

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССАХ У РАСТЕНИЙ (ОБЗОР) Мосолов В.В., Валуева Т.А.	501-507	2
<input type="checkbox"/>	АЭРОБНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ЭТИЛЕНДИАМИНТЕТРААЦЕТАТА (ОБЗОР) Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А.	508-522	1
<input type="checkbox"/>	ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ РЕНАТУРАЦИЯ ИММОБИЛИЗОВАННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО С-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА ЧЕЛОВЕКА Шарапова О.А., Юркова М.С., Андропова С.М., Фёдоров А.Н., Северин С.Е., Северин Е.С.	523-529	2
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ НА АКТИВНОСТЬ α - И β-АМИЛАЗ И СОДЕРЖАНИЕ СУММАРНОГО БЕЛКА В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ Давидянц Э.С.	530-536	1
<input type="checkbox"/>	CHANGES IN GENE TRANSCRIPTION AND PROTEIN EXPRESSION INVOLVED IN THE RESPONSE OF AGROBACTERIUM SP. ATCC 31749 TO NITROGEN AVAILABILITY DURING CURDLAN PRODUCTION Yu L.J., Wu J.R., Zheng Z.Z., Lin C.C., Zhan X.B.	537-543	0
<input type="checkbox"/>	СИНТЕЗ СОПОЛИМЕРОВ 3-ГИДРОКСИБУТИРАТА-СО-4-ГИДРОКСИБУТИРАТА ВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ Волова Т.Г., Жила Н.О., Калачёва Г.С., Соколенко В.А., Сински Э.Д.	544-550	2
<input type="checkbox"/>	МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО МЕЛАНИНА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ Агаджанян А.Е., Асатурян Р.А., Амбарцумян А.А., Саргисян Л.Б., Овсепян А.С., Варданян А.А., Сагиян А.С.	551-557	1
<input type="checkbox"/>	МЕТАНОГЕННАЯ ДЕСТРУКЦИЯ (АМИНО) АРОМАТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ АНАЭРОБНЫМИ МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ Линькова Ю.В., Дьяконова А.Т., Гладченко М.А., Калужный С.В., Котова И.Б., Стамс А., Нетрусов А.И.	558-565	0
<input type="checkbox"/>	СЕЛЕКТИВНОЕ ИЗВЛЕЧЕНИЕ МЕТАЛЛОВ ИЗ ЦИНКОВОГО КОНЦЕНТРАТА АССОЦИАЦИЕЙ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ Варданян Н.С., Варданян А.К.	566-571	0
<input type="checkbox"/>	ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ МЕДНОЙ РУДЫ УДОКАНСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ АССОЦИАЦИЕЙ АЦИДОФИЛЬНЫХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ Кондратьева Т.Ф., Пивоварова Т.А., Крылова Л.Н., Меламуд В.С., Адамов Э.В., Каравайко Г.И.	572-578	1
<input type="checkbox"/>	INCREASE OF ETHANOL PRODUCTIVITY BY CELL-RECYCLE FERMENTATION OF FLOCCULATING YEAST Wang F.Z., Xie T., Hul M.	579-583	0
<input type="checkbox"/>	PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF LIGNIN PEROXIDASE FROM PYCNOPORUS SANGUINEUS MTCC-137 Sharma J.K., Yadav M., Singh N.P., Yadav K.D.S.	584-589	0
<input type="checkbox"/>	GC-MS AND SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS OF BIODEGRADATION OF NEW DISAZO DYE BY TRAMETES VERSICOLOR Ardag Akdogan H., Demircali A., Aydemir C., Pazarlioglu N., Karci F.	590-594	0
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЛАККАЗЫ ГРИБОМ БЕЛОЙ ГНИЛИ PLEUROTUS OSTREATUS D1 Позднякова Н.Н., Никифорова С.В., Макаров О.Е., Турковская О.В.	595-601	0
<input type="checkbox"/>	САЛИЦИЛОВАЯ И ЖАСМОНОВАЯ КИСЛОТЫ В РЕГУЛЯЦИИ ПРО-АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ SEPTORIA NODORUM BERK Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Черепанова Е.А., Заикина Е.А., Максимов И.В.	602-608	5
<input type="checkbox"/>	APPLICATION OF STANDARD ADDITION FOR THE DETERMINATION OF CARBOXYPEPTIDASE ACTIVITY IN ACTINOMUCOR ELEGANS BRAN KOJI Fu J., Li L., Yang X.Q., Zhu M.J.	609-614	0
<input type="checkbox"/>	ПОЗДРАВЛЯЕМ ЛЕНУ ИВАНОВНУ ВОРОБЬЁВУ С ЮБИЛЕЕМ	615-616	0

УДК 577.152.3

ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПРИ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССАХ У РАСТЕНИЙ (ОБЗОР)

© 2011 г. В. В. Мосолов, Т. А. Валуева

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

e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 14.03.2011 г.

Рассмотрены данные о значении ингибиторов протеолитических ферментов в адаптации растений к различным неблагоприятным внешним факторам абиотического характера – недостатку воды, засолению почвы, экстремальным температурам и др., а также вероятные формы участия ингибиторов протеиназ в процессе естественного старения у растений.

Ингибиторы протеолитических ферментов образуют большую и сложную по составу группу белков, которые объединяет общая способность образовывать с ферментами обратимые субстратоподобные комплексы, в составе которых последние утрачивают каталитическую активность [1, 2]. Ингибиторы широко распространены у растений, содержатся как в вегетативных, так и в репродуктивных органах [3, 4].

В зависимости от типа ферментов, на которые они действуют, различаются ингибиторы сериновых, цистеиновых, аспартатных и металлсодержащих протеиназ. У растений в настоящее время в наибольшей степени изучены ингибиторы сериновых и цистеиновых протеиназ [5]. На основании особенностей первичной структуры, числа и расположения дисульфидных связей и реактивных центров ингибиторы разделяют на отдельные семейства родственных белков [1]. Среди ингибиторов сериновых протеиназ у растений в настоящее время можно выделить, по крайней мере, девять таких семейств [5, 6]. В отличие от ингибиторов сериновых протеиназ ингибиторы цистеиновых протеиназ из растений в подавляющем большинстве принадлежат к суперсемейству цистатинов и образуют в его составе отдельное семейство фитоцистатинов [7, 8].

Что касается физиологических функций ингибиторов протеиназ у растений, то они могут действовать как регуляторы активности собственных протеиназ, а также играть роль запасных белков [3, 4, 9]. Способность ингибиторов из растений подавлять активность протеиназ пищеварительного тракта насекомых и ферментов фитопатогенных микроорганизмов привела к заключению, что они могут действовать как защитные белки [9–13]. Это заключение получило подтверждение в опытах с трансгенными растениями, содержащими гены ингибиторов протеиназ, которые обладают повышенной устойчивостью по отношению к насекомым и другим вредителям [14–16].

Наряду с вредителями и фитопатогенными микроорганизмами растения постоянно сталкиваются с неблагоприятными внешними воздействиями абиотического характера – недостатком воды, засолением почвы, пониженной и повышенной температурой, присутствием тяжелых металлов и т.д. Все эти факторы отрицательно влияют на рост, развитие и продуктивность растений и являются одной из главных причин снижения урожайности важнейших сельскохозяйственных культур [17].

Адаптация растений к различным неблагоприятным внешним воздействиям связана с изменением в регуляции большого числа так называемых стресс-зависимых генов [18–20]. При этом происходит увеличение активности одних генов и подавление активности других. К числу генов, активность которых возрастает, принадлежат гены ферментов, гидролизующих белки и другие макромолекулы [21, 22]. В условиях стресса протеолитические ферменты не только осуществляют расщепление дефактных, денатурированных и утративших свое функциональное значение белков, но и участвуют в реутилизации азота, процессинге и активации вновь синтезированных белков [23, 24].

В наибольшей степени изучены изменения протеолитической активности у растений при одном из самых распространенных и важных в практическом отношении водном стрессе. В листьях фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.) внутриклеточная протеолитическая активность при водном стрессе увеличивается в несколько раз [25–28]. Одновременно происходит снижение содержания белка во всех клеточных фракциях, включая мембранную фракцию и хлоропласты [25, 26]. При регидратации протеолитическая активность снижается и восстанавливается содержание белка в клетке [26, 28]. Это указывает на наличие тесной связи между двумя явлениями. Усиление экспрессии протеолитических ферментов наблюдалось и при других видах стресса – повышенной концен-

трации солей, экстремальных температурах, в присутствии тяжелых металлов и др. [29–34].

Оптимальные значения рН для ферментов, активность которых повышается в условиях стресса, лежат в слабокислой среде (рН 4–6), что согласуется с их вероятным вакуолярным происхождением [26–28, 35]. Преобладающим типом стресс-зависимых эндопептидаз являются цистеиновые протеиназы [26, 28–30, 32, 36, 37]. Однако в ряде случаев наблюдалось усиление экспрессии и протеиназ других каталитических типов – сериновых и аспаратных [27, 31, 38, 39]. Наряду с эндопептидазами было также отмечено увеличение активности экзопептидаз, аминопептидаз и карбоксипептидаз [28, 38, 40, 41].

Заслуживает внимания то обстоятельство, что увеличение протеолитической активности и снижение содержания белка в клетке в условиях стресса намного сильнее выражены у чувствительных видов и сортов растений по сравнению с устойчивыми [22, 25, 27, 38]. Это, по-видимому, может быть связано с тем, что белковый аппарат у чувствительных растений нуждается в более глубокой перестройке в условиях стресса.

Увеличение протеолитической активности в условиях стресса особенно у чувствительных видов и сортов растений может приводить к нарушению баланса между процессами синтеза и распада белков и вызвать преждевременное старение и гибель растений. Чтобы предотвратить такую возможность необходимо наличие надежных механизмов контроля протеолитической активности не только на уровне транскрипции и трансляции, но и на посттрансляционном уровне. К числу таких механизмов относятся синтез протеолитических ферментов в латентной, зимогенной форме и наличие эндогенных ингибиторов ферментов [42, 43]. У растений в условиях стресса, по-видимому, могут реализовываться оба эти механизма. Так, цистеиновая протеиназа BD21 экспрессируется в листьях *Arabidopsis thaliana* при водном стрессе в виде высокомолекулярного предшественника с молекулярной массой 57 кДа и лишь затем превращается в активную форму 33 кДа в кислой среде центральной вакуоли [29, 44]. Аспаратная протеиназа типа фитепсина синтезируется в листьях фасоли в форме зимогена с молекулярной массой 46 кДа. Фермент сохраняется в латентной форме в обычных условиях и превращается в активную форму 38 кДа при водном стрессе, когда происходит резкое увеличение протеолитической активности в листьях [45]. При различных абиотических стрессах наблюдается также увеличение активности ингибиторов протеиназ у растений [34]. При этом в ряде случаев происходит одновременное увеличение активности протеиназ и их ингибиторов [46, 47].

В листьях рапса (*Brassica napus* L.) были обнаружены два близких по свойствам пептида с молеку-

лярной массой 22 кДа. Пептиды накапливаются в значительных количествах при водном и солевом стрессах и исчезают при регидратации [48]. Эти полипептиды, обозначенные как BnD22, имеют аминокислотную последовательность, гомологичную аминокислотной последовательности ингибиторов сериновых протеиназ из семейства соевого ингибитора трипсина Кунитца (SKTI). Соответствующая мРНК накапливается при водном и солевом стрессах в листьях растения, но отсутствует в семенах [49]. Позднее было установлено существование обратной корреляции между содержанием белка BnD22 в листьях рапса и протеолитической активностью при прогрессирующем водном стрессе [50]. Зрелая форма ингибитора с молекулярной массой 19 кДа, образующаяся в результате отщепления от BnD22 С-концевого пептида, способна подавлять активность эндогенных протеиназ из листьев рапса и модельных сериновых протеиназ [50]. Усиление экспрессии при различных стрессовых воздействиях было установлено и для ингибиторов цистеиновых протеиназ. Так, увеличение содержания транскриптов цистатина наблюдалось в листьях и корнях каштана (*Castanea sativa* Mill.) при температурном и солевом шоке, а в листьях ячменя (*Hordeum vulgare* L.) – при пониженной температуре, в темноте и анаэробии [51, 52]. В дальнейшем усиление экспрессии генов ингибиторов сериновых и цистеиновых протеиназ при различных видах стресса было установлено для большого числа растений, представителей различных семейств как двудольных, так и однодольных (табл. 1 и 2).

Активная роль ингибиторов протеиназ в адаптации растений к неблагоприятным внешним условиям подтверждается результатами опытов, проведенных с трансгенными растениями [66, 67, 71, 74]. Гиперэкспрессия ингибитора химотрипсина, принадлежащего к семейству ингибитора I из картофеля, у трансгенного риса (*Oryza sativa* L.) повышала устойчивость растений при водном дефиците. При этом наблюдалось снижение активности собственной химотрипсиноподобной протеиназы в листьях и замедление распада клеточных белков [67]. Из солеустойчивого соматического гибрида пшеницы и житняка (*Thinopyrum ponticum*, Подр.) выделен ген *WRS15*, который кодирует белок-ингибитор трипсина, относящийся к семейству ингибитора Баумана–Бирк [66]. Гиперэкспрессия гена *WRS15* у *Arabidopsis thaliana* повышала устойчивость растений к избытку соли [66]. Аналогичные результаты были получены для ингибиторов цистеиновых протеиназ. Повышенная экспрессия цистатинов AtCYSa и AtCYSb у *A. thaliana* придавала устойчивость растениям при водном, солевом, окислительном и температурном стрессах [71].

Различные абиотические стрессы могут индуцировать процесс преждевременного старения растительных тканей [78, 79]. В свою очередь, задержка процесса старения приводила в некото-

Таблица 1. Индукция ингибиторов сериновых протеиназ

Растение (семейство, вид)	Стресс*				Ингибитор**	Ссылка
	В	С	Т	Д		
Бобовые (Leguminosae)						
горох (<i>Pisum sativum</i> L.)	+				ВВ1	[53]
люпин (<i>Lupinus albus</i> L.)	+				SKTI	[46]
Капустные (Brassicaceae)						
рапс (<i>Brassica napus</i> L.)	+	+			SKTI	[48]
редис (<i>Raphanus sativus</i> L.)		+			“_”	[54]
капуста (<i>Brassica oleracea</i> L.)	+	+	+		“_”	[55, 56]
арабидопсис (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	+				“_”	[57]
Пасленовые (Solanaceae)						
томаты (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)				+	pot 1, 2	[58]
“_”		+			pot 2	[59]
картофель (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	+				SKTI	[60, 61]
табак (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	+			+	pot 2	[62, 63]
Злаки (Graminea)						
пшеница (<i>Triticum aestivum</i> L.)	+	+		+	ВВ1	[64–66]
рис (<i>Oryza sativa</i> L.)	+	+			pot 1	[67]
Вьюнковые (Convolvulaceae)						
батат (<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam)	+		+		pot 1	[68]
Амарантовые (Amaranthaceae)						
амарант (<i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.)	+	+			pot 1	[69]

* Виды стресса: В – водный, С – солевой, Т – температурный, Д – другие.

** Ингибиторы: SKTI – соевый ингибитор трипсина Кунитца, ВВ1 – соевый ингибитор Баумана–Бирк, pot 1 – ингибитор I из картофеля, pot 2 – ингибитор II из картофеля.

“+” – условия, при которых наблюдалась экспрессия данного ингибитора.

рых случаях к повышенной устойчивости растений к абиотическим стрессам [80]. Старение у растений служит завершающей стадией онтогенеза и является активным контролируемым процессом, связанным с изменением экспрессии значительного числа генов [78, 79]. Для процесса старения характерно интенсивное расщепление белков и других макромолекул в стареющих и отмирающих тканях и перенос продуктов деградации в молодые растущие части растения и в репродуктивные органы [78, 79, 81].

Интенсивный распад клеточных белков в стареющих тканях связан с усиленной экспрессией протеолитических ферментов различных каталитических типов, в первую очередь цистеиновых, а также аспаргатных и сериновых [82–85]. В некоторых случаях это те же ферменты, индукция которых наблюдается при стрессах [29, 86]. Другие протеиназы экспрессируются исключительно в стареющих органах и тканях. К их числу относятся цистеиновая протеиназа SAG12 из *A. thaliana* и ее гомологи из некоторых других растений, а также субтилизиноподобная протеиназа P1 из листьев пшеницы [85, 87]. Подав-

ление протеолитической активности с помощью химических ингибиторов цистеиновых и сериновых протеиназ приводит к замедлению процесса старения [88, 89]. Аналогичное действие могут оказывать и природные ингибиторы протеолитических ферментов. При стрессе, вызванном недостатком азота, в листьях рапса различного возраста наблюдалась обратная зависимость между содержанием ингибитора трипсина VnD22 и скоростью старения [90, 91]. Если в молодых листьях при водном и солевом стрессах содержание VnD22 достигает 1% от общего содержания белков, то в старых, желтеющих и отмирающих листьях ингибитор полностью отсутствует [48, 49]. Сходная ситуация имеет место и с ингибиторами цистеиновых протеиназ. Известно, что увядание цветов гвоздики (*Dianthus caryophyllus* L.) связано с усиленной экспрессией гена цистеиновой протеиназы [93]. Имеющийся у гвоздики ген цистатина активно экспрессируется в лепестках на момент цветения. При старении в цветах обнаруживаются в большом количестве транскрипты цистеиновой протеиназы, тогда как транскрипты цистатина отсутствуют [94].

Таблица 2. Индукция ингибиторов цистеиновых протеиназ (фитоцистатинов)

Растение (семейство, вид)	Стресс*				Ссылка
	В	С	Т	Д	
Бобовые (Leguminosae)					
вигна (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.)	+				[70]
Капустные (Brassicaceae)					
арабидопсис (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	+	+	+	+	[71]
какиле (<i>Cakile moritima</i> Scop.)	+	+			[72]
Злаки (Gramineae)					
ячмень (<i>Hordeum vulgare</i> L.)			+	+	[52]
кукуруза (<i>Zea mays</i> L.)			+		[73]
пшеница (<i>Triticum aestivum</i> L.)	+	+	+		[74]
Буковые (Fagaceae)					
каштан (<i>Castanea sativa</i> Mill.)		+	+		[51]
Амарантовые (Amaranthaceae)					
амарант (<i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.)	+	+	+		[75]
Лавровые (Lauraceae)					
авокадо (<i>Persea americana</i> Mill.)			+		[76]
Аралиевые (Araliaceae)					
женьшень (<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer)		+	+	+	[77]

* Обозначения см. табл. 1.

Снижение эффективности фотосинтеза является характерным признаком для стареющих тканей растений, а также для растений в условиях стресса [21, 22, 95]. Снижение эффективности фотосинтеза сопровождается деградацией белков стромы хлоропластов, включая главный белок, рибулезо-1,5-бифосфат карбоксилазу/оксигеназу (**Rubisco**, КФ 4.1.1.39), а также деструкцией хлорофилла [96]. Ведущая роль в расщеплении Rubisco и других белков стромы хлоропластов принадлежит цистеиновым протеиназам вакуолярного происхождения [97, 98]. Экспрессия ингибитора цистеиновых протеиназ из риса, оризацистатин I, у трансгенного табака приводила к замедлению скорости снижения эффективности фотосинтеза и активности Rubisco как при стрессе, так и в процессе старения [98].

В действительности, функции ингибиторов протеиназ могут не ограничиваться защитой белков хлоропластов от протеолитической деградации. Из листьев капусты (*Brassica oleracea* L.) был выделен белок, связывающий хлорофилл (WSCP, water-soluble chlorophyll protein). Белок имеет высокую степень гомологии с BnD22 и ингибиторами сериновых протеиназ из семейства SKTI [55, 99]. Аналогичные хлорофиллсвязывающие белки обнаружены и у многих растений семейства капустных (Brassicaceae), а также у некоторых растений из других семейств. Их синтез индуцируется при водном и тепловом стрессах [99]. Поскольку белки WSCP класса II способны извле-

кать хлорофилл из мембран тилакоидов, было высказано предположение о том, что они могут действовать как его переносчики [100]. Рассматривалась также возможность участия WSCP в синтезе и деградации хлорофилла [101]. Наконец, недавно было установлено, что белки WSCP могут образовывать тетрамерные комплексы, содержащие молекулы хлорофилла. В составе таких комплексов хлорофилл приобретает устойчивость к фотодеградации в присутствии реактивных форм кислорода [102]. На основании имеющихся данных было высказано предположение о том, что ингибиторы протеиназ типа BnD22 или WSCP играют у растений при стрессах и старении двоякую роль. С одной стороны, они защищают белки от преждевременной деградации, а с другой – препятствуют разрушению хлорофилла [91, 92].

Имеются и другие данные, свидетельствующие в пользу того, что функции ингибиторов протеолитических ферментов у растений при стрессах не ограничиваются только способностью подавлять активность протеиназ. Так, было показано, что экстракт из семян бобового растения *Adenanthera pavonina* (L.) оказывает стабилизирующее действие на белки, предохраняя их от денатурации. При этом было установлено, что активным началом в экстрактах служат ингибиторы протеиназ, относящиеся к семейству SKTI [103].

Различные абиотические стрессы у растений сопровождаются увеличением содержания реактивных форм кислорода, в том числе H_2O_2 . Это может приводить к повреждению белков, липидов и других соединений и, в конечном счете, быть причиной окислительного стресса [104]. Важную роль в нейтрализации H_2O_2 играют ферменты аскорбат-глутатионового цикла, в том числе монодегидроаскорбат редуктаза (КФ 1.6.5.4) и дегидроаскорбат редуктаза (КФ 1.8.5.1) [17].

Дегидроаскорбат редуктаза, выделенная из хлоропластов шпината (*Spinacia oleracea* L.), и SKPI имеют гомологичные N-концевые аминокислотные последовательности. Более того, в окисленной (дисульфидной) форме белок обладает активностью ингибитора трипсина [105]. Высказывается предположение, что в восстановительной среде внутри хлоропластов белок присутствует в тиоловой форме и действует как дегидроаскорбат редуктаза, тогда как в других частях клетки он находится в окисленной форме и обладает активностью ингибитора трипсина [105]. Такие свойства дегидроаскорбат редуктазы из хлоропластов шпината не являются уникальными. Известны еще два белка, обладающие активностью дегидроаскорбат редуктазы и монодегидроаскорбат редуктазы и одновременно действующие, как ингибиторы протеиназ. Это спорамин из корней батата (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) и диоскорин, запасной белок из клубней ямса (*Dioscorea batatas* Decne) [106, 107]. Из митохондрий этиолированных проростков маша (*Vigna radiata* L. (Wilczek)) был выделен белковый комплекс с активностью ингибитора трипсина и дегидроаскорбат редуктазы. Имеющиеся данные привели к заключению, что обе эти активности принадлежат одному и тому же белку [108].

Приведенные выше данные позволяют сделать заключение, что ингибиторы протеолитических ферментов играют активную роль в защите растений от неблагоприятных воздействий внешней среды. Об этом свидетельствует усиленная экспрессия ингибиторов сериновых и цистеиновых протеиназ при различных стрессах абиотического характера — недостатке воды, избытке соли, экстремальных температурах и др. (табл. 1 и 2). Такое заключение подтверждается и результатами опытов с трансгенными растениями, содержащими гены ингибиторов протеиназ [66, 67, 71, 74]. Абиотические стрессы, в свою очередь, могут индуцировать процесс старения растительных тканей [78, 79]. Характерной чертой процесса старения является ускоренная деградация белков и других высокомолекулярных соединений в стареющих и отмирающих частях растений и перенос продуктов распада в молодые растущие ткани и репродуктивные органы [78, 79, 81]. Действуя на активность протеолитических ферментов, ингибиторы могут контролировать общую скорость процесса старения, обеспечивая тем са-

мым успешное завершение жизненного цикла у многокарпических растений и создавая условия для дальнейшего роста и развития многолетних растений при ликвидации неблагоприятных внешних условий [91, 92, 109].

В соответствии с имеющимися данными в деградации клеточных белков в условиях стресса и при старении основная роль принадлежит цистеиновым протеиназам вакуолярного происхождения [28–30, 87, 96–98, 110]. Однако при неблагоприятных внешних условиях наблюдается усиленная экспрессия ингибиторов как цистеиновых, так и сериновых протеиназ (табл. 1). Это может быть связано с той активной ролью, которую сериновые протеиназы играют у растений не только в общем обмене белков, но и в регуляции целого ряда важных физиологических процессов, связанных с морфогенезом и развитием [24, 111, 112]. Следует также иметь в виду, что функции белков, ингибиторов протеолитических ферментов, у растений могут быть шире и не ограничиваться их участием в регуляции протеолитических процессов [103, 105–108].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Laskowski M., Jr., Kato I.* // Annu. Rev. Biochem. 1980. V. 49. P. 593–626.
2. *Bode W., Huber R.* // Eur. J. Biochem. 1992. V. 204. № 2. P. 433–451.
3. *Ryan C.A.* // Annu. Rev. Plant Physiol. 1973. V. 24. P. 173–196.
4. *Richardson M.* // Phytochemistry. 1997. V. 16. № 1. P. 159–169.
5. *Мосолов В.В., Валуева Т.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 3. С. 261–282.
6. *Rawlings N.D.* // Biochimie. 2010. V. 92. № 11. P. 1463–1483.
7. *Turk V., Bode W.* // FEBS Lett. 1991. V. 185. № 2. P. 213–219.
8. *Margis R., Reis E.M., Villeret V.* // Arch. Biochem. Biophys. 1998. V. 359. № 1. P. 24–30.
9. *Мосолов В.В., Григорьева Л.И., Валуева Т.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 2. С. 131–140.
10. *Ryan C.A.* // Annu. Rev. Phytopathol. 1990. V. 28. P. 425–449.
11. *Shewry P.R., Lucas J.A.* // Adv. Bot. Res. 1997. V. 26. P. 135–192.
12. *Валуева Т.А., Мосолов В.В.* // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1600–1606.
13. *Haq S.K., Atif S.M., Khan R.H.* // Arch. Biochem. Biophys. 2004. V. 431. № 1. P. 145–159.
14. *Schuler T.H., Poppy G.M., Kerry B.R., Donholm I.* // Trends Biotechnol. 1998. V. 16. № 4. P. 168–175.
15. *Мосолов В.В., Валуева Т.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 3. С. 261–269.
16. *Schluter U., Benchabane M., Munger A., Kiggundu A., Vorster J., Goulet M.C., Cloutier C., Michaud D.* // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. № 15. P. 4169–4183.
17. *Bray E.A., Bailey-Serres J.E., Weretilnyk E.* // Biochemistry and Molecular Biology of Plants / Eds

- W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, 2000. P. 1158–1203.
18. Wang W., Vinocur B., Altman A. // *Planta*. 2003. V. 218. № 1. P. 1–14.
 19. Seki M., Narusaka M., Abe H., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Hayashizaki Y., Shinozaki K. // *Plant Cell*. 2001. V. 13. № 1. P. 61–72.
 20. Gong P., Zhang J., Li H., Zhang C., Zhang X., Khurr Z., Zhang Y., Wang T., Fei Z., Ye Z. // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. № 13. P. 3563–3575.
 21. Munne-Bosch S., Alegre L. // *Funct. Plant Biol.* 2004. V. 31. № 3. P. 203–216.
 22. Degencolbe T., Do P.T., Zuther E., Repsilber D., Walther D., Hincha D.K., Kohl K.I. // *Plant Mol. Biol.* 2009. V. 69. № 1–2. P. 133–153.
 23. Callis J. // *Plant Cell*. 1995. V. 7. № 7. P. 845–857.
 24. Schaller A. // *Planta*. 2004. V. 220. № 2. P. 183–197.
 25. Roy-Macaulay H., Zuily-Fodil Y., Kidric M., Pham-Thi A.T., Vieira de Silva J. // *Physiol. Plant.* 1992. V. 85. № 1. P. 90–96.
 26. Zagdanska B., Wisniewski K. // *Acta Biochim. Pol.* 1996. V. 43. № 3. P. 515–519.
 27. Cruz de Carvalho M.H., d'Arcy-Lameta A., Roy-Macaulay H., Gareil M., El Maarof H., Pham-Thi A.T., Zuily-Fodil Y. // *FEBS Lett.* 2001. V. 492. № 3. P. 242–246.
 28. Simova-Stoilova L., Vaseva I., Grigorova B., Demirevska K. // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. V. 48. № 2–3. P. 200–206.
 29. Koizumi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Tsuji H., Shinozaki K. // *Gene*. 1993. V. 129. № 2. P. 175–182.
 30. Jones J.T., Mullet J.E. // *Plant Mol. Biol.* 1995. V. 28. № 6. P. 1055–1065.
 31. Golldack D., Vera P., Dietz K.J. // *Physiol. Plant.* 2003. V. 116. № 1. P. 64–73.
 32. Schaffer M.A., Fischer R.L. // *Plant Physiol.* 1988. V. 87. № 2. P. 431–436.
 33. Schaffer M.A., Fischer R.L. // *Plant Physiol.* 1990. V. 93. № 4. P. 1486–1491.
 34. Домаш В.И., Шарпио Т.П., Забрейко С.В., Сосновская Т.Ф. // *Биоорган. химия*. 2008. Т. 34. № 3. С. 353–357.
 35. Khanna-Chopra R., Srivalli B., Ahlawat Y.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. V. 255. № 2. P. 324–327.
 36. Stroehler V.L., Maclagan J.L., Good A.G. // *Physiol. Plant.* 1997. V. 101. № 2. P. 389–397.
 37. Harrak H., Azelmat S., Baker E.N., Tabaeizadeh Z. // *Genome*. 2001. V. 44. № 3. P. 368–374.
 38. Hieng B., Ugrinovic K., Sustar-Vozlic J., Kidric M. // *J. Plant Physiol.* 2004. V. 161. № 5. P. 519–530.
 39. Timotijevic G.S., Milisavljevic M.D., Radovic S.R., Konstantinovic M.M., Maksimovic V.R. // *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167. № 1. P. 61–68.
 40. Chao W.S., Gu Y.Q., Pautot V.V., Bray E.A., Walling L.L. // *Plant Physiol.* 1999. V. 120. № 4. P. 979–992.
 41. Miazek A., Zagdanska B. // *Biologia Plant.* 2008. V. 52. № 4. P. 687–694.
 42. Мосолов В.В. // *Биоорган. химия*. 1998. Т. 24. № 5. С. 332–340.
 43. Wiederanders B., Kaulmann G., Schilling K. // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2003. V. 4. № 5. P. 309–326.
 44. Yamada K., Matsushima R., Nishimura M., Hara-Nishimura I. // *Plant Physiol.* 2001. V. 127. № 4. P. 1626–1634.
 45. Contour-Ansel D., Torres-Franklin M.L., Zouly-Fodil Y., Cruz de Carvalho M.H. // *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167. № 18. P. 1606–1612.
 46. Pinheiro C., Kehr J., Ricardo C.P. // *Planta*. 2005. V. 221. № 5. P. 716–728.
 47. Домаш В.И., Процко П.Ф., Васюк В.А., Шумихин С.В., Ермолицкая Л.В., Шапио Т.П. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2006. Т. 42. № 1. С. 106–110.
 48. Reviron M.-P., Vartanian N., Sallantin M., Huet J.-C., Pernollet J.-C., de Vienne D. // *Plant Physiol.* 1992. V. 111. № 3. P. 1486–1493.
 49. Downing W.L., Mauxion F., Fauvarque M.-O., Reviron M.P., de Vienne D., Vartanian N., Giraudat J. // *Plant J.* 1992. V. 2. № 5. P. 685–693.
 50. Ilami G., Nespoulous C., Huet J.-C., Vartanian N., Pernollet J.-C. // *Phytochem.* 1997. V. 45. № 1. P. 1–8.
 51. Pernas M., Sanchez-Monge R., Salcedo G. // *FEBS Lett.* 2000. V. 467. № 2–3. P. 206–210.
 52. Gaddour K., Vicente-Carbajosa J., Lara P., Isabel-Lamonedá I., Diaz I., Carbonero P. // *Plant Mol. Biol.* 2001. V. 45. № 5. P. 599–608.
 53. Welham T., Domoney C. // *Plant Sci.* 2000. V. 159. № 2. P. 289–299.
 54. Lopez F., Vansuyt G., Derancourt J., Fourcroy P., Casse-Delbart F. // *Cell. Mol. Biol.* 1994. V. 40. № 1. P. 85–90.
 55. Nishio N., Satoh H. // *Plant. Physiol.* 1997. V. 115. № 2. P. 841–846.
 56. Annamalai P., Yanagihara S. // *J. Plant Physiol.* 1999. V. 155. № 2. P. 226–233.
 57. Gosti F., Bertauche N., Vartanian N., Giraudat J. // *Mol. Gen. Genet.* 1995. V. 246. № 1. P. 10–18.
 58. Conconi A., Smerdon M.J., Howe G.A., Ryan C.A. // *Nature*. 1996. V. 383. P. 826–829.
 59. Dombrowski J.E. // *Plant Physiol.* 2003. V. 132. № 4. P. 2098–2107.
 60. Kang S.G., Choi J.H., Suh S.G. // *Mol. Cells.* 2002. V. 13. № 1. P. 144–147.
 61. Ledoigt G., Griffaut B., Debiton E., Vian C., Mustel A., Evray G., Maurizis J.C., Madelmont J.C. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2006. V. 38. № 3–5. P. 268–271.
 62. Balandin T., van der Does C., Albert J.M., Bol J.F., Linthorst H.J. // *Plant Mol. Biol.* 1995. V. 27. № 6. P. 1197–1204.
 63. Srinivasan T., Kumar K.R., Kirti P.B. // *Plant Cell Physiol.* 2009. V. 50. № 3. P. 541–553.
 64. Richards K.D., Snowden K.C., Gardner R.C. // *Plant Physiol.* 1994. V. 105. № 4. P. 1455–1456.
 65. Snowden K.C., Richards K.D., Gardner R.C. // *Plant Physiol.* 1995. V. 107. № 2. P. 341–348.
 66. Shan L., Li C., Chen F., Zhao S., Xia G. // *Plant Cell Environ.* 2008. V. 31. № 8. P. 1128–1137.
 67. Huang Y., Xiao B., Xiong L. // *Planta*. 2007. V. 226. № 1. P. 73–85.
 68. Wang H.Y., Huang Y.C., Chen S.F., Yeh K.W. // *Plant Sci.* 2003. V. 165. № 1. P. 191–203.
 69. Sanchez-Hernandez C., Martinez-Gallardo N., Guerrero-Rangel A., Valdes-Rodriguez S., Delano-Frier J. // *Physiol. Plant.* 2004. V. 122. № 2. P. 254–264.
 70. Diop N.N., Kidric M., Repellin A., Goreil M., d'Arcy-Lameta A., Pham-Thi A.T., Zuily-Fodil Y. // *FEBS Lett.* 2004. V. 577. № 3. P. 546–550.
 71. Zhang X., Liu S., Takano T. // *Plant Mol. Biol.* 2008. V. 68. № 1–2. P. 131–143.

72. Megdiche W., Passaquet C., Zourring W., Zuily-Fodil Y., Abdelly C. // *J. Plant Physiol.* 2008. V. 166. № 7. P. 739–749.
73. Massonneau A., Condamine P., Wisniewski J.P., Zivy M., Rogowsky P.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. V. 1729. № 3. P. 186–199.
74. Christova P.K., Christov N.K., Imai R. // *Planta.* 2006. V. 223. № 6. P. 1207–1218.
75. Valdes-Rodriguez S., Guerrero-Rangel A., Meldoza-Villegomez C., Chagolla-Lopez A., Delgado-Vargas F., Martinez-Gallardo N., Sanchez-Hernandez C., Delano-Frier J. // *Plant Physiol. Biochem.* 2007. V. 45. № 10–11. P. 790–798.
76. Dopico B., Lowe A.L., Wilson I.D., Merodio C., Grierson D. // *Plant Mol. Biol.* 1993. V. 21. № 3. P. 437–449.
77. Jung D.Y., Lee O.R., Kim Y.J., Lee J.H., Pulla R.K., Sathiyaraj G., Shim J.S., Yang D.C. // *Acta Physiol. Plant.* 2010. V. 32. № 5. P. 961–970.
78. Gan S., Amasino R.M. // *Plant Physiol.* 1997. V. 113. № 2. P. 313–319.
79. Masclaux-Daubresse C., Reisdorf-Cren M., Orsel M. // *Plant Biol.* 2008. V. 10. Suppl. 1. P. 23–36.
80. Rivero R.M., Kojima M., Gepstein A., Sakakibara H., Mittler S., Blumwald E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 49. P. 19631–19636.
81. Huffaker R.C. // *New Phytol.* 1990. V. 116. № 2. P. 199–231.
82. Buchanan-Wollaston V. // *J. Exp. Bot.* 1997. V. 48. № 2. P. 181–199.
83. Guo Y., Cai Z., Gan S. // *Plant Cell Environ.* 2004. V. 27. № 5. P. 521–549.
84. Otegui M.S., Noh Y.S., Martinez D.E., Vila Petroff M.G., Staehelin L.A., Amasino R.M., Guaiamet J.J. // *Plant J.* 2005. V. 41. № 6. P. 831–844.
85. Roberts I.N., Passeron S., Barneix A.J. // *Planta.* 2006. V. 224. № 6. P. 1437–1447.
86. Esteban-Garcia B., Garrido-Cardenas J.A., Alonso D.L., Garcia-Maroto F. // *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167. № 13. P. 1101–1108.
87. Noh Y.S., Amasino R.M. // *Plant Mol. Biol.* 1999. V. 41. № 2. P. 195–206.
88. Coupe S.A., Sinclair B.K., Watson L.M., Heyes J.A., Eason J.R. // *J. Exp. Bot.* 2003. V. 54. № 5. P. 1045–1056.
89. Pak C., van Doorn W.G. // *New Phytol.* 2005. V. 165. № 2. P. 473–480.
90. Eason J.R., Ryan D.J., Watson L.M., Hedderley D., Christey M.C., Braun R.H., Coupe S.A. // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 57. № 5. P. 645–657.
91. Etienne P., Desclos M., Le Gou L., Combert J., Bonnefoy J., Maurel K., Le Dily F., Ourry A., Avice J.C. // *Funct. Plant Biol.* 2007. V. 34. № 10. P. 895–906.
92. Desclos M., Dubouset L., Etienne P., Le Caherec F., Satoh H., Bonnefoy L., Ourry A., Avice J.C. // *Plant Physiol.* 2008. V. 147. № 4. P. 1830–1844.
93. Jones M.L., Larsen P.B., Woodson W.R. // *Plant Mol. Biol.* 1995. V. 28. № 3. P. 505–512.
94. Sugawara H., Shibuya K., Yoshioka T., Hashiba T., Satoh S. // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. № 3. P. 497–413.
95. Krupinska K., Humbeck K. // *Plant Cell Dead Processes.* San Diego CA: Acad. Press, 2004. P. 169–187.
96. Hortensteiner S., Feller U. // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. № 7. P. 927–937.
97. Martinez D.E., Costa M.L., Gomez P.M., Otegui M.S., Guaiamet J.J. // *Plant J.* 2008. V. 56. № 2. P. 196–206.
98. Prins A., van Heerden P.O., Olmos E., Kunert K.J., Foyer C.H. // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. № 7. P. 1935–1950.
99. Satoh H., Uchida A., Nakayama K., Okada M. // *Plant Cell Physiol.* 2001. V. 42. № 9. P. 906–911.
100. Satoh H., Nakayama K., Okada M. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 46. P. 30568–30575.
101. Reinbothe C., Satoh H., Alcaraz J.P., Reinbothe S. // *Plant Physiol.* 2004. V. 134. № 4. P. 1355–1365.
102. Horigome D., Satoh H., Itoh N., Mitsunaga K., Oonishi I., Nakagawa A., Uchida A. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 9. P. 6525–6531.
103. Lam J.-M., Kwee K.-H., Sun W.Q., Chua Y.-L., Wang X.-J. // *Plant Sci.* 1999. V. 142. № 2. P. 209–218.
104. Gill S.S., Tuteja N. // *Plant Physiol. Biochem.* 2010. V. 48. № 12. P. 909–930.
105. Trumper S., Follmann H., Haberlein I. // *FEBS Lett.* V. 352. № 2. P. 159–162.
106. Hou W.-C., Lin Y.-H. // *Plant Sci.* 1997. V. 128. № 2. P. 151–158.
107. Hou W.-C., Chen H.-J., Lin Y.-H. // *Plant Sci.* 1999. V. 149. № 2. P. 151–156.
108. How W.-C., Wang Y.-T., Lin Y.-H., Hsiao L.-J., Chen T.-E., Wang C.-W., Dai H. // *J. Exp. Bot.* 2000. V. 51. № 4. P. 713–719.
109. Munne-Bosch S. // *Trends Plant Sci.* 2008. V. 13. № 5. P. 216–220.
110. Grudkowska M., Zagdanska B. // *Acta Biochim. Pol.* 2004. V. 51. № 3. P. 609–624.
111. Antao C.M., Malcata F.X. // *Plant Physiol. Biochem.* 2005. V. 43. № 7. P. 637–650.
112. Srivastava R., Liu J.X., Howell S.H. // *Plant J.* 2008. V. 56. № 2. P. 219–227.

Inhibitors of Proteolytic Enzymes under Abiotic Stresses in Plants (Review)

V. V. Mosolov and T. A. Valueva

Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117071 Russia

e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Received March 14, 2011

Abstract—Data on the role of proteolytic enzyme inhibitors in plant adaptation to various unfavorable environmental abiotic factors—water deficiency, salinization of soil, extreme temperatures, etc.—and also probable functions of proteinase inhibitors in natural plant senescence are considered.

УДК 579.841

АЭРОБНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ЭТИЛЕНДИАМИНТЕТРААЦЕТАТА (ОБЗОР)

© 2011 г. Е. Н. Капарулина, Н. В. Доронина, Ю. А. Троценко

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН, Пущино, Московская область 142290
e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 17.12.2010 г.

Проанализированы и обобщены данные литературы по влиянию комплексообразующего соединения этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) на окружающую среду, а также экологические риски в связи с его применением. Систематизированы способы абиотического и биотического разложения ЭДТА. Особое внимание уделено микробиологической деградации этого соединения. Представлены данные о транспорте и путях метаболизма ЭДТА у аэробных бактерий. Обсуждаются практические аспекты использования аэробных бактерий-деструкторов ЭДТА в экобиотехнологии.

Проблема разложения персистентных и опасных соединений, которые накапливаются в окружающей среде вследствие интенсивного промышленного производства и применения, актуальна. Органические соединения группы аминополикарбоновых кислот (АПК), к которым относится ЭДТА, способны образовывать стабильные комплексы с большинством ионов металлов в водных растворах [1]. Анион ЭДТА⁴⁻ содержит 10 активных центров, способных осуществлять координацию лиганда ионами металлов: 2 атома азота и 8 атомов кислорода (рис. 1). В твердой фазе в качестве донорных атомов могут выступать все 10 центров. Однако геометрия лиганда такова, что с одним атомом металла он может образовывать не более 6 связей: 2 с атомами азота и 4 с атомами кислорода разных ацетатных фрагментов ЭДТА, что соответствует гексадентатному типу данного комплексона. При этом образуется 5 пятичленных металлоциклов: один этилендиаминный (Е-цикл) и четыре глицинатных (Gly-циклы) (рис. 1). Такое сочетание донорных центров делает ЭДТА одним из наиболее эффективных хелатов, применяемых в различных областях современных технологии, аналитической химии и медицины.

Универсальность действия ЭДТА связана в первую очередь с хелатоэффектом [2], при котором отличительным свойством хелата является цикличность, обусловленная наличием нескольких донорных групп, вследствие чего лиганд занимает несколько координационных мест во внутренней сфере комплекса. Кроме способности к формированию хелатных циклов, для молекулы ЭДТА характерна повышенная лабильность как во взаимном расположении этилендиаминного и глицинатного фрагментов, так и в конформации каждого из них в отдельности.

Другой интересной особенностью ЭДТА является возможность варьирования относительных

расстояний металл–кислород и металл–азот в комплексах с металлами разной природы [3]. В зависимости от металла изменяется способность преимущественно координироваться с О- и N-атомами, которые служат непосредственными донорами в большинстве комплексов. Катионы трехвалентных металлов образуют комплексы при pH 2–3, тяжелые двухвалентные металлы при pH > 3–4, тогда как щелочноземельные – при pH > 7 [4].

Важной характеристикой комплексов является константа стабильности K, представляющая собой константу равновесия реакции образования комплекса металла (Me) с лигандом (L): $K = \frac{[MeL]}{[Me] \cdot [L]}$. Константы стабильности для различных комплексов MeEDTA различаются [5, 6], наименьшее значение константы стабильности определено для Ba-EDTA, а наибольшее – для Fe(III)-EDTA.

Первые упоминания о синтезе ЭДТА связаны с именем Ф. Мюнца, который, пытаясь создать заменитель лимонной кислоты, синтезировал ЭДТА из этилендиамина, обрабатывая его хлоруксусной кислотой и гидроокисью натрия [7]. Однако промышленное производство ЭДТА было начато немецкой фирмой “I.G. Farbenindustrie” лишь к 1940 г. В дальнейшем методы получения комплексона совершенствовались в связи с широким практическим использованием.

В настоящее время ЭДТА синтезируют из этилендиамина, формальдегида и цианида натрия под наиболее известными торговыми названиями: трилон Б, версен, эдетат, титриплекс, комплексон II и хелатон. Спектр производимых комплексона, включая ЭДТА, насчитывает более 200 наименований. Суммарное мировое производство ЭДТА в 2000 г. достигло 2×10^5 т, при этом 70–80% потребленного ЭДТА поступает в окружающую среду [8–10].

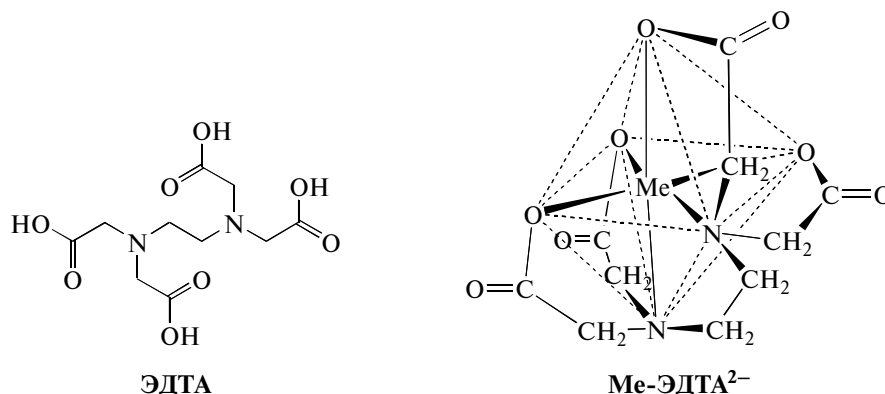


Рис. 1. Структура ЭДТА и его комплекса с металлами [29].

Развитие фундаментальных исследований химии комплексонов способствовало расширению сфер их применения. В основном это относится к использованию комплексонов для предотвращения образования осадков металлов, устранения ионов металлов, катализирующих нежелательную реакцию (смягчение воды, удаление накипи), или наоборот, делая их более доступными путем удержания в растворе (удобрения в сельском хозяйстве). Кроме того, комплексные соединения широко применяются в текстильной, нефтегазовой, фармацевтической, косметической и пищевой промышленности для предотвращения трансформации ингредиентов и их прогоркания вследствие спонтанно происходящих окислительных реакций, а также в фотографии, где $\text{FeNH}_4\text{-ЭДТА}$ используют как окисляющий агент для серебра [11–13].

Традиционно, в механических процессах измельчения древесины хелаты добавляют до стадии сгущения. Затем металлы из хелатов удаляют на стадии обезвоживания, при этом общая концентрация ионов в пульпе значительно снижается. Поскольку требования к белизне бумаги возрастают, добавление хелатов на разных этапах технологического процесса повышает степень отбеливания (<http://www.versene.com>).

Обнаружено, что присутствие ЭДТА во фракции очищенных сточных вод целлюлозно-бумажного производства стимулировало рост водорослей на 20–40%, возможно, из-за повышения доступности необходимых металлов, как железо, цинк и медь [14]. Способность таких промышленных стоков поддерживать рост водорослей была сравнима с богатой питательной средой для морских водорослей. Следовательно, присутствие плохо деградируемого хелата, вызывающего увеличение доступности металлов, может ускорять эвтрофикацию водоемов, где концентрация ЭДТА и диэтиленetriаминпентаацетата (ДТПА) достигала 10–60 мг/л [15].

При удалении радионуклидов и продуктов коррозии из охлаждающих систем ядерных реакторов используют широкий спектр реакций, причем обычно применяют ЭДТА, ДТПА, пиколиновую и лимонную кислоты для образования комплексов. Такие комплексы с радионуклидами затем обрабатывают ионообменными смолами. Полученные отходы уплотняют и ликвидируют [16–19].

ЭДТА широко используется в медицине как фармацевтический агент с полифункциональными свойствами. Он применяется для выведения ядов и тяжелых металлов из организма человека, как антикоагулянт в крови для лабораторных исследований [20], кроме того, эффективен при сосудистых нарушениях (гиперкальцемия), предотвращает атеросклероз и другие хронические заболевания [21–23]. Клинические испытания показали снижение уровня холестерина и кровяного давления в ходе орального применения препаратов, содержащих ЭДТА [24]. Разработаны методы выведения радиоактивных изотопов с помощью комплексонов. Отмечается резкое возрастание интереса к исследованию комплексонов радиоактивных металлов (технеция-99) для диагностики. По данным ВОЗ, ежедневное потребление ЭДТА в концентрации 2.5 мг/кг не оказывает токсичного действия на людей, однако необходимы дополнительные и более длительные исследования его безопасности.

Изучено влияние ЭДТА на клетки *Salmonella enterica* при выращивании в присутствии Ca^{2+} или Mg^{2+} . ЭДТА оказывал влияние на внешнюю мембрану активнее в начале, нежели в середине или конце экспоненциальной фазы роста [25]. Дестабилизирующий эффект ЭДТА на клеточные стенки грамотрицательных бактерий хорошо известен. ЭДТА удаляет катионные мостики в клеточных стенках бактерий, где концентрируются катионы магния и кальция. При этом клетки становятся более чувствительными к антимикробным агентам [26].

Уровни ЭДТА в окружающей среде. Повсеместное использование и устойчивость к биодеграда-

ции приводят к накоплению хелатных агентов в окружающей среде. В 1997 г. мировые продажи ЭДТА в Европе составили 32550 т, а в 2000 г. их использование достигало 200000 т [27]. Примечательно, что среди антропогенных соединений ЭДТА присутствует в водоемах в самой высокой концентрации [12]. ЭДТА обнаружен в грунтовых и в сточных водах [28]. Другой хелат, нитрилотриацетат (НТА), широко распространен в грунтовых водах [29].

Концентрация ЭДТА в реках Англии достигала 1 г/л, тогда как в других европейских реках составляла десятки мкг/л [30]. Несмотря на широкое использование, накопление НТА в водоемах Канады не выявлено. В прибрежных водах Атлантики и Тихого океана и в образцах из порта в Галифаксе ЭДТА не обнаруживали в течение двух лет после первого использования в моющих средствах, тогда как в реках Германии и Швейцарии содержание ЭДТА превышало 100 мг/л. В донных отложениях северной части озера Рифенс обнаружен ЭДТА в концентрации 60–170 мг/л [31], а в донных осадках южной части этого озера концентрация ЭДТА составляла 80–310 мг/л. Столь высокие концентрации объясняются сбросами сточных вод целлюлозно-бумажных заводов Швейцарии, которые используют ЭДТА и ДТПА в технологических процессах [12]. Следовательно, комплексоны могут потенциально адсорбировать тяжелые металлы из донных отложений рек и других водоемов в естественных условиях [6, 31]. В фильтрате воды с поверхности реки Рур обнаружены довольно высокие концентрации ЭДТА (25 мг/л). В таких же концентрациях встречается ЭДТА и в необработанной воде, поскольку это соединение не удаляется в ходе фильтрации [6]. Хотя ЭДТА не токсичен для животных и людей в столь высоких концентрациях, его накопление в грунтовых водах приводит к ухудшению качества питьевой воды, так как способствует переходу в растворенное состояние ионов тяжелых и токсичных металлов. Кроме того, нельзя исключать, что это соединение может адсорбировать тяжелые металлы в трубопроводах, образуя растворимые в воде комплексы. Анализ проб, взятых из очистных сооружений Швейцарии, показал, что средние концентрации ЭДТА в необработанных сточных водах варьировали в пределах 10–500 мг/л. Однако уровни ЭДТА до и после очистки этих сточных вод существенно не отличались. Из этого следует, что большая часть ЭДТА не удалялась из сточных вод в процессе их очистки [28, 32].

Экологические риски применения хелатов. Мониторинг окружающей среды выявил накопление ЭДТА, поскольку биodeградация этого соединения в очистных сооружениях малоэффективна, а в природе обнаружен только один значимый путь деградации ЭДТА – фотохимическое разложение комплекса Fe(III)-ЭДТА на поверхности воды под

воздействием УФ-лучей. К главным проблемам, обсуждаемым в связи с риском накопления АПК в окружающей среде, относят: токсическое действие на млекопитающих, вклад азота в эвтрофикацию водоемов и иммобилизацию металлов.

Токсичность НТА изучена на 50 разновидностях пресноводных и морских организмов, эффекты наблюдали лишь в тех случаях, когда концентрации НТА, используемые в тестах, были равны или превышали концентрации ионов двухвалентных металлов [33]. Аналогично, комплексы ЭДТА и ДТПА с металлами характеризовались токсическим эффектом по отношению к водным организмам [34]. Показано, что ЭДТА нарушает клеточное деление, синтез хлорофилла и накопление биомассы водорослей. Интересно отметить, что та же концентрация хелатов ЭДТА с микроэлементами не оказывала токсического действия на водоросли. Показано также, что масштабное применение ЭДТА или НТА (оба содержат азот) может увеличить эвтрофикацию водоемов, но существенного вклада в этот процесс не обнаружено [11].

Цитотоксичность хелатов возникает чаще всего на фоне недостатка металлов, необходимых для различных клеточных функций. Показано летальное воздействие ЭДТА в низких концентрациях (<100 мкМ) на клетки почек крыс [34]. Кроме того, подавлялся синтез белка из-за образования комплексов цинка и марганца в клетках печени крыс после введения Ca²⁺-ЭДТА. ЭДТА оказывал также неблагоприятное воздействие на размножение и развитие млекопитающих, но был безопасен при наружном применении, поэтому активно используется в косметической промышленности [35].

Установлено, что при pH 7–8 тяжелые токсичные металлы (Pb²⁺ или Cd²⁺) сорбируются на частицах, а комплекс Fe(III)-ЭДТА, присутствующий во многих реках, может повторно мобилизовать адсорбируемые тяжелые металлы. С другой стороны, в водоносных слоях с pH < 7 двухвалентные Me-ЭДТА комплексы будут реагировать с Fe(OH)₃, что способствует формированию Fe(III)-ЭДТА комплексов. Итак, появление заметных количеств ЭДТА и других комплексонов в окружающей среде создает серьезные экологические проблемы, поэтому актуален поиск новых эффективных штаммов-деструкторов ЭДТА для разработки современных технологий биоремедиации экосистем и очистки промышленных стоков.

Удаление различных АПК из окружающей среды основано на различных абиотических, а также биотических процессах, которые играют главную роль в их деструкции. Несмотря на химическое и структурное сходство АПК, механизмы, ответственные за их деградацию, следует рассматривать отдельно для каждого соединения [6].

Абиотические методы разложения АПК. В природных условиях ЭДТА, как и другие АПК, могут

подвергаться физико-химическому разложению под действием УФ (фотолиз) в диапазоне спектра излучения солнечного света не выше 400 нм [36]. Показано, что только комплекс Fe(III)-ЭДТА разрушается под действием солнечного света с периодом полураспада 11.3 мин, тогда как комплексы ЭДТА с Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} и Hg^{2+} не подвергаются фотолизу. В лабораторных условиях комплексы Mn(II)-ЭДТА и Co(III)-ЭДТА также подвергаются фотолизу, но разрушение незначительно [37, 38]. Фотолиз другого хелата – ДТПА, происходит быстрее, по сравнению с ЭДТА [39]. Выявлена деградация ЭДТА под действием УФ-лучей в диапазоне, который чаще всего используется для очистки от радиоактивности (0.6–30 г/л ЭДТА, pH 10) и ядерных отходов (1.5 г/л лимонной кислоты + 2.5–5 г/л ЭДТА). Показано, что фотохимическая деградация ЭДТА (1–7 г/л) возможна в щелочных условиях при pH 10, а также при pH 3.3–3.6 [40].

В опытах с различными видами излучения показано, что при использовании ксеноновых ламп уровень деградации ЭДТА на единицу светового излучения выше, по сравнению с ртутными лампами. Положительный результат был достигнут при добавлении H_2O_2 : время разложения ЭДТА под действием УФ сокращалось с 80 до 5 мин [40]. В ходе фотокаталитической деградации ЭДТА с TiO_2 идентифицированы интермедиаты, такие как глиоксилат, гликолевая кислота, этилендиамин, иминодиацетат, глицин, что позволило предложить путь превращения ЭДТА [41]. Кроме того, выявлена незначительная адсорбция ЭДТА на гуминовых кислотах, кварце, каолине, речных отложениях, твердых частицах перегнойа и на частицах активного ила [36]. Из-за отрицательного заряда комплексов Me-ЭДТА в диапазоне pH 5.0–8.0 их сорбция возможна только на твердых положительно заряженных частицах, таких как: гидроксид алюминия, гидроксид железа (III) и оксид марганца (III, IV) [6].

Разложение 1 мМ ЭДТА в ходе озонирования (10 мг/мин/л) зависело от уровня озона [42]. При pH 3.0 получен ряд продуктов деградации, таких как этилендиаминтриацетат, ИДА, НТА, глиоксилат, формиаат, оксалиновая кислота, глицин, аммоний, нитрат и перекись. При pH 7.0 обнаружены те же продукты, за исключением перекиси и формиаата [43]. В ходе термической деградации комплексов ЭДТА с металлами в щелочных условиях при 250°C основными продуктами были ИДА, гидроксидэтилиминодиацетат и этиленгликоль, тогда как при более высокой температуре выделялись диметиламин и углекислота [44]. Исследовали также совместное действие озона и УФ на деградацию комплекса Cu^{2+} -ЭДТА, полученного в ходе выщелачивания меди из загрязненной почвы виноградников. В итоге, было удалено почти 40% меди, при этом токсичность почвы снизилась на 29% [45]. Кроме того, для деградации ЭДТА используют радиолиз [46] и ком-

бинированные физико-химические подходы [30]. Недавно показано, что ЭДТА, НТА и этилендиамин могут окисляться в присутствии перманганата калия при pH 12–14 [47].

Разложение АПК микроорганизмами. Известно небольшое число штаммов–деструкторов АПК, способных расти на НТА, ЭДТА и этилендиаминдисулфинате (ЭДС). Бактерии могут разрушать НТА как в присутствии молекулярного кислорода, так и в условиях денитрификации. Первые принадлежат к классу *Alphaproteobacteria* и кластеризуются с родами *Rhizobium* и *Agrobacterium*, вторые – к классу *Gammaproteobacteria* и близки *Xanthomonas* [6, 48]. Охарактеризованы и изучены граммотрицательные, аэробно использующие НТА *Chelatobacter heintzii* ATCC 29600 и *Chelatococcus asaccharovorans* [6, 49–51]. Хотя микробиологический способ деградации ЭДТА считается наиболее перспективным, до сих пор выделено несколько смешанных и чистых культур деструкторов ЭДТА [6, 42, 52].

1. *Agrobacterium radiobacter* выделен из сточных вод, содержащих Fe(III)-ЭДТА [46, 53], позднее реклассифицирован в *Rhizobium radiobacter* [54]. Этот штамм деградировал комплекс Fe(III)-ЭДТА в высоких концентрациях (30 мМ) в течение 48 ч до остаточной концентрации 3 мМ. В ходе эксперимента варьировали начальную концентрацию Fe(III)-ЭДТА от 2.9 до 140 мМ. Рост *R. radiobacter* на ЭДТА, связанным с другими металлами, не обнаружен [53]. Этот штамм не использовал НТА, ИДА и этилендиаминдиацетат (ЭДДА). Добавление пептона или дрожжевого экстракта в среду не влияло на разложение ЭДТА, однако внесение глицерина резко снижало его деградацию. По-видимому, в присутствии глицерина культура утилизировала ЭДТА только как источник азота.

2. *Pseudomonas* sp. A1 разлагал Fe(III)-ЭДТА и другие хелаты при начальной концентрации менее 100 мг/л (0.3 мМ/л), а при более высоких концентрациях рост этого штамма ингибировался [55].

3. Из морских образцов изолированы несколько бактериальных штаммов–деструкторов Fe(III)-ЭДТА. Аэробный грамм-вариабельный штамм 02-N-2, выделенный из моллюска в Индийском океане, разрушал комплекс Fe(III)-ЭДТА при различных концентрациях морской воды (осмолярности). Кроме того, интактные клетки были способны деградировать комплексы ЭДТА с Ca^{2+} , Cu^{2+} , и Mg^{2+} . По данным секвенирования гена 16S рРНК этот штамм проявлял высокое сходство с *Bacillus jeotgali* JCM 10885^T [56].

4. Транспорт и деградацию Fe(III)-ЭДТА также изучали у *Escherichia coli* BL21 [57]. Этот штамм использовал комплекс Fe(III)-ЭДТА до 20 мМ в качестве единственного источника азота, причем накопление биомассы было примерно одинаковым на среде с глюкозой или на среде с глюкозой и Fe(III)-ЭДТА. При этом штамм BL21 слабо ис-

пользовал комплексы ЭДТА (10 мМ) с другими ионами: Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} и Zn^{2+} . При определении протондвижущей силы для транспорта ЭДТА использовали ионофоры карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон и грамицидин (Na^+), которые не влияли на потребление ЭДТА клетками *E. coli*. Сделано заключение, что транспорт ЭДТА у исследуемого штамма зависит от АТФ. Кроме того, штамм BL21 обладал никель-транспортной системой, имеющей сходство с известными ABC-транспортерами. Показано, что в присутствии Ni^{2+} потребление ЭДТА составляло 10% от потребления Fe(III)-ЭДТА. Другие катионы (Mn^{2+} , Zn^{2+}) не оказывали ингибирующего действия, хотя скорость потребления была невысокой. Остается невыясненным, какой фермент *E. coli* BL21 разрушает Fe(III)-ЭДТА, поскольку при сравнении геномов штаммов BL21 и BNC1 не удалось найти нуклеотидные последовательности монооксигеназы, имеющей более 20% сходства с ЭДТА-монооксигеназой штамма BNC1, характеристика которой приведена ниже.

5. Из сточных вод, содержащих ЭДТА, выделена грамотрицательная бактерия BNC1 (DSM 6780), у которой способность к деструкции ЭДТА строго зависела от термодинамической стабильности комплексов [58–60]. Штамм BNC1 способен разлагать комплексы с константой стабильности ниже 10^{16} – Ba-(lg K 7.8), Mg-(lg K 10.6), Ca-ЭДТА (lg K 10.7) со скоростью 20 мкМ/мг белка/ч и комплекс Mn-ЭДТА (lg K 15.6) с меньшей скоростью 15 мкМ/мг белка/ч. В тоже время комплексы с константой стабильности выше 10^{16} [Fe(III)-, Co-, Cd-, Pb-, Ni-, Cu-ЭДТА] не утилизировались. Кроме того, штамм не способен расти в присутствии свободного, не объединенного в комплекс, ЭДТА. Предполагают, что свободный ЭДТА значительно снижает жизнеспособность клеток из-за взаимодействия с ионами металлов клеточной поверхности. Недавно выделен штамм ANP11, способный наряду с ЭДТА разрушать 1,2-диаминопропантетраацетат [61].

6. В чистую культуру выделен также бактериальный штамм DSM 9103 [62, 63], который при добавлении в активный ил городских очистных сооружений полностью разрушал ЭДТА при его начальной концентрации 3 мМ. Обнаружено, что клетки этого штамма способны разрушать свободный ЭДТА и хелаты с низкой константой стабильности. Комплексы Mg^{2+} -, Ca^{2+} -, Mn^{2+} -ЭДТА разрушались в течение 10 ч с постоянной скоростью. Деструкция более стабильных хелатов с Co-, Cu-, Zn-, Pb-ЭДТА происходила частично и с меньшей скоростью, а Cd- и Fe(III)-ЭДТА не выявлена [64].

7. *Burkholderia cepacia* YL-6 использует 1 г/л Fe(III)-ЭДТА в качестве источника углерода и энергии, а также смесь $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ в качестве источника азота. Показано, что через

17 сут периодического культивирования комплекс Fe(III)-ЭДТА разрушался до конечной концентрации 100 мг/л. Кроме того, штамм YL-6 способен разлагать 0.5 г/л Cu(II)-ЭДТА за 20 сут [65].

8. Из очистных сооружений г. Пушкино выделены три чистые культуры грамотрицательных бактерий – факультативных деструкторов ЭДТА: LPM-410, LPM-5, LPM-6, а также облигатный деструктор ЭДТА – штамм LPM-4 [66, 67]. Штамм LPM-410 утилизировал ЭДТА в качестве источника углерода, энергии и азота, а также широкий спектр других органических соединений [66]. Показано, что суспензия клеток, собранных в экспоненциальной фазе роста на ЭДТА, способна разрушать комплексы ЭДТА с Mg-, Ca-, Ba- и Mn-ЭДТА с постоянной скоростью от 0.363 до 0.525 мМ ЭДТА/(г клеток·ч). Более стабильный комплекс Zn-ЭДТА разлагался штаммом с низкой скоростью – 0.195 мМ ЭДТА/(г клеток·ч). Не обнаружена дегградация комплексов с Co-, Cu-, Fe(III)-ЭДТА [66].

Облигатный деструктор, штамм LPM-4, обладает специфической потребностью в ЭДТА как единственном источнике углерода, энергии и азота [9]. Подобно штамму DSM 9103, клетки штамма LPM-4 деградировали комплексы Mg-, Ca-, Ba-, Mn-ЭДТА со скоростью от 0.310 до 0.486 мМ ЭДТА/(г клеток·ч) в течение 10 ч. Более стабильный комплекс Zn-ЭДТА ($K = 10^{18.3}$) разрушался в течение 48 ч с начальной скоростью 0.137 мМ ЭДТА/(г клеток·ч). Комплексы ЭДТА с Pb-, Cu-, Fe(III)-ЭДТА не разрушались. Следовательно, штаммы DSM 9103, LPM-410 и LPM-4 более активно, чем другие известные деструкторы, разлагают не только ЭДТА, но и его комплексы с Ba, Mg, Ca, Mn, Zn, т.е. перспективны для практического применения с целью очистки сточных вод, содержащих ЭДТА или его хелаты [52]. Факультативные деструкторы штаммы LPM-410, LPM-5 и LPM-6 способны расти в среде, содержащей 1.0 г/л ЭДТА.

Несколько работ посвящено деструкции ЭДТА смешанными культурами. Из ассоциации изолировано 40 культур, среди которых обнаружены представители родов *Methylobacterium*, *Variovorax*, *Enterobacter*, *Aureobacterium* и *Bacillus*. Однако смешанная культура слабо разрушала комплексы Me-ЭДТА, которые по степени деградальности располагались в следующем порядке: Fe (60%) > Cu (30%) > Co (25%) > Ni (23.4%) > Cd (19.3%). Деструкция Na-ЭДТА после 28 сут культивирования составила 1.57 мМ (31%). При добавлении в среду неорганического фосфора наблюдали удаление тяжелых металлов, которое происходило параллельно с разложением ЭДТА. Имобилизованные клетки данной культуры разрушали 20% комплекса Fe(III)-ЭДТА в течение 2.5 ч, тогда как в непрерывной культуре для этого требовалось 4.5 сут, что может быть использовано для биодеградации целого ряда комплексов с тяжелыми металлами [68].

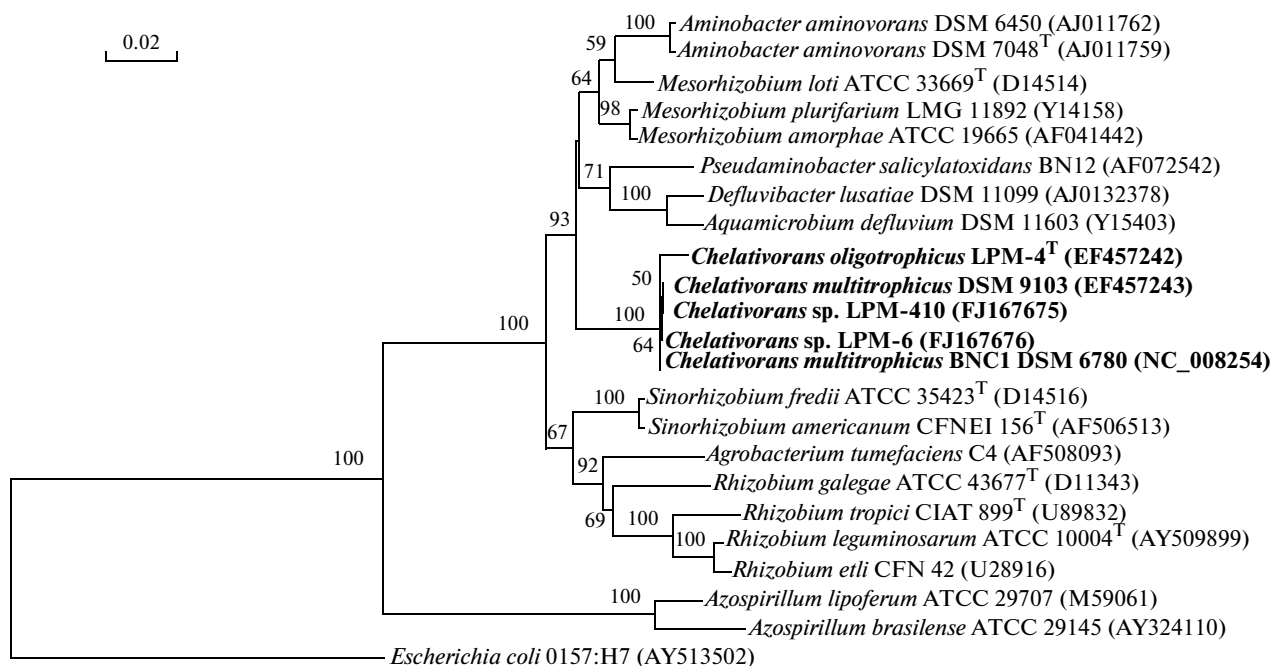


Рис. 2. Филогенетическое положение деструкторов ЭДТА, среди представителей *Alphaproteobacteria*, основанное на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК. Масштаб соответствует двум нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов (эволюционным расстоянием). Корень определен включением последовательности *E. coli* в качестве внешней группы. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа 100 альтернативных деревьев.

Таксономия и филогения новых деструкторов ЭДТА. Таксономическое положение деструкторов ЭДТА – штаммов DSM 9103, LPM-410, LPM-6, LPM-5 и LPM-4 долгое время оставалось невыясненным. Для идентификации новых деструкторов ЭДТА использовали методы полифазной таксономии. Нами показано, что штаммы LPM-410, LPM-6 и LPM-4 принадлежат к новому роду *Chelativorans* [69], тогда как штамм LPM-5 отнесен к новому виду *Stenotrophomonas chelatiphaga* [70] (рис. 2, 3). Основные и дифференцирующие свойства деструкторов ЭДТА представлены в таблице.

Биохимические и генетические аспекты деградации НТА и ЭДТА. Эти аспекты ранее изучались на *Chelatobacter heintzii* ATCC 29600, *Chelatococcus asaccharovorans* TE 11, ЭДТА-деградирующих штаммах DSM 9103 и BNC1 (DSM 6780) [59, 63, 71, 72]. Также была исследована деградация ЭДДС штаммом DSM 9103 [6].

Транспорт ЭДТА. Энергозависимость транспорта ЭДТА исследовали на клетках штамма DSM 9103 [62]. Определяли влияние различных ингибиторов энергетического метаболизма на транспорт ЭДТА и внутриклеточный уровень АТФ. 2,4-Динитрофенол, карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон и карбонилцианид-п-(трифторметокси)-фенилгидразон могут разобщать протондвижущую силу, электрический (мембранный) потенциал и градиент рН через мембрану клетки.

Преинкубация с этими соединениями значительно ингибировала процесс транспорта ЭДТА.

Эксперименты с цианидом калия показали, что транспорт ЭДТА является энергозависимым. Транспорт ЭДТА в клетки штамма DSM 9103 (конечная концентрация 10.4 мкмоль) полностью подавлялся в присутствии 10 мМ KCN, а при концентрации 1 мМ KCN наблюдали лишь 8% от первоначальной активности транспорта [62].

Потребление комплекса Ca^{2+} -ЭДТА клетками штамма DSM 9103 значительно снижалось также в присутствии ингибитора АТФазы и ионофора нигерицина, разобщающего протонный градиент. Напротив, валиномицин, который действует на электрохимический градиент, практически не влиял на транспорт ЭДТА, указывая на то, что транспорт ЭДТА, вероятно, осуществляется по протонному градиенту [62]. Комбинация обоих ионофоров разобщала протондвижущую силу. Добавление ингибитора АТФазы, N,N-дициклогексил-карбосидимиды, привело к наибольшему ингибированию. В присутствии ингибиторов транспорта и ингибитора АТФазы уровень внутриклеточного АТФ снижался до 40% от контроля. Добавление одного из двух ионофоров несущественно влияло на этот уровень. Тем не менее, в присутствии нигерицина потребление ЭДТА клетками штамма DSM 9103 значительно снижалось, несмотря на высокий уровень АТФ, возможно, из-за отсутствия корреляции между ак-

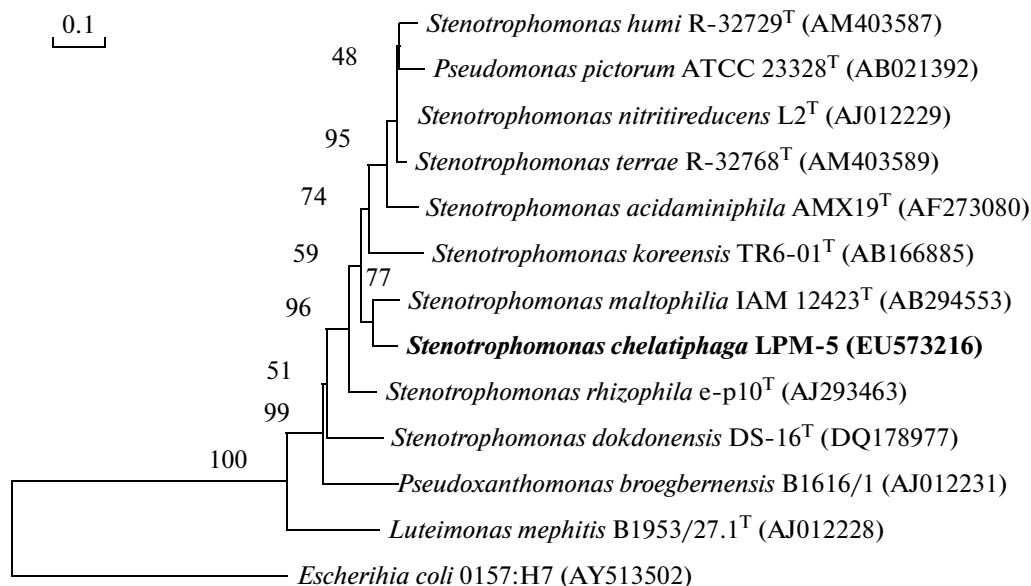


Рис. 3. Филогенетическое положение *Stenotrophomonas chelatiphaga* LPM-5^T, основанное на сравнении нуклеотидных последовательностей 16S рДНК представителей родов *Stenotrophomonas*, *Luteimonas* и *Pseudoxanthomonas*. Показаны bootstrap значения выше 45%. Дерево построено относительно последовательности 16S рДНК *E. coli* 0157:H7 (AY513502).

тивностью транспорта и внутриклеточным содержанием АТФ. Показано, что оптимальными для транспорта ЭДТА в клетки были 40°C и pH 7.0 [62]. Доказано существование индуцибельной и энергозависимой транспортной систем, которые весьма специфичны, поскольку из всего диапазона АПК только ДТПА конкурентно ингибировал потребление ЭДТА.

Установлено, что транспортные системы для НТА и ЭДТА у *S. heintzii* и штамма DSM 9103 имеют много общего [71, 73]. Также обнаружено, что транспорт ЭДТА клетками, выращенными на НТА, ингибировался при внесении НТА в среду культивирования. Вероятно, НТА транспортируется своим переносчиком, отличным от транспортера ЭДТА, либо идет конкуренция между двумя ферментами за субстрат. Транспорт различных комплексов ЭДТА с металлами строго зависел от констант стабильности этих комплексов. Так, клетки штамма DSM 9103 способны поглощать свободный ЭДТА или в комплексе с металлами, с константами их стабильности менее 10¹⁶. Близкие результаты получены для штамма BNC1 [59].

Результаты опытов с ⁴⁵Ca-ЭДТА во многом объяснили поведение иона металла в ходе этого процесса. Установлено, что ионы Ca²⁺ транспортируются в клетки вместе с ЭДТА [62]. Выдвинуты две гипотезы относительно того, каким образом клетки справляются с высокими внутриклеточными концентрациями ионов металлов. Согласно первой гипотезе, ионы металлов осаждаются в виде нерастворимых солей, например,

фосфатов кальция. Согласно второй гипотезе ионы металлов экскретируются. Кроме того, рентгеноструктурный анализ показал, что клетки, выращенные на ЭДТА, имеют включения, содержащие преимущественно ионы Ca²⁺ и Mg²⁺, что подтверждает механизм осаждения металлов внутри клеток. Механизмы экскреции ионов Ca²⁺ также, вероятно, присутствуют у всех бактерий, чтобы поддерживать низкую внутриклеточную концентрацию ионов металла.

ЭДТА-монооксигеназа штамма DSM 9103.

Первичные реакции деградации ЭДТА у факультативных деструкторов DSM 9103 и BNC1 очень близки и катализируются монооксигеназными системами [71, 73–75].

Показано, что при добавлении Mg-ЭДТА и НАДН₂ к бесклеточному экстракту штамма DSM 9103 ЭДТА разлагается монооксигеназой, активность которой составила 0.097 мкмоль/мин/мг белка [74]. Добавление в реакционную смесь ФМН или ФАД увеличивало активность фермента в 7 и 2.5 раза соответственно. Оптимум фермента наблюдался при pH 8.0. При pH 7.0 и 8.5 отмечена 50%-ная активность этого фермента, а при pH 6.0 и 9.5 активность фермента не удалось обнаружить. Оптимум температуры фермента – 28–30°C. Экстракты клеток, выращенных на фумарате с аммонием в качестве источника азота или ИДА в качестве источника углерода, энергии и азота, имели десятикратное снижение активности первого фермента разложения ЭДТА. Напро-

Характеристика деструкторов ЭДТА

Свойства	<i>Chelativorans oligotrophicus</i> LPM-4 [69]	<i>Chelativorans multitrophicus</i> DSM 9103 [69]	<i>Chelativorans</i> sp. LPM-410 [66]	<i>Chelativorans</i> sp. LPM-6 [66]	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i> LPM-5 [70]
Размеры клеток, мкм	0.4–0.5 × 1.0–2.0	0.5–1.0 × 0.7–2.0 мкм	0.6–0.8 × 1.0–3.0	0.6–0.7 × 1.0–1.3	0.5–0.7 × 0.8–1.3
Морфология клеток	Палочки	Палочки	Палочки	Палочки	Палочки
Тип клеточной стенки	Грамотрицательные	Грамотрицательные	Грамотрицательные	Грамотрицательные	Грамотрицательные
Жгутикование	–	+	+	+	+
Оксидаза, каталаза	+	+	+	+	+
Тип деструкции ЭДТА	Облигатный	Факультативный	Факультативный	Ограниченно-факультативный	Факультативный
Источники углерода и энергии					
ЭДТА	+	+	+	+	+
Нитрилогриацетат	–	+	+	–	+
Этилендиаминдисулфинат	–	+	+	–	–
Глюкоза	–	+	+	–	+
Фумарат	–	+	–	–	–
Сукцинат	–	+	+	+	+
Малаг	–	–	–	–	+
Ацетат, пируват	–	–	+	–	+
L-аланин, L-серин	–	–	+	–	–
Спирты и амины:					
Этанол, метанол	–	–	–	–	–
Потребность в витаминах	Биотин	Биотин, тиамин	–	Биотин, тиамин	–
Температурный оптимум, °С	32–34	30	28–30	28–37	28–37
Оптимальный рН для роста	6.8–7.2	7.0	6.8–7.2	6.8–7.2	5.5–8.5
Оптимальный NaCl для роста, %	1.5	1.5	1.5	1.5	2.5
Содержание ГЦ в ДНК, мол. %	60.8	63.1	65.4	63.2	68.3

Примечание: '+', '–' – положительная и отрицательная реакция.

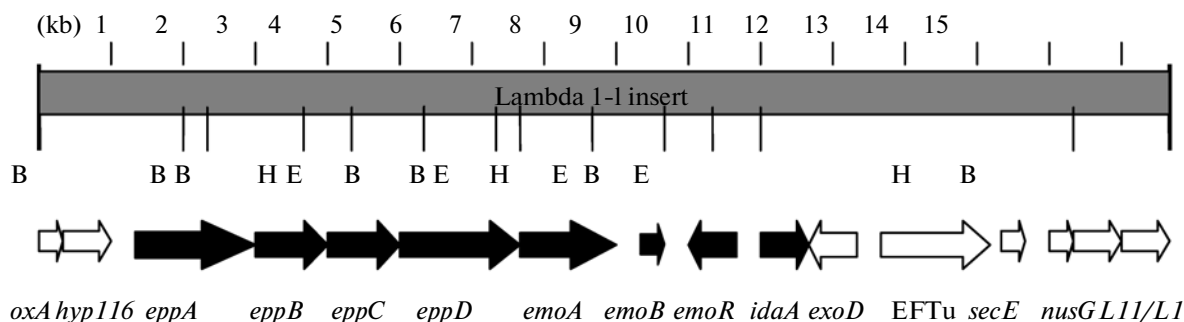


Рис. 4. Рестрикционные сайты *Bam*HI (B), *Hind*III (H) и *Eco*RI (E) и организация генов 15.603 п.н. фрагмента ДНК. Гены, показанные черными стрелками, непосредственно участвуют в деградации ЭДТА [76].

тив, клетки, выращенные на НТА или ЭДДС, обладали 80% активности ЭДТА-монооксигеназы.

Установлено, что ЭДТА-монооксигеназа состоит из двух субъединиц [74, 76]. Субъединица В – оксидоредуктаза, которая переносит восстановительные эквиваленты от НАДН₂ на ФМН. Субъединица А – собственно монооксигеназа, превращающая комплекс металл-ЭДТА в этилендиаминтриацетат и глиоксилат в присутствии O₂ и ФМНН₂. Очищены полный ферментный комплекс деградации ЭДТА и субъединицы в отдельности [74]. Активность субъединицы А (сА¹), которая составила 0.2 мкмоль/мин/ мг белка, определяли после реконструкции фермента с оксидоредуктазой сВ¹ из *Photobacterium fischeri*. Методом электрофореза в ПААГ показано, что очищенная субъединица сА имеет молекулярную массу (м.м.) 44 кДа, а методом аналитической гель-фильтрации определена величина нативной м.м. 210 кДа, что соответствует тетрамерной структуре. Субъединица оксидоредуктазы (сВ¹) – гомодимер (25 × 2 кДа). Оксидоредуктазная активность четко проявлялась с НАДН₂, но не наблюдалась с НАДФН₂ и составляла 50 мкмоль/мин/мг белка. После достижения концентрации ЭДТА 0.2–0.3 мМ начинался второй этап – деструкция этого промежуточного соединения с образованием глиоксилата и N,N¹-ЭДДА. “ЭДДА-трансформирующий фермент”, который приводил к образованию этилендиаминмоноацетата и глиоксилата, был охарактеризован для штамма BNC1 позднее. Кроме того, предполагается, что в ходе деградации ЭДТА и ДТПА один из интермедиатов этилендиаминтриацетат может спонтанно приобретать циклическую структуру, образуя кетопиперазинкарбоксилат, устойчивый к деградации, но о его токсичности и поведении в окружающей среде ничего не известно [42].

Монооксигеназа ЭДТА штамма BNC1. Обнаружено, что монооксигеназа в клетках штамма BNC1 аналогична таковой штамма DSM 9103. Очищенная монооксигеназа ЭДТА имеет м.м. 45 кДа, что коррелирует с данными для монооксигеназы штамма

DSM 9103, но является мономером по данным гель-фильтрации. Установлено, что фермент катализирует окисление не только свободного ЭДТА, но и комплексов с ионами двухвалентных металлов, из которых комплекс с Mg²⁺ наиболее предпочтителен. Оптимальными условиями для работы фермента являются 20 мМ HEPES буфер с pH 7.7 и температура 35°C. Кроме того, монооксигеназа ЭДТА штамма BNC1 может использовать НТА и ДТПА в качестве субстратов [75]. ФМНН₂-оксидоредуктаза из штамма BNC1 детально охарактеризована [77]. Для расшифровки механизма этой реакции определили кристаллическую структуру апоформы, ФМН–ФМН комплекса и ФМН–НАДН₂ комплекса. ФМН–НАДН₂-оксидоредуктаза ЕмоВ представляет собой гомотетрамер, состоящий из четырех альфа/бета единичных мономеров, окруженных пятью альфа-спиралями, которые различаются вторичной и третичной структурой от других двухкомпонентных монооксигеназ, таких как PheA2 и PheC. Два изоаллоксазиновых кольца и никотинамид/изоаллоксазиновых кольца служили для переноса водородной связи. Следовательно, реакция идет по механизму пинг-понга, что подтверждено энзимологическими исследованиями [77].

Иминодиацетат-оксидаза штамма BNC1. Из клеток штамма BNC1 наряду с монооксигеназой выделена и охарактеризована оксидаза иминодиацетата (ИДА), отвечающая за последующее его расщепление до глицина и глиоксилата, а также ЭДДА – до этилендиамина [78]. Очистка белка, включающая 8 этапов, позволила получить гомогенный препарат ИДА-оксидазы. Методом электрофореза в ПААГ удалось показать, что очищенный фермент имеет м.м. 40 кДа, а нативный белок представляет собой гомодимер. Очищенная ИДА-оксидаза имела слегка желтоватый цвет с пиком поглощения при 446 нм, характерным для флавопротеинов. Флавин, экстрагированный из ИДА-оксидазы, давал флуоресцентное пятно с Rf 0.055, которое соответствовало ФАД, а молярное соотношение флавина к белку 0.98 указало на то, что каждая субъединица содержит по одной молекуле ФАД [78]. Также

показано, что очищенная ИДА-оксидаза высоко-специфична, так как скорость деградации других субстратов ЭДДА и саркозина составляла соответственно 26 и 4% таковой ИДА. Фермент не проявлял активности в присутствии ЭДТА, НТА, сукцината, фумарата и глицина. При деградации 500 нмоль ЭДДА образовалось 794.4 нмоль глиоксилата, а молярное соотношение 1.59 указывало на отщепление обеих ацетильных групп и образование этилендиамина в качестве конечного продукта. Определены оптимальные условия для работы фермента: наибольшую активность наблюдали в 20 мМ Трис-НСl буфере (рН 8.0) при 35°C. Добавление CaCl₂ или MgCl₂ к очищенному ферменту не влияло на активность, следовательно, данный фермент не нуждается в ионах двухвалентных металлов. Таким образом, выделен и охарактеризован еще один важный фермент, участвующий в процессе деградации НТА и ЭДТА, что позволяет лучше понять пути образования интермедиатов их метаболизма.

Генный кластер, участвующий в деградации ЭДТА.

Клонирован и секвенирован кластер, состоящий из восьми генов *errABCD*, *emoA*, *emoB*, *emoR*, *idaA* [76]. Особое место в деградации ЭДТА занимает группа генов *errABCD*, действующих как АТФ-связывающая транспортная система и обеспечивающая транспорт ЭДТА в клетки [79]. Как гидрофильное соединение ЭДТА нуждается в активном транспорте через цитоплазматическую мембрану. Установлено, что гены деградации и транспорта ЭДТА транскрибируются и регулируются как один оперон (рис. 4). Стоп-кодон последнего гена пермеазной системы *errABCD* перекрывается со стартовым кодоном гена монооксигеназы ЭДТА *emoA*, за которым расположен ген *emoB*, кодирующий НАДН₂:ФМН-зависимую оксидоредуктазу и далее следует регуляторный ген *emoR*. ABC-транспортер имеет периплазматический связанный белок (*ErrA*), придающий субстратную специфичность транспортеру. С использованием изотермической титрационной калориметрии показано, что белок *ErrA* способен связывать свободный ЭДТА с константой диссоциации ниже 25 нмоль, а также комплексы Ca²⁺-ЭДТА, Mg²⁺-ЭДТА, Ca-НТА и Mg-НТА⁻, но не Cu²⁺-ЭДТА²⁻ или Cu-НТА.

Поскольку ЭДТА-монооксигеназа находится в цитоплазме и использует стабильные комплексы в качестве субстратов, отсутствие связывания *ErrA* некоторых комплексов может приводить к неспособности их деградации клетками штамма BNC1. Ген *errV* кодирует пермеазный белок, состоящий из 315 аминокислот, а ген *errC* кодирует белок из 308 аминокислот с консервативной петлей (ЕАА) между двумя трансмембранными спиралями. Оба белка содержали консервативные домены, имеющие высокую гомологию с пермеазными компонентами ABC транспортной системы и шесть

мембранных α-спиралей. Далее гена *errC* находится ген, кодирующий белок *ErrD*, который является АТФ-связывающим белком. *ErrD* содержал два мотива, характерные для таких белков, и аминокислотную линкерную последовательность, что свидетельствует об АТФ-связывающем домене ABC-транспортера [79]. Методом ПЦР в реальном времени показано, что гены транспорта и ген *emoA* транскрибируются с одного промотора, а ген *emoB* конститутивно экспрессируется со своего промотора. Ген ИДА-оксидазы *idaA* располагается после регуляторного гена и не входит в оперон, так как отстоит от него примерно на 400 п.н. Однако *idaA* играет важную роль в окислении ИДА до глицина и глиоксилата, а рассматриваемый генный кластер содержит все гены, необходимые для деградации ЭДТА.

Пути первичного и центрального метаболизма ЭДТА у новых деструкторов. Несмотря на то, что были изучены первичные пути деградации ЭДТА у факультативных штаммов DSM 9103 и BNC1, пути центрального метаболизма до сих пор оставались невыясненными. При выращивании *C. oligotrophicus* LPM-4, *S. chelatiphaga* LPM-5, *Chelativorans* sp. LPM-6, LPM-410 на среде с ЭДТА, в качестве единственного источника углерода, азота и энергии нами обнаружены два промежуточных продукта деградации: глиоксилат (13–30 мкМ) и ионы аммония (40–80 мг/л) [80]. Кроме того, в культуральной жидкости обнаружено вещество, окрашиваемое нингидрином, тогда как ЭДТА не проявляется нингидрином. С использованием тонкослойной хроматографии и аминокислотного анализатора, показано, что это соединение содержит аминокислотную группу, но, не будучи аминокислотой, возможно, является этилендиамином.

Полярографические исследования показали, что клетки штаммов-деструкторов LPM-4, LPM-410, LPM-5, LPM-6 при внесении ЭДТА активно потребляли кислород. Анализ продуктов разложения ЭДТА экстрактами клеток исследуемых штаммов выявил, что одним из первых продуктов деградации является глиоксилат. Реакция разложения ЭДТА зависела от НАДН₂ и стимулировалась ФМН у штаммов LPM-4 и LPM-6, но не ФАД или рибофлавином. Следовательно, первым ферментом деградации ЭДТА у исследуемых штаммов была монооксигеназа, подобная обнаруженной ранее у штамма DSM 9103 [74]. В отличие от штаммов LPM-4 и DSM 9103, штамм LPM-5 обладает ФАД-стимулируемой ЭДТА-монооксигеназой, в то время как первый фермент деградации ЭДТА у штамма LPM-410 не стимулируется флавинами. ЭДТА-монооксигеназы у штаммов LPM-4, LPM-410 и LPM-5 активны в широком диапазоне рН, в отличие от известного штамма DSM 9103. Это существенно отличает первый фермент деградации ЭДТА у новых деструкторов. Нами показана высокая активность мо-

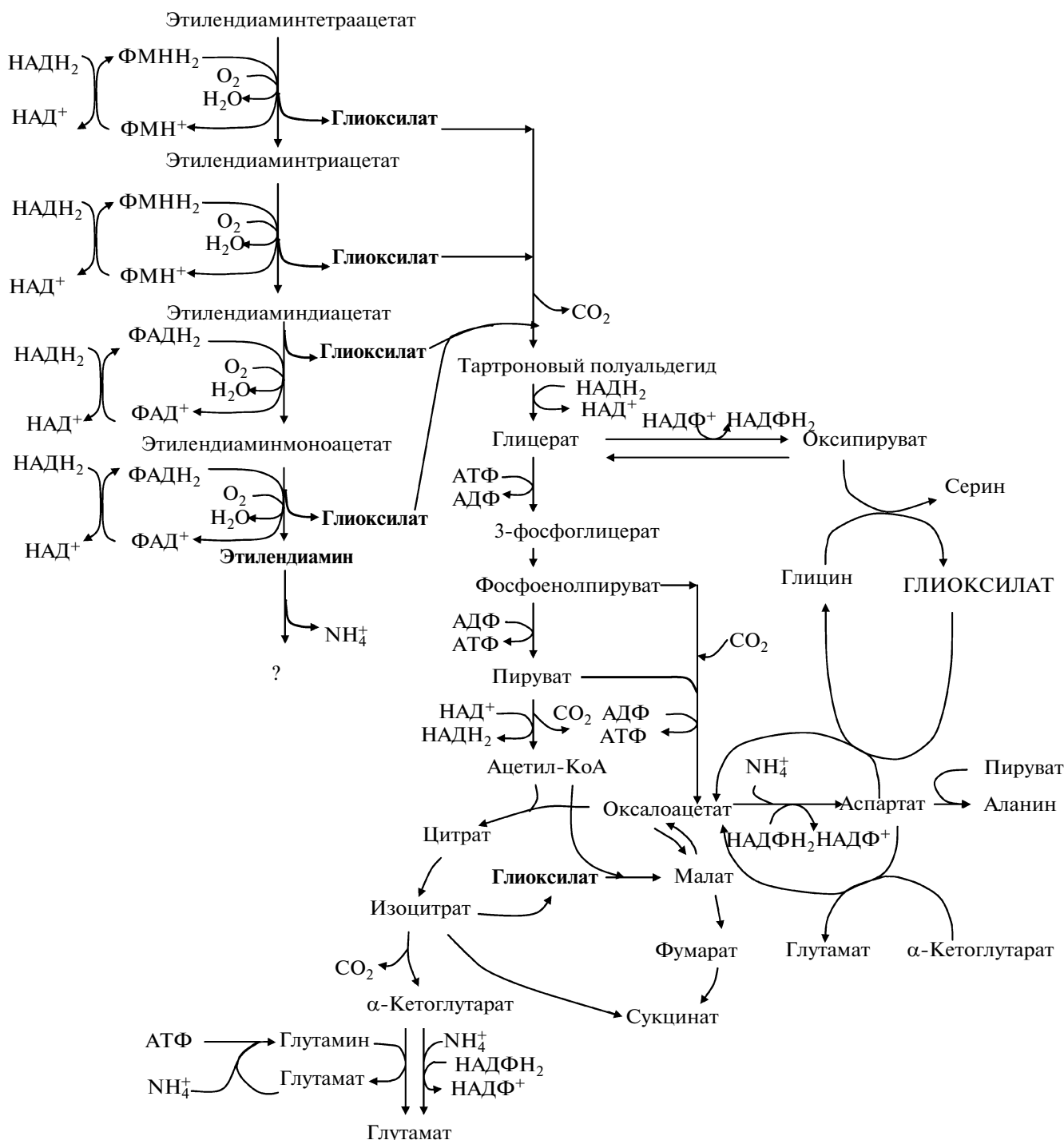


Рис. 5. Схема путей первичного и центрального метаболизма ЭДТА у облигатного деструктора *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4.

нооксигеназы у штаммов LPM-4 и LPM-410 при pH 8.0, а у штамма LPM-5 – при pH 7.4.

Использование “функциональных генов” позволяет оценить распространение различных групп микроорганизмов в биотопах. Нами была разработана система олигонуклеотидных прай-

меров на монооксигеназу ЭДТА [81]. Учитывая, что список бактерий, способных к деградации ЭДТА, весьма ограничен, объем выборки включал последовательности гена *emoA* из кластера генов, ответственных за разрушение ЭДТА, штамма BNC1 (AF176664) и гена *ntoA* деградации НТА у *Aminobacter aminovorans* ATCC 29600 (L49438).

Последовательности монооксигеназ других поллютантов значительно отличались от таковых *emoA*, что привело к высокой степени вырожденности разработанных нами праймеров. Были выбраны наиболее консервативные участки гена монооксигеназы, что позволило создать системы праймеров для амплификации генов *emoA* размером около 750 п. н. ДНК чистых культур деструкторов ЭДТА (*C. oligotrophicus* LPM-4, *C. multitrophicus* DSM 9103, *Chelativorans* sp. LPM-410, *Chelativorans* sp. LPM-6 и *S. chelatiphaga* LPM-5) использовали для проверки разработанных систем праймеров, а в качестве негативного контроля – ДНК *E.coli*. Для проверки того, что полученные ампликоны действительно являются фрагментами генов *emoA*, их секвенировали. Все выделенные ДНК имели 99.5–100% гомологию между секвенированными фрагментами генов *emoA* и *emoA* у штамма BNC1 [81]. Показано, что все новые и ранее известные деструкторы ЭДТА объединены в один кластер. Следует отметить, что род *Stenotrophomonas* принадлежит к классу *Gammaproteobacteria*, тогда как остальные исследованные штаммы–деструкторы ЭДТА являются представителями *Alphaproteobacteria*. Следовательно, предложенная система праймеров способна успешно выявлять фрагменты гена *emoA* у прокариот различных классов.

Энзимологический анализ, проведенный нами, у штаммов-деструкторов LPM-4, LPM-410, LPM-5 и LPM-6, выращенных на ЭДТА, показал, что первичные продукты деградации ЭДТА – глиоксилат и ионы аммония, далее вовлекаются в центральный метаболизм. Глиоксилат метаболизируется с участием малатсинтазы через глиоксилатный шунт и глицератный путь. Факультативные деструкторы ЭДТА штаммы LPM-410 и LPM-5 имеют замкнутый цикл Кребса, в отличие от облигатного (LPM-4) и ограниченно-факультативного штамма LPM-6, у которого цикл Кребса разомкнут на уровне α -кетоглутаратдегидрогеназы и отсутствуют ферменты гликолиза (6-фосфофруктокиназа и фруктозо-1,6-бисфосфатальдолаза). Очевидно, что обнаруженные метаболические дефекты являются одной из причин облигатной и ограниченно-факультативной зависимости от ЭДТА. Напротив, факультативные деструкторы LPM-410 и LPM-5 обладают активностями фруктозо-1,6-бисфосфатальдолазы, фруктозо-1,6-бисфосфатазы и 2-кето-3-дезоксиглюконоат альдолазы. Из этого следует, что данные штаммы ассимилируют глюкозу гликолитическим и пентозофосфатным путями. NH_4^+ ассимилируется посредством восстановительного аминирования пирувата или α -кетоглутарата и в реакциях трансаминирования. В анаэробной фиксации CO_2 у штаммов LPM-4 и LPM-410 участвуют пируваткарбоксилаза, ФЕП-карбоксилаза и ФЕП-карбоксикиназа. На основании результатов

энзимологического анализа нами предложена схема путей первичного и центрального метаболизма ЭДТА для наиболее детально изученного деструктора *C. oligotrophicus* LPM-4 (рис. 5). Используя праймеры на ИДА-оксидазу, показано, что *IdaA* штаммов BNC1 и LPM-4 имеют 99.7% сходства, что свидетельствует об участии ИДА оксидазы у штамма LPM-4 в окислении этилендиаминдиацетата до глиоксилата и этилендиамина [82].

Особый интерес представляло изучение способности *C. oligotrophicus* LPM-4 к двухфазному росту на смеси ЭДТА + глюкоза. Показано, что глюкоза не метаболизируется культурой в течение 48 ч и начинала потребляться только после значительного снижения концентрации ЭДТА в среде. Предполагается, что при этом глюкоза используется в качестве дополнительного источника углерода. Возможно, рост культуры на глюкозе после исчерпания ЭДТА в среде обусловлен использованием энергии накопленных полифосфатов, уровень которых снижался во второй фазе роста. Обнаруженное ингибирование гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы ЭДТА может быть одной из причин диауксии *C. oligotrophicus* LPM-4 на смеси ЭДТА с глюкозой [83].

Также установлено, что потребление ацетата клетками *C. oligotrophicus* LPM-4 происходило практически одновременно с использованием ЭДТА, тогда как сукцинат, фумарат, малат и цитрат потреблялись после значительного снижения концентрации ЭДТА в среде. *C. oligotrophicus* LPM-4 можно использовать на очистных сооружениях, поскольку присутствие органических кислот и сахаров не снижало способности культуры к деградации ЭДТА.

Применение деструкторов ЭДТА в экобиотехнологии. Многочисленные исследования показали, что значимого разрушения ЭДТА в очистных сооружениях практически не происходит. Большинство комплексов, которые образуются в результате взаимодействия ЭДТА с ионами металлов, в том числе тяжелых и токсичных, проникают в грунтовые и сточные воды, а также в питьевую воду. Проблема очистки от комплексов металл-ЭДТА может быть решена микробиологическим способом. Выделенные чистые культуры, использующие ЭДТА в качестве источников углерода, азота и энергии, перспективны как деструкторы этого соединения.

Первые работы по деградации ЭДТА смешанными культурами относятся к 1975 г. Исследовали биodeградацию (^{14}C)ЭДТА и комплексов смешанной культурой из почвы и осадков озера Мичиган. Свежеотобранную почву и осадки инкубировали с (^{14}C)ЭДТА и его комплексами в аэробных условиях. За исключением комплекса с Ni^{2+} , деградация которого проходила медленно, хелаты с Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} и Fe^{3+} , добавленные к смешанной культуре успешно разлагались [84]. Показана 90%-

ная деструкция комплекса (^{14}C)ЭДТА с железом смешанной культурой в течение 5 сут при оптимальном значении pH 7.0–8.0 и комнатной температуре [85]. Дegrаdация ЭДТА проходила успешнее при щелочных значениях pH 8.0–9.0, ее эффективность возрастала до 50% [6].

Факультативные деструкторы *C. multitrophicus* DSM 9103 и *C. multitrophicus* BNC1 также ранее использовали для очистки сточных вод от ЭДТА [86]. В случае *C. multitrophicus* DSM 9103 при добавлении к сточным водам растворов щелочноземельных металлов проходила деградация до 3.5 мМ ЭДТА, тогда как *Chelativorans multitrophicus* BNC1 разрушал до 16 мМ ЭДТА [58]. Имобилизованные клетки факультативного деструктора *C. multitrophicus* DSM 9103 использовали для определения низких концентраций ЭДТА, регистрируя скорость потребления кислорода [87]. Кроме того, недавно на основе иммобилизованных клеток облигатного деструктора *C. oligotrophicus* LPM-4 разработан биосенсор амперометрического типа, рабочий диапазон которого составил 0.1–4.0 мМ. Этот диапазон концентраций согласуется с физиологическими особенностями штамма LPM-4, который может использовать до 8 мМ ЭДТА.

Анализ доступной информации свидетельствует о наличии нескольких ЭДТА-деструкторов и детальном изучении первого этапа деградации. Получены данные по транспорту ЭДТА в клетки деструкторов. Клонирован и секвенирован генный кластер, участвующий в деградации этого вещества. Поскольку ЭДТА – исключительно техногенное соединение, появившееся в промышленных стоках относительно недавно, возникновение в природе штаммов, использующих ЭДТА в качестве единственного источника углерода, азота и энергии, свидетельствует о достаточно высокой скорости эволюционного процесса у бактерий, реализующих новые метаболические пути. Следовательно, облигатные и факультативные штаммы–деструкторы ЭДТА перспективны в качестве моделей для исследования механизмов адаптации бактерий к данному хелатону и для биоремедиации окружающей среды.

Работа выполнялась в рамках ГК 02.740.11.0296.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дятлова И.М., Темкина В.Я., Колпакова М.Д. Комплексоны и комплексонаты металлов. М.: Химия, 1988. 545 с.
2. Schwarzenbach G. // Helv. Chim. Acta. 1952. V. 35. P. 2344–2359.
3. Порой-Коненц М.А., Полюнова Т.Н. Координационная химия М.: Химия, 1984. 725 с.
4. Дятлова И.М., Темкина В.Я., Колпакова М.Д. Комплексоны. М.: Химия, 1970. 416 с.
5. Martell A.E., Smith, R.M. *Amino Acids*. New York: Plenum Press, 1974. V. 1. P. 469.
6. Bucheli-Witshel M., Egli T. // FEMS Microbiol Rev. 2001. V. 25. P. 69–106.
7. Munz F. Patent USA 2 130 505. 1938.
8. Nowack B., Van Briesen J.M. // Biogeochemistry of Chelating Agents. Eds B. Nowack and J.M. VanBriesen, ACS Symposium Series 910. Washington DC: Oxford Univ. Press for the Amer. Chem. Soc., 2005. P. 1–18.
9. Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Минкевич И.Г. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. 2007. № 2. С. 40–49.
10. Дедюхина Э.Г., Салмов Н., Чистякова Т.И., Минкевич И.Г., Вайнштейн М.Б. // Вода: химия и экология. 2008. № 2. С. 31–34.
11. Wolf K., Gilbert P.A., Hutzinger O. // The Handbook of Environmental Chemistry. Berlin: Springer, 1992. V. 3. P. 241–259.
12. Sillanpaa M. // Rev. Environ. Contam. Toxicol. 1997. V. 152. P. 85–111.
13. Kechrid Z., Amamra S., Dahdouh F., Bouzerna N. // Iranian J. Publ. Health. 2007. V. 36. P. 15–21.
14. Eklund B., Bruno E., Lithner G., Borg H. // Environ. Toxicol. Chem. 2002. V. 21. № 5. P. 1040–1051.
15. Suss H.U. // Restaurator. 2009. V. 30. P. 245–279.
16. Акользин П.А., Герасимов В.В. Коррозия конструкционных материалов ядерных и тепловых энергетических установок. М.: Высшая школа. 1963. 350 с.
17. Means J.L., Alexander C.A. // Nucl. Chem. Waste Manag. 1981. V. 2. P. 183–196.
18. Macaskie L.E. // Crit. Rev. Biotechnol. 1991. V. 11. P. 41–112.
19. Toste A.P., Lechner-Fish T.J. // Waste Manag. 1993. V. 13. P. 237–244.
20. Manville I., Moser R. // AMA Atrch. Indust. Health. 1955. V. 12. P. 528–538.
21. Casdorff H.R. // J. Holistic Medicine. 1981. V. 3. № 1. P. 53–59.
22. Olszwer E., Carter J. // Medical Hypotheses. 1988. V. 27. P. 41–49.
23. Gordon G.F. // J. Holistic. Medicine. 1986. V. 8. P. 79–80.
24. Schroeder H.A. // Chronic Diseases. 1956. V. 4. P. 461–468.
25. Alakomi H.-L., Saarela M., Helander I. M. // Microbiology. 2003. V. 149. P. 2015–2021.
26. Ferris F.G., Beveidge T.J., Doyle R.J. // J. Metal Ions and Bacteria. 1989. V. 102. P. 295–323.
27. Yuan Z., VanBriesen J.M. // Environ. Eng. Scie. 2006. V. 23. P. 533–544.
28. Alder A.C., Siegrist H., Gujer W., Giger W. // Water Res. 1990. V. 24. P. 733–742.
29. Egli T. // J. Biosci. Bioeng. 2001. V. 92. P. 89–97.
30. Oviedo C., Rodriguez J. // Quim. Nova. 2003. V. 26. P. 901–905.

31. Nowack B., Xue H., Stigg L. // Environ. Sci. Technol. 1997. V. 31. P. 866–872.
32. Kari F.G., Giger W. // Environ. Sci. Technol. 1995. V. 29. P. 2814–2827.
33. Anderson R.L., Bishop E.B., Campbell R.L. // Crit. Rev. Toxicol. 1985. V. 15. P. 1–102.
34. Hugenschmidt, S., Planas-Bohne, F., Taylor D. // Arch. Toxicol. 1993. V. 67. P. 76–78.
35. Lanigan R.S., Yamarik T.A. // Int. J. Toxicol. 2002. V. 21. P. 95–142.
36. Kari F.G., Giger W. // Water Res. 1996. V. 30. P. 122–134.
37. Lockhart H.B., Blakeley R.V. // Environ. Sci. Technol. 1975. V. 9. P. 1035–1038.
38. Natarajan P. and Endicott J.F. // J. Phys. Chem. 1973. V. 77. P. 2049–2054.
39. Alarcón E., Decap J., Vidal G. // Electronic J. Biotechnol. 2005. V. 8. № 3. P. 308–313.
40. Селиверстов А.Ф., Ершов Б.Г., Лагунова Ю.О., Морозов П.А., Камруков А.С., Шапковский С.Г. // Радиохимия. 2008. Т. 50. С. 62–65.
41. Babay P.A., Emilio C.A., Ferreyra R.E., Gautier E.A., Gettar R.T., Litter M.I. // Int. J. Photoenergy. 2001. V. 3. P. 193–199.
42. Nörtemann B. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 51. P. 751–759.
43. Gilbert E., Hoffmann-Glewe S. // Water Res. WATRAG. 1990. V. 24. P. 39–44.
44. Motekaitis R., Cox III X.B., Taylor P., Martell A.E., Miles B. Tvedt T.J. // Can. J. Chem. 1982. V. 60. № 10. P. 1207–1213.
45. Udovic M., Lestan D. // Water Air Soil Pollut. 2007. V. 181. P. 319–327.
46. Palumbo A.V., Lee S.Y., Borman P. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1994. V. 45/46. P. 811–822.
47. Chang H.S., Korshin G.V., Ferguson J.F. // Environ. Sci. Technol. 2006. V. 40. P. 5089–5090.
48. Nishikiori T., Okuyama T., Naganawa T., Takita T., Hamada M., Takeuchi Aouyagi T., Umezawa H. // J. Antibiot. 1984. V. 37. P. 426–427.
49. Auling G., Busse H.G., Egli T., El-Banna T., Stakebrandt E. // Syst. Appl. Microbiol. 1993. V. 16. P. 104–112.
50. Wilberg E., El-Banna T., Auling G., Egli T. // Syst. Appl. Microbiol. 1993. V. 16. P. 147–152.
51. Bolton H., Girvin D.C., Playmale A.E., Harvey S.D., Workman D.G. // Environ. Sci. Technol. 1996. V. 30. P. 931–938.
52. Сатрутдинов А.Д., Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Минкевич И.Г., Ерошин В.К. // Микробиология. 2003. Т. 72. № 1. С. 97–102.
53. Lauff J.J., Steele D.B., Coogan L.A., Breitfeller J.M. // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. P. 3346–3353.
54. Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr A., Sawada H. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. V. 51. P. 89–103.
55. Miyzaki H., Suzuki S., Imada K. // Environ. Sci. 1997. V. 10. P. 257–262.
56. Imada C., Harada Y., Kobayashi T., Hamada-Sato N., Watanabe E. // Mar. Biotechnol. (NY) 2005. V. 7. P. 21–25.
57. Suzuki Y., Koyama N. // Biodegradation. 2009. V. 20. P. 39–44.
58. Nörtemann B. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. P. 671–676.
59. Kluener T., Henneken L., Gehle M., Bruggenthies A., Norteman B., Hempel D.C. // Bioforum. 1994. V. 17. P. 284–288.
60. Yuan Z., VanBriesen J.M. // Biogeochemistry of Chelating Agents. Ed. B. Nowack, J.M. VanBriesen, ACS Symposium Series 910. Washington DC: Oxford Univ. Press for the Amer. Chem. Soc., 2005. P. 139–148.
61. Nörtemann B. // Biogeochemistry of Chelating Agents. Ed. B. Nowack, J.M. VanBriesen, ACS Symposium Series 910. Washington DC: Oxford Univ. Press for the Amer. Chem. Soc. 2005. P. 150–170.
62. Witschel M., Egli T., Wehrli E., Zehnder A., Spycher M. // Microbiology (UK). 1999. V. 154. P. 973–983.
63. Weilenmann H.-U., Engeli B., Bucheli-Witschel M., Egli T. // Biodegradation. 2004. V. 15. P. 289–301.
64. Satrutdinov A.D., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Witschel M., Minkevich I.G., Eroshin V.K., Egli T. // Environ. Sci. Technol. 2000. V. 34. P. 1715–1720.
65. Chen S.C., Chen S.-L., Fang H.Y. // Biores. Technology. 2005. V. 96. P. 1782–1787.
66. Chistyakova T.I., Belikova V.L., Satrutdinov A.D., Dedyukhina E.G., Eroshin V.K. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 19. P. 977–980.
67. Chistyakova T.I., Dedyukhina E.G., Satrutdinov A.D., Kaparullina E.N., Gavriush E.Yu., Eroshin V.K. // Proc. Biochem. 2005. V. 40. № 2. P. 601–605.
68. Thomas R.A.P., Lawlor K., Bailey M., Macaski L.E. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 1319–1322.
69. Doronina N.V., Kaparullina E.N., Trotsenko Yu.A., Nörtemann B., Bucheli-Witschel M., Weilenmann H.-U., Egli T. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 1044–1051.
70. Kaparullina E., Doronina N., Chistyakova T., Trotsenko Yu. // Syst. Appl. Microbiol. 2009. V. 32. № 3. P. 157–162.
71. Uetz T., Schneider R., Snozzi M., Egli T. // J. Bacteriol. 1992. V. 174. P. 1179–1188.
72. Uetz T., Egli T. // Biodegradation. 1993. V. 3. P. 423–434.
73. Knobel H.R., Egli T., Van den Meer J.R. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. № 21. P. 6123–6132.
74. Witschel M., Nagel S., Egli T. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 6937–6943.
75. Payne J. W., Bolton H., Campbell J. A., Xun L. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 3823–3827.

76. Bohuslavek J., Payne J.W., Liu Y., Bolton H., Hun L. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. № 2. P. 688–695.
77. Nissen M.S., Youn B., Knowles B.D., Ballinger J.W., Jun S.Y., Belchik S.M., Hun L., Kang C. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 28710–28720.
78. Liu Y., Louie T. M., Payne J., Bohuslavek J., Bolton Jr. H., Hun L. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 696–701.
79. Zhang H., Herman J.P., Bolton H., Zhang Z., Clark S., Hun L. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. P. 7991–7997.
80. Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Вайнштейн М.Б., Троценко Ю.А. // *Микробиология.* 2006. Т. 75. № 4. С. 420–423.
81. Капаруллина Е.Н., Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2008. Т. 44. № 4. С. 399–403.
82. Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А., Алферов В.А. // *Известия ТулГУ. Естественные науки.* 2010. № 2. С. 271–278.
83. Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Трилисенко Л.В., Вагабов В.М., Троценко Ю.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2009. Т. 45. С. 555–560.
84. Tiedje J.M. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1975. V. 30. P. 327–329.
85. Belly R.T., Lauff J.J., Goodhue C.T. // *Appl. Microbiol.* 1975. V. 29. P. 787–794.
86. Henneken L., Noertemann B., Hempel D.C. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V. 44. P. 190–179.
87. Eroshin V.K., Satroutdinov A.D., Minkevich I.G., Deduykhina E.G., Chistykhova T.I., Reshetilov A.N. // *Process Biochem.* 2002. V. 38. P. 151–154.

Aerobic Degradation of Ethylenediaminetetraacetate (Review)

E. N. Kaparullina, N. V. Doronina, and Yu. A. Trotsenko

Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Received December 17, 2010

Abstract—Literature data on the influence of complexing compound ethylenediaminetetraacetate (EDTA) on environmental and ecological risks related with its application were analyzed and summarized. Methods of abiotic and biotic degradation of EDTA were systemized. Special attention was paid to microbiological degradation of EDTA was paid. Data on EDTA transport and metabolism pathways in aerobic bacteria are represented. The practical aspects of application of aerobic bacteria-destroyers of EDTA in ecobiotechnology were discussed.

УДК 577.112.083

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ РЕНАТУРАЦИЯ ИММОБИЛИЗОВАННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО С-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА ЧЕЛОВЕКА

© 2011 г. О. А. Шарапова*, М. С. Юркова**, С. М. Андропова**, А. Н. Фёдоров**, С. Е. Северин*, Е. С. Северин**

*Московский научно-исследовательский институт медицинской экологии, Москва, 117638
e-mail: sharapova_o@hotmail.com

**Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва, 117638

Поступила в редакцию 01.03.2011 г.

С-концевой фрагмент человеческого онкофетального белка альфа-фетопротейна (АФП) может быть использован для адресной доставки цитостатиков к раковым клеткам многих видов опухолей. Фрагмент АФП (с 404 по 595 аминокислотный остаток полноразмерного белка) был клонирован и продуцирован в клетках *Escherichia coli*, штамм BL21 (DE3) в виде телец включения. Для получения функционально активного белка необходимо проводить его ренатурацию. Процедура ренатурации третьего домена АФП (rAFP3D) значительно усложняется тем, что данный белок является гидрофобным и содержит большое количество S–S-связей. Была разработана методика ренатурации rAFP3D иммобилизованного на кремниевой металл-хелатной смоле. Выход ренатурированного С-концевого фрагмента составил не менее 60% с чистотой порядка 98%. Разработанная методика была впервые применена для гидрофобного белка с большим количеством S–S-связей. Данный подход может быть применен для эффективной ренатурации других гидрофобных белков с большим количеством дисульфидных связей для научных и практических целей.

Альфа-фетопротейн (АФП) является основным сывороточным белком, характерным для эмбрионального периода развития человека [1]. В норме в постэмбриональный период развития АФП отсутствует в сыворотке крови. Появление этого белка в этот период в сыворотке крови человека указывает на развитие различных опухолевых заболеваний (первичный рак печени, тетракарцинома и пр.) [2, 3]. Методом электронной микроскопии была продемонстрирована трехдоменная организация молекулы АФП [4]. Данный белок проникает в клетку с помощью рецепторопосредованного эндоцитоза [5]. Белок, играющий роль рецептора для АФП (РАФП), также является онкофетальным белком: он экспрессируется во многих видах раковых клеток, но не в нормальных клетках организма в постэмбриональный период [6, 7]. Существуют данные о том, что конъюгаты природного АФП с цитостатиками избирательно ингибируют рост раковых клеток *in vivo* и *in vitro* [8–10]. Таким образом, наличие специфического взаимодействия АФП со своим рецептором позволяет создавать на основе АФП конъюгаты с цитостатиками для их адресной доставки к раковым клеткам. Такие конъюгаты могут быть исполь-

зованы для создания новых противораковых лекарств, практическое применение которых может значительно улучшить противораковую терапию.

Участок связывания АФП с рецептором находится в третьем домене [11], поэтому для целевой доставки лекарств достаточно использовать рекомбинантный третий домен АФП (rAFP3D) вместо полноразмерного белка. Ранее нами была создана высокоэффективная система для продукции rAFP3D в клетках *Escherichia coli* [12]. Рекомбинантный третий домен продуцировался в тельца включения (ТВ), поэтому для получения функционально активного белка необходимо проводить его ренатурацию [13, 14]. Для практического использования данного белка в крупных масштабах необходимо, чтобы методика его получения была высокоэффективной и с минимальной затратой материалов. Процедура ренатурации третьего домена значительно усложняется тем, что данный белок является гидрофобным и содержит большое количество S–S-связей. Поэтому разработка эффективной методики ренатурации является основной трудностью при получении функционального рекомбинантного третьего домена АФП.

Во время ренатурации образуются частично свернутые белковые молекулы, агрегация которых значительно снижает эффективность процесса. Таким образом, основная задача заключается в сведении к минимуму взаимодействия между та-

Принятые сокращения: АФП – альфа-фетопротейн человека; РАФП – рецептор альфа-фетопротейна; ТВ – тельца включения; rAFP3D – рекомбинантный третий домен альфа-фетопротейна; LB – среда Лаурия–Бертани; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; КД – круговой дихроизм; УЗ – ультразвук.

кими интермедиатами в этом процессе. Традиционно для этого проводят ренатурацию методом разбавления, т.е. при очень низкой концентрации белка [15]. К сожалению, в большинстве случаев такой подход не обеспечивает эффективную ренатурацию гидрофобных и содержащих большое количество дисульфидных связей белков [16].

Альтернативным подходом к сворачиванию белков *in vitro* является сворачивание белков, иммобилизованных на твердой фазе. Суть метода состоит в том, что денатурированный белок иммобилизуют на смоле и затем ренатурируют, удаляя денатурант. Таким образом, в процессе ренатурации молекулы белка изолированы друг от друга и вероятность их агрегации уменьшается. Широко используемой разновидностью ренатурации на твердой фазе является ренатурация белка, иммобилизованного на металло-хелатной смоле. Преимуществом данного метода является то, что белок иммобилизован за счет гистидинового тага, при этом вся белковая молекула может свободно колебаться в растворе во время ренатурации. В то же время гидрофобные взаимодействия между частично свернутыми белковыми молекулами сведены к минимуму.

При ренатурации белков на смоле чаще всего используются матрицы на основе углеводов (агароза, декстроза и пр.). Установлено, что при ренатурации полноразмерного АФП на агарозной смоле большая часть белка необратимо связывалась с матрицей и не элюировалась [17]. Использование в качестве основы для матрицы оксида кремния, как более инертного материала, возможно, позволило бы снизить необратимое связывание белковых молекул со смолой во время ренатурации.

Цель исследования – разработка эффективной методики ренатурации иммобилизованного третьего домена АФП, пригодной для ее практического применения.

МЕТОДИКА

Создание конструкции для продукции третьего домена АФП (гAFP3D) в *Escherichia coli*. Из линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, экспрессирующих белок АФП, была выделена тотальная мРНК [18]. Для создания конструкции были использованы стандартные молекулярно-генетические методики [19]. С помощью реакции обратной транскрипции была синтезирована кДНК, кодирующая полноразмерный белок АФП, которую использовали в качестве матрицы для получения фрагмента гена, кодирующего С-концевой фрагмент белка (остатки 404–595 полноразмерного АФП) – гAFP3D.

В нуклеотидной последовательности, кодирующей гAFP3D, был заменен тандем кодонов

AGG, кодирующих Arg508 и Arg509, на изоакцепторные кодоны CGT и CGC.

При амплификации итоговой нуклеотидной последовательности гAFP3D были использованы следующие праймеры (5'–3'):

GGGAATTCCATATGTACATCCAGGAGAGC-CAAGCATT (прямой) содержит сайт расщепления рестриктазы NdeI (выделено курсивом), за которым следует последовательность нуклеотидов, представляющая 5'-конец С-концевого фрагмента АФП;

AAGAATGTCGACTTAGTGATGGTGATGGTG-ATGGTGCTCTTCAGCAAAGCAGACTTCCCT (обратный) был сконструирован так, что после 23 оснований, комплементарных последовательности 3'-конца С-концевого фрагмента АФП (выделено жирным шрифтом), следовала последовательность, кодирующая 7 гистидинов, комплементарный стоп-кодону триплет TTA и сайт расщепления рестриктазы SalI (выделен курсивом).

Полученная нуклеотидная последовательность была клонирована в модифицированную плазмиду pET11c (“Novagen”, Германия): в полилинкер коммерческой плазмиды были добавлены сайты расщепления рестриктаз SmaI, KpnI, XhoI, SalI [19].

Производство гAFP3D. Полученную плазмиду, содержащую модифицированную последовательность, кодирующую гAFP3D, трансформировали в клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) (*E. coli* В F⁻ dcm ompT hsdS(r_B- m_B-) gal λ(DE3) (“Novagen”, Германия)). Производство белка индуцировали добавлением изопропил-β-D-тиогаалактопиранозиды (“Sigma-Aldrich”, США) в конечной концентрации 0.4 mM. Производство проводили при температуре 37°C в течение 3 ч в среде LB (“Sigma-Aldrich”, США) с ампициллином (“Sigma-Aldrich”, США). Индуктор добавляли при оптической плотности культуры 0.5–0.6 D₆₀₀ [19].

После продукции клетки осаждали центрифугированием и осадок хранили при –20°C.

Выделение и очистка телец включения. Осадок клеток после индукции ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ – 1.7 mM KН₂РO₄, 5.2 mM Na₂НРO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4) дополнительно содержащем 0.1 M NaCl и 1 mM 4-(2-аминоэтил) бензол-сульфонилфторид (“Melford Lab.”, США) при комнатной температуре. Суспензию обрабатывали ультразвуком (УЗ) 2 раза по 40 с при 0°C. После этого добавляли Тритон X-100 до конечной концентрации 1% и снова обрабатывали УЗ при тех же условиях. Суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g (“Beckman”, JA-14, Германия). Осадок ресуспендировали в ФСБ, pH 7.4, дополнительно содержащем 0.1 M NaCl и 0.1%-ный дезоксихолат натрия, и обрабатывали УЗ в течение 40 с при 0°C. Суспензию центрифугировали в течение 10 мин при

12000 g. Осадок ресуспендировали в ФСБ, рН 7.4, и вновь центрифугировали, как описано выше.

Полученный осадок телец включения хранили при -20°C .

Ренатурация гAFP3D, иммобилизованного на кремниевой металло-хелатной смоле. В качестве носителя использовалась кремниевая смола His-Link (“Promega”, США). Осадок телец включения ресуспендировали в солибилизирующем буфере (0.05 M Na_3BO_3 , рН 8.6, содержащем 8 M мочевины, 12 mM β -меркаптоэтанол и 10 mM имидазол). Раствор инкубировали в течение 5 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании до полного растворения осадка. Суспензию центрифугировали 15 мин при 13000 g и 7°C . На смолу HisLink, уравновешенную тем же буфером, наносили супернатант и инкубировали минимум 30 мин при комнатной температуре. Смолу промывали 3 раза по 10 объемов в течение 10 мин ФСБ, рН 8.0, содержащим 8 M мочевины, 12 mM β -меркаптоэтанол и 10 mM имидазол. К смоле добавляли 10-кратный избыток ренатурирующего буфера, содержащего 10 mM имидазол, и инкубировали в течение 4 ч при постоянном перемешивании при 4°C . Белок элюировали 2 раза в течение 10 мин 1 объемом ФСБ, рН 8.0, содержащего 800 mM имидазол, при 4°C . При необходимости белок диализовали против 1000-кратного избытка ФСБ, рН 8.0, при 4°C в течение ночи.

Ренатурированный белок хранили при -20°C .

Выделение и очистка гAFP3D с помощью металло-хелатной хроматографии на агарозной Ni-NTA смоле. Осадок телец включения после очистки растворяли в солибилизирующем буфере (0.05 M Na_3BO_3 , рН 8.6, содержащем 8 M мочевины и 12 mM β -меркаптоэтанол). Раствор инкубировали в течение 5 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании до полного растворения осадка. Суспензию центрифугировали 15 мин при 13000 g и 7°C .

На смолу Ni-NTA (“Qiagen”, США), уравновешенную солибилизирующим буфером, наносили супернатант и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Смолу промывали 30 объемами ФСБ, рН 8.0, содержащего 8 M мочевины и 15 mM имидазол. Белок элюировали ФСБ, рН 8.0, содержащим 8 M мочевины и 0.3 M имидазол.

Ренатурация очищенного гAFP3D методом быстрого разбавления. Очищенный гAFP3D (1–2 мг/мл) ренатурировали быстрым разбавлением при постоянном перемешивании в 100-кратном избытке ренатурирующего буфера (ФСБ, рН 8.0, 5 mM глутатион восстановленный, 1 mM глутатион окисленный) до конечной концентрации 0.01–0.02 мг/мл и инкубировали в течение 2 сут при 4°C при постоянном перемешивании. Далее в ренатурирующий буфер с белком вносили смолу Ni-NTA (на 5 мг белка 1 мл смолы), уравновешен-

ную ренатурирующим буфером, и инкубировали еще 1 сут при перемешивании и 4°C . После этого смолу переносили в колонку, промывали ФСБ, рН 8.0, и элюировали тем же буфером, содержащим 300 mM имидазол. Далее раствор ренатурированного белка диализовали против ФСБ, рН 8.0, при 4°C в течение 1 сут.

Ренатурированный белок хранили при -20°C .

Содержание белка в пробах определяли денситометрией ДДС–ПААГ электрофоретических с помощью программного обеспечения OnedScan (“Stratagene”, США). Использовали белковые маркеры молекулярных масс (“Fermentas”, Литва) для оценки относительной электрофоретической подвижности исследуемого белка.

Определение свободных сульфгидрильных групп. Свободные сульфгидрильные группы определяли после процедуры ренатурации по методу Элмана [20].

Аналитическая хроматография. Гель-фильтрацию проводили на приборе Breeze (“Waters”, США), на колонке BioSuite 450 HR SEC 7.8×300 мм в ФСБ, рН 7.4, при скорости потока 1 мл/мин с детекцией белка при 280 нм. В качестве стандартов молекулярной массы использовали (M, кДа): ферритин (440), бычий сывороточный альбумин (134 и 67 для димера и мономера соответственно), белок человека CD81 (30), лизоцим (14).

Хроматографию в обращенной фазе осуществляли на приборе Breeze (“Waters”, США), на колонке Symmetry300 C4 5 mm 3.9×150 мм, в линейном градиенте ацетонитрила (0–100%, 60 мин) с добавлением 0.1% трифторуксусной кислоты при скорости потока 0.5 мл/мин с детекцией белка при 214 и 280 нм.

Круговой дихроизм. Исследование вторичной структуры ренатурированного белка проводили с использованием спектроскопии КД на спектрополяриметре “JASCO-810” (Япония) в диапазоне длин волн от 190 до 250 нм. Значения молярной эллиптичности рассчитывали из уравнения: $[\theta] = [\theta]_{\text{изм}} M_{\text{ост}} / (LC)$, в котором C – концентрация белка (мг/мл), L – длина оптического пути кюветы (мм), $[\theta]_{\text{изм}}$ – измеренная эллиптичность (градусы) и $M_{\text{ост}}$ – средняя молекулярная масса остатка пептида (Да), рассчитанная из его аминокислотной последовательности. Измерения проводили в 1 мм кювете при концентрации белка 0.03 мг/мл в ФСБ, рН 7.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально для ренатурации гAFP3D использовали смолу Ni-NTA, с помощью которой проводили очистку белка в предыдущей работе [12]. К сожалению, белок после ренатурации не элюировался со смолы высокими концентрациями имидазола ни в нативных буферах, ни в растворах с добавлением денатурирующих агентов.

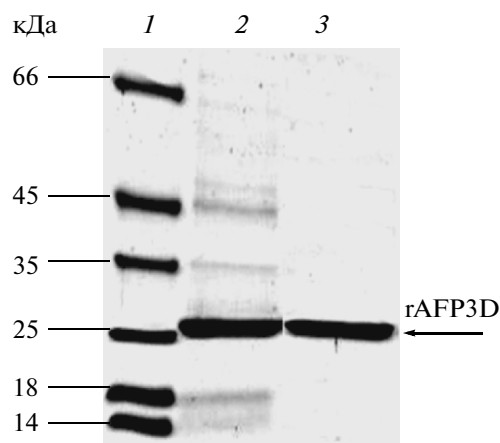


Рис. 1. Электрофоретический анализ (ДДС-ПААГ-электрофорез) rAFP3D до (2) и после (3) ренатурации; 1 – белковые маркеры молекулярных масс.

Исходя из этого, можно заключить, что в процессе ренатурации молекулы белка необратимо связывались с углеводной матрицей смолы – агарозой. Известно, что агароза – это полимер, состоящий из дисахаридов, т.е. достаточно реакционно-активный материал. Возможно, что в процессе ренатурации несвернутые белковые молекулы связываются с агарозой матрицей посредством гидрофобных связей и/или реакционно-способных групп (SH-, NH₂- и т.д.), и поэтому впоследствии не элюируются со смолы.

Другим широко используемым носителем в качестве основы для смол может служить силикагель. По сравнению с агарозой, силикагель является химически инертным материалом. Для ренатурации rAFP3D была использована смола на основе силикагеля HisLink. Состав ренатурирующего буфера был такой же, как при ренатурации разбавлением (см. Методика).

Белок в концентрации 1 мг/мл ренатурировали на смоле в течение 1–24 ч. Наилучший выход ренатурированного белка составил 60% после 4 ч инкубации. Чистота ренатурированного белка составила не менее 98% (рис. 1). По результатам ДДС-ПААГ-электрофореза при нанесении 1 мг белка весь материал связывался со смолой. В элюате после ренатурации анализ показывал наличие 0.6 мг белка. Основные потери rAFP3D происходили в результате необратимого связывания со смолой в процессе ренатурации.

Принято считать, что при ренатурации белка на смоле, упакованной в колонку, увеличение количества наносимого белка коррелирует с уменьшением выхода ренатурации из-за большей агрегации белковых молекул [21]. Причиной этого может быть неравномерное распределение белковых молекул на колонке в процессе нанесения. Локальное повышение концентрации белка в какой-либо части ко-

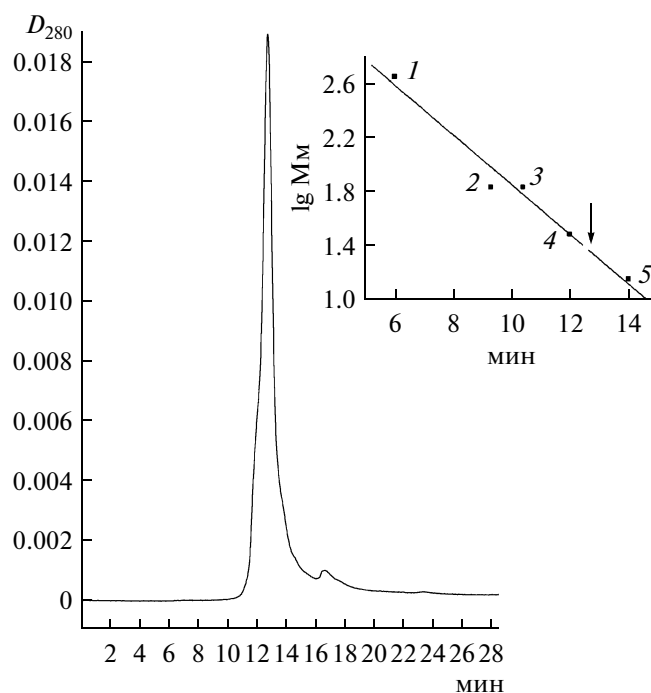


Рис. 2. Гель-фильтрация ренатурированного rAFP3D в ФСБ. Во вставке представлена зависимость времени выхода от молекулярного веса белковых стандартов молекулярной массы: 1 – ферритин (440 кДа), 2 и 3 – бычий сывороточный альбумин, димерная (134 кДа) и мономерная (67 кДа) формы, 4 – человеческий CD81 (30 кДа), 5 – лизоцим (14 кДа). Стрелкой обозначено время выхода rAFP3D.

лонки может способствовать агрегации при переводе в ренатурирующие условия и тем самым уменьшать выход ренатурированного белка [17]. Было изучено влияние количества нанесенного белка на выход ренатурации. Разные количества rAFP3D (0.5–10.0 мг) наносили на один и тот же объем смолы (1 мл) и ренатурировали при одинаковых условиях (см. Методика). Выход ренатурации не зависел от количества нанесенного белка в исследуемом диапазоне и составлял 60–65%. Такой результат можно объяснить тем, что при взаимодействии белка со смолой в пробирке его распределение происходит более равномерно, чем при нанесении на смолу, упакованную в колонку. Как следствие, выход ренатурации не зависит от количества нанесенного белка.

Рассчитанная по времени выхода с колонки при проведении гель-фильтрации молекулярная масса rAFP3D составила 26 кДа, что близко к теоретической. Высокомолекулярные формы и агрегаты отсутствовали в детектируемых количествах (рис. 2). При проведении хроматографии в обращенных фазах в препарате определялся только один пик (рис. 3). Это подтверждает гомогенность выделенного препарата белка. В препарате полученного

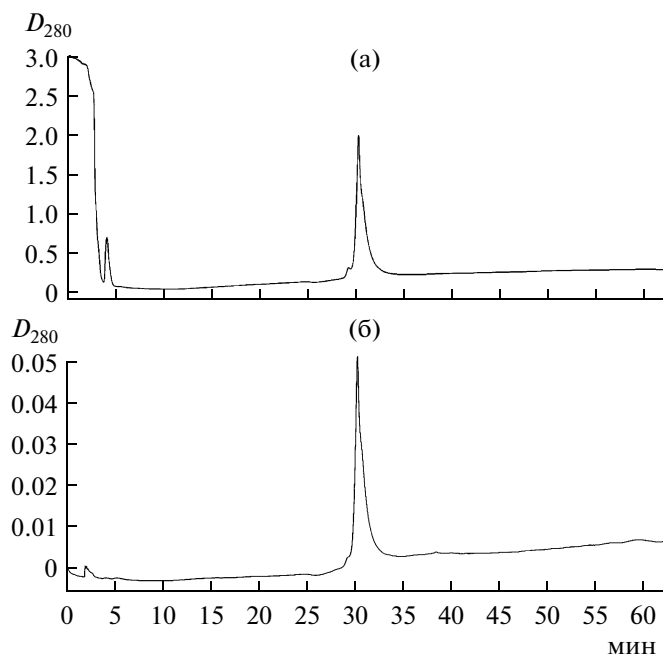


Рис. 3. Хроматография в обращенных фазах ренатурированного gAFP3D. Оптическую плотность измеряли при 214 (а) и 280 (б) нм. Хроматографию осуществляли в линейном градиенте ацетонитрила (0–100%, 60 мин) с добавлением 0.1% трифторуксусной кислоты при скорости потока 0.5 мл/мин.

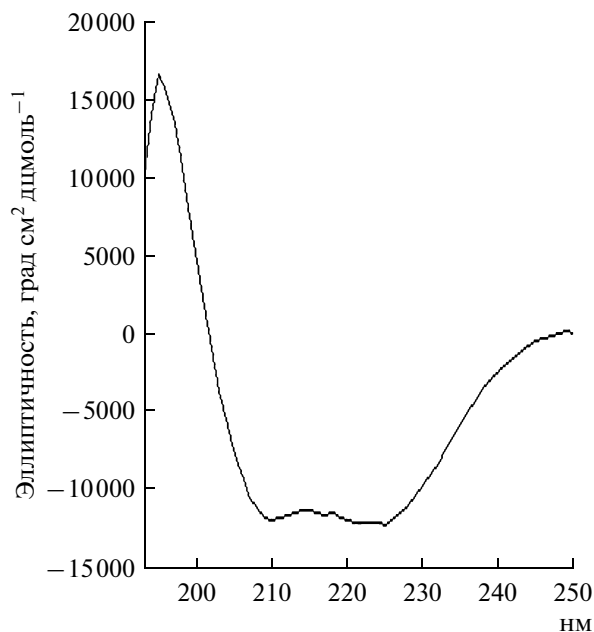


Рис. 4. Спектр кругового дихроизма ренатурированного gAFP3D.

белка отсутствовали свободные сульфгидрильные группы (определяли по методу Элмана).

Вторичная структура ренатурированного gAFP3D была проанализирована методом КД (рис. 4). Анализ показал, что вторичная структура ренатурированного белка состоит преимущественно из α -спиралей, так как профиль КД имеет ярко выраженные пики на 199, 208 и 222 нм. Полученный профиль КД сходен с результатами анализа полноразмерного природного АФП и

функционально активного gAFP3D, ренатурированного разбавлением [12, 22].

Вышеизложенные результаты позволяют предположить, что ренатурированный gAFP3D образовал пространственную структуру, соответствующую таковой в природном АФП.

Для сравнения разных способов ренатурации gAFP3D в качестве контроля была проведена ренатурация разбавлением. Концентрация белка при ренатурации составила 0.01–0.02 мг/мл, выход ренатурированного белка составил 50% с чистотой порядка 95%.

Выходы белка при ренатурации на смоле и разбавлением были близки и составили 60 и 50% соот-

Сравнение экспериментальных параметров ренатурации на смоле и ренатурации разбавлением

Экспериментальный параметр	Смола	Разбавление
Исходное количество gAFP3D, мг	1	1
Объем ренатурирующего буфера, мл	10	100
Время ренатурации, ч	4	48
Концентрация gAFP3D при ренатурации, мг/мл	0.1	0.01
Выход ренатурированного gAFP3D, %*	60	50
Чистота ренатурированного gAFP3D, %*	98	95
Продуктивность ренатурации (мг мл ⁻¹ ч ⁻¹)	0.015	0.01 × 10 ⁻²

* Определяли денситометрией электрофореграмм с помощью программы OnedScan (“Stratagen”, США).

ответственно. Основные различия заключались в необходимом времени ренатурации и количестве ренатурирующего буфера (таблица). Поэтому с точки зрения практического получения белка более адекватным будет сравнение продуктивности ренатурации, которая определялась по уравнению:

$$P = \frac{YM}{Vt100\%}, \quad (1)$$

где P – продуктивность ренатурации ($\text{мг мл}^{-1} \text{ч}^{-1}$), Y – выход ренатурированного белка, %, M – исходное количество белка, взятого для ренатурации, мг, V – объем ренатурирующего буфера, мл, t – время ренатурации, ч.

Значительное превосходство продуктивности ренатурации на смоле по сравнению с ренатурацией разбавлением объясняется меньшим временем инкубации и меньшим объемом ренатурирующего буфера (таблица). При этом чистота белка после ренатурации на смоле была выше, чем при ренатурации разбавлением. Необходимость концентрировать и дополнительно очищать белок после ренатурации разбавлением вносит определенные трудности в процесс получения функционального белка.

Результаты свидетельствуют о том, что ренатурация rAFP3D иммобилизованного на смоле по продуктивности значительно превосходит ренатурацию методом разбавления. Данный способ ренатурации впервые применен с высокой эффективностью для гидрофобного белка с большим количеством дисульфидных связей. Основа смолы, на которой иммобилизовали белок для ренатурации, имела огромное влияние на эффективность процедуры. Использование смолы на основе силикагеля, вместо традиционно используемых агарозных смол, позволило значительно улучшить эффективность ренатурации (от практически 0 до 60%). Использование такой смолы на основе силикагеля для ренатурации иммобилизованных белков, по свойствам сходных с rAFP3D, т.е. гидрофобных и содержащих большое количество дисульфидных связей, может позволить расширить спектр как исследуемых в науке белков, так и применяемых для практических целей.

Приносим благодарность Б.С. Мельнику за измерение спектров кругового дихроизма.

Работа была поддержана грантом РФФИ (№ 09-04-12281-офи_м).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bergstrand C.G., Czar B. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1956. V. 8. № 2. P. 174.
2. Abelev G.I. // Adv. Cancer. Res. 1971. V. 14. P. 295–358.
3. Gillespie J.R., Uversky V.N. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1480. № 1–2. P. 41–56.
4. Luft A.J., Lorscheider F.L. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 25. P. 5978–5981.
5. Villacampa M.J., Moro R., Naval J., Faily-Crepin C., Lampreave F., Uriel J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1984. V. 122. № 3. P. 1322–1327.
6. Geuskens M., Dupressoir T., Uriel J. // J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 1991. V. 23. № 1. P. 59–66.
7. Ницетов М.Б., Москалева Е.Ю., Посыпанова Г.А., Макарова О.В., Степанов В.А., Рогов К.А., Коромылова И.А., Караулов А.В., Северин С.Е., Северин Е.С. // Иммунология. 2005. Т. 26. № 2. С. 122–125.
8. Severin S.E., Posypanova G.A., Shmyrev I.I., Gerasimova G.K., Zhukova O.S., Vorozhtsov G.N., Kaliya O.L., Lukyanets E.A., Severin E.S. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1997. V. 43. № 4. P. 1081–1089.
9. Северин С.Е., Посыпанова Г.А., Сотниченко А.И., Москалева Е.Ю., Фельдман Н.Б., Григорьев М.И., Северин Е.С., Петров Р.В. // Докл. РАН. 1999. Т. 366. № 4. С. 561–564.
10. Ницетов М.Б., Родина А.В., Москалева Е.Ю., Посыпанова Г.А., Попова О.Н., Сологуб В.К., Коромылова И.А., Шмырев И.И., Сотниченко А.И., Заболотнев Д.В., Караулов А.В., Северин С.Е. // Вopr. биол. мед. фарм. химии. 2001. Т. 3. № 2. С. 19–25.
11. Mizejewski G.J. // Exp. Biol. Med (Maywood). 2001. T. 226. № 5. С. 377–408.
12. Sharapova O.A., Pozdnykova N.V., Laurinavichyuten D.K., Yurkova M.S., Posypanova G.A., Fedorov A.N., Severin S.E., Severin E.S. // Protein Expr. Purif. 2010. V. 73. № 1. P. 31–35.
13. Bowden G.A., Paredes A.M., Georgiou G. // Biotechnology (N.Y.). 1991. V. 9. № 8. P. 725–730.
14. Ventura S., Villaverde A. // Trends. Biotechnol. 2006. V. 24. № 4. P. 179–185.
15. Valejo L.F., Rinas U. // Microb. Cell Fact. 2004. V. 3. № 1. P. 11.
16. Jaenicke R. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 1987. V. 49. № 2–3. P. 117–237.
17. Chen Y., Leong S.S. // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216. № 24. P. 4877–4886.
18. Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. № 1. P. 156–159.
19. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 420 с.
20. Ellman G.L. // Arch. Biochem. Biophys. 1959. V. 82. № 1. P. 70–77.
21. Stempfer G., Höll-Neugebauer B., Rudolph R. // Nat. Biotechnol. 1996. V. 14. № 3. P. 329–334.
22. Leong S.S., Middelbegr A.P. // Biotechnol. Bioeng. 2007. V. 97. № 1. P. 99–117.

High-Efficient Renaturation of Immobilized Recombinant C-Terminal Fragment of Human Alpha-Fetoprotein

O. A. Sharapova^a, M. S. Yurkova^b, S. M. Andronova^b, A. N. Fedorov^b,
S. E. Severin^a, and E. S. Severin^b

^a *Moscow Research Institute of Medical Ecology, Moscow, 117638 Russia*

e-mail: sharapova_o@hotmail.ru

^b *All-Russia Center for Molecular Diagnostics and Treatment, Moscow, 117638 Russia*

e-mail: sharapova_o@hotmail.ru

Received March 1, 2011

Abstract—C-terminal fragment of a human oncofetal alpha-fetoprotein (AFP) may be used in targeted cyto-statics delivery to malignant cells of many tumors. AFP fragment (from 404 to 595 amino acids residues of a full-sized protein) was cloned and produced in *Escherichia coli* cells, BL21 strain (DE3) in the form of inclusion bodies. To obtain a functionally active protein, it is necessary to renature the protein. The renaturation procedure of the AFP third domain (rAFP3D) is considerably complicated by the fact that the protein is hydrophobic and contains a large number of S–S bonds. A renaturation technique of rAFP3D immobilized on silicic metal chelate resin has been developed. The yield of renatured C-terminal fragment was no less than 60% with purity on the order of 98%. The developed technique has been applied for the first time for hydrophobic protein with a large number of S–S bonds. The approach can be applied for efficient renaturation of other hydrophobic proteins with a large number of disulfide bonds for scientific and practical purposes.

УДК 577.19:577.152.321

ВЛИЯНИЕ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ НА АКТИВНОСТЬ α - И β -АМИЛАЗ И СОДЕРЖАНИЕ СУММАРНОГО БЕЛКА В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ

© 2011 г. Э. С. Давидянц

Ставропольский научно-исследовательский институт сельского хозяйства РАСХН,
Михайловск, 356241, Ставропольский край
e-mail: sniish@mail.ru

Поступила в редакцию 12.01.2011 г.

Изучено влияние гликозидов олеаноловой кислоты, полученных из надземной части *Silphium perfoliatum* L. (сульфиозиды В, С, Е и G) и их прогенинов на активность амилаз и содержание суммарного белка в проростках пшеницы. Обработка семян озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) 1.0–10.0 мкМ водными растворами моно- и дигликозидов (моно- и бисдесмозиды) повышала α -амилазную и суммарную амилолитическую активность в проростках. Увеличение количества глюкозных остатков до 3 (сульфиозид Е) приводило к потере стимулирующего эффекта на активность α -амилазы. У бис-триглюкозида, содержащего ацетильную группу в углеводной части молекулы (сульфиозид С) способность к стимуляции α -амилазной активности в концентрации 0.5–1.0 мкМ сохранялась. Обработка семян 5.0–10.0 мкМ растворами исследуемых веществ приводила к повышению суммарного белка в проростках и усилению их роста, при этом действие гликозидов не уступало эффектам экзогенных гиббереллина А₃ и 6-бензиламинопурина.

Тритерпеновые гликозиды представляют широко распространенную и структурно разнообразную группу вторичных метаболитов растений, которые предположительно играют регуляторную роль в процессах роста, развития и стрессоустойчивости растений.

Рострегулирующая активность установлена для тритерпеноидов ряда олеанана, лупана, дам-марана и их гликозидов [1–7].

Выявление ростстимулирующего действия у тритерпеновых кислот ланостанового ряда, выделенных из пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) [8], позволило получать на их основе препараты (силк, биосил, новосил, вэрва), доказавшие свою эффективность при возделывании многих сельскохозяйственных культур [9].

В ряде работ [3, 4, 7] показано, что тритерпеновые гликозиды обладают более высокой рострегулирующей активностью, чем свободные тритерпеноиды (агликоны). Кроме того, гликозиды растворимы в воде, что облегчает их выделение из растения и открывает возможность практического использования этих соединений в качестве эффективных, экологически безопасных регуляторов роста растений.

Биологические испытания экстракта сильфии пронзеннолистной (*Silphium perfoliatum* L.), содержащего физиологически активные тритерпеновые гликозиды, показали, что обработка экстрактом растений озимой пшеницы разных сортов повышала содержание хлорофилла в листьях,

урожайность зерна и содержание в нем белка и сырой клейковины [10, 11].

Удобной биологической моделью для изучения действия тритерпеновых гликозидов также могут служить прорастающие зерновки пшеницы. Образовавшиеся в результате протеолиза запасных белков глиадина и глютеина аминокислоты и полипептиды используются для биосинтеза структурных и ферментативных белков, необходимых для новообразования новых клеток и синтеза веществ. Продукты амилолиза участвуют в формировании структурных элементов проростка, а также вовлекаются в окислительные процессы, обеспечивающие энергией анаболические реакции.

Особую активность в прорастающих зерновках пшеницы приобретают ферменты амилолитического комплекса – α - и β -амилазы, участвующие в деградации основного запасного вещества – крахмала.

α -Амилаза – 1,4- α -D-глюкан-глюкангидролаза (КФ 3.2.1.1), кальцийсодержащая эндоглюкозилаза, гидролизует α -(1 → 4)-гликозидные связи в амилозе и амилопектине с образованием смеси мальтозы и низкомолекулярных олигосахаридов.

β -Амилаза – 1,4- α -D-глюканмальтогидролаза (КФ 3.2.1.2), экзоглюкозилаза, разрывает α -(1 → 4)-гликозидные связи в крахмале, последовательно отщепляя мальтозу с нередуцирующими концов молекулы. Амилозу β -амилаза расщепляет полностью, а при действии на амилопектин образуются мальтоза и высокомолекулярные декстрины, которые гидролизуются α -амилазой с образованием декстри-

нов с меньшей молекулярной массой. При одновременном действии обеих амилаз крахмал гидролизует на 95% [12].

Цель работы – изучение изменений активности α - и β -амилаз и содержания суммарного белка в проростках пшеницы, возникающих после обработки семян тритерпеновыми гликозидами различного строения, установление влияния структуры гликозидов на их метаболическую активность.

МЕТОДИКА

В работе использовали 3-О- β -D-глюкопиранозид олеаноловой кислоты (I), 3-О- β -D-глюкопиранозил (1 \rightarrow 2)-О- β -D-глюкопиранозид олеаноловой кислоты (софорозид олеаноловой кислоты, II); 3,28-ди-О- β -D-глюкопиранозид олеаноловой кислоты (сильфиозид В, III); 3-О-[β -D-глюкопиранозил (1 \rightarrow 2) – (6-О-ацетил)- β -D-глюкопиранозид]; 28-О- β -D-глюкопиранозид олеаноловой кислоты (сильфиозид С, IV); 3-О-[β -D-глюкопиранозил (1 \rightarrow 2) – О- β -D-глюкопиранозид]; 28-О- β -D-глюкопиранозид олеаноловой кислоты (сильфиозид Е, V); 3-О- β -D-глюкуронопиранозид – 28-О- β -D-глюкопиранозид олеаноловой кислоты (сильфиозид G, VI).

Сильфиозиды (III–VI) были выделены из наземной части *Silphium perfoliatum* L. по методике, описанной нами ранее [13–16]. Гликозиды I и II получены омылением соответственно сильфиозидов В (III) [13] и Е (V) [15].

Опыты проводили на семенах озимой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Авеста, прошедшие период послеуборочного дозревания (3–6 месячного хранения). Предпосевную обработку семян исследуемыми веществами осуществляли по общепринятой методике, “полусухим” способом. Для этого семена интенсивно встряхивали с водными растворами гликозидов из расчета 1 мл/100 семян. В контроле семена обрабатывали дистиллированной водой. Для сравнения биологического действия гликозидов семена обрабатывали растворами гиббереллина А₃ (гибберелловая кислота) (ГА₃) и 6-бензиламинопурина (БАП) (“Serva”, Германия) одной из эффективных концентраций, которые определяли в предварительном опыте.

Обработанные семена сушили при комнатной температуре. Затем проращивали в течение 7 сут в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной 6 мл дистиллированной воды в термостате при температуре 22–24°C. Для определения активности амилаз и суммарного белка использовали 7-суточные проростки с эндоспермом и семенной кожурой. О действии гликозидов на рост судили по изменению длины корней, наземной части, сырой и сухой массы контрольных и опытных проростков.

Экстракт ферментов получали по методике [16]. Навеску растительного материала (20 проростков)

растирали в ступке с небольшим количеством 1%-ного NaCl. Соотношение между навеской и раствором NaCl 1 : 20. Экстракция продолжалась 1.5 ч при температуре 4°C при медленном перемешивании. Гомогенат фильтровали и центрифугировали при 4000 g в течение 10 мин. Супернатант использовали для определения активности амилаз.

Суммарную активность амилаз определяли спектрофотометрически при 595 нм, используя крахмал в качестве субстрата согласно [17]. В пробирки приливали по 3 мл ацетатного буфера, рН 5.5, и по 3 мл 2%-ного раствора крахмала, нагревали до 40°C. Затем в опытные пробирки вносили 0.2 мл экстракта ферментов, в контрольные – такое же количество дистиллированной воды. После инкубации при 40°C на водяной бане в течение 30 мин реакцию останавливали добавлением 2 мл 1 М HCl. Затем из каждой пробирки отбирали по 0.5 мл смеси и вносили в мерные колбы на 50 мл, в которых содержалось 30 мл дистиллированной воды, 1 мл 0.1 М HCl и 5 капель 0.3%-ного раствора йода в 3.0%-ном растворе KI. Содержимое колб доводили до метки водой, перемешивали и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре Spekol (“Carl Zeiss”, Германия).

Для определения активности α -амилазы к экстракту ферментов (5 мл) добавляли несколько миллиграмм сухого ацетата кальция, выдерживали 15 мин на водяной бане при 70°C для инактивации β -амилазы, затем быстро охлаждали. Полученный раствор использовали для определения α -амилазной активности по вышеописанной методике.

Активность β -амилазы определяли по разности между суммарной активностью α - и β -амилаз и активностью α -амилазы. Активность амилаз выражали в условных единицах, в мг гидролизованного крахмала за 30 мин инкубации при 40°C в расчете на 1 проросток.

Суммарный белок экстрагировали из измельченного растительного материала 4-кратным количеством боратного буфера (рН 10.0), содержащего 0.2% бисульфата натрия [17]. Гомогенат взбалтывали на шейкере (“Elpan”, Польша) в течение 1 ч, после отстаивания раствора в течение 15 мин отбирали 10 мл и центрифугировали при 3000 g 15 мин. Центрифугат использовали для определения суммарного белка по методу Лоури.

Исследования проводились в 3-кратной повторности. На рис. 2–4 и в таблице приведены средние арифметические из трех независимых экспериментов и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взятые для исследования гликозиды олеаноловой кислоты различались строением углеводной части (рис. 1). Моносахаридный состав гликозидов

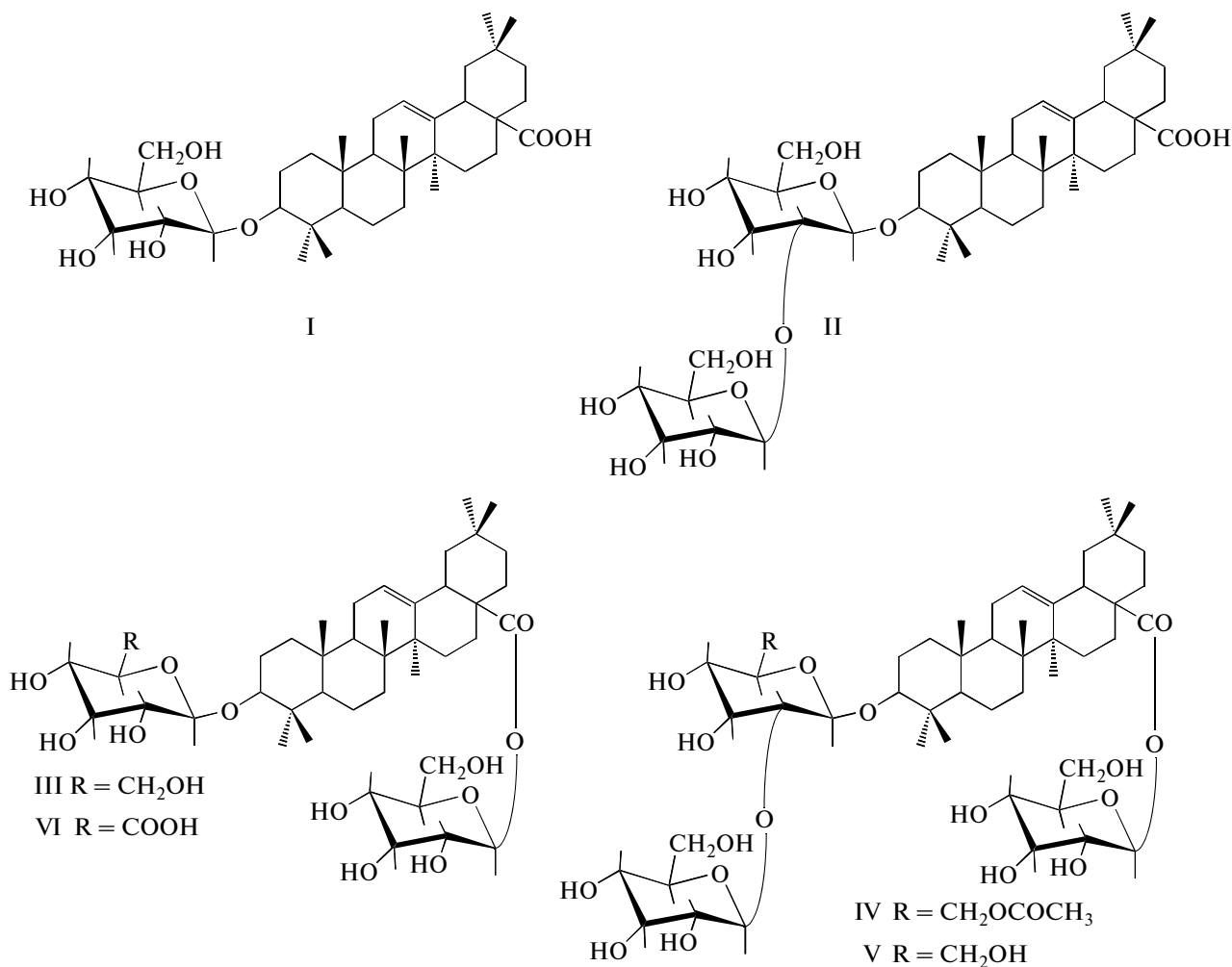


Рис. 1. Формулы гликозидов олеаноловой кислоты, использованных в работе.

представлен преимущественно остатками D-глюкозы, за исключением гликозида G (VI), содержащего также остаток D-глюкуроновой кислоты.

Обработка семян озимой пшеницы исследуемыми веществами оказывала различное действие на активность амилаз в проростках в зависимости от концентрации и структуры гликозида.

После обработки семян растворами моно- и биозидов олеаноловой кислоты наблюдалось повышение суммарной амилазной активности в проростках по сравнению с контролем, причем наиболее эффективными оказались концентрации монозида (I) 10.0 мкМ и биозидов (II, III, VI) – 5.0 мкМ (рис. 2).

Эти же концентрации гликозидов существенно стимулировали в проростках активность α -амилазы (в 2.3–3.0 раза) относительно контроля, причем эффект гликозидов превосходил действие экзогенных ГА₃ и БАП. При этом по сравнению с контролем изменилось соотношение между активностью α -ами-

лазы и β -амилазы в сторону увеличения доли активности α -амилазы.

Максимальное увеличение активности α -амилазы в проростках (в 3.0 раза) отмечено при действии софорозида олеаноловой кислоты (II), имеющего остаток софорозы при атоме С-3 агликона. Аналогичный с ним по составу сильфиозид В (III), но содержащий остатки D-глюкозы как при С-3, так и при С-28 агликона, действовал менее активно. Однако эффект сильфиозида В (III) был более выражен, чем сильфиозида G (VI), имеющего такое расположение углеводных фрагментов, как и сильфиозид В (III), но в отличие от него, содержащего вместо остатка D-глюкозы при С-3 агликона остаток D-глюкуроновой кислоты.

Обработка семян пшеницы растворами триозидов олеаноловой кислоты также вызывала изменение активности амилаз в проростках, но характер действия сильфиозида С (IV) существенно отличался от такового сильфиозида Е (V). Использование

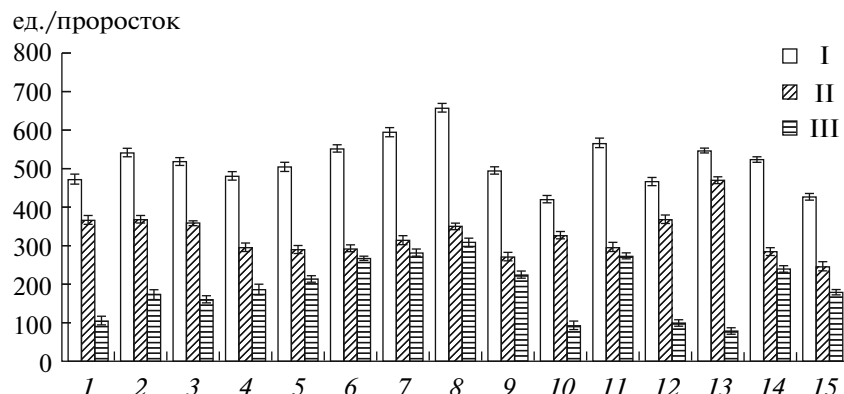


Рис. 2. Влияние обработки семян пшеницы различными концентрациями моно- и дигликозидов олеаноловой кислоты на активность α - и β -амилаз в проростках: 1 – дистиллированная вода (контроль), 2 – 2.9 мкМ ГА₃, 3 – 45.0 мкМ БАП, 4 – 1.0, 5 – 5.0, 6 – 10 мкМ 3-0- β -D-глюкопиранозид олеаноловой кислоты, 7 – 1.0, 8 – 5.0, 9 – 10.0 мкМ софорозид олеаноловой кислоты, 10 – 1.0, 11 – 5.0, 12 – 10 мкМ сальфиозид В, 13 – 1.0, 14 – 5.0, 15 – 10 мкМ сальфиозид G. I – суммарная активность амилаз, II – активность β -амилазы, III – активность α -амилазы.

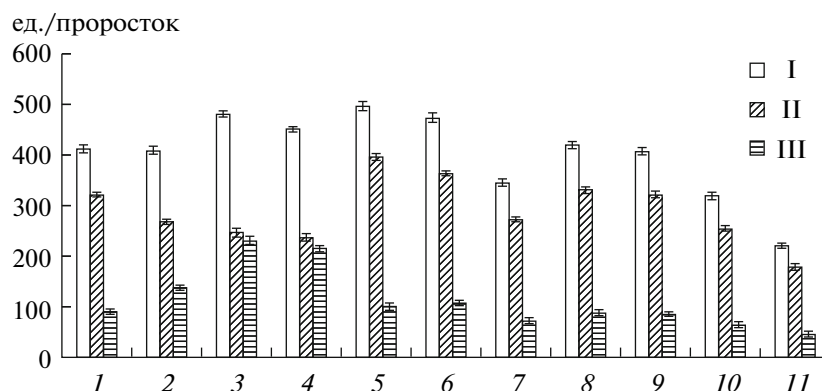


Рис. 3. Влияние обработки семян пшеницы различными концентрациями тригликозидов олеаноловой кислоты на активность α - и β -амилаз в проростках: 1 – дистиллированная вода (контроль), 2 – 0.1, 3 – 0.5, 4 – 1.0, 5 – 5.0, 6 – 10.0 мкМ сальфиозид С, 7 – 0.1, 8 – 0.5, 9 – 1.0, 10 – 5.0, 11 – 10 мкМ сальфиозид E. I – суммарная активность амилаз, II – активность β -амилазы, III – активность α -амилазы.

0.5–10.0 мкМ сальфиозида С приводило к увеличению суммарной амилолитической активности по сравнению с контролем, в то время как ни одна из исследованных концентраций сальфиозида E (0.1–10.0 мкМ) такого эффекта не оказывала (рис. 3). Активность α -амилазы в проростках, полученных из семян, обработанных растворами сальфиозида С в интервале концентраций 0.1–10.0 мкМ была выше, чем в контроле (рис. 3). Наибольшее повышение активности α -амилазы в 2.6 и 2.4 раза отмечено при использовании 0.5 и 1.0 мкМ сальфиозида С соответственно. После обработки семян пшеницы различными концентрациями сальфиозида E повышения активности α -амилазы в проростках не выявлено, а использование 0.1, 5.0 и 10.0 мкМ растворов V вызывало снижение активности фермента (рис. 3). Следовательно, увеличение количества моносахаридных остатков до 3 в молекуле

сальфиозида E (V) приводит к потере стимулирующего эффекта на активность α -амилазы по сравнению с гликозидами (I–III, VI), содержащими 1–2 углеводных компонента. У сальфиозида С (IV), отличающегося от своего структурного аналога сальфиозида E (V) наличием ацетильной группы в углеводной части молекулы, напротив, способность к стимуляции α -амилазной активности сохранялась.

Если в отношении активности α -амилазы проявилась специфичность действия гликозидов, обусловленная особенностями их химического строения, то на содержание суммарного белка в проростках все исследуемые гликозиды независимо от их строения оказывали стимулирующее действие (рис. 4). Наибольший эффект вызывала обработка семян 10.0 мкМ раствором монозида (I), 5.0 мкМ биозидов (II, III, VI) и 5.0 и 10.0 мкМ триазидов олеаноловой кислоты (IV, V) соот-

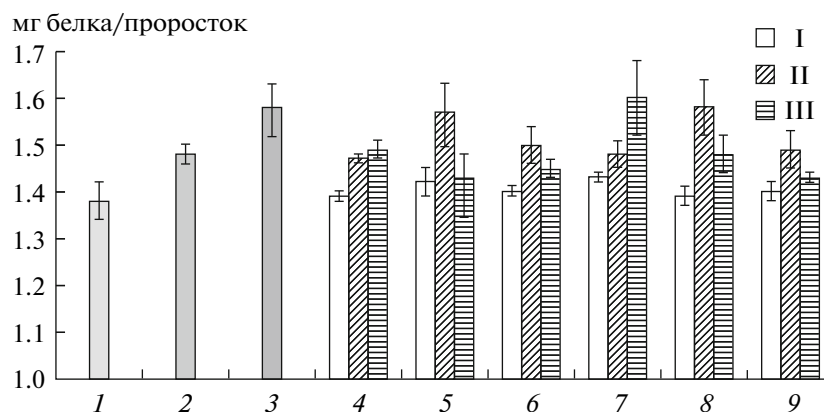


Рис. 4. Влияние обработки семян пшеницы различными концентрациями тритерпеновых гликозидов (I – 1.0, II – 5.0, III – 10.0 мкМ) на содержание суммарного белка в проростках: 1 – дистиллированная вода (контроль), 2 – GA₃ (2.9 мкМ), 3 – БАП (45.0 мкМ), 4 – 3-0-β-D-глюкопиранозид олеаноловой кислоты, 5 – софорозид олеаноловой кислоты, 6 – сильфиозид В, 7 – сильфиозид С, 8 – сильфиозид Е, 9 – сильфиозид G.

ответственно. При этом содержание суммарного белка в проростках повышалось на 8–16% относительно контроля. Наиболее высокий уровень содержания белка отмечен в проростках, полученных из семян, обработанных указанными концентрациями сильфиозидов С и Е, а также софорозида олеаноловой кислоты. Активность гликозидов в данном случае не уступала активности экзогенного БАП.

Таким образом, тритерпеновые гликозиды способны стимулировать важнейшие биохимические процессы в прорастающих семенах пшеницы (гидролиз запасного крахмала, биосинтез белка), составляющие основу активного роста растений.

При обработке семян пшеницы гликозидами наблюдалось изменение морфофизиологических показателей проростков, свидетельствующих об усилении ростовых процессов (таблица). При действии оптимальных концентраций гликозидов (5.0–10.0 мкМ) сухая масса проростков повышалась на 8–13% по сравнению с контролем. Максимальное увеличение сухой массы проростков коррелировало с накоплением в них белка.

Ключевая роль в регуляции роста и метаболизма растений отводится гормональной системе. Индуцированный GA₃ синтез α-амилазы *de novo* в алейроновом слое семян пшеницы связан с увеличением содержания специфичной иРНК, транслирующей α-амилазу [19]. Тритерпеновые гликозиды, возможно, связываются с рецептором GA₃, оказывая непосредственное влияние на активность гиббереллинозависимых генов. Гиббереллиноподобное действие гликозидов было ранее установлено нами в биотесте по удлинению гипокотилей салата, выявлены также эффекты гликозидов в других тестах, характерных для биологической активности ауксина (стимуляция корнеобразования у черенков фасоли) и цито-

кинина (задержка разрушения хлорофилла в листовых отрезках ячменя, стимуляция прорастания семян салата при повышенной температуре) [6].

Эти данные позволяют предполагать, что тритерпеновые гликозиды, взаимодействуя с фитогормонами, могут вовлекаться в регуляцию метаболических и ростовых процессов.

В реализации фиторегулирующего действия тритерпеновых гликозидов важное значение может иметь их способность изменять проницаемость клеточных мембран. Взаимодействуя со стеринами мембран, тритерпеновые гликозиды образуют комплексы и формируют каналы [20], через которые может осуществляться как отток из клеток низкомолекулярных метаболитов, так, по-видимому, и их приток. Не исключено, что вызванное определенными концентрациями тритерпеновых гликозидов изменение проницаемости клеточных мембран может способствовать активизации метаболизма и роста растений. Изменение проницаемости клеточных мембран оказывает влияние на скорость поступления воды в цитоплазму, высвобождение ферментов, транспорт ионов и их концентрацию, рН, содержание ингибиторов, доступность субстратов и т.п., что, в свою очередь, вызывает изменение активности ферментов и метаболизма нуклеиновых кислот [21].

Действие повышенных концентраций тритерпеновых гликозидов, вызывающих торможение роста у высших растений, возможно, аналогично их действию на грибы. В этом случае при взаимодействии тритерпеновых гликозидов со стеринами клеточной поверхности происходит значительное увеличение проницаемости биомембран, что, в свою очередь, приводит к нарушению их нормального функционирования, утечке низко-

Влияние обработки семян пшеницы различными концентрациями тритерпеновых гликозидов на рост проростков

Вещество, концентрация, мкМ	Длина корня, см	Длина надземной части, см	Сырая масса проростка, мг	Сухая масса проростка, мг
Дистиллированная вода (контроль)	11.5 ± 0.2	8.5 ± 0.2	102.5 ± 1.3	13.0 ± 0.2
ГА ₃ , 2.9	11.8 ± 0.4	8.8 ± 0.2	107.4 ± 1.5	13.4 ± 0.3
БАП, 45.0	11.5 ± 0.2	8.8 ± 0.1	114.2 ± 1.7	14.4 ± 0.3
3-0-β-D-глюкопиранозид олеаноловой кислоты (I)				
1.0	11.9 ± 0.2	9.0 ± 0.3	104.7 ± 1.3	13.1 ± 0.6
5.0	12.1 ± 0.2	9.1 ± 0.2	106.5 ± 1.4	13.2 ± 0.2
10.0	12.4 ± 0.5	9.1 ± 0.3	113.3 ± 1.9	14.0 ± 0.4
Софорозид олеаноловой кислоты (II)				
1.0	12.2 ± 0.3	9.4 ± 0.2	115.0 ± 1.8	14.2 ± 0.1
5.0	12.1 ± 0.2	9.5 ± 0.2	115.8 ± 1.4	14.3 ± 0.3
10.0	11.8 ± 0.5	9.1 ± 0.1	109.2 ± 2.0	13.3 ± 0.3
Сильфиозид В (III)				
1.0	12.1 ± 0.2	8.9 ± 0.2	110.7 ± 3.3	13.9 ± 0.2
5.0	11.9 ± 0.2	9.3 ± 0.2	112.2 ± 2.7	14.0 ± 0.3
10.0	11.1 ± 0.2	8.9 ± 0.1	109.3 ± 1.2	13.8 ± 0.2
Сильфиозид С (IV)				
0.1	11.8 ± 0.2	8.9 ± 0.3	103.4 ± 2.4	13.5 ± 0.3
0.5	12.3 ± 0.1	9.0 ± 0.2	106.5 ± 2.9	13.5 ± 0.2
1.0	12.1 ± 0.3	9.2 ± 0.6	107.6 ± 1.8	13.8 ± 0.7
5.0	12.0 ± 0.5	9.4 ± 0.6	111.7 ± 2.5	13.9 ± 0.5
10.0	12.6 ± 0.8	9.7 ± 0.7	125.1 ± 3.0	14.7 ± 0.8
Сильфиозид Е (V)				
0.1	11.4 ± 0.2	8.7 ± 0.2	103.5 ± 2.2	13.8 ± 0.2
0.5	12.5 ± 0.1	9.1 ± 0.3	112.9 ± 3.1	14.0 ± 0.1
1.0	12.3 ± 0.2	8.9 ± 0.1	104.6 ± 3.0	13.8 ± 0.1
5.0	12.1 ± 0.2	9.4 ± 0.3	114.8 ± 2.8	14.4 ± 0.1
10.0	12.4 ± 0.1	9.3 ± 0.1	122.0 ± 3.2	13.8 ± 0.6
Сильфиозид G (VI)				
1.0	11.7 ± 0.3	8.5 ± 0.2	104.0 ± 2.8	13.0 ± 0.2
5.0	12.0 ± 0.4	9.0 ± 0.3	107.6 ± 5.4	13.8 ± 0.3
10.0	12.2 ± 0.7	8.9 ± 0.3	103.5 ± 4.5	13.6 ± 0.2

молекулярных компонентов клеточного пула и ингибированию роста грибов [22].

Результаты исследования, представленные в настоящей работе, показали, что оптимальные концентрации экзогенных тритерпеновых гликозидов приводили к увеличению α-амилазной, суммарной амилолитической активности и содержания суммарного белка в проростках пшеницы. В отношении активности α-амилазы выявлена избирательность действия гликозидов, зависящая от количества моносахаридных остатков в молекуле. Установленные эффекты гликозидов, вероятно, являются лишь одной из сторон проявления многооб-

разной метаболической и, следовательно, рострегулирующей активности этих соединений. Можно ожидать, что механизм действия гликозидов на молекулярном уровне осуществляется как путем непосредственного регулирования активности генов, так и путем воздействия на проницаемость клеточных мембран и активность фитогормонов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тариков С., Тимбекова А.Е., Абубакиров Н.К., Коблов Р.К. // Узб. биол. журн. 1988. № 6. С. 24–26.

2. Давидянц Э.С., Нешина Л.П., Нешин И.В. // Раст. ресурсы. 2001. Т. 37. № 3. С. 93–97.
3. Стехова С.И., Самошина Н.Ф., Денисенко М.В., Денисенко В.А., Логачев В.В., Анисимов М.М., Уварова Н.И. // Раст. ресурсы. 2002. Т. 38. № 2. С. 92–98.
4. Ohara S., Ohira T. // J. Wood Sci. 2003. V. 49. P. 59–64.
5. Стехова С.И., Атопкина Л.Н., Анисимов М.М., Уварова Н.И. // Раст. ресурсы. 2005. Т. 41. № 3. С. 80–86.
6. Давидянц Э.С. // Раст. ресурсы. 2006. Т. 42. № 1. С. 127–136.
7. Анисимов М.М., Логачев В.В., Демина Е.А., Самошина Н.Ф., Денисенко М.В., Уварова Н.И. // Раст. ресурсы. 2006. Т. 42. № 3. С. 74–81.
8. Ралдугин В.А., Друганов А.Г., Климов В.П., Шубин А.Н., Чекуров В.М. Патент РФ. 1998. № 2108803.
9. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. 2010 г. Приложение к журналу “Защита растений и карантин”. 2010. № 6. С. 449–457.
10. Давидянц Э.С., Нешин И.В. Патент РФ. 2001. № 2200409.
11. Давидянц Э.С. // Агрохимия. 2006. № 8. С. 30–33.
12. Казаков Е.Д., Кретович В.Л. Биохимия зерна и продуктов его переработки. М.: Агропромиздат, 1989. 368 с.
13. Давидянц Э.С., Путиева Ж.М., Бандюкова В.А., Абубакиров Н.К. // Химия природных соединений. 1984. № 1. С. 120–121.
14. Давидянц Э.С., Путиева Ж.М., Бандюкова В.А., Абубакиров Н.К. // Химия природных соединений. 1984. № 5. С. 666–667.
15. Давидянц Э.С., Путиева Ж.М., Бандюкова В.А., Абубакиров Н.К. // Химия природных соединений. 1984. № 6. С. 750–753.
16. Давидянц Э.С., Путиева Ж.М., Шашков А.С., Бандюкова В.А., Абубакиров Н.К. // Химия природных соединений. 1985. № 4. С. 519–522.
17. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1985. 255 с.
18. Методы биохимического анализа растений / Ред. А.И. Ермакова. Л.: Агропромиздат, 1987. 430 с.
19. Higgins T.J.V., Zwar I.A., Jacobson J.V. // Nature. 1976. V. 26. P. 166–169.
20. Лихацкая Г.Н., Яровая Т.П., Руднев В.С., Попов А.М., Анисимов М.М., Ровин Ю.Г. // Биофизика. 1985. № 2. С. 358–359.
21. Физиология и биохимия покоя и прорастания семян / Ред. М.Г. Николаева, Н.В. Обручева. М.: Колос, 1982. 495 с.
22. Анисимов М.М., Иванов А.С., Попов А.М., Киселева М.И., Себко И.Г., Коротких Л.Я., Антонов А.С., Стоник В.А., Антонов В.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 1981. Т. 17. № 6. С. 890–895.

Effect of Triterpenoid Glycosides on α - and β -Amylase Activity and Total Protein Content in Wheat Seedlings

E. S. Davidyants

Stavropol Research Institute of Agriculture, Russian Academy of Agricultural Sciences,
Mikhailovsk, Stavropol oblast, 354241 Russia

e-mail: sniish@mail.ru

Received January 12, 2011

Abstract—Influence of the aleanolic acid glycosides from *Silphium perfoliatum* L. (silphioside B, C, E and G) and their progenins on the amylase activity and total protein content in wheat seedlings was studied. Treatment of the *Triticum aestivum* L. seeds with 1–10 μ M water solutions of mono- and diglycosides (mono- and bisdesmosines) elevated the α -amylase and total amylase activities in seedlings. Silphioside E containing three glucose moieties in its molecule did not change α -amylase activity, but it did if bis-triglycoside acetylated carbohydrate (as in silphioside C). Effects of 5–10 μ M solutions of the active glycosides was comparable with that of exogenous gibberellin A₃ and 6-benzylaminopurine.

UDC: 576.809.53

CHANGES IN GENE TRANSCRIPTION AND PROTEIN EXPRESSION INVOLVED IN THE RESPONSE OF *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 TO NITROGEN AVAILABILITY DURING CURDLAN PRODUCTION

© 2011 L. J. Yu, J. R. Wu, Z. Z. Zheng, C. C. Lin, X. B. Zhan

School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, 214122, PR China

e-mail: xbzhan@yahoo.com

Received March 24, 2011

The changes in transcription of genes involved in nitrogen metabolism and curdlan biosynthesis, and total protein expression were firstly analyzed to define the responses of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 to nitrogen source availability during curdlan fermentation. The transcription of all nitrogen metabolism and regulation genes increased significantly under nitrogen limitation. The genes of carbon (*exoC*) and nitrogen (*ntrB*, *ntrC*, and *nifR*) metabolism showed distinctive transcriptional responses to nitrogen limitation. Their relative expression level was increased by 14, 9, 7 and 7-fold, respectively. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) revealed that the expression of 14 proteins were elevated and 6 proteins were down-regulated significantly under nitrogen starvation. Furthermore, 4 proteins (GroEL, ABC transporter, Atu1730 and enoyl-acyl carrier protein reductase) in which the expression level changed significantly were identified. The results showed that *Agrobacterium* sp. regulates its carbon flux and nitrogen assimilation effectively for better survival.

Nutrient limitation is the prerequisite for the accumulation of many microbial metabolites in which curdlan production is a distinct case. Curdlan is a water insoluble β -(1,3)-exopolysaccharide produced by *Agrobacterium* species under nitrogen limitation [1]. Similar phenomenon was also observed in many other biopolymer-producing bacteria, such as *Azospirillum brasilense* for the production of polyhydroxyalkanoates (PHA) and poly-3-hydroxybutyrate (PHB) [2]. However, hitherto the mechanism of the nitrogen regulation on biopolymers synthesis in bacteria has not been fully understood. Reports showed that the *ntrBC* and *ntrC* mutants of strain *A. brasilense* Sp7 could accumulate a large amount PHB in the presence of a high concentration of ammonia in the medium. The classical bacterial nitrogen metabolic regulation system is the NtrB-NtrC two-component system (Ntr family) [3]. The protein NtrB – histidine protein kinase (EC 2.7.13.3) catalyzes the phosphorylation and activation of its partner response regulator NtrC- response regulator (EC 2.7.13.3) under nitrogen limitation. The activated NtrC then turns on many other genes and proteins responsible for the initiation of the nitrogen starvation response. It was found that the Ntr family positively regulated biosynthesis other macromolecules, such as alginate, lipase and other biopolymers [3–5].

In this study we investigated the transcription and proteomic profiles of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 in response to nitrogen limitation in order to understand the mechanism of nitrogen regulation on curdlan biosynthesis. In *Agrobacterium* sp., 4 genes coding for enzymes of nitrogen regulation components (*ntrB*, *ntrC*, *ntrX*, *ntrY*), 3 genes for nitrogen assimilation and fixation (*nifR*, *glnA*, *gltB*), 5 genes for carbon metabo-

lism and curdlan biosynthesis (*glmU*, *Crd*, *exoC*, *musC*, *pssA*) were selected for evaluating their transcription response (Table 1). The roles of these genes in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 metabolic pathway and the rationale for the tests are summarized in Fig. 1 [6]. The two-dimensional electrophoresis method was applied to study changes of total protein expression in response to nitrogen starvation of *Agrobacterium* sp. The results showed that the chosen Ntr family of genes and carbon metabolism genes apparently altered their relative expression level in response to nitrogen limitation as well as many accompanying protein expression modulating systems.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism, culture medium and conditions of cultivation. The strain of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 was used in this study. The batch fermentation medium contained (g l⁻¹): glucose – 50, NH₄Cl – 1.6, KH₂PO₄ – 2.7, MgSO₄ – 0.5 and 10 ml of a trace element solution [7]. The batch fermentation was carried out in a 7 l jar fermenter (BioFlo 110, NBS, USA). Culture temperature was controlled at 30°C. Agitation speed and aeration rate were maintained at 400 rpm and 1 v/v min (volume of air per volume of medium per min), respectively during cultivation.

Estimation of curdlan yield, cell dry weight and ammonia concentration. The biomass and curdlan production were determined by the dry weight method. The cells were centrifuged at 6000 g for 30 min at 4°C. The supernatant was collected for the analysis of ammonium. The pellet containing cells and curdlan was

Table 1. Genes function and primer sequences for RT-PCR in this study

Gene	Protein	Primer F	Primer R	Length
<i>Crd</i>	Putative curdlan synthase	TGTGACGACACACGTGCGCGG	GCGTCTGGACGACAGCCACC	247
<i>glmU</i>	Bifunctional N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyl-transferase	CGCGAAGCGATCAAACGCG	TTGCGTTCCTCGTTCGGTGGC	230
<i>mucS</i>	Exopolysaccharide II synthesis transcriptional activator ExpG	CGTTGTTGCCGACGCACACG	GACACGCGAACGCTGGTGGT	289
<i>pssA</i>	Phosphatidylserine synthase	GCCGGACAAGCCCTTCGCTT	CGTAGCGGCGATGCCAGAGG	254
<i>nifR</i>	Nitrogen regulation protein	GGCTGTGCTCGCCGACATT	TCATGCGGCCTTCCTTGCGG	277
<i>ntrB</i>	Two component sensor kinase	CACAGCCCAGGCGATGCGAA	CCGAGGCGTGGCGAACTCAG	269
<i>ntrC</i>	Two component response regulator	TCGAGACGGAGGCGCTGGA	CCGGTGCGAACCGCCATCTT	187
<i>ntrX</i>	Two component response regulator	TGACAGGGTTGCCCCACCA	TCCGTGCCGAACAGCGCAAT	177
<i>ntrY</i>	Two component sensor kinase	GCGGGAATGGTGGTTGCCGA	CCGCCGCCCTGCCCTTTTAA	247
<i>gltB</i>	Glutamate synthase	CGCTCCCCGATCCTGACCCA	CGAAACGTGCCGGTTCGGTGA	216
<i>exoC</i>	Phosphoglucomutase	CGCGGCGGCGGATGATTTTG	CGCATCCGGCTCGTAACGCT	172
<i>glnA</i>	Glutamine synthetase	TCAACCACGTGCCGGATGCC	CCGACGGACCGTTTTCCCGG	207

resuspended in NaOH solution (0.5 M) for 1 h and the centrifugation was repeated. The resulting curdlan in the supernatant was neutralized and precipitated by 2.0 M HCl. The cells and curdlan were washed and dried to a constant weight in an oven at 80°C. Ammonium (NH₄⁺) concentration was determined by the sodium salicylate method [8].

RNA extraction. *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 cells were harvested by centrifugation at 4°C, 6000 g for 10 min and cells were disrupted with glass beads at 4°C for and centrifuged for 6 × 30 s at 6000 g. Thereafter one fifth volume of chloroform was added into the supernatants. The solution was mixed thoroughly and left to stand at room temperature for 5 min. The mixture was subsequently centrifuged at 4°C, 13000 g for 15 min, and supernatant was transferred to a new 1.5 ml centrifuge tube. Propanol of the same volume was added to the tubes and the centrifugation was repeated. The precipitate was washed with 0.7 ml 70% ethanol and collected by centrifugation again. Purified RNAs were suspended in 30 µl of (dimethylpyrocarbonate)-treated water (DMPC) 0.1%.

Reverse transcription and real-time PCR. The cDNA was synthesized using the Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lithuania). Primers were designed in order to have a length of about 20 bases at Tm of about 60°C and synthesized by SBS (SBS Genetech, Shanghai, China). Details of primers were listed in Table 1. The accession ID (Identification) of tested genes in sequence database (NCBI) were: 40556679 (*Crd*), 1133482 (*nifR*), 1133483 (*ntrB*), 1133484 (*ntrC*), 1133485 (*ntrY*), 1133486 (*ntrX*),

1132231 (*glnA*), 1132183 (*gltB*), 1135948 (*exoC*), 1133100 (*pssA*), 1133201 (*mucS*), 1133825 (*glmU*).

Real-time PCR was carried out with an ABI 7300 quantitative PCR instrument (ABI, USA) with RT-PCR Master Mix (SYBR Green, TOYOBO, Japan). Thermal cycling conditions were designated as follows: initial denaturizing at 95°C for 5 min, followed by 45 cycles of 94°C for 10 s and 60°C for 30 s. An additional step starting from 90 to 60°C was performed to establish a melting curve to verify the specificity of the real-time PCR reaction for each primer pair. For each measurement, a threshold cycle value (C_T) was determined. Results were analyzed using the comparative critical threshold (C_T) method in which the amount of target RNA is adjusted to a reference relative to an internal calibrated target RNA as described [9].

Sample preparation for two-dimensional electrophoresis. *Agrobacterium* sp. cells were harvested by centrifugation at room temperature at 6000 g for 15 min. The pellets were washed 3 times with a Tris-HCl buffer (40 mM, pH 8.0) and 50 µl cell pellets were resuspended in 1 ml of a lysis buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 1% w/v amidosulfobetaine-14, 40 mM Tris, 0.001% bromophenol blue, 1 mM EDTA, 10 µl tributyl phosphate and 10 µl carrier ampholyte. After sonication (JY92, XinZhi Biotechnology Company, Ningbo, China) for 3 min in ice bath (ultrasonic-15 s, spacing interval-4 s, cycle-20 times) the cell debris was removed by centrifugation at 12000 g for 60 min [10]. The supernatants were stored at -80°C until analyzed by two-dimensional electrophoresis (2-DE).

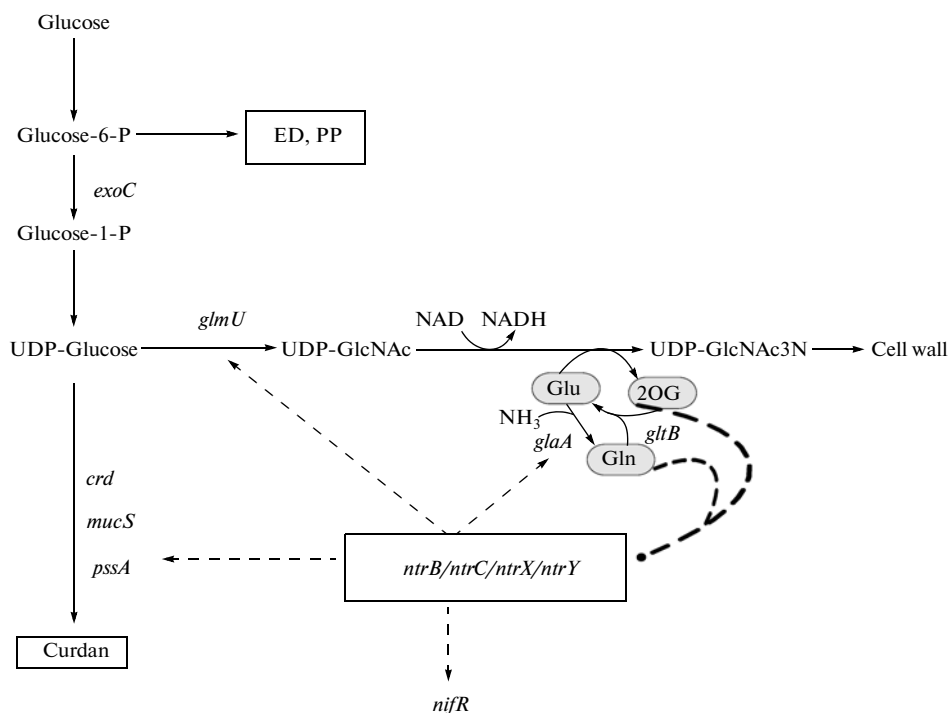


Fig. 1. Metabolic network of the test genes involved in curdlan production by *Agrobacterium* sp. ATCC 31749. UDP-Glucose – uridine diphosphoglucose; UDP-GlcNAc – beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase; ED – Entner-Doudoroff pathway.

Two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometric analysis. The first dimension of 2-DE was carried out on a GE IPGphor™ Electrophoresis System at 20°C. Linear pH 4–7 immobilized pH gradient (IPG) gel strips (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) were rehydrated overnight by placing the strips gel-side-down in the sample containing rehydration solution in a strip holder and covering them with mineral oil (Bio-Rad Laboratories, USA). The first dimension was performed for 30 min at 250 V, for 1 h at 1000 V, for 5 h at 10000 V, and until 70000 V h at 10000 V for the analytical and preparative gels that had been prepared for image analysis. The IPG gel strips were then equilibrated for 15 min in an equilibration solution of 0.375 M Tris-HCl buffer pH 8.8 containing 6 M urea, 20% glycerol (v/v) and 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) with 2% dithiothreitol (DTT) for 15 min and then 2.5% iodoacetamide for 15 min. The equilibrated gel strips were placed on a 12.5% polyacrylamide gel and the second dimensional separation was carried out using an Ettan Dalt six Electrophoresis system (GE Healthcare, USA) at 12°C. SDS-PAGE was carried out at 2 W/gel for 30 min and 16 W/gel for 6 h until the bromophenol blue reached to the bottom of the gel. Silver-staining of proteins was performed using a modified method, as described elsewhere [11]. Triplicate gels used to visualize proteins by silver-staining were scanned with GE Image Scanner. The images were analyzed by using PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad Laboratories, USA).

The samples for the matrix-assisted laser desorption-ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry analysis were extracted from the Coomassie-stained spots [12]. Protein analysis was performed using a MALDI-TOF mass spectrometry system (Voyager DE-STR, USA). The web-based search engine MASCOT 2.2 and the most recent Swiss-Prot database (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) were used to identify protein spots by querying the trypsin digested peptide fragment data.

Statistic analysis. All data were entered into the SPSS 15.0 program for standard deviation and significance analysis. The significant P value was set as 0.05.

RESULTS

The batch growth profile of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749. A typical growth profile of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 was shown in Fig. 2. Apparently, the biomass accumulated in the nitrogen-sufficient period and no curdlan was produced at this phase. At the end of nitrogen exhaustion, the biomass reached the maximum level and curdlan synthesis was initiated. Samples analyzed were taken from the cultures with cultivation times of 8, 12, 24 and 36 h (labeled in Fig. 2 as C, A, D, B, respectively).

Changes in relative expression level of genes related to nitrogen metabolism of *Agrobacterium* sp. in response to nitrogen limitation. Two samples were taken for relative expression (RE) level analysis: culture in growth phase

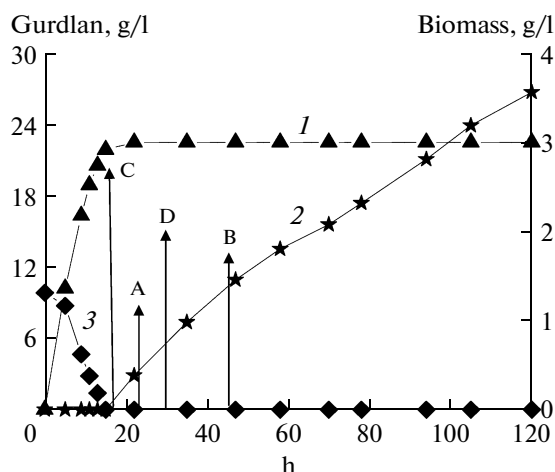


Fig. 2. The kinetic of cell growth and curdlan production in batch fermentation. A, B – sampling time for RT-PCR at 12 and 36 h; C, D – sampling time for 2-DE at 8 h and 20 h; 1 – biomass; 2 – curdlan production; 3 – residual NH_4Cl .

with sufficient nitrogen at 12 h (sample A), in curdlan synthesis phase with exhausted nitrogen at 36 h (sample B), as shown in Fig. 2. Sample A was defined as the calibration point using 16sRNA as internal reference, the RE level elevated higher than 2-fold means that the genes were increased their expression significantly [13]. The results are shown in Fig. 3.

When the availability of nitrogen in the environment was changed from sufficient to limited, an apparent transcriptional increase of Ntr family of genes was observed and their RE levels all exceeded 2-fold, resulting in a significant elevation. As shown in Fig. 3a, the highest increase in gene expression level was *ntrB* and its RE level increased nearly 9-fold. The RE level of *ntrC* increased 7-fold, 5-fold for *ntrX* and 3-fold for *ntrY*. Activated NtrC can turn on many

genes expression in the cell, but its gene expression was also controlled by nitrogen availability.

Glutamate (Glu) and glutamine (Gln) serve as the key nitrogen donors for the biosynthesis of many building blocks and some small molecules in all bacteria. The most important pathway which facilitates the incorporation of nitrogen into Glu and Gln is the Gln synthetase (EC 6.3.1.2)/Glu synthetase (EC 6.3.1.2) (GS/GOGAT, *glnA* and *gltB*) pathway, which is ubiquitous in bacteria. In addition, NifR is the main enzyme responsible for nitrogen fixation regulation for some soil bacteria such as *Agrobacterium* sp. [14]. The RE level of *gltB* and *glnA* genes showed a moderate increase of 3 and 5-fold respectively under nitrogen starvation, and the RE level of *nifR* was also elevated significantly.

Changes in RE level related to curdlan biosynthesis and carbon metabolism genes under nitrogen limitation.

The bifunctional N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyl-transferase (EC 2.7.7.23; 2.3.1.157, *glmU*) is a cytoplasmic bifunctional enzyme involved in the biosynthesis of the nucleotide-activated UDP-GlcNAc (EC 2.4.1.149) [15]. As shown in Fig. 3 b, the expression of *glmU* is quite sensitive to changes in the available nitrogen level of the culture medium, and its RE level increased 3-fold. Phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2, *exoC*) is central in carbon metabolism and catalyzes the conversion of G-1-P to G-6-P. The RE level of *exoC* increased to the highest level of 15-fold during the transition from sufficient nitrogen source to limited level in the culture medium. *Crd* gene encodes the key enzyme of curdlan synthase (EC 2.4.1.12) for curdlan biosynthesis [16]. Under nitrogen starvation *Crd* gene was activated and its expression level was elevated 5-fold. Similar result was observed in exopolysaccharide II synthesis, in which transcriptional activator ExpG (*mucS*) is a regulator controlling EPS II synthesis in response to nitrogen availability [17]. Phosphatidylserine synthase (EC 2.7.8.8, *pssA*) is a membrane-associated enzyme involving in curdlan transport [18]. When nitrogen source was used up and curdlan bio-

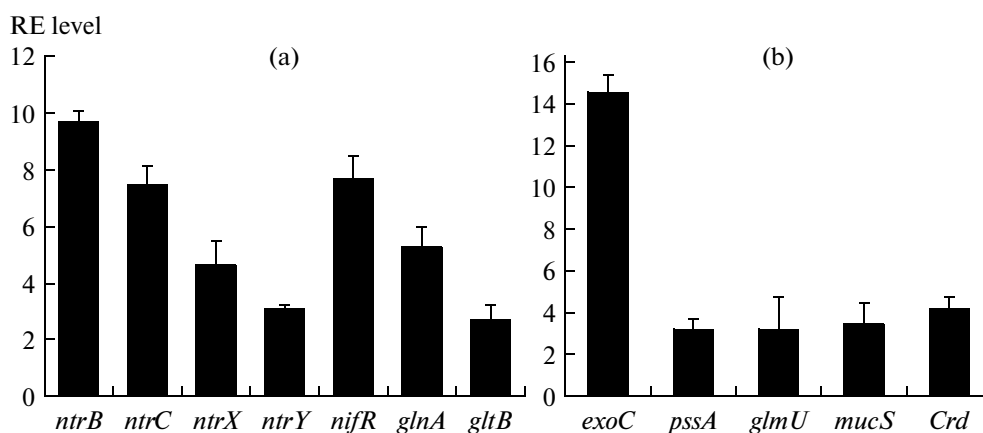


Fig. 3. Changes in the RE level of the curdlan biosynthesis, nitrogen (a) and carbon (b) metabolism related genes under nitrogen limitation in *Agrobacterium* sp. ATCC 31749.

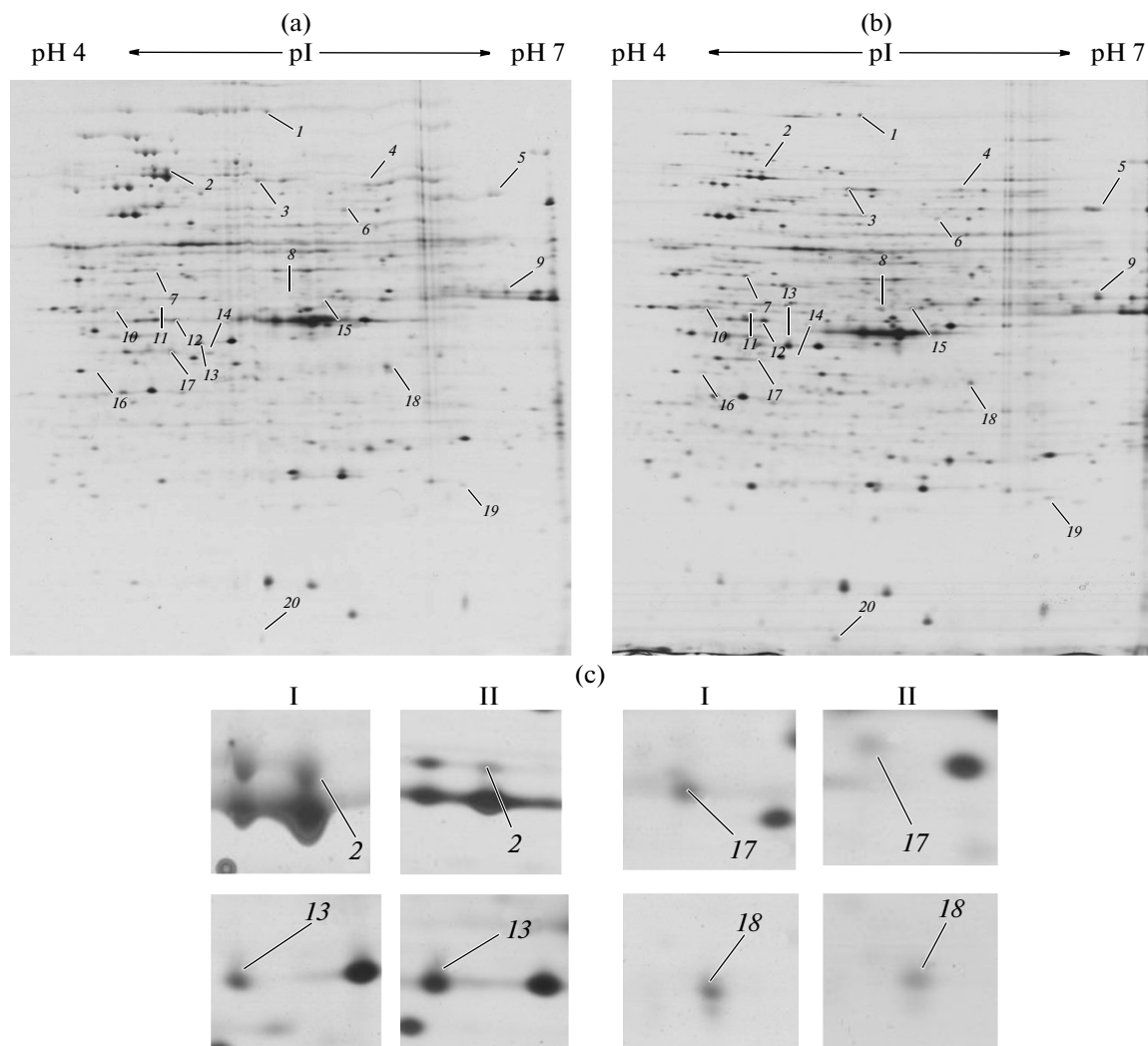


Fig. 4. Silver-stained 2-DE SDS-PAGE at the 8 h (a) and 20 h (b) of the curdlan batch-fermentation process, and close-up views of the 4 identified proteins on 2-DE maps: a – 2-DE map of sample at 8 h fermentation; b – 2-DE map of sample at 20 h fermentation; c – close-up view of identified proteins spots, and among them I represents protein 2-DE map at 8 h, II represents protein 2-DE map at 20 h.

synthesis was initiated and the RE level of *psaA* gene also increased 3-fold.

Proteomic analysis of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 in response to nitrogen limitation. The samples for 2-DE analysis were: culture in growth phase of 8 h (sample C) and in curdlan synthesis phase of 20 h (sample D), as shown in Fig. 2. Triplicate 2-DE were run for 2 samples with good reproducibility. The 2-DE maps of 2 samples are shown in Fig. 4 a and b. Further analysis of the 2-DE map was carried out using the PDQuest8.0.1 software. As a result, nearly 750 protein spots were found on the two maps and the protein spots distribution position were generally identical and the matching rate was about 78%. When comparing 2 maps 20 protein expressions changed significantly and 14 of them were elevated (labeled with numbers as 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 19, 20).

Six of them (labeled with numbers as 2, 4, 6, 14, 17, 18) decreased significantly.

Identification of changed proteins by MALDI-TOF mass spectroscopy. Subsequently, 5 proteins were chosen from the 20 proteins exhibited significant changes for identifying. Four proteins were successfully identified – 3 proteins with known functions and the other was unknown protein as shown in Table 2. Close-up views of 2-DE maps of the tested 4 proteins spots were shown in Fig. 4c, and spots on I maps represented protein expression under nitrogen sufficient conditions, spots on II maps represented protein expression under nitrogen limitation. The No. 2 protein was a molecular chaperone of GroEL. The main function of this protein is to combine and to stabilize other protein which has unstable conformation that promotes new peptide folding and transmembrane transport of protein associated with cell or-

Table 2. Identification of differential proteins of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 in different phases by MALDI-TOF/TOF-MS/MS and protein database searching

Spot no.	Protein name*	Accession no.	Mr, kDa/pI	Protein score	Matched peptides	Protein function
2	Chaperonin GroEL	gi 15888025	57.63/5.08	234	15	Helps new protein folding exactly
13	ABC transporter	gi 159185771	36.14/5.70	620	18	Transports salt ions from vivo to vitro
17	Hypothetical protein Atu1730	gi 15889035	30.10/5.13	302	12	—
18	Enoyl-acyl carrier protein reductase	gi 15888100	29.29/6.51	263	13	Catalyzes the last step of fatty acids extension

* The proteins were searching from the protein database of *A. tumefaciens* str. C58 whose genome is highly homologous to *Agrobacterium* sp. ATCC 31749.

ganelle [19]. The protein expression decreased apparently under nitrogen source exhaustion. The No. 13 protein was an ABC transmembrane transport protein capable of transporting different molecules such as carbohydrates, amino acids, peptides and cell metabolites into the cell [20]. The expression of the No. 13 protein was elevated. When nitrogen source was absent in the environment, toxic metabolites accumulated and cell growth ceased. Conceivably, this protein may remove harmful metabolites out of the cells and the osmotic pressure balance was maintained. The No. 18 protein was an enoyl-acyl carrier protein reductase (EC 1.3.1.9), one of the key enzymes in fatty acid biosynthesis. Fatty acid is the precursor for the biosynthesis of phosphatide, lipopolysaccharide and other lipid components which are the important components for cell wall and biofilm formation in bacteria.

DISCUSSION

In this work we investigated the response of *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 to nitrogen limitation and the relationship between nitrogen and carbon metabolism in unbalanced nutrient situation by the appropriate transcriptional and proteomic data. One of the most interesting observations is that with regard to the target genes, *Agrobacterium* sp. reacts immediately to environmental changes of nitrogen availability.

The Ntr family of genes showed profound sensitivity to nitrogen availability in the culture medium. Similar phenomena were also found in other bacteria in which the Ntr family of genes was responsible for switch on nitrogen assimilation. In *E. coli* the intracellular NtrB and NtrC increased upon nitrogen limitation. The activated NtrC would elevate the transcription level of *glnA* and *gltB* which were controlled by nitrogen availability [21]. Kumar and Shimizu [22] also reported that the transcription level of *gltB* and *glnA* was enhanced under high C/N condition in the same bacterium. The *gltB* mutant of *Pseudomonas putida* KT2442, was found to be impaired in the capacity to survive under prolonged nitrogen starvation [23]. Thus, the Ntr family of genes and nitrogen assimilation proteins were responsible for the survival of

the bacterial cells in nitrogen starvation environment by elevating their expression.

As a result, genes related to curdlan biosynthesis were rapidly activated to produce curdlan in the bacterial surface to protect the bacteria under adverse environment of nitrogen exhaustion [16]. The transcription of the *exoC* gene was highly elevated under nitrogen starvation, and more carbon flux of G-1-P was channeled into curdlan biosynthetic pathway. The phenomenon was similar to previous reports that *exoC* mutants of *A. tumefaciens* could not convert G-1-P into G-6-P, an intermediate for the biosynthesis of UDP-glucose which is the precursor for exopolysaccharide biosynthesis [24]. Thus, *Agrobacterium* sp. elevates *exoC* gene expression in order to supply more G-6-P for the curdlan biosynthetic pathway. Janczarek and Skorupska [25] reported that the gene *psaA* in *Rhizobium leguminosarum* was involved in exopolysaccharide biosynthesis and its production was enhanced when the specific gene transcription was increased under nitrogen limitation. Analyzing the changes in the RE level of genes examined under nitrogen starvation we could postulate that the Ntr family as a regulator of nitrogen metabolism would increase their transcription level in order to activate some genes transcription related to nitrogen assimilation and exopolysaccharide biosynthesis in response to nitrogen availability.

Consequently, it is conceivable that down-expression of enoyl-acyl carrier protein reductase, the important enzyme for cell wall and lipopolysaccharide formation, inhibits cell growth under nitrogen limitation since the cell wall synthesis would be blocked. Accordingly, the reduced lipopolysaccharide biosynthesis enabled the UDP-glucose to be channeled to curdlan exopolysaccharide synthesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the research grants from the National Natural Science Foundation of China (20676055 and 20806034), National Programs for High Technology Research and Development of China

(No. 2006AA02Z207), Programme of Introducing Talents of Discipline to Universities (No. 111-2-06).

REFERENCES

1. Harada, T., Fujimori, K., Hirose, S., and Masada, M., *Agric. Biol. Chem.*, 1966, vol. 30, no. 8, pp. 764–769.
2. Sun, J., Peng, X., Jan, V.I., and Vanderleyden, J., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 6, no. 1, pp. 113–117.
3. Andrew, J. and Leech, A.S., *J. Bacteriol.*, 2008, vol. 190, no. 2, pp. 581–589.
4. Krzeslak, J., Gerritse, G., Ronald, V.M., Robbert, C., and Quax, W. J., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, vol. 74, pp. 1402–1411.
5. Kim, H.K., Park, S.J., and Lee, K.H., *Mol. Microbiol.*, 2009, vol. 74, no. 2, pp. 436–453.
6. Zheng, Z.Y., Lee, J.W., Zhan, X.B., Shi Z.P., Wang, L., Zhu, L., Wu, J.R., and Chi, C.C., *Biotechnol. Bioproc. E.*, 2007, vol. 12, no. 4, pp. 359–365.
7. Zhan, X.B., Han, J., Li, Z.Y., Zhu, L., Wang, L., and Zhu, Y.H., *J. Food. Sci. Biotechnol.*, 2001, vol. 20, no. 4, pp. 347–351.
8. Harwood, J.E. and Huysen, D.J., *Water. Res.*, 1970, vol. 4, no. 10, pp. 695–704.
9. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., *Methods*, 2001, vol. 25, no. 4, pp. 402–408.
10. Shaw, M.M. and Riederer, B.M., *Proteomics*, 2003, vol. 3, no. 8, pp. 1408–1417.
11. Rabilloud, T., *Methods. Mol. Biol.*, 1999, vol. 112, pp. 297–305.
12. Candiano, G. and Bruschi, L.M., *Electrophoresis*, 2004, vol. 25, no. 9, pp. 1327–1333.
13. Desroche, N., Beltramo, C., and Guzzo, J., *J. Microbiol. Meth.*, 2005, vol. 60, no. 3, pp. 325–333.
14. Hill, S., Kennedy, C., Kavanag, E., Goldberg, R.B., and Hanau, R., *Nature*, 1981, vol. 290, no. 5805, pp. 424–426.
15. Raetz, C.R.H., *Cellular and Molecular Biology*, Washington DC: ASM Press, 1996, pp. 104–122.
16. Mcintosh, M., Stone, B.A., and Stanisich, V.A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, vol. 68, pp. 163–173.
17. Bartels, F.W., Baumgarth, B.A., Nselmetti, D., Robert, R., and Becker, A., *J. Struct. Biol.*, 2003, vol. 143, no.2, pp. 145–152.
18. Karnezis, T., Fisher, H.C., Neumann, G.M., Stone, B.A., and Stanisich, V.A., *J. Bacteriol.*, 2002, vol. 184, no. 15, pp. 4114–4123.
19. Harye-Hartl, M.K. and Weber, F., *EMBO. J.*, 1996, vol. 15, no. 22, pp. 6111–6121.
20. Wang, H.B., Zhang, Z.Y., Bao, R., and Chen, X. Y., *Chem. Life*, 2007, vol. 27, no. 3, pp. 208–210.
21. Atkinson, M.R., Blauwkamp, T.A., and Ninfa, A.J., *J. Bacteriol.*, 2002, vol. 184, no. 19, pp. 5364–5375.
22. Kumar, R. and Shimizu, K., *Microb. Cell. Fact.*, 2010, vol. 9, pp. 1–17.
23. Eberl, L., Ammendola, A., Rothballer, M.H., Givskov, M., Sternberg, C., Kilstrop, M., Schliefer, K.H., and Molin, S., *J. Bacteriol.*, 2000, vol. 182, no. 12, pp. 3368–3376.
24. Brautaset, T., Petersen, S.B., and Valla, S., *Metab. Eng.*, 2000, vol. 2, no. 2, pp. 104–114.
25. Janczarek, M. and Skorupska A., *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2004, vol. 85, no. 3, pp. 217–227.

УДК 574.4

СИНТЕЗ СОПОЛИМЕРОВ 3-ГИДРОКСИБУТИРАТА-СО-4-ГИДРОКСИБУТИРАТА ВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ

© 2011 г. Т. Г. Волова*, Н. О. Жила**, Г. С. Калачёва**, В. А. Соколенко***, Э. Дж. Сински****

*Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041

e-mail: volova45@mail.ru

**Институт биофизики Сибирского отделения РАН, Красноярск, 660036

***Институт химии и химической технологии Сибирского отделения РАН, Красноярск, 660036

****Массачусетский технологический институт, Кембридж, Массачусетс, США, 02139

Поступила в редакцию 21.01.2011 г.

Исследован синтез сополимера 3- и 4-гидроксибутирата (ЗГБ-СО-4ГБ) как наиболее перспективного представителя семейства биоразрушаемых полигидроксиалканоатов (ПГА). С использованием природных штаммов водородокисляющих бактерий *Ralstonia eutropha* B5786 и *Cupriavidus eutrophus* B10646 найдены условия культивирования для эффективного синтеза сополимера ЗГБ-СО-4ГБ. Получена серия высокоочищенных образцов сополимера ЗГБ-СО-4ГБ с различным содержанием 4ГБ (от 8.7 до 24.3 мол. %). Установлено, что включение 4ГБ в сополимер в большей степени, нежели 3-гидроксивалерат и 3-гидроксигексаноат, приводит к снижению кристалличности сополимера; получены образцы, имеющие степень кристалличности ниже 30%. Показано, что средневесовая молекулярная масса сополимеров ЗГБ-СО-4ГБ не зависит от соотношения мономеров и варьирует в широких пределах (от 540 до 1110 кДа).

В настоящее время уделяется значительное внимание исследованию синтеза микроорганизмами резервных полимеров – гидроксипроизводных алкановых кислот (полигидроксиалканоаты, ПГА). Связано это с комплексом высоких потребительских свойств, характерных для данного класса полимеров. ПГА представлены разнообразными полиэфирами, образованными однородными мономерами с различной длиной С-цепи, а также сополимерами, среди них – высококристаллические термопласты и термолабильные резиноподобные эластомеры [1]. Направленный синтез ПГА – весьма сложная технологическая задача, поэтому для получения ПГА заданного состава необходимы фундаментальные знания о закономерностях синтеза ПГА того или иного состава и о влиянии химической структуры полимеров на их физико-химические свойства.

Бактерии *Ralstonia eutropha* относят к перспективным продуцентам, так как они накапливают ПГА с высокими выходами на различных субстратах, включая отходы промышленных и сельскохозяйственных производств [2–5]. Доминирующим мономером в ПГА, синтезируемых природными штаммами *Ralstonia eutropha*, однако, является короткоцепочечный 3-гидроксибутират, выходы которого могут достигать в специализированных режимах до 80–90% от веса сухой биомассы [6]. До недавнего времени описанные в литературе

достигнутые уровни включения среднецепочечных мономеров (например, 3-гидроксигексаноата, 3-гидроксиоктаноата) в многокомпонентные ПГА не превышали у *R. eutropha* 1–2 мол. % [7–10]. В результате исследований закономерностей образования ПГА у бактерий *R. eutropha* B5786 нами предложено два подхода для синтеза полимеров различной структуры. Один подход базируется на параметрически управляемом культивировании бактерий с использованием комплексного углеродного субстрата с учетом знаний о том, что скорости синтеза общего пула полимера (главным образом, 3-гидроксибутирата), не совпадают со скоростью синтеза мономеров с более длинной С-цепью, а также, что соотношение мономеров в ПГА непостоянно, и максимальная величина включения, например 3-гидроксигексаноата, наблюдается через несколько часов после добавки дополнительного субстрата (соли алкановых кислот) в культуру. Следует учитывать также, что подобные субстраты-добавки, стимулирующие образование многокомпонентных ПГА, токсичны для бактерий, поэтому их использование возможно в установленных для штаммов индивидуальных предельно допустимых концентрациях [11]. Другой подход основан на метаболической регуляции путей биосинтеза ПГА с ингибированием реакций цикла β-окисления, что препятствует укорачиванию С-цепи среднецепочечных мономеров в реакциях β-окисления и, сле-

довательно, обеспечивает накопление их в клеточном пуле и последующее включение в ПГА. В результате реализованы режимы, позволившие синтезировать спектр многокомпонентных ПГА, в том числе новой химической структуры [12].

Одним из перспективных, но трудно синтезируемым и мало изученным ПГА является сополимер 3-гидроксibuтирата-СО-4-гидроксibuтирата (**ЗГБ-СО-4ГБ**). Для этого типа ПГА характерны высокие скорости биодеградации *in vivo* и в окружающей среде, он является эластомером, имеет более высокие показатели удлинения при разрыве и относительно высокий предел прочности на разрыв в отличие от большинства общеизвестных полимеров этого класса [13]. Способность микроорганизмов (*Ralstonia eutropha*, ранее *Alcaligenes eutrophus* [14], *Alcaligenes latus* [15], *Comamonas testosteronii* [16], *Comamonas acidovorans* [17], *Hydrogenophaga pseudoflava* [18], *Chromobacterium* sp. [19], *Rhodococcus ruber* [20]) синтезировать этот тип ПГА при росте на средах, содержащих в качестве углеродного субстрата 4-гидроксимасляную кислоту, γ -бутиролактон или 1,4-бутандиол, показана в серии работ еще в 90-е годы прошлого века. Однако ингибирующее воздействие этих субстратов отрицательно сказывается на общем урожае биомассы и выходах сополимера. В последние годы изучение этого представителя ПГА активизировалось. В качестве новых продуцентов сополимера ЗГБ-СО-4ГБ описаны рекомбинантные и природные штаммы [21–24].

Цель работы – исследование возможности получения нового типа сополимера ЗГБ-СО-4ГБ с различным содержанием 4-гидроксibuтирата (**4ГБ**) природными штаммами водородокисляющих бактерий на среде с γ -бутиролактоном и оценка влияния фракции 4ГБ на свойства сополимера.

МЕТОДИКА

Исследованы 2 штамма водородокисляющих бактерий: *Ralstonia eutropha* B5786 [25] и *Cupriavidus eutrophus* B10646, которые культивировали в строго стерильном периодическом режиме на термостатируемой качалке “New Brunswick” (США) в стеклянных колбах объемом 1.0 л с коэффициентом заполнения 0.5 на минеральной солевой среде Шлегеля (г/л): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 9.1, KH_2PO_4 – 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.2, $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.025. Микроэлементы вводили в среду по прописи Хоагленда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор микроэлементов содержит (г/л): H_3BO_3 – 0.228, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.030, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.008, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.008, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.176, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, NiCl_2 – 0.008. В автотрофных условиях в качестве источника углерода и

энергии использовали смесь газов (CO_2 , H_2 , O_2). С помощью компрессора удаляли из колб воздух, замещая объем газовой смесью из газгольдера, соединенного с колбами системой герметичных шлангов. Соотношение компонентов в газовой смеси было следующим: CO_2 – O_2 – H_2 как 1 : 2 : 7 по объему. При гетеротрофных условиях выращивания бактерий использовали фруктозу или масляную кислоту. Применяли разработанный ранее режим культивирования бактерий с лимитированием роста по азоту на первом этапе (0.4–0.5 г/л NH_4Cl) и в безазотной среде – на втором, при pH 7.0 и 30°C [26]. Для стимулирования образования мономеров 4ГБ и синтеза сополимеров ЗГБ-СО-4ГБ в состав среды в качестве предшественника мономеров 4ГБ вносили γ -бутиролактон (“Fluka”, Германия). Длительность культивирования штаммов в зависимости от условий углеродного питания культур в отдельных экспериментах составляла от 48 до 144 ч. Подачу γ -бутиролактона в культуру варьировали как по количеству, так и концентрации добавок.

Концентрацию фруктозы в среде определяли реорциновым методом [27]. Урожай биомассы регистрировали по весу сухого вещества и оптическим показателям культуры. Содержание сополимера в клетках определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза биомассы на хромато-масс-спектрометре Agilent 5975 Inert, “Agilent” (США); в качестве внутреннего стандарта использовали бензойную кислоту. Для корректного определения соотношения мономеров 3- и 4-гидроксibuтирата в сополимере, помимо регистрации масс-спектров, сняты ^1H -ЯМР спектры растворов сополимера в CDCl_3 (ЯМР-спектрометр Avance III 600 “Bruker” (Германия). Текущую концентрацию γ -бутиролактона в культуре анализировали хроматографически.

Рентгеноструктурный анализ и определение степени кристалличности образцов ПГА выполнены на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE “Bruker” (Германия) (графитовый монохроматор на отраженном пучке). Для этого сняты спектры в пошаговом режиме (“scan-step”) с шагом 0.04° и 2-секундной выдержкой для измерения интенсивности в точке (режим работы прибора – 40 кВ \times 40 мкА).

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение ПГА исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии Breeze System (“Waters”, США) относительно полистироловых стандартов (“Fluka”, Швейцария, Германия). Находили средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, а также полидисперсность ($PD = M_w/M_n$).

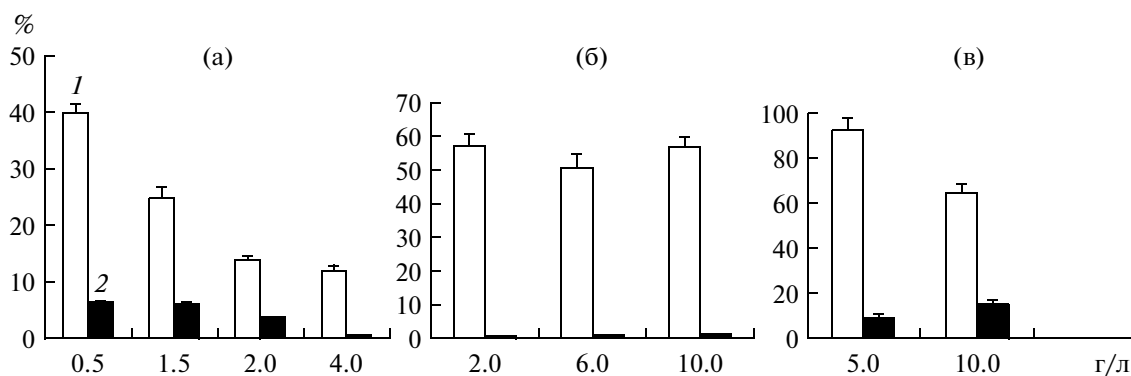


Рис. 1. Выход сополимера 3-гидроксибутирата-СО-4-гидроксибутирата (% от веса сухой биомассы) (1) и содержание 4-гидроксибутирата в сополимере (мол. %) (2) в условиях автотрофной (а), гетеротрофной, субстрат – фруктоза (б) или масляная кислота (в) культуры бактерий *R. eutropha* B5786 при различных концентрациях γ -бутиролактона в среде (г/л).

Эксперименты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку результатов осуществляли общепринятыми методами [28] с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В автотрофной культуре *R. eutropha* B5786, выращиваемой в колбах на качалке, при дефиците в среде азота на моноуглеродном субстрате (CO_2), урожай и выход полимера за 68 ч ферментации составили соответственно 6.1 ± 0.2 г/л и $65.4 \pm 4.2\%$. В составе полимера, синтезированного штаммом *R. eutropha* B5786 на моноуглеродном субстрате, было 99.2 мол. % 3-гидроксибутирата и 0.8 мол. % 3-гидроксиивалерата. Ранее нами было показано, что более длительное культивирование бактерий в колбах, а также использование совершенной ферментационной техники позволяет увеличить выход полимера до 85–90% [29]. Однако в данном исследовании главный вопрос, на который следовало получить ответ, обладает ли данный штамм способностью включать в ПГА в качестве мономера 4ГБ и какие ростовые условия для культуры следует для этого обеспечить. Вопрос о выходе собственно биомассы в культуре был второстепенным, поэтому длительность культивирования в автотрофной культуре в колбах обычно не превышала 60–70 ч.

С учетом имеющихся данных о токсичности γ -бутиролактона [14] исследовано влияние концентрации этого дополнительного субстрата на рост и синтез ПГА *R. eutropha* B5786 в диапазоне концентраций от 0.5 до 4.0 г/л. Результаты биосинтеза ПГА и включения 4ГБ в сополимер на смешанном углеродном субстрате ($\text{CO}_2 + \gamma$ -бутиролактон) представлены на рис. 1а, из которого следует, что γ -бутиролактон ингибировал рост и накопление полимера. Показано, что увеличение концентрации γ -бутиро-

лактона в среде не только не увеличивало содержание 4ГБ в сополимере, но ингибировало процесс превращения γ -бутиролактона в 4ГБ. Если при концентрации γ -бутиролактона в среде 0.5 г/л степень его превращения в 4ГБ составила 0.21, то при 4 г/л – менее 0.02. Эти результаты согласуются с данными других авторов по образованию 4ГБ из токсичного γ -бутиролактона. Так, у штамма *Cupriavidus* sp. USNAA1020 при росте только на γ -бутиролактоне степень его превращения в 4ГБ варьировала от 0.04 до 0.1 [30], у *Comamonas acidovorans* составила 0.12 [17], у *Hydrogenophaga pseudoflava* – 0.33 [18].

Независимо от величины добавки γ -бутиролактона, урожай культуры не превышал 5.0 г/л, что на 25–30% ниже контроля (рост бактерий в аналогичных условиях на моноуглеродном субстрате – CO_2). При исследовании влияния добавок γ -бутиролактона на синтез полимера обнаружено дозозависимое снижение внутриклеточной концентрации полимера; при этом максимальный выход полимера ($39.9 \pm 1.7\%$) получен при минимальной однократной добавке γ -бутиролактона в дозе 0.5 г/л. Синтезированный в этих условиях полимер содержал 3 мономера: доминирующий 3-гидроксибутират, 4ГБ и минорные включения 3-гидроксиивалерата. Наличие 4ГБ выявлено во всех пробах, максимальная величина включения этого мономера составила 6.3 мол. % (рис. 1а).

Для снижения токсического действия на культуру γ -бутиролактона использовали режим дробного дозирования. Варьируя величину подаваемой в культуру бактерий дозы γ -бутиролактона и последующее время культивирования, удалось повысить общий урожай бактерий, а также выход полимера. При двух добавках γ -бутиролактона (суммарная концентрация 6 г/л) выход полимера составил 55.7% от веса сухой биомассы без потери общей продуктивности культуры, однако величина вклю-

чения 4ГБ осталась на прежнем уровне и не превышала 6 мол. %. При подаче γ -бутиролактона в концентрации 9.0 г/л тремя добавками по 3 г/л с перерывами в 8 ч выход полимера составил 50.3% при общем урожае биомассы 6.0 г/л и аналогично низком (не выше 6 мол. %) содержании 4ГБ.

При гетеротрофном выращивании бактерий *R. eutropha* B5786 на фруктозе в качестве основного субстрата ингибирующий эффект γ -бутиролактона был выражен в меньшей степени (рис. 1б). Доза однократной подачи γ -бутиролактона в культуру составила 2.0, 6.0 и 10.0 г/л. Ингибирование роста бактерий имело место только при самой высокой концентрации γ -бутиролактона; урожаем биомассы при этом не превысил 4.5 г/л. В двух других вариантах урожаем биомассы был близок к контролю, порядка 7.0–7.5 г/л при длительности культивирования 58 ч. В этих условиях потребление γ -бутиролактона культурой было более активное по сравнению с автотрофным процессом, и через 34 ч после его добавления концентрация γ -бутиролактона в культуре не превышала 0.1–0.2 г/л. При ингибирующей концентрации γ -бутиролактона выход полимера составил $56.7 \pm 2.9\%$ от веса сухой биомассы, но доля 4ГБ в полимере при этом не превысила 2 мол. %. При подаче γ -бутиролактона в культуру в дозе 6.0 и 2.0 г/л выход полимера соответственно составил 50.6 ± 4.1 и $57.3 \pm 3.4\%$ от веса сухой биомассы, однако содержание 4ГБ в сополимере было менее 2 мол. %. Переход на режим дробной подачи γ -бутиролактона в культуру обеспечил увеличение урожая полимера до 65.9–78.1% от веса сухой биомассы, однако с незначительным изменением содержания в нем 4ГБ, до 3.8–4.1 мол. %.

Замена фруктозы масляной кислотой (использовали натриевую соль масляной кислоты) положительно влияла на выход сополимера и его состав. В связи с тем, что концентрация масляной кислоты свыше 5.0 г/л ингибировала рост бактерий, использовали режим с дробными добавками этого субстрата. Выращивание *R. eutropha* B5786 на среде с масляной кислотой и с двумя добавками γ -бутиролактона (суммарная концентрация γ -бутиролактона составила 6 г/л) позволило достичь выхода полимера до 81.7%. Однако увеличения доли 4ГБ в сополимере не происходило; величина фракции не превысила 4.4 мол. %.

Таким образом, варьируя условия углеродного питания, включая тип и концентрацию основного углеродного субстрата и режим дозирования дополнительного субстрата (γ -бутиролактон), удалось увеличить выходы полимера и урожая биомассы в культуре *R. eutropha* B5786 и обеспечить получение сополимеров 3ГБ-СО-4ГБ с включением 4ГБ от 0.6 до 6.3 мол. %.

Согласно данным литературы, для увеличения доли 4ГБ в сополимере в среду с γ -бутиролактоном добавляют ацетат, пропионовую кислоту, аминокислоты. Это позволило в отдельных случаях увеличить включение 4ГБ до 60–80 мол. %, однако при общем низком выходе полимера (19–38% от веса сухой биомассы) [22, 30, 31]. Позитивное влияние данных дополнительных углеродных субстратов на синтез сополимера и соотношение в нем мономеров 3- и 4-гидроксibuтирата, возможно, связано с тем, что утилизация этих соединений сопровождается увеличением внутриклеточного пула ацетил-СоА, что, в свою очередь, ингибирует реакцию расщепления 4-гидроксibuтирил-СоА до двух молекул ацетил-СоА и, соответственно, приводит к возрастанию содержания 4ГБ и включению его в сополимер [30].

Реализованный далее режим выращивания *R. eutropha* B5786 на среде, содержащей в качестве основного субстрата пропионовую кислоту в концентрации 2 г/л и добавки γ -бутиролактона, позволил незначительно повысить содержание 4ГБ в полимере (до 8.1 мол. %), при этом в нем, помимо 3-гидроксibuтирата, присутствовал в качестве третьего мономера 3-гидроксивалерат (35.2 мол. %).

Выращивание бактерий на масляной кислоте с добавками γ -бутиролактона позволило получить более высокие результаты (рис. 1в). Урожай бактерий и выход полимера варьировали в широких пределах в зависимости от соотношения в культуре масляной кислоты и добавки γ -бутиролактона, максимальные выходы составили соответственно 7.1 г/л и 92.7% от веса сухой биомассы; при этом содержание 4ГБ варьировало в диапазоне 8.7–16 мол. %.

Использование в качестве продуцента сополимера 3ГБ-СО-4ГБ штамма *Cupriavidus eutrophus* B10646, обладающего повышенной толерантностью к воздействию γ -бутиролактона, в качестве моноуглеродного субстрата в концентрации 10 г/л позволило увеличить содержание 4ГБ в сополимере до 24.3 мол. %.

Все полученные нами образцы сополимера 3ГБ-со-4ГБ были дополнительно проверены на включение 4ГБ в полимер методом ^1H -ЯМР. Проведенные исследования подтвердили наличие 4ГБ в полимере. На рис. 2 представлены спектры ^1H -ЯМР образцов сополимера с включением 4ГБ 8.7 и 16 мол. %.

Таким образом, синтезированы сополимеры различного состава, которые были очищены до гомогенного состояния, что позволило исследовать их свойства.

Важнейшими характеристиками полимеров служат величина молекулярной массы (ММ) и степень

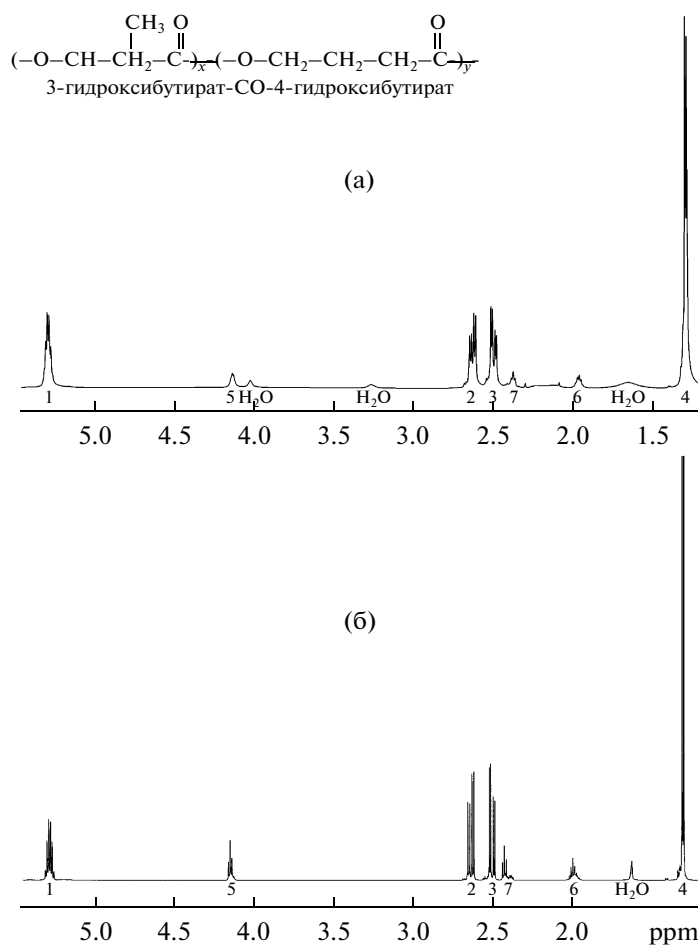


Рис. 2. Спектры ^1H -ЯМР сополимера 3ГБ-СО-4ГБ с содержанием 4ГБ 8.7% (а) и 16% (б).

полимеризуемости. Полидисперсность позволяет оценить, каково соотношение в полимере фрагментов с различной степенью полимеризуемости. Корректная регистрация данных параметров возможна только с применением гелепроникающей хроматографии, которая позволяет определить ММ и полидисперсность полимера.

С использованием гелепроникающей хроматографии определена ММ серии синтезированных образцов сополимеров 3ГБ-СО-4ГБ (таблица). В исследованном диапазоне соотношения мономеров в сополимере (включение 4ГБ варьировало от 8.7 до 24.3 мол. %) не обнаружено влияния этого параметра на ММ и полидисперсность сополимера. Сред-

Молекулярная масса и степень кристалличности сополимеров, синтезируемых *R. eutropha* B5786

Содержание 4ГБ в сополимере 3ГБ-СО-4ГБ, мол. %	Среднечисловая молекулярная масса (M_n), кДа	Средневесовая молекулярная масса (M_w), Да	Полидисперсность	Степень кристалличности, %
0	760 ± 15.2	1300 ± 28.7	1.60 ± 0.03	76
8.7	230 ± 1.7	630 ± 3.5	2.76 ± 0.03	44
10.7	480 ± 9.1	1110 ± 17.9	2.32 ± 0.06	43
14.9	320 ± 6.6	850 ± 12.2	2.65 ± 0.04	44
16	370 ± 5.2	970 ± 18.2	2.59 ± 0.04	43
17	370 ± 12.2	850 ± 24.2	2.31 ± 0.06	25
24.3	285 ± 5.3	540 ± 9.6	1.91 ± 0.01	12

нечисловая молекулярная масса у серии образцов варьировала в диапазоне 230–480 кДа; средневесовая молекулярная масса составила 540–1110 кДа; полидисперсность от 1.91 до 2.76 без четкой связи с содержанием 4ГБ в сополимере. Это подтверждает ранее полученные результаты об отсутствии связи между составом ПГА и молекулярной массой [29].

Установлено, что включение 4ГБ резко (существенно в большей степени по сравнению с 3-гидроксивалератом и 3-гидроксигексаноатом) влияет на соотношение кристаллической и аморфной зон в сополимере, значительно снижая кристалличность последнего (таблица). Впервые удалось получить образцы ПГА, имеющие пониженную степень кристалличности (от 44 до 12%).

В результате выполненных исследований найдены условия культивирования водородокисляющих бактерий, позволяющие получать высокие общие выходы высокомолекулярного и низкокристаллического сополимера с включением 4ГБ свыше 20 мол. %.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, Пост. Правительства РФ № 220 (проект “Биотехнологии новых биоматериалов”), и Программы интеграционных исследований Президиума СО РАН (проект № 96).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Philip S., Keshavarz T., Roy I. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2007. Т. 82. № 3. P. 233–247.
2. Fukui T., Doi Y. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 49. № 3. P. 333–336.
3. Bormann E.J., Roth M. // Biothechnol. Lett. 1999. V. 21. № 12. P. 1059–1063.
4. Ishizaki A., Tanaka K., Taga N. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 57. № 1–2. P. 6–12.
5. Volova T.G., Kalacheva G.S., Altuhova O.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 58. № 5. P. 675–678.
6. Doi Y., Tamaki A., Kunioka M., Soga K. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988. V. 28. № 4–5. P. 330–334.
7. Liebergesell M., Hustede E., Timm A., Steinbüchel A., Fuller R.C., Lenz R.W., Schlegel H.G. // Arch. Microbiol. 1991. V. 155. № 5. P. 415–421.
8. Dennis D., McCoy M., Stangl A., Valentin H.E., Wu Z. // J. Biotechnol. 1998. V. 64. № 2–3. P. 177–186.
9. Antonio R.V., Steinbüchel A., Rehm B.H.A. // FEMS Microbiol. Lett. 2000. V. 182. № 1. P. 111–117.
10. Green P.R., Kemper J., Schechtman L., Guo L., Satkowski M., Fiedler S., Steinbüchel A., Rehm B.H.A. // Biomacromolecules. 2002. V. 3. № 1. P. 208–213.
11. Волова Т.Г., Миронов П.В., Васильев А.Д. // Пластические массы. 2006. № 5. С. 35–41.
12. Volova T.G., Kalacheva G.S., Steinbüchel A. // Macromol. Symposia. № 1. 2008. V. 269. № 1. P. 1–7.
13. Martin D.P., Williams S.F. // Biochem. Eng. J. 2003. V. 16. № 2. P. 97–105.
14. Nakamura S., Doi Y., Scandola M. // Macromolecules. 1992. V. 25. № 17. P. 4237–4241.
15. Hiramitsu M., Koyama N., Doi Y. // Biotechnol. Lett. 1993. V. 15. № 5. P. 461–464.
16. Renner G., Pongratz K., Brauneegg G. // Food Technol. Biotechnol. 1996. V. 34. № 2–3. P. 91–95.
17. Saito Y., Doi Y. // Int. J. Biol. Macromol. 1994. V. 16. № 2. P. 99–104.
18. Choi M.H., Yoon S.C., Lenz R.W. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 4. P. 1570–1577.
19. Kimura H., Iwama M., Sasaki S., Takeishi M. // Chem. Lett. 1999. V. 28. № 8. P. 737–738.
20. Haywood G.W., Anderson A.J., Williams D.R., Dawes E.A., Ewing D.F. // Int. J. Biol. Macromol. 1991. V. 13. № 2. P. 83–88.
21. Li Z.-J., Shi Z.-Yu, Jian J., Guo Y.-Y., Wu Q., Chen G.-Q. // Metabolic Engineering. 2010. V. 12. № 4. P. 352–359.
22. Chanprateep S., Katakura Yo., Visetkoop S., Shimizu H., Kulpreecha S., Shioya S. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 35. № 11. P. 1205–1215.
23. Vigneswari S., Vijaya S., Majid M.I.A., Sudesh K., Sripaut C.S., Azizan M.N.M., Amirul A.A. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 36. № 4. P. 547–556.
24. Патент США. 2007. № 7229804.
25. Стасишина Г.Н., Волова Т.Г. // Патент РФ. 1992. № 2053292.
26. Волова Т.Г., Калачёва Г.С., Константинова В.М., Пузырь А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 1992. Т. 28. № 2. С. 221–229.
27. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.И., Ярош Н.П., Луковникова Г.А. Методы биохимического исследования растений. Л.: Колос, 1972. 306 с.
28. Плохинский Н.А. Алгоритмы биометрии. М.: Издво МГУ, 1980. 150 с.
29. Волова Т.Г., Калачёва Г.С. // Микробиология. 2005. Т. 74. № 1. С. 63–69.
30. Lee Y.-H., Kang M.-S., Jung Y.-M. // J. Biosci. Bioeng. 2000. V. 89. № 4. P. 380–383.
31. Kimura H., Ohura T., Matsumoto T., Ikarashi T. // Polym. Int. 2008. V. 57. № 1. P. 149–157.

Synthesis of 3-Hydroxybutyrate-CO-4-Hydroxybutyrate Copolymers by Hydrogen-Oxidizing Bacteria

T. G. Volova^a, N. O. Zhila^b, G. S. Kalacheva^b, V. A. Sokolenko^c, and E. J. Sinski^d

^a Siberian Federal University, Krasnoyarsk, 660041 Russia

e-mail: volova45@mail.ru

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

^c Chemistry and Chemical Technology Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia

^d Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, 02139 United States of America

Received January 21, 2011

Abstract—Synthesis of 3- and 4-hydroxybutyrate copolymer (³HB-CO-4HB), the most promising member of the biodegradable polyhydroxyalcanoate (PHA) family, has been studied. Cultivation conditions of naturally occurring strains of hydrogen-oxidizing bacteria *Ralstonia eutropha* B5786 and *Cupriavidus eutrophus* B10646 have been optimized to ensure efficient synthesis of the 3HB-CO-4HB copolymer. A set of highly pure samples of the 3HB-CO-4HB copolymer with 4HB content varying from 8.7 to 24.3 mol % has been obtained. Incorporation of 4-HB into the copolymer was shown to cause a more pronounced decrease in polymer crystallinity than the incorporation of 3-hydroxyvalerate or 3-hydroxyhexanoate; samples with a degree of crystallinity below 30% have been obtained. The weight average molecular mass of the 3HB-CO-4HB copolymers was shown to be independent on the monomer ratio and to vary broadly (from 540 to 1110 kDa).

УДК 579.66

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО МЕЛАНИНА И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

© 2011 г. А. Е. Агаджанян, Р. А. Асатуриян, А. А. Амбарцумян, Л. Б. Саргисян, А. С. Овсепян, А. А. Варданян, А. С. Сагиян

Научно производственный центр “Армбиотехнология” ГНКО НАН РА, Ереван 0056, Армения

e-mail: aghajanyanarmen@yahoo.com

Поступила в редакцию 12.01.2011 г.

Разработан эффективный сорбционный метод выделения и очистки меланина из культуральной жидкости *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* K1, представлена принципиальная технологическая схема получения. Идентификацию полученного пигмента с образцами природного и синтетического меланинов проводили методом ИК-спектроскопии, а соотношение интенсивностей оптического поглощения при 650 и 500 нм позволяет выделенный меланин отнести к классу эумеланинов. Термической обработкой установлено, что аморфный осадок меланина устойчив при температурах до 120°C, при этом концентрация парамагнитных центров изменяется с 0.053×10^{18} спин/г (48°C) до 0.25×10^{18} спин/г (120°C). Повышение температуры обработки до 210°C приводит к существенному увеличению концентрации неспаренных электронов, и при 280°C наблюдается ее резкий рост. При 350°C рост прекращался, а затем наблюдался спад. Полученные результаты подтверждены методами ИК-спектроскопии и дериватографии.

Меланины – темноокрашенные высокомолекулярные нерегулярные биополимеры, образующиеся в организмах при ферментативном окислении азотсодержащих и безазотистых полифенолов [1, 2]. Являясь ингибитором свободнорадикальных реакций, меланины способны подавлять рост злокачественных опухолей, оказывать защитное действие от летальных доз ионизирующего излучения, тормозить процессы перекисного окисления липидов, стимулировать рост растений. Меланины используются в медицине, фармакологии, сельском хозяйстве и в других областях [3].

Меланины получают химическим [4] и микробиологическим синтезом [5–8], а также экстракцией из животного и растительного материала [2, 9].

Химический синтез меланина, из-за высокой стоимости исходных материалов и сложности технологического процесса, в промышленном масштабе трудно осуществим, что в значительной степени сказывается на стоимости конечного продукта.

Трудности выделения и очистки меланинов из биологических материалов и изучения их структуры связаны с тем, что все меланиновые пигменты являются аморфными веществами [1, 2]. Вследствие этого, а также из-за большого разнообразия путей их биосинтеза, точная структура и функции многих меланинов до сих пор не выяснены [10] и приведенные в литературе данные об их физико-химических свойствах, в основном, относятся к водонерастворимым диоксифенилаланин-меланинам [1, 2, 11, 12].

Большое разнообразие биологического сырья для получения меланина послужило препятствием созданию стандартного метода выделения и очистки пигмента.

Основная проблема при микробиологическом способе получения меланина заключается в том, что использованные штаммы при ферментации синтезируют внутриклеточный меланин. Для получения меланина нами использовался штамм-продуцент, накапливающий в культуральной жидкости (КЖ) внеклеточный водорастворимый меланин, что значительно облегчает последующие процессы его выделения.

Цель исследования – разработка эффективного способа получения водорастворимого микробного меланина и изучение его физико-химических свойств.

МЕТОДИКА

Использовали штамм-продуцент *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* K1 (депонированный номер ИНМИА 11212), полученный нами из производственного инсектицидного штамма *B. thuringiensis galleriae* 69-6 методом химического мутагенеза [13]. Ферментацию проводили в лабораторном ферментере Анкум-2М (Россия) с рабочим объемом 7 л, при следующих технологических параметрах: рН 7.3–7.8; температура 30–32°C, $KLa = 180–220 \text{ ч}^{-1}$; продолжительность ферментации 72–76 ч. Для ферментации использовали среду следующего со-

става (%): пшеничные отруби – 1.5–2.0; 20%-ный сернокислотный гидролизат рыбной муки – 2.5–3.0; NaCl – 0.2; $MnCl_2$ – 0.01; $CaCl_2$ – 0.05. Концентрация меланина в полученной культуральной жидкости составляла 7–8 г/л. Биомассу использовали в качестве основы для получения инсектицидного препарата.

Сорбцию меланина из супернатанта КЖ на низкоосновном пористом анионите ИА-1р конденсационного типа (Россия) обладающим хорошей поглотительной способностью пигментов [14, 15] в динамических условиях проводили при линейной скорости потока супернатанта по направлению снизу вверх, равной 0.034 см/с. Элюцию меланина со смолы проводили 3%-ным аммиачным раствором при скорости потока элюента по направлению сверху вниз, равной 0.015 см/с.

Контроль за ходом процесса осуществляли изменением оптической плотности (ОП) раствора при 315 нм и сравнением полученной величины со значением ОП стандартного раствора меланина.

ИК-спектры снимали на спектрометре Nexus Nicolet FT-IR (“Thermo Nicolet”, США) с призмой из ZnSe (4000–650 cm^{-1}) с однократным отражением, число сканирований 32, разрешение 4 cm^{-1} .

Спектры ЭПР регистрировали при 20°C на спектрометре типа SE/X-2543 (“Radiopan”, Польша) с высокочастотной модуляцией 100 кГц на частоте 9.4 ГГц.

Оптические спектры поглощения снимали на спектрометре 550S UV-VIS (“Perkin Elmer”, США).

Термогравиметрический анализ проводили на дериватографе марки Q-1500 (“MOM”, Венгрия) при скорости нагрева 5°C/мин в атмосфере воздуха.

Содержание белка в образцах меланина определяли по методу Брэдфорд.

Анализ элементного состава меланина осуществляли на анализаторе EURO EA 300 (Италия).

Для приготовления стандартных растворов использовали синтетический меланин фирмы “Sigma” (США), а также полученный нами очищенный препарат водорастворимого меланина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали, что наиболее эффективный способ выделения меланина из супернатанта КЖ – сорбционный [16, 17]. Сорбция меланина из супернатанта изучена в зависимости от типа применяемого сорбента или смолы, величины рН раствора и размера гранул смолы [17]. По совокупности параметров (доступность, прочность, большая емкость, легкость элюции) наиболее предпочтительным сорбентом для извлечения меланина из КЖ оказалась ионообменная смола ИА-1р (фракция –0.6 – +0.2 мм) в СГ-форма, с рН равновесного раствора при сорбции 3.5–4.0.

Несмотря на то, что при этом часть пигмента из раствора переходила в осадок, в случае соблюдения условий гидродинамического режима, образовавшийся осадок не мешал эффективной сорбции [17]. Нерастворенная часть меланина вместе с сорбированной при элюции аммиачной водой переходила в элюат. Собранный аммиачный элюат подвергали вакуум-упариванию до концентрации меланина 70–90 г/л. С целью освобождения от пирогенов и других микропримесей элюат подвергали ультрафильтрации с дальнейшим вакуум-упариванием до концентрации меланина в растворе 250–270 г/л. Из упаренного раствора высушиванием получали черно-коричневую аморфную массу с металлическим блеском [16, 17]. Разработанная принципиальная технологическая схема выделения меланина из КЖ представлена на рис. 1.

Для установления принадлежности полученного пигмента к меланинам использовали качественные реакции с окислителями (H_2O_2 , $KMnO_4$, $FeCl_3$). Результаты показали присутствие в молекуле полученного пигмента хиноидных и фенольных структур, что подтвердило его меланиновую природу [1, 2, 18].

Поглощение света природными пигментами имеет фундаментальное значение и определяет основную функцию меланинов. Спектрофотометрирование полученного пигмента осуществляли в водном и в щелочном растворах, а синтетического меланина – в щелочном растворе.

Величины ОП растворов синтетического и микробного меланинов в щелочной среде монотонно снижались с увеличением длины волны. У спектров обоих меланинов в области 300–340 нм наблюдалось плато, что, по-видимому, связано с наличием в молекуле меланинов группировок ароматической природы, поглощающих свет при вышеуказанной длине волны. Снижение рН раствора приводило к сдвигу пика спектра поглощения микробного меланина в сторону увеличения длины волны. Из рис. 2 видно также, что в области 220–300 нм при нейтральном рН раствора у микробного меланина наблюдалось снижение величины коэффициента экстинкции, что коррелировало с данными ЭПР-спектроскопии – уменьшение величины сигнала ЭПР с понижением значения рН раствора [16].

Исследована интенсивность спектра поглощения синтетического и микробного меланина в зависимости от времени выдержки растворов. Опыты показали независимость коэффициента экстинкции как синтетического, так и микробного меланина от времени выдержки их растворов в течение 15 сут при комнатной температуре в темноте.

В ряде работ для определения принадлежности пигментов к эумеланинам или феомеланинам предлагается использовать отношение интенсивностей поглощения при 650 и 500 нм. Так, у синтетических

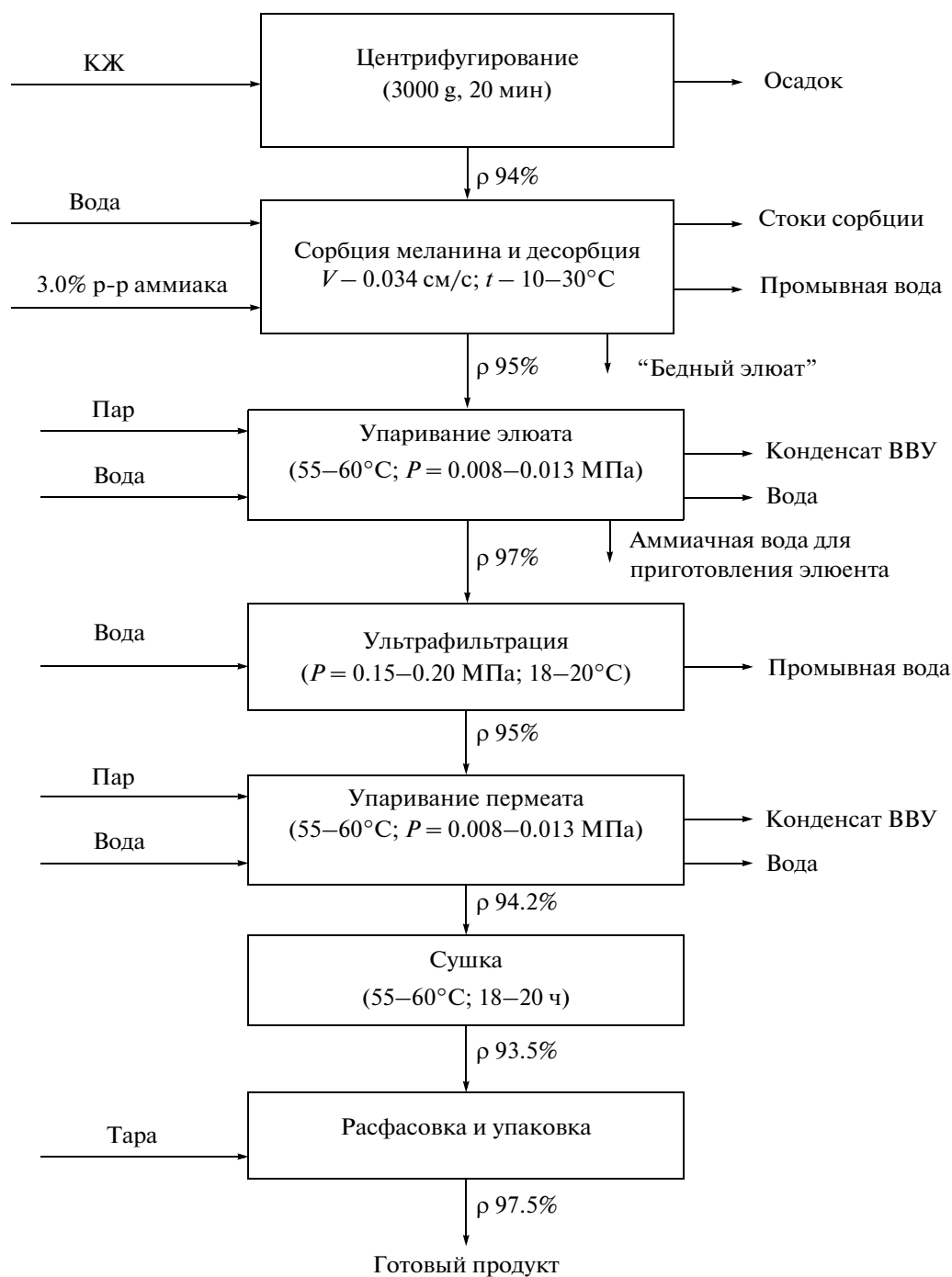


Рис. 1. Принципиальная технологическая схема выделения меланина из КЖ, ρ – выход на стадии, ВВУ – вакуум выпарная установка.

эумеланинов отношение D 650/500 колебалось в диапазоне 0.25–0.33, а у синтетических феомеланинов – диапазоне 0.10–0.14 [19, 20]. Проведенные нами эксперименты показали, что отношение интенсивностей поглощения микробного и синтетического меланина при 650 и 500 нм составляло 0.328 и 0.315 соответственно. Из полученных по вышеука-

занному способу данных следует, что оба меланина принадлежат к эумеланинам.

В ИК-спектре водорастворимого микробного меланина присутствовали полосы, характерные для меланинов [16, 17]. При сопоставлении ИК-спектров виноградных меланиновых пигментов [21], пигментов, выделенных из природной и

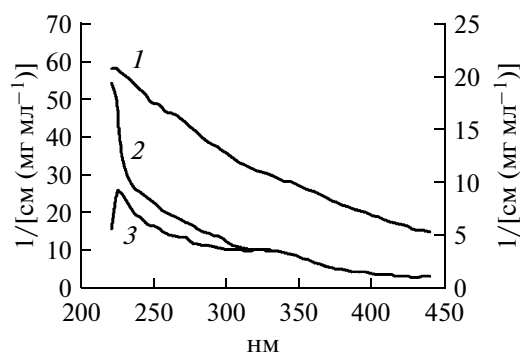


Рис. 2. Спектры поглощения меланина: 1 – синтетический меланин, рН 11.5 (левая шкала); 2 – микробный, рН 11.5 (правая шкала); 3 – микробный, рН 7.2 (правая шкала).

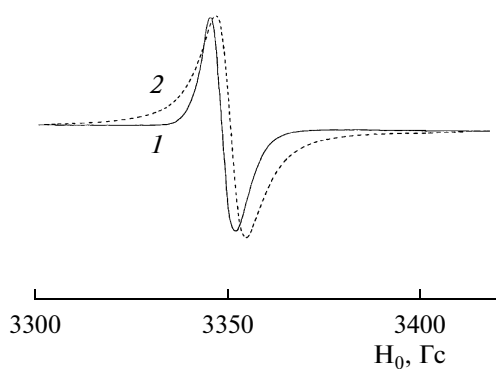


Рис. 3. Спектры ЭПР меланинов микробного (1) и синтетического (2) происхождения при 20°C.

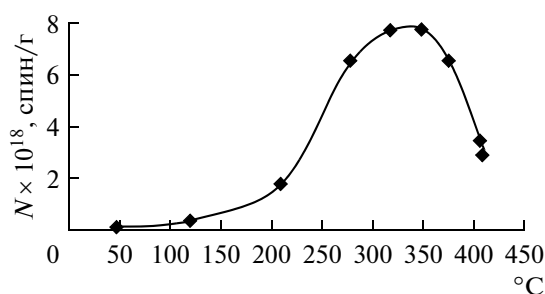


Рис. 4. Зависимость концентрации неспаренных электронов в микробном меланине от температуры обработки.

культивированной чаги [11], синтетического и полученного нами микробного меланина [16, 17] обнаруживается их сходство в отношении основных полос поглощения.

Особенностью меланинов, как природных полимеров, содержащих развитые системы сопряженных связей, является наличие неспаренных электронов. Все меланины без исключения имеют ЭПР-поглощение в виде слегка асиммет-

ричного синглетного сигнала без сверхтонкой структуры с величиной g -фактора, варьирующей в пределах 2.003–2.004 [22].

Парамагнетизм природных меланинов оказывает существенное влияние на многие важные свойства: электропроводность, обменную емкость, химическую реакционную способность, антиоксидантные свойства, биологическую активность и т.д. [11, 21–23].

Исходя из вышесказанного, для более полного исследования представлений о строении и свойствах исследуемых меланинов был применен метод ЭПР, который позволил получить информацию о парамагнитных центрах. Спектр микробного меланина представлял собой слегка асимметричный синглет без сверхтонкой структуры с шириной линии между точками максимальной крутизны около 7 гаусс и значением g -фактора, равным 2.003 (рис. 3).

Двойное интегрирование этого спектра показало, что в нем содержится 0.21×10^{18} спин/г парамагнитных центров. Спектр синтетического меланина был тоже синглетным, но линия поглощения представляла уже лоренцевую форму с g -фактором, равным 2,004 и шириной около 8 гаусс. Число неспаренных электронов в нем 0.37×10^{18} спин/г [16].

Полученный меланин хорошо растворим в воде, что позволило зарегистрировать его спектры ЭПР в растворе в зависимости от разбавления [16]. Показано, что в структуре меланина имелись два типа парамагнитных центров, один из которых являлся лабильным, а другой стабильным.

Исследование зависимости сигналов ЭПР от величины рН раствора показало, что в диапазоне рН от 3.0 до 7.6 наблюдалась почти линейная зависимость сигнала ЭПР от рН, а при рН выше 7.6 – ее резкий рост [16].

Изучено также влияние температурного воздействия на парамагнитные свойства микробного меланина и его растворимость. На рис. 4 представлена зависимость концентрации неспаренных электронов в 1 г микробного меланина от температуры обработки.

Контрольный образец, высушенный при 48°C, имел концентрацию 0.053×10^{18} спин/г. После прогрева до 120°C его концентрация увеличивалась до 0.25×10^{18} спин/г. Дальнейший рост температуры обработки до 210°C приводил к существенному увеличению концентрации неспаренных электронов и при 280°C наблюдался ее резкий рост. При 350°C рост прекращается, затем наблюдается спад.

Для понимания характера полученной кривой на этих же образцах меланина снимали ИК-спектры (рис. 5).

В спектре микробного меланина присутствуют полосы, которые являются идентификационными для меланинов [11, 16, 17]. Полосы в области 3400–

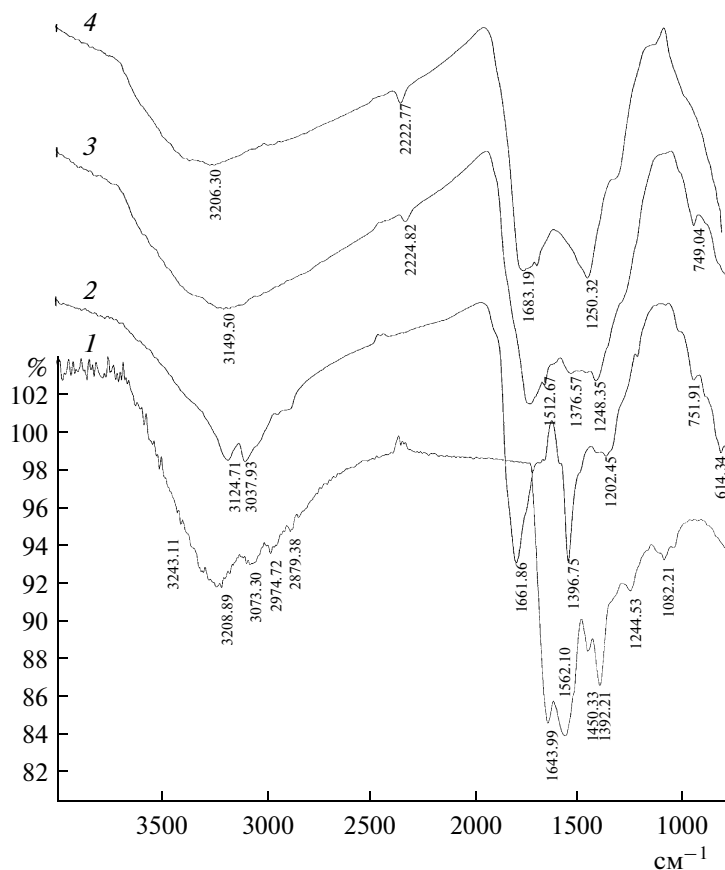


Рис. 5. ИК-спектры микробного меланина, обработанного при различных температурах: 1 – образец, высушенный при 48°C; 2 – 210°C; 3 – 280°C; 4 – 410°C.

3300 cm^{-1} обусловлены валентными колебаниями OH- и NH-групп; 2960–2870 cm^{-1} –CH₂-, –CH₃-групп; 1650–1600 cm^{-1} – колебаниями сопряженных двойных связей C=C и C=O, C=O в составе вторичных амидов; 1400 cm^{-1} – присутствием амидных и аминных групп, деформационными колебаниями NH-групп вторичных амидов, –CH₂ в составе алифатических радикалов, C=O хинонов; 1090 cm^{-1} – C–O-углеводных и спиртовых групп [24].

В исходном контрольном ИК-спектре (рис. 5, 1) наблюдалась полоса поглощения при 1644 cm^{-1} , которая относится к полосе сопряженных групп в меланине. В образце, обработанном при 210°C (рис. 5, 2), происходили резкие изменения в ИК-спектре: полоса, связанная с сопряженными связями, исчезала, и вместо нее появлялись 2 интенсивные полосы поглощения при 1662 и 1397 cm^{-1} . ИК-спектр образца меланина, прогретого при 280°C (рис. 5, 3), имел полосу, совершенно не связанную с сопряженными связями. Наконец, при 410°C (рис. 5, 4) наблюдался пик при 1683 cm^{-1} . По данным ИК-спектроскопии, наблюдалось соответствие между концентрацией спинов в меланине и температурой обработки образцов. Эти

данные подтверждены дериватографическим анализом (рис. 6).

Примерно с 80°C начиналось плавное уменьшение веса образца меланина. С 140°C наклон падения кривой изменения веса (рис. 6, 1) был более стремительным и это продолжалось до 320°C. Сравнительный анализ кривых дифференциально-термического анализа (рис. 6, 3) и дифференциально-термического изменения веса (рис. 6, 2) показывает, что появляющиеся эндотермические эффекты совпадали с изменением массы образца. На кривой выше 330°C, по-видимому, отражен процесс окисления углерода, который сопровождается дальнейшей потерей веса, и появление экзоэффекта. С 320°C меланин, по-видимому, начинал разлагаться, что подтверждается резким уменьшением концентрации свободнорадикальных состояний при температуре выше указанной. Эндотермические эффекты на кривых при низких температурах (менее 120°C), в основном, обусловлены удалением H₂O, а при высоких температурах – H₂O, CO₂ и NH₃ [25].

При высушивании образцов микробного меланина температуру можно поднимать до 120°C.

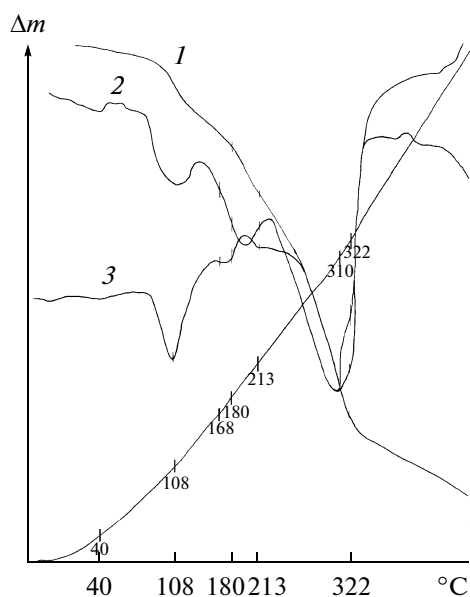


Рис. 6. Кривые дериватогаммы микробного меланина: 1 – изменение веса; 2 – дифференциально-термическое изменение веса; 3 – дифференциально-термический анализ.

Указанные данные были подтверждены биологической активностью полученных препаратов.

Исследовано также влияние температуры на растворимость микробного меланина. Для этого аморфный темно-коричневый осадок меланина подвергали термообработке при 45, 80, 120, 200, 350 и 500°C в течение 2 ч. Затем полученные образцы меланина растворяли в воде при различных величинах рН раствора. Опыты показали, что образцы, подвергнутые термообработке при 45, 80 и 120°C, хорошо растворялись в воде. Образцы меланина, высушенные при 200°C, не растворялись в воде, но растворялись при кипячении в 1 н. растворе едкого натра. Что касается образцов, высушенных при 350 и 500°C, то они не растворялись ни в растворе щелочи, ни в кислоте.

Анализируя полученные результаты, можно сделать следующее заключение. Аморфный осадок меланина устойчив при 120°C. При повышении температуры среды (до 200°C), по-видимому, началась деградация меланина, что приводило к частичному нарушению его структуры. В результате этого меланин терял способность растворяться в воде. При кипячении в щелочной среде меланин, по-видимому, восстанавливал первоначальную структуру и растворялся в воде. При температуре выше 350°C меланин подвергался разрушению и поэтому терял способность растворяться как в щелочной, так и кислой среде.

Молекулярная масса полученного микробного меланина составляла около 4 кДа [16].

Исследования показали, что в выделенных образцах меланина содержится примерно 25% белка [13]. Установлено, что в гидролизате доля кислых, нейтральных, ароматических и основных аминокислот была 44.0; 11.5; 37.3 и 7.3% соответственно. Это хорошо коррелирует как с данными экспериментов по изучению изоэлектрической точки (рI = 3.0–3.2), так и с данными экспериментов по растворимости (малая растворимость в диапазоне рН 2.6–4.3) [16].

Наличие пептида, по-видимому, придает меланину гидрофильные свойства, что обеспечивает хорошую растворимость в воде [3, 13]. В отдельных экспериментах было показано, что содержащийся в препарате меланина пептид не отделялся от пигмента в процессе гель-фильтрации.

Определен элементный состав полученного меланина: С (44.96–45.02%), Н (5.04–5.14%) и N (11.57–11.65%), сера (0.61%).

Исходя из данных гель-хроматографии и элементного анализа, водорастворимый меланин из культуры *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* K1 имеет следующую эмпирическую формулу: $C_{185}H_{257}O_{62}N_{40}S$.

Препараты меланина были успешно использованы в сельском хозяйстве в качестве биостимулятора роста растений [26] и в медико-биологических исследованиях [27].

Работа выполнена при поддержке научного гранта А.Н.С.Е.Ф. (NS-2077), основанного в Нью-Йорке, США.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лях С.П. Микробный меланогенез и его функция. М.: Наука, 1981. 274 с.
2. Prota G. Melanins and Melanogenesis. N.-Y.: Acad. Press, 1992. 290 p.
3. Барцевская М.И., Васильева С.М. // Вопросы мед. химии. 1999. № 1. С. 3–15.
4. Патент США. 1993. № 5227459А.
5. Патент России. 1998. № 2116036С1.
6. Патент США. 1998. № 5814495.
7. Патент России. 2002. № 2186105 С2.
8. Патент России. 2006. № 2278163 С2.
9. Жеребин Ю.Л., Макан С.Ю. // Докл. АН УССР. Сер. Б. 1978. № 7. С. 46–50.
10. Nosanchuk J.D., Casadevall A. // Cellular Microbiol. 2003. V. 5. № 4. P. 203–223.
11. Кукулянская Т.А., Курченко Н.В., Курченко В. Л., Бабицкая В.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 40. № 1. С. 68–72.
12. Голоунин А.В., Селютин Г.Е. // Журн. прикл. химии. 1996. Т. 69. № 4. С. 645–648.
13. Патент Армении. 2003. № 1385 А2.
14. Славинская Г.В., Зеленева Л.А., Кузнецова Н.С. // Теория и практика сорбционных процессов. 1983. Вып. 16. С. 101–105.

15. Жданович Ю.В., Насонова Л.И. // Антибиотики и химиотерапия. 1997. № 12. С. 33–40.
16. Aghajanyan A., Hambardzumyan A., Hovsepyan A., Asaturian R., Vardanyan A., Saghiyan A. // *Pigment Cell Res.* 2005. V. 18. P. 130–135.
17. Агаджанян А. // Биотехнология. 2006. № 1. С. 36–42.
18. Nicolaus R.A. *Melanins*. Paris: Herman, 1968. 247 p.
19. Ozeki H., Ito S., Wakamatsu K., Thody A.J. // *Pigment Cell Res.* 1996. V. 9. P. 265–270.
20. Wakamatsu K., Ito S. // *Pigment Cell Res.* 2002. V. 15. P. 174–183.
21. Богатский А.В., Жеребин Ю.Л., Макан С. Ю. // Виноделие и Виноградарство СССР. 1979. № 3. С. 52–54.
22. Макардий Ф.В., Венгер Л.А., Слюсаренко Л.И., Бараба И.Н. // Изв. ВУЗ. Химия и химическая технология. 1996. № 4–6. С. 3–10.
23. Рубан Е.Л., Лях С.П. // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1968. № 4. С. 530–541.
24. Наканиси К. Инфракрасные спектроскопия и строение органических соединений. М.: Мир, 1965. 216 с.
25. Simonovic B., Vucelic V., Hadzi-Povlovic A., Stepien K., Wilczok T., Vucelic D. // *J. Thermal Analysis.* 1990. V. 36. P. 2475–2482.
26. Popov Yu. G., Azaryan K.G., Petrosyan M.T., Agadjanyan J.A., Sherbakova E.N. // *Rev. Cytol. Biol. Vegetales.* 2005. V. 28. P. 252–259.
27. Sarkisyan J.S., Galoyan A.A., Kamalyan R.G., Charushyan V.A., Meliksetyan I.B., Pogosyan M.V., Hovsepyan A.S. Avakyan Z.F. // *Neurochem. J.* 2007. V.1. № 3. P. 227–234.

Obtaining of Water Soluble Microbial Melanin and Study of Its Some Properties

A. E. Aghajanyan, R. A. Asaturian, A. A. Hambardzumyan, L. B. Sargsyan,
A. S. Hovsepyan, A. H. Vardanyan, and A. S. Saghiyan

SPC "Armbiotechnology" NAS RA 14 Gyurjyan Str., Yerevan, 0056, Armenia

e-mail: aghajanyanarmen@yahoo.com

Received January 12, 2011

Abstract—The effective sorption method for melanin isolation and purification from fermentation solutions of *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* K1 has been elaborated, the principle process flowsheet is presented. The identification of obtained pigment with the samples of natural and synthetic melanin was done by IR-spectroscopy, and the intensity ratio of optical absorption at 650 and 500 nm allows to refer the isolated melanin to eumelanin class. By thermal treatment it was determined, that melanin's amorphous sediment is steady at up to 120°C temperatures, at that the concentration of paramagnetic centers is changed from 0.053×10^{18} spin/g (48°C) to 0.25×10^{18} spin/g (120°C). The rising of the temperature of treatment up to 210°C brings to substantial increase of the concentration of unpaired electrons, and at 280°C its sharp growth is observed. At 350°C growth stops, then sharp decrease is observed. The obtained results were confirmed by methods of IR spectroscopy and derivatographic analysis.

УДК 579.695:579.262:579.222.2

МЕТАНОГЕННАЯ ДЕСТРУКЦИЯ (АМИНО)АРОМАТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ АНАЭРОБНЫМИ МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ

© 2011 г. Ю. В. Линькова*, А. Т. Дьяконова*, М. А. Гладченко**, С. В. Калюжный**,
И. Б. Котова*, А. Стамс***, А. И. Нетрусов*

* Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992
e-mail: linkovay@gmail.com, kira1959@gmail.com

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

*** Университет Вагенингена, 6703 НВ, Вагенинген, Нидерланды

Поступила в редакцию 08.12.2010 г.

Исследована деструкция ряда ароматических субстратов анаэробными микробными сообществами. Выделены активные метаногенные микробные сообщества, разлагающие аминокислоты и азокрасители до CH_4 и CO_2 . Продукты первичной трансформации аминокислот определены как 2-гидроксибензиловый и бензиловый спирты, последовательно превращающиеся в бензоат. Показано, что выделенные микробные сообщества способны без лаг-периода, но с разными скоростями превращать в биогаз бензиловый спирт, бензоат, салициловую кислоту и азокраситель золотисто-желтый, используемые как исходные субстраты. Впервые определены промежуточные ароматические и линейные интермедиаты биодеструкции ароматических аминов полученными накопительными культурами. Установлено селективное воздействие аминокислотных субстратов на микробное сообщество, выражающееся в снижении разнообразия и последовательной смене доминирующих морфотипов.

С развитием новых химических технологий в биосферу поступает большое количество токсичных и устойчивых соединений, уровень которых возрастает с каждым годом. Аминоароматические соединения, используемые в производстве лекарственных препаратов и лакокрасочных материалов, содержатся в сточных водах предприятий химической и фармацевтической промышленности [1]. Аминоароматические вещества являются также продуктами восстановления азокрасителей в анаэробных условиях [2], причем некоторые имеют природное происхождение. Например, 2-аминобензойная кислота (2-АБК) – предшественник синтеза алкалоидов в растениях, а 4-АБК (4-аминобензойная кислота, витамин H_1) используется кишечной микробиотой для синтеза фолиевой кислоты.

Деструкция таких (амино)ароматических соединений зачастую происходит более эффективно в анаэробных условиях, т.к. в присутствии кислорода многие из них полимеризуются, что затрудняет дальнейшую минерализацию либо образуют токсичные промежуточные продукты [3]. В связи с этим актуальны исследования, направленные на получение микробных сообществ, способных осуществлять процесс минерализации (амино)ароматических ксенобиотиков в отсутствие кислорода.

К настоящему моменту изучены физиолого-биохимические особенности процесса анаэробного расщепления бензольного кольца [1, 4–7], описаны как чистые культуры, так и микробные

сообщества, разрушающие аминокислоты и азокрасители в нитрат-, сульфат- и карбонатредуцирующих условиях [4, 5, 8, 9].

Цель работы – изучение способности микробных сообществ к деструкции ряда ароматических субстратов, часть из которых является интермедиатами анаэробной конверсии аминокислот.

МЕТОДИКА

Исследуемые образцы. Накопительные и чистые культуры выделяли из проб анаэробных илов ряда очистных сооружений и донных отложений естественного водоема (табл. 1, 2). Анаэробные культуры **О4** и **Р2** были получены из мезофильного флокулярного ила очистных сооружений Курьяновской станции аэрации (ил **КСА**) путем адаптации к 2-АБК и 4-АБК соответственно в течение длительного периода. Исходным биоматериалом для культуры **ЕР** послужил анаэробный мезофильный гранулярный ил очистных сооружений пивоваренного завода “Efes Pilsener”, потребляемым субстратом являлась 2-АБК. Анаэробную культуру **Ц** получали путем адаптации анаэробного ила донных отложений озера Цайдам к 5-АСК. Используемые ароматические амины (2-АБК, 4-АБК, 5-АСК) являлись единственным источником углерода и энергии в сообществе.

Условия культивирования. Пробы ила рассевали на минеральную среду [10, 11] следующего состава (мг/л): NH_4Cl – 280, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 10,

Таблица 1. Свойства анаэробных образцов ила, взятых для исследования

Анаэробный образец	Происхождение биологического материала	Физико-химические условия на момент отбора пробы	Морфологические особенности
Мезофильный флокулярный ил, КСА	Очистные сооружения Курьяновской станции аэрации, Москва	15–25°C, pH 7.0, содержание белка 0.69 мг/мл	Черные мелкие частицы, состоящие из тонких палочек разной длины, мелких прямых палочек, кокков разного размера, преимущественно в виде тетрад и крупных диплококков
Мезофильный гранулярный ил, ЕР	Очистные сооружения (EGSB-реактор) стоков пивоваренного завода "Efes Pilsener", Москва	25–30°C, pH 6.5–6.9, содержание белка 1.13 мг/мл	Темные частицы, состоящие из 11 типов палочек и 3 типов кокков, с преобладанием крупных прямых палочек с обрубленными концами в виде коротких цепочек и коккобацилл, лежащих попарно
Донные отложения, Ц	Озеро Цайдам, Бурятия	15–20°C, pH 9.2, содержание белка 0.38–0.53 мг/мл, общая минерализация 14 г/л	Зеленовато-серые крупные рыхлые хлопья, состоящие из скопленных мелких и крупных кокков и палочек разной длины и формы

Таблица 2. Накопительные культуры, расщепляющие аминокислотные субстраты

Вариант	Исходный ил	Параметры культивирования, субстрат	Лаг-период активности биоразложения, сут	Средняя скорость деградации в цикле потребления субстрата, мМ/сут	Стабильность активности (возраст культуры/число циклов потребления)
О4	КСА	30°C, pH 6.5–7.5, 2-АБК	10	0.03	Высокая (9 лет 9 мес/355)
Р2	КСА	30°C, pH 6.5–7.5, 4-АБК	10–14	0.03	Высокая (3 года 7 мес/129)
ЕР	ЕР	30°C, pH 6.5–7.5, 2-АБК	7–14	0.08	Средняя (5 лет 6 мес/39)
Ц	Ц	30°C, pH 7.0, 5-АСК	113	0.07	Средняя (2 года/10)

K_2HPO_4 – 250, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 100, ЭДТА – 1, $NaHCO_3$ – 5000, H_3BO_3 – 0.05, $FeCl_3 \cdot 4H_2O$ – 2, $ZnCl_2$ – 0.05, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0.05, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0.03, $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ – 2, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0.05, $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ – 0.1. Среда содержала также 100 мг/л дрожжевого экстракта и индикатор анаэробных условий резазурин (0.2 мг/л), начальный pH среды был 7.0–7.5. Анаэробные условия создавали с помощью замены азотом газовой фазы в закрытых резиновыми пробками флаконах объемом 120 мл, а также внесения восстановителя – 0.278 г/л $Na_2S \cdot 9H_2O$. В качестве основных аминокислотных субстратов использовали 2- и 4-аминобензойные кислоты (2- и 4-АБК), 5-аминосалициловую кислоту (5-АСК), а также бензойную кислоту (БК), 2-гидроксибензиловый спирт (2-ГБС), бензиловый спирт (БС) и салициловую кислоту (СК). Субстраты и другие необходимые добавки хранили в виде стерильных концентрированных растворов в анаэробных условиях и вносили в сосуды шприцем до нужной концентрации. Для формирования анаэробных сообществ в жидкую среду, содержащую (амино)ароматический субстрат, вносили 5–10% (об./об.) гомогенизированной

пробы ила. Накопительные культуры инкубировали при 30°C в статических условиях в темноте и пересевали с помощью стерильных шприцев, соблюдая условия анаэробнозиса.

Определение токсичности. Токсичность ароматических интермедиатов определяли стандартным методом по активности ацетокластического метаногенеза микробного сообщества [12]. В сосуды для культивирования с минеральной анаэробной средой вносили анаэробно инокулят (10% от объема стандартной среды) и добавляли шприцем раствор ацетата натрия до конечной концентрации 2 г/л в качестве субстрата метаногенеза. После внесения аликвот концентрированных растворов токсикантов флаконы помещали в термостат при 30°C. Конечные концентрации ароматических веществ в жидкой фазе составили от 0.5 до 12 мМ. В качестве контролей использовали флаконы без добавления ароматических веществ. Через каждые 24 ч методом газовой хроматографии измеряли концентрацию метана в газовой фазе, полученные результаты представляли в виде графика в координатах: Y – количество метана, мМ; X – время, сут. Значение аце-

токластической активности анаэробного ила рассчитывали по тангенсу угла наклона линейного участка кривой зависимости концентрации метана от времени. За 100% активности принимали тангенс угла наклона линейного участка этой кривой в эксперименте без добавления ароматических токсиантов. Поскольку скорость разложения ароматических веществ в описанных выше условиях (соответственно, и скорость образования ацетата на одном из этапов процесса разложения) намного ниже скорости ацетокластической реакции, вкладом ацетата, который образовался из ароматических веществ, пренебрегали (т.к. его количество слишком мало по сравнению с количеством вносимого ацетата).

Аналитические методы. Концентрации ароматических соединений и продуктов их деградации определяли спектрофотометрически (Shimadzu UV-1202, "Shimadzu", Япония) при соответствующих длинах волн (нм): 5-АСК – 330, 2-АБК – 310, салициловая кислота – 300, сульфаниловая кислота – 255, 4-АБК – 275, а также высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) в обращенных фазах на колонках ChromSpher C18 2–10 см ("Chrompack", Нидерланды) по поглощению при 230 нм. Концентрацию органических кислот и спиртов определяли с помощью ВЭЖХ на колонке Varian Metacarb 67H (300 × 6.5 мм; "Merck", ФРГ). Содержание газов измеряли на газовом хроматографе Shimadzu GC-2014 ("Shimadzu", Япония) с двумя колонками. Разделение водорода и метана проводили на колонке Molsieve 2 м × 3 мм, температура детектора – 100°C, газ-носитель – гелий. CO₂ измеряли на том же хроматографе, температура детектора 33°C, газ-носитель – гелий, колонка – Poraplot Q C37554, 25 м × 0.53 мм ("Chrompack", "Varian Inc.", США).

Микроскопические методы. Морфологические особенности микроорганизмов в образцах исследовали методами фазово-контрастной и световой (микроскоп Биолам-2, "ЛОМО", Россия) микроскопии препаратов живых и термически фиксированных окрашенных фуксином клеток соответственно. Микрофотографии с использованием фазового контраста получали с использованием микроскопа Leica DMR HC ("Wetzlar", ФРГ), оборудованного цифровой камерой Leica DC 250.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Накопительные культуры, деградирующие аминокислоты. Анаэробные накопительные культуры О4, Р2, ЕР и Ц получали путем селективной адаптации активных метаногенных илов к различным аминокислотам.

Для повышения эффективности биodeградации изменяли условия культивирования, используя различные сочетания температуры инкубации и кислотности среды. Оптимальными для про-

цесса биodeградации выбранных аминокислотных субстратов были 30°C и рН 6.5–7.5.

Для всех накопительных культур на начальном этапе был характерен определенный лаг-период, в течение которого не наблюдали активной деструкции субстрата. Время адаптации и длительность цикла минерализации исходного аминокислотного субстрата (табл. 2) в разных вариантах накопительных культур различались, но последовательность появления, состав основных интермедиатов и конечных продуктов оставались неизменными. В качестве промежуточных продуктов всегда образовывались CO₂, H₂ и NH₄⁺, затем бензоат, ацетат. Конечными продуктами деструкции были CH₄ и CO₂. Такая последовательность интермедиатов характерна и для разрушающих аминокислотные соединения анаэробных сообществ, полученных из других источников [8].

Анализ продуктов трансформации аминокислотных субстратов. Для того чтобы определить продукты, образовавшиеся в результате первичной трансформации основных субстратов, был проведен ВЭЖХ-анализ культуральной жидкости, который выявил в качестве продукта первичной трансформации 2-аминобензойной и салициловой кислот бензиловый спирт, последовательно превращающийся в бензоат. Продуктом анаэробной деградации бензилового спирта также была бензойная кислота (табл. 3).

Ранее при исследовании деградации (амино)ароматических соединений в качестве продукта первичной трансформации 5-АСК метаногенным сообществом, полученным из ила очистных сооружений свиноводческого комплекса [9], был определен 2-ГБС. Продукт трансформации 5-АСК микробным сообществом, выделенным из ила озера Цайдам (Бурятия), был также идентифицирован, как 2-ГБС, превращающийся последовательно в бензоат.

Для проверки возможности реализации альтернативных путей деградации аминокислот, где в качестве центральных интермедиатов выступают резорцин или флороглюцинол, было изучено потребление сообществом ЕР, изначально адаптированным к 2-АБК, флороглюцинола, резорцина и его аналога пирогаллола (табл. 4). Отсутствие потребления флороглюцинола и резорцина данным сообществом наряду с наличием интермедиатов разложения 2-АБК и 5-АСК свидетельствует о реализации бензоил-КоА-пути деструкции аминокислотных субстратов [13] микробными сообществами.

Деструкция накопительными культурами аминокислотных субстратов. Для определения метаболических возможностей накопительных культур О4, Р2 и ЕР проверяли их способность к деструкции интермедиатов анаэробной биоконверсии ами-

Таблица 3. Использование ароматических субстратов сообществами О4, Р2 и ЕР, адаптированными к аминокислотам

Культура	Субстрат	Скорость потребления, мМ/сут	Промежуточные продукты	Конечные продукты
О4	2-АБК, основной	0.03	Бензиловый спирт, бензоат, ацетат, NH ₄ ⁺	CH ₄ , CO ₂
	ЗЖ	0.25	Сульфаниловая кислота, ацетат, этанол	CH ₄ , CO ₂
	БС	0.167	Бензоат, ацетат, этанол (следы)	CH ₄ , CO ₂
	БК	0.071	Ацетат, этанол (следы)	CH ₄ , CO ₂
	2-ГБС	0	—	—
	СК	0	—	—
Р2	4-АБК, основной	0.03	Бензиловый спирт, бензоат, ацетат, NH ₄ ⁺	CH ₄ , CO ₂
	ЗЖ	0.22	Сульфаниловая кислота, ацетат, этанол	CH ₄ , CO ₂
	БС	0.040	Бензоат, ацетат, этанол (следы)	CH ₄ , CO ₂
	БК	0	—	—
	2-ГБС	0	—	—
	СК	0	—	—
ЕР	2-АБК, основной	0.08	Бензиловый спирт, бензоат, ацетат, NH ₄ ⁺	CH ₄ , CO ₂
	ЗЖ	0.12	Сульфаниловая кислота, ацетат, этанол	CH ₄ , CO ₂
	БС	0.022	Бензоат, ацетат, этанол	CH ₄ , CO ₂
	БК	0.113	Ацетат, этанол (следы)	CH ₄ , CO ₂
	2-ГБС	0.002	H ₂ (следы), бензоат, ацетат, этанол (следы)	CH ₄ , CO ₂
	СК	0	—	—

нобензойных кислот (бензиловый спирт, бензойная кислота, 2-гидроксibenзиловый спирт), а также салициловой кислоты и кислотного азокрасителя золотисто-желтого (ЗЖ).

Довольно активное, практически без лаг-периода, потребление бензинового спирта с образованием CH₄ и CO₂ в качестве конечных продуктов наблюдали в культурах О4, Р2 и ЕР. Наиболее значительная деградация происходила в сообществах О4 и Р2, ранее подвергавшихся более длительному воздействию аминокислотного субстрата, чем вариант ЕР. Бензойную кислоту с образованием CH₄ и CO₂ потребляли накопительные культуры О4 и ЕР, причем вариант ЕР отличался большей активностью. В качестве промежуточных продуктов регистрировали ацетат и следы этанола.

Незначительное потребление 2-гидроксibenзинового спирта (0.34 мМ) с образованием CH₄ и CO₂ происходило только в варианте ЕР (табл. 3). При этом лаг-период активности культуры составил 150 сут. На 7 сут регистрировали следы молекулярного водорода, бензоат, ацетат, а также следы этанола. Полной минерализации субстрата не происходило даже спустя 200 сут, что могло быть связано с токсичностью данного субстрата.

Таким образом, изученные накопительные культуры оказались способны к расщеплению ряда ароматических субстратов без лаг-периода, но с разными скоростями. Это согласуется с данными других авторов [11, 12] о значении химической природы и положения заместителей в молекулах ароматических соединений для их деструкции метаногенными микробными сообществами.

Токсичность использованных ароматических субстратов. Оценка цитотоксичности ароматических ксенобиотиков является одним из важных параметров при определении возможности использования микроорганизмов для минерализации таких веществ. Зачастую стадия образования метана лимитирует процесс минерализации органического вещества микробным сообществом. Центральным субстратом метаногенеза считается ацетат, из которого при разложении органических веществ образуется более 70% метана [14]. Изменение уровня ацетокластического метаногенеза в присутствии поллютанта можно сравнительно легко зарегистрировать в лабораторных условиях, в связи с чем этот метод применяют, как стандартный способ определения токсичности ксенобиотика для микробного сообщества [11]. Однако данный метод не позволяет определить степень воздействия токсиканта на другие функ-

Таблица 4. Использование ароматических субстратов накопительной культурой E.P, первоначально адаптированной к 2-АБК

Субстрат	Скорость потребления субстрата, мМ/сут	Ароматические промежуточные продукты	Линейные промежуточные продукты	Конечные продукты
2-АБК	0.08	Бензиловый спирт → бензоат	→ ацетат	CH ₄ , CO ₂ , NH ₄ ⁺
2-АБК + пируват	0.20	Бензиловый спирт → бензоат	→ ацетат, пропионат, H ₂	CH ₄ , CO ₂ , NH ₄ ⁺
Бензиловый спирт	0.022	→ Бензоат	→ ацетат, этанол (следы)	CH ₄ , CO ₂
Бензиловый спирт + пируват	1.419	→ Бензоат	→ ацетат, пропионат	CH ₄ , CO ₂
Бензойная кислота	0.113	–	→ ацетат, этанол (следы)	CH ₄ , CO ₂
Бензойная кислота + пируват	0.312	–	→ ацетат, пропионат	CH ₄ , CO ₂
Салициловая кислота	0	–	–	–
Салициловая кислота + пируват	0.0745	Бензиловый спирт → бензоат	→ ацетат, пропионат, H ₂	CH ₄ , CO ₂
2-гидроксибензиловый спирт	0.002	Бензальдегид → бензоат	→ ацетат	CH ₄ , CO ₂
2-ГБС + пируват	0.011	Бензальдегид → бензоат	→ ацетат, пропионат	CH ₄ , CO ₂
Бензальдегид	0	–	–	–
Бензальдегид + пируват	0.5	→ Бензоат	→ ацетат, пропионат	CH ₄ , CO ₂
Пирогаллол	0	–	–	–
Пирогаллол + пируват	0.019	–	→ ацетат, бутират, H ₂	CH ₄ , CO ₂
Флороглюцинол	0	–	–	–
Резорцин	0	–	–	–
Флороглюцинол + пируват	Потребления субстрата не происходило, наблюдали только сбраживание пирувата	–	→ ацетат, бутират (из пирувата)	CH ₄ , CO ₂
Резорцин + пируват		–	→ ацетат, формиат, лактат, бутират	CH ₄ , CO ₂

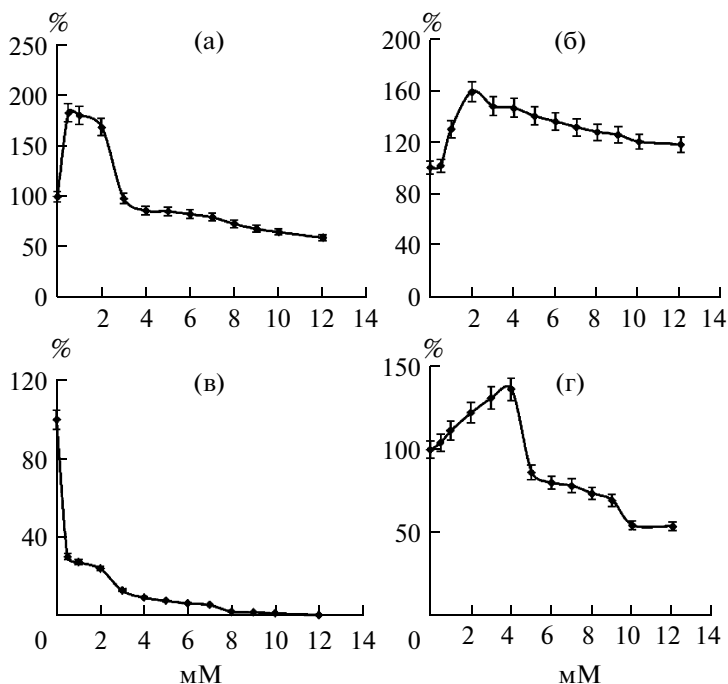


Рис. 1. Токсичность ароматических субстратов по отношению к метаногенному сообществу ЕР (ацетокластическая активность, %): а – бензиловый спирт; б – салициловая кислота; в – 2-гидроксибензиловый спирт; г – бензойная кислота.

циональные и таксономические группы микроорганизмов, входящие в сообщество.

Токсичность ароматических веществ по отношению к анаэробному сообществу ЕР уменьшается в ряду: 2-ГБС > бензиловый спирт > бензойная кислота > салициловая кислота (рис. 1). Концентрация, при которой ацетокластическая метаногенная активность микробного сообщества снижается на 50% (IC_{50}), составила для 2-ГБС 0.355 мМ. В случаях бензинового спирта, бензойной и салициловой кислот наблюдали увеличение ацетокластической активности вплоть до концентрации 3, 4 и 12 мМ соответственно. Это можно объяснить минерализацией промежуточного продукта бензоата, в процессе которой в качестве интермедиата образуется дополнительное количество ацетата.

Образование CH_4 и CO_2 накопительными культурами свидетельствует о том, что использованные нами концентрации аминокислот (2–3 мМ) не оказывают сильного токсического действия на метаногенные организмы, присутствующие в культурах, хотя этот метод не является информативным для определения влияния данных ксенобиотиков на другие группы микроорганизмов в сообществе.

Вместе с тем снижение биоразнообразия в сообществе [3] свидетельствует о возможной токсичности ароматики для микроорганизмов, осуществляющих неметаногенные стадии процесса биоразложения.

Стимулирование пируватом процесса биодеградации ароматических субстратов. Помимо основного субстрата, 2-АБК, культура ЕР в присутствии пирувата оказалась способна к деструкции других ароматических субстратов (табл. 4). Внесение 20 мМ пирувата в среду культивирования стимулировало процесс биодеградации как 2-АБК, так и других ароматических веществ. Причем некоторые вещества (салициловая кислота, пирогаллол, бензальдегид) накопительная культура ЕР разлагала только в присутствии пирувата как дополнительного источника углерода и энергии. В случае, когда исследуемый субстрат потреблялся культурой в качестве единственного источника углерода и энергии, добавление пирувата увеличивало скорость потребления ароматики в 2–60 раз.

Таким образом, в присутствии пирувата минерализация основного и других ароматических субстратов происходила значительно быстрее, чем при росте на (амино)ароматическом веществе как единственном источнике углерода и энергии (табл. 4). Параллельно с деструкцией ароматического субстрата сообщество сбраживало пируват, образуя ацетат, пропионат, формиат, бутират и лактат в качестве промежуточных продуктов.

Микроскопическая картина сообщества. При сравнении морфологических особенностей исходного ила и активных накопительных культур было обнаружено селективное воздействие аминокислот. Для накопительной культуры ЕР, разрушающей 2-АБК, при формировании ста-

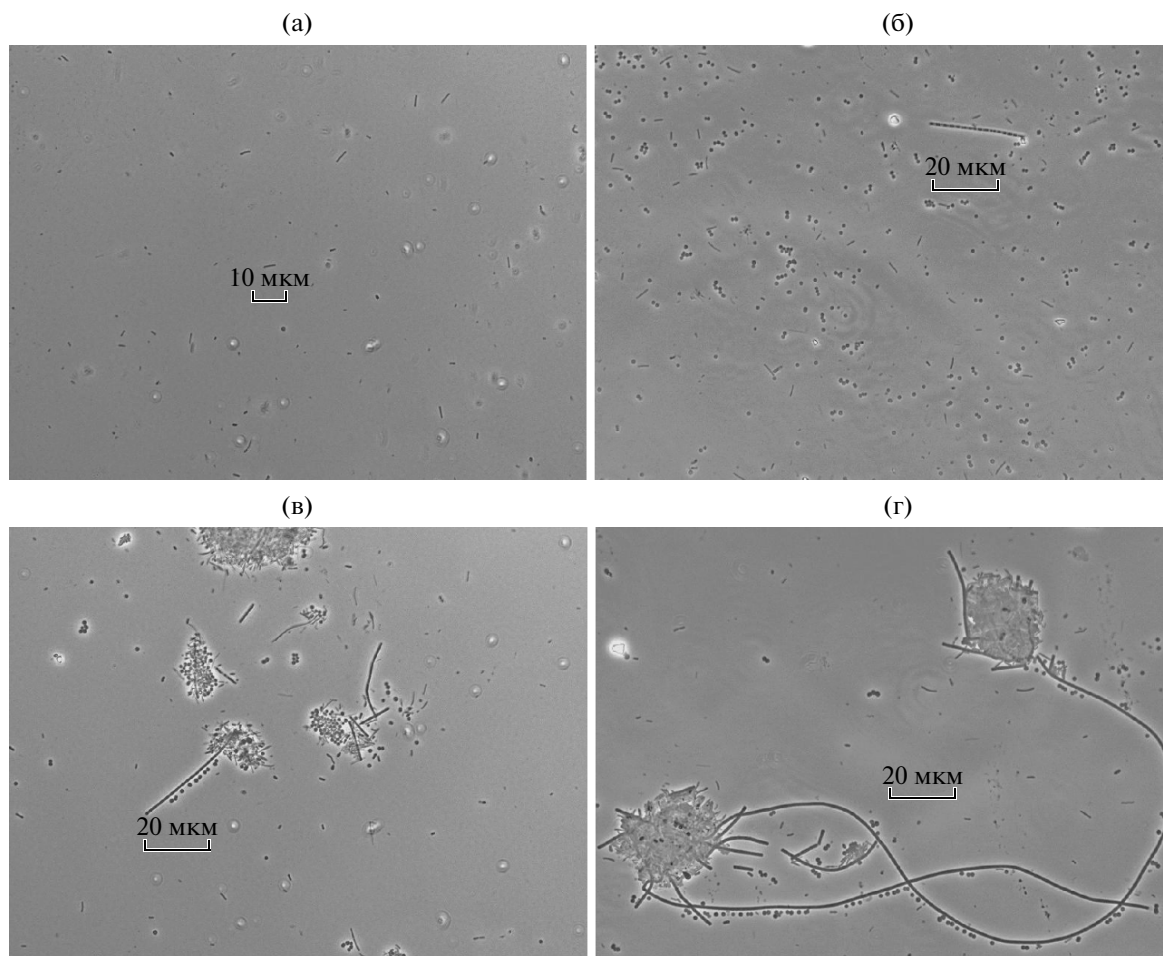


Рис. 2. Изменение микроскопической картины сообщества ЕР в течение цикла потребления 2-АБК (световая микроскопия с фазово-контрастным устройством, $\times 1200$): а – нулевая точка, б – 2, в, г – 6–8 сут цикла.

бильного метаногенного сообщества зафиксировано уменьшение числа морфотипов клеток от 14 (исходный неадаптированный ил) до 5. Снижение количества сателлитных микроорганизмов, приводящее к уменьшению числа микробных морфотипов под воздействием аминокислотных веществ, было описано и другими авторами [3]. В течение цикла потребления 2-АБК наблюдали сукцессию сообщества ЕР (рис. 2). Вначале в культуре присутствовали короткие и средней длины палочки, а также небольшое количество кокков (рис. 2а). Начало метаногенеза всегда было связано с появлением в сообществе длинных палочек или нитей, окруженных кокками (рис. 2в, 2г). Клетки в составе агрегатов в активной накопительной культуре часто были ослизнены (рис. 2г).

Как известно, симбиотическая кооперация (синтрофия) между метаболически разными микроорганизмами, зависящими друг от друга при разрушении субстратов, в анаэробных местообитаниях является одним из важных условий, т.к. зачастую

отдельные члены ассоциации из-за энергетических барьеров не могут использовать химически стабильные вещества [5, 15]. Кооперация микроорганизмов-партнеров при синтрофных взаимодействиях оптимальна, если расстояния, на которых происходит поступление субстрата путем молекулярной диффузии, предельно малы. Это достигается в случае тесного физического контакта партнеров, т.е. пространственного объединения трофически связанных типов микроорганизмов [5, 15]. Вероятно, кокки (рис. 2в, 2г) образуют синтрофную ассоциацию с длинными палочками (сходными с метаногеном *Methanosaeta*), обладают броидильным типом метаболизма и превращают пируват (либо бензоат) в ацетат, который используется организмом подобным *Methanosaeta*. Микроскопическая картина сообщества с дополнительным источником углерода (пируват) близка таковой, где присутствует только ароматический субстрат, однако наблюдается увеличение общего количества клеток

и увеличение количества кокков средних размеров (рис. 2б).

Синтрофные взаимодействия в анаэробных сообществах зачастую усложняют выделение чистых культур из метаногенных микробных сообществ и затрудняют их культивирование из-за таких особенностей, как, например, низкое парциальное давление водорода, которое поддерживается метаногенными археями [16], или наличие особых ростовых факторов.

Итак, выделенные нами анаэробные микробные сообщества проявляли активность в отношении ряда ароматических ксенобиотиков. Изучение разложения поллютантов накопительными культурами из очистных сооружений демонстрирует высокий метаболический потенциал как самих культур, так и исходных илов, из которых они были получены. Исследование деградации аминокислот анаэробными микробными сообществами из донных отложений способствует осмыслению механизмов самоочищения естественных мест обитания. Понимание процессов анаэробной биодеструкции (амино)ароматических веществ позволяет прогнозировать судьбу таких ксенобиотиков в природе и очистных сооружениях и служит фундаментальной основой создания специальных биотехнологий для борьбы с подобными загрязнениями.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Федерации европейских микробиологических обществ (FEMS) № FRF 2009-2, RU-IMRS.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carmona M., Zamarró M.T., Blázquez B., Durante-Rodríguez, Juárez J.F., Valderrama J.A., Barragan M.J.L., Garcia J.L., Diaz E. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2009. V. 73. № 1. P. 71–133.
2. Емашова Н.А., Котова И.Б., Нетрусов А.И., Калюжный С.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 2. С. 195–201.
3. Savelieva O., Kotova I., Roelofs W., Stams A.J.M., Netrusov A. // Arch. Microbiol. 2004. V. 181. № 2. P. 163–170.
4. Schnell S., Schink B. // Arch. Microbiol. 1992. V. 158. № 4. P. 328–334.
5. Schink B. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997. V. 61. № 2. P. 262–280.
6. Harwood C.S., Burchhardt G., Herrmann H., Fuchs G. // FEMS Microbiol. Rev. 1999. V. 22. № 5. P. 439–458.
7. Fuchs G. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2008. V. 1125. № 1. P. 82–99.
8. Котова И.Б., Савельева О.В., Дьяконова А.Т., Скляр В.И., Калюжный С.В., Стамс А., Нетрусов А.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 4. С. 422–428.
9. Савельева О.В., Емашова Н.А., Котова И.Б., Нетрусов А.И., Калюжный С.В. // Усп. современ. биологии. 2003. Т. 123. № 4. С. 336–349.
10. Kalyuzhnyi S.V., Scljar V.I., Mosolova T.P., Kucherenko I.A., Russkova I.A., Degtyarova N.N. // Water Sci. Technol. 2000. V. 42. № 5–6. P. 363–370.
11. Razo-Flores E., Luijten M., Donlon B.A., Lettinga G., Field J. // Water Sci. Technol. 1997. V. 36. № 6–7. P. 65–72.
12. Donlon B.A., Razo-Flores E., Field J.A., Lettinga G. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 11. P. 3889–3893.
13. Heider J., Fuchs G. // Anaerobe. 1997. V. 3. № 1. P. 1–22.
14. Калюжный С.В., Данилович Д.А., Ножевникова А.Н. // Итоги науки и техники. Серия “Биотехнология”. Т. 29. М.: ВИНТИ, 1991. С. 156.
15. Stams A.J.M., Plugge C.M. // Nature Rev. Microbiol. 2009. V. 7. № 8. P. 568–577.
16. Schink B., Stams A.J.M. The Prokaryotes. 3 ed. / Eds. M. Dworkin, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. N.Y.: Springer Verlag, 2002. P. 25.

Methanogenic Destruction of (Amino)Aromatic Compounds by Anaerobic Microbial Communities

Yu. V. Linkova^a, A. T. Dyakonova^a, M. A. Gladchenko^b, S. V. Kalyuzhnyi^b,
I. B. Kotova^a, A. Stams^c, and A. I. Netrusov^a

^a School of Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia
e-mail: linkovay@gmail.com, kira1959@gmail.com

^b School of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

^c Wageningen University, 6703 HB Wageningen, Netherlands

Received December 8, 2010

Abstract—Destruction of a number of aromatic substrates by anaerobic microbial communities was studied. Active methanogenic microbial communities decomposing aminoaromatic acids and azo dyes into CH₄ and CO₂ were isolated. Products of primary conversion were found to be 2-hydroxybenzyl and benzyl alcohols gradually transforming into benzoate. It was shown that isolated microbial communities are capable of converting the initial substrates—benzyl alcohol, benzoate, salicylic acid, and golden yellow azo dye—into biogas without a lag-phase but with different velocities. Aromatic and linear intermediates of biodestruction of aromatic amines by obtained enrichment cultures were determined for the first time. Selective effect of aromatic substrates on a microbial community that was expressed in decrease in diversity and gradual change of dominant morphotypes was revealed.

УДК 579.846

СЕЛЕКТИВНОЕ ИЗВЛЕЧЕНИЕ МЕТАЛЛОВ ИЗ ЦИНКОВОГО КОНЦЕНТРАТА АССОЦИАЦИЕЙ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

© 2011 г. Н. С. Варданян, А. К. Варданян

Центр микробиологии и депонирования микроорганизмов НАН РА, Абовян, 2201, Армения
e-mail: nvard@sci.am

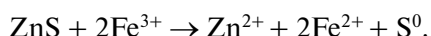
Поступила в редакцию 18.01.2011г.

Изучена возможность селективного извлечения меди и цинка из цинкового концентрата ассоциацией хемолитотрофных бактерий. Показано, что в присутствии ассоциации бактерий ускоряется выщелачивание цинка в 3, меди в 4–5 и железа в 2 раза. При этом с наибольшей скоростью выщелачивается цинк, затем медь и железо. Выявлено, что при добавлении 2г/л Fe^{3+} сильно подавляется выщелачивание железа, и в 3 раза возрастает скорость выщелачивания меди при неизменной скорости растворения минерала цинка. Предполагается, что интенсификация выщелачивания меди связана с деятельностью сероокисляющих бактерий, способных активизировать поверхность минерала путем удаления с нее пассивирующего слоя элементной серы. Делается заключение, что существенная роль в выщелачивании меди из цинкового концентрата принадлежит сероокисляющим бактериям. Из пульпы выщелачивания цинкового концентрата выделен и изучен оригинальный штамм мезофильных сероокисляющих бактерий, который в перспективе может служить эффективным кандидатом для осуществления селективного извлечения меди из цинкового концентрата.

Полиметаллические руды относят к наиболее труднообогатимым. Сложность их обогащения объясняется вкрапленностью различных сульфидов и их взаимным срастанием. Даже при тонком измельчении большая часть минералов цинка и меди находится в сростках между собой и с пиритом, что не позволяет получать селективные кондиционные продукты при флотационном обогащении и приводит к значительным потерям цинка, меди, а также золота, серебра и других ценных элементов в отвалах и хвостах [1].

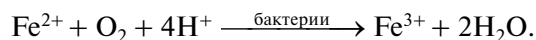
Чановое бактериальное выщелачивание является наиболее выгодным по экономическим и экологическим соображениям процессом для переработки полиметаллических руд и флотационных концентратов [2].

Считают, что биовыщелачивание минерала цинка – сфалерита происходит главным образом по непрямому механизму под действием трехвалентного железа (Fe^{3+}), являющегося продуктом бактериального окисления закисного железа и железосодержащих минералов. Окисление сфалерита (ZnS) ионами Fe^{3+} хорошо изучено [3, 4]. Соответствующую реакцию можно представить следующим уравнением:



Вместе с тем в работах ряда авторов показано, что скорость окисления сфалерита ионами Fe^{3+} в присутствии бактерий значительно выше, чем без них [5, 6]. При этом установлено, что наибольшую скорость окисления сфалерита обеспечивают умеренно

термофильные *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* и экстремально термофильные бактерии [7, 8]. По данным других авторов, степень извлечения цинка из некондиционных сульфидных руд с помощью *Leptospirillum ferrooxidans* значительно выше, чем при использовании *Acidithiobacillus ferrooxidans*, причем *L. ferrooxidans* проявляет высокую эффективность в окислении комплексных сульфидов даже в отсутствие сероокисляющих бактерий [9]. Однако нет исследований, подтверждающих, что окисление сфалерита протекает по прямому механизму непосредственно с помощью прикрепленных к минералу клеток бактерий. Более того, показано, что клетки *A. ferrooxidans* специфически прикрепляются к минералу железа – пириту, тогда как их сродство к сфалериту значительно меньше [6]. Поэтому роль хемолитотрофных бактерий в процессе выщелачивания сфалерита сводится лишь к регенерации окислителя – Fe^{3+} согласно уравнению:



Учитывая вышесказанное, для выщелачивания цинкового концентрата Зангезурского медно-молибденового комбината (ЗММК) (Армения), мы использовали ассоциацию железокисляющих хемолитотрофных (ЖОХ) бактерий, состоящую из *A. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans*, *S. thermosulfidooxidans*, проявляющую высокую эффективность в выщелачивании медного концентрата [10, 11].

Цель работы – изучение возможности селективного извлечения цинка и меди из цинкового концентрата с помощью ассоциации хемолитотрофных бактерий.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили образцы цинкового концентрата ЗММК. Химические анализы образцов концентрата, приведенные в таблице, были проведены общепринятыми в минералогии методами. Основные минералы – сфалерит (ZnS), халькопирит (CuFeS) и пирит (FeS).

Для биовыщелачивания образцов цинкового концентрата использовали ассоциацию железокисляющих хемолитотрофных (ЖОХ) бактерий, выделенных из проб полиметаллической руды Ахтала (Армения) на среде 9К, содержащей (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3.0, KCl – 0.1, K_2HPO_4 – 0.5, MgSO_4 – 0.5, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 0.01) и двухвалентное железо в качестве источника энергии [12].

Опыты по выщелачиванию цинкового концентрата проводили в периодическом режиме культивирования бактерий. Образцы концентрата измельчали до частиц размером 0.080 мм. Навески измельченных образцов помещали в колбы Эрленмейера объемом 250 мл, смачивали дистиллированной водой и стерилизовали при 0.5 атм в течение 30 мин. Затем колбы заполняли 50 мл среды 9К без железа, подкисленной до pH 2.0 и вносили ассоциации ЖОХ бактерий (5%).

Интенсивность выщелачивания концентрата оценивали по количеству выщелоченных меди, цинка и железа, а также по снижению pH среды и увеличению титра серо- и железокисляющих бактерий.

Количество Fe^{2+} и Fe^{3+} определяли комплексометрическим методом с трилоном Б [13]. Количество выщелоченных меди и цинка определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре ААС 1N (“Carl Zeiss”, Германия).

За ростом бактерий наблюдали с использованием микроскопа МБИ-3 (“ЛОМО”, Россия) с фазово-контрастным устройством. Количество жизнеспособных клеток определяли методом предельных разведений, наиболее вероятное число клеток рассчитывали по таблицам Мак-Креди [11].

Выделение чистых культур серо- и железокисляющих бактерий проводили с использованием плотной среды Маннинга, содержащей 0.6% агарозы (Agarose, type I, Low EEO, “Sigma”, США) и соответственно тетрагидрата (3.0 г/л $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) или двухвалентного железа (6.0 г/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) в качестве источника энергии.

Данные обрабатывали статистически.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выщелачивание цинкового концентрата. Исследования показали, что применение ЖОХ бактерий для выщелачивания цинкового концентрата позволяет увеличить извлечение цинка в 3.3, меди в 4–5 и железа в 2.0 раза по сравнению с неино-

Химический анализ образцов цинкового концентрата ЗММК

Образец	Содержание металлов, %				
	Zn	S	Cd	Fe	Cu
№ 1	58.75	23.56	0.35	6.8	2.64
№ 2	53.7	30.1	0.31	5.8	2.8

кулированным контролем (рис. 1а). При этом с наибольшей скоростью выщелачивался цинк, затем медь. Скорость выщелачивания железа была значительно ниже. Так, скорость извлечения цинка из образца № 1 в 2 и 10 раз превышала скорости извлечения меди и железа соответственно. В варианте с пробой № 2 скорость выщелачивания цинка была примерно в 5 раз выше, чем для меди и железа. Полученные данные можно объяснить электрохимическими свойствами сульфидов указанных металлов, входящих в состав концентрата. Известно, что электрохимический потенциал сульфидных минералов является фундаментальной основой их окисления и определяется энергией связи металл–сера в кристаллической решетке минералов [14]. В данной системе, содержащей смесь сульфидов металлов, сфалерит (ZnS) имеет наименьший электродный потенциал и быстро окисляется [15]. Минерал меди – халькопирит характеризуется более высоким потенциалом и окисляется менее активно. Наивысшим потенциалом в цинковом концентрате обладает пирит, который с трудом подвергается окислению, в том числе бактериальному [14].

Полученные данные указывают также на то, что при выщелачивании цинкового концентрата имеет место эффект гальванопар. Содержащийся в концентрате высокопотенциальный минерал железа – пирит, выполняя роль катода, стимулирует окислительный процесс низкопотенциальных минералов – сфалерита и халькопирита (аноды). Так как интенсивность окисления минерала – анода прямо пропорциональна разнице в величинах электродного потенциала партнеров гальванической пары, то максимальной коррозии подвергается наиболее низкопотенциальный член этой системы, каковым является сфалерит. Кроме того, выщелачиванию Zn способствуют также ионы Fe^{3+} (непрямое окисление сфалерита), образующиеся в результате частичного выщелачивания бактериями пирита.

Следует отметить, что несмотря на различие в скоростях выщелачивания составляющих сульфидов, обусловленные их электрохимическими свойствами, за 14 сут степень извлечения металлов с использованием указанного сообщества ЖОХ бактерий достигала 95.2 и 100% для меди, 52.9 и 66.4% для железа и примерно 20% для цинка из цинкового концентрата образцов № 1 и № 2 соот-

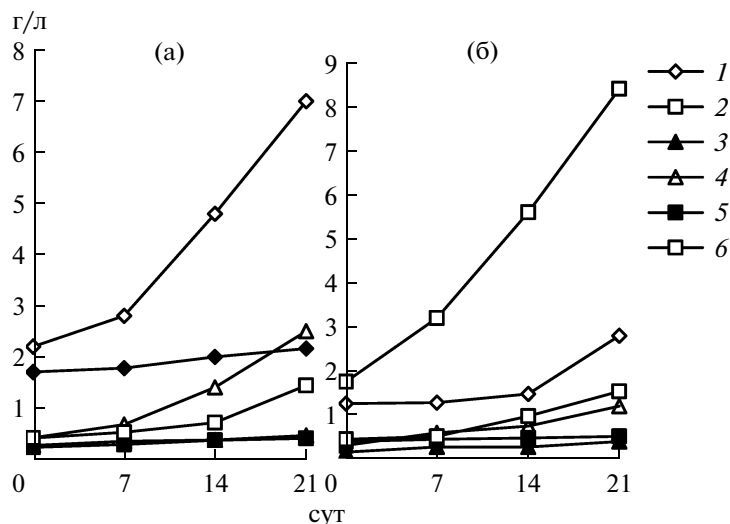


Рис. 1. Кинетика выщелачивания цинка, меди и железа (г/л) при окислении образцов № 1 (а) и № 2 (б) цинкового концентрата сообществом ЖОХ бактерий (рН 2.0; плотность пульпы (ПП) – 4%): 1, 3, 5 – выщелачивание цинка, меди и железа в контрольном варианте; 2, 4, 6 – выщелачивание цинка, меди и железа в опытном варианте с бактериями.

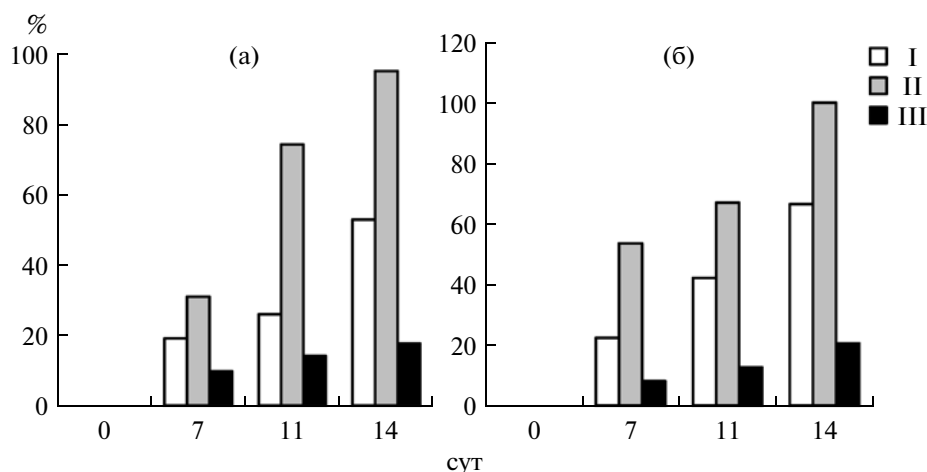


Рис. 2. Извлечение (%) железа (I), меди (II) и цинка (III) из проб № 1 (а) и № 2 (б) сообществом ЖОХ бактерий (рН 2.0; (ПП) – 4%; 30°C).

ответственно (рис. 2). Таким образом, применение ассоциации ЖОХ бактерий позволяет почти полностью извлекать медь из цинкового концентрата.

Влияние ионов Fe^{3+} . Проведенные исследования показали, что при добавлении 2 г/л Fe^{3+} к среде биоокисления в 3 раза возрастает скорость извлечения меди, скорость извлечения цинка слегка уменьшается (1.2 раза), а окисление сульфида железа резко (в 2–3 раза) подавляется (рис. 3).

По данным ряда авторов, ионы Fe^{3+} выполняют ключевую роль в растворении сульфида цинка. Показано, что добавление ионов Fe^{3+} в концентрациях, не превышающих 12 г/л, приводит к значи-

тельному ускорению биовыщелачивания минералов цинка – сфалерита и марматита [16–18].

Однако согласно полученным нами данным, при выщелачивании цинкового концентрата ассоциацией ЖОХ бактерий добавление ионов Fe^{3+} вместо сфалерита приводило к ускорению окисления минерала меди – халькопирита. Примечательно, что при этом железо в выщелачивающей среде находилось преимущественно в виде Fe^{3+} . Количество Fe^{2+} было незначительно, что свидетельствует о том, что скорость окисления Fe^{2+} ассоциацией бактерий превышает скорость химического выщелачивания сфалерита ионами Fe^{3+} . Это можно объяснить образованием на поверхности наиболее легко окисляемого (в

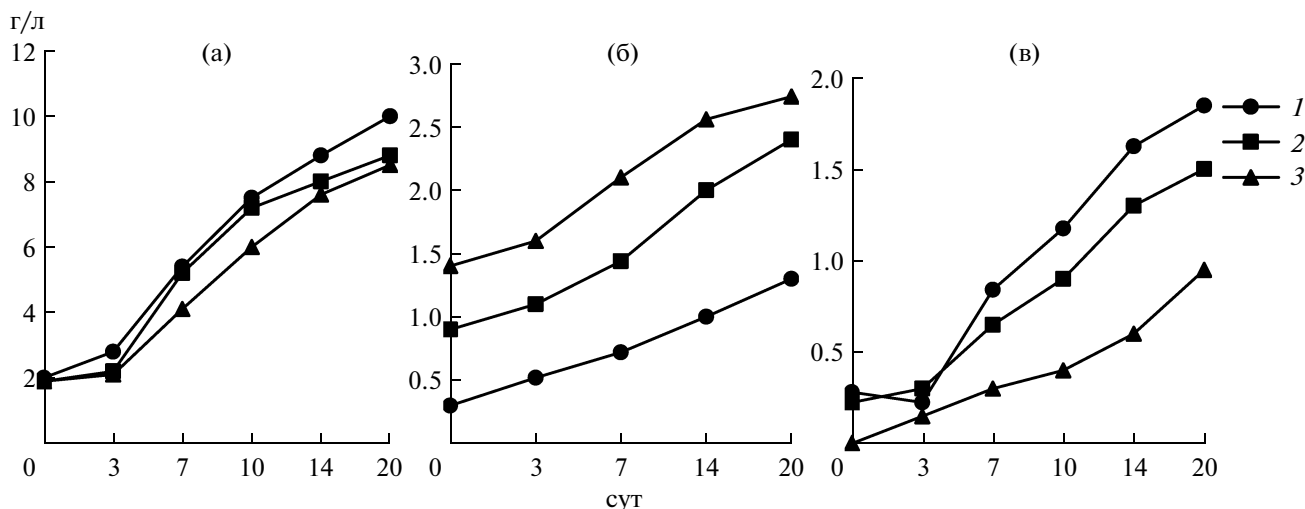
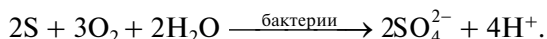


Рис. 3. Выщелачивание (г/л) цинка (а), меди (б) и железа (в) при окислении цинкового концентрата сообществом ЖОХ в отсутствие (1) и в присутствии 1.0 г/л (2), 2.0 г/л Fe³⁺ (3) (при рН 2.0; (ПП) – 10%; 30°С).

том числе химически) минерала – сфалерита гидроксидоокислительных соединений железа и элементарной серы, что приводит к затруднению диффузии ионов Fe³⁺ и замедлению процесса окисления минерала.

Что касается ускорения выщелачивания халькопирита, то это, по-видимому, связано с активацией пассивирующего слоя сероокисляющими бактериями. Известно, что при химической и в некоторых случаях микробиологической (с участием лептоспирилл) деструкции халькопирита на поверхности минерала образуется непористый слой элементарной серы и тем самым препятствует его дальнейшему окислению [5, 19]. Сероокисляющие бактерии благодаря способности окислять элементарную серу и ее восстановленные соединения приводят к ускорению окисления халькопирита путем удаления указанного пассивирующего слоя с его поверхности согласно уравнению:



Кроме того, образовавшиеся ионы водорода (протоны), в свою очередь, являются не менее сильным окислителем для халькопирита.

Микробиологический анализ пульпы. Проведенные микробиологические исследования показали, что в пульпе выщелачивания цинкового концентрата к концу опыта доминировали сероокисляющие бактерии. Их количество достигало 10⁸–10⁹ кл./мл, тогда как численность железобактерий, представленных преимущественно лептоспириллами, не превышала 10⁴–10⁵ кл./мл. По-видимому, по мере выщелачивания цинкового концентрата условия в пульпе меняются и становятся более благоприятными для роста сероокисляющих бактерий. Как уже отмечалось выше, это, в первую очередь, связано с накоплением в среде элементарной серы как

продукта химического и бактериального окисления минералов цинка и меди.

Полученные результаты позволяют заключить, что в выщелачивании цинкового концентрата наряду с железобактериями важную роль играют сероокисляющие бактерии. При этом деятельность сероокисляющих бактерий в основном связана с выщелачиванием содержащегося в концентрате минерала меди – халькопирита.

Таким образом, в процессе выщелачивания цинкового концентрата под действием соответствующих физико-химических и минералогических факторов формируется особое по своему составу новое сообщество хемолитотрофных бактерий, состоящее преимущественно из сероокисляющих бактерий, а также железобактерий лептоспирилл, наиболее адаптированных к условиям выщелачивания данного концентрата, которое в перспективе может служить эффективным потенциальным кандидатом для осуществления селективного извлечения меди и цинка из цинкового концентрата.

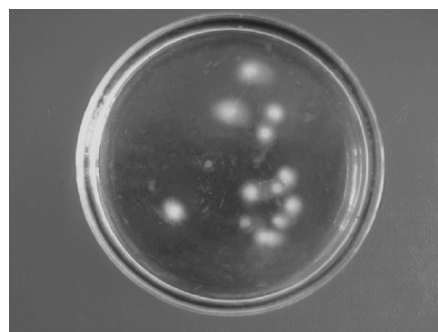


Рис. 4. Колонии выделенных сероокисляющих бактерий на агаризованной среде.

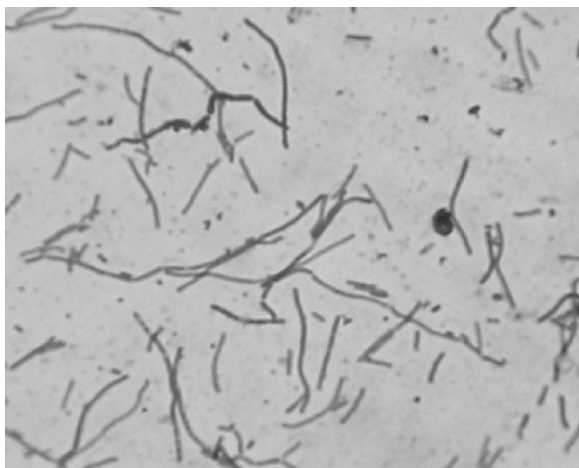


Рис. 5. Микрофотография окрашенных клеток сероокисляющих бактерий, выделенных из пульпы выщелачивания цинкового концентрата, $\times 1000$.

Из пульпы бактериального выщелачивания цинкового концентрата была изолирована чистая культура – мезофильные сероокисляющие бактерии. На твердой среде с тетрагидратом бактерии образуют регулярные колонии молочного цвета, покрытые толстым слоем слизи (рис. 4). В молодой культуре клетки представляют собой подвижные палочки размером $0.8 \times 1.5\text{--}2.0$ мкм. По мере роста палочки могут превратиться в длинные нити или цепочки клеток (рис. 5). В качестве источника энергии бактерии могут использовать тетрагидрат ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), а также элементарную серу (S^0), не способны окислять сульфиды металлов. Строгий автотроф, дрожжевой экстракт ингибирует рост бактерий и окисление элементарной серы.

Дальнейшие более детальные исследования, включая молекулярно-генетические, позволят идентифицировать выделенную бактерию, выявить ее основные биохимические и другие характеристики, а также потенциал в выщелачивании меди, цинка и других металлов.

В заключение можно сказать, что, учитывая разные интенсивности биоокисления сульфидов различных металлов, входящих в состав концентрата, обусловленные их электрохимическими свойствами и сложными взаимодействиями между ними, варьированием физико-химических параметров процесса бактериального выщелачивания можно осуществить селективное извлечение меди, цинка и других ценных металлов из цинкового концентрата, что при традиционных технологиях невозможно

или экономически невыгодно из-за сложного минералогического состава концентрата.

Работа выполнена при поддержке гранта ANSEF (Armenian National Science and Education Foundation) 2010 NS 2091.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алоян П.Г., Алоян Г.П., Давтян А.А., Маркосян А.А., Арутюнян Т.М., Степанян И.Г. Металлы: Черные, цветные, благородные, редкие металлы и редкие земли. Ереван: ГЕОИД, 2006. 250 с.
2. Адамов Э.В., Панин В.В. Биотехнология металлов. М.: МИСиС, 2003. 147 с.
3. Carranza F., Carcia M.J., Palencia I., Pereda J. // Hydrometallurgy. 1990. V. 24. № 1. P. 67–76.
4. Carranza F., Iglesias N., Romero R., Palencia I. // FEMS Microbiol. Rev. 1993. V. 11. № 1–3. P. 129–138.
5. Fowler T.A., Crundwell F.K. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 12. P. 5285–5292.
6. Harneit K., Goksel A., Kock D., Klock J.-H., Gehrke T., Sand W. // Hydrometallurgy. 2006. V. 83. № 1–4. P. 245–254.
7. Sandstrom A., Petersson S. // Hydrobiology. 1997. V. 46. № 1–2. P. 181–190.
8. Rehman M., Anvar M.A., Iqbal M., Akhtar K., Khalia A.M., Ghauri M.A. // Hydrometallurgy. 2009. V. 97. № 1–2. P. 1–7.
9. Giaveno A., Lavalle L., Chiacchiarini P., Donati E. // Hydrometallurgy. 2007. V. 89. № 1–2. P. 117–126.
10. Нагдалян С.З., Кочарян Е.М., Варданян Н.С. // Биол. журн. Армении. 2009. Т. 61. № 1. С. 18–23.
11. Варданян Н.С., Нагдалян С.З. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 4. С. 446–451.
12. Биоготехнология металлов. Практическое руководство / Ред. Г.И. Каравайко, Дж. Росси, А. Агате, С. Грудев, З.А. Авакян. М.: Центр межд. проектов ГКНТ, 1989. 375 с.
13. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М.: Недра, 1970. 140 с.
14. Olson G.J., Brierley J.A., Brierley C.I. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 63. № 3. P. 249–257.
15. Промышленная микробиология / Ред. Н.С. Егоров. М.: Высшая школа, 1989. С. 634–660, 687 с.
16. Adelson de S., Pablo S.P., Versiane A.L. // Mineral Engineering. 2007. V. 20. № 6. P. 591–599.
17. Shi S.-Y., Fang Z.-H., Ni J.-R. // Process Biochemistry. 2006. V. 41. № 2. P. 438–446.
18. Deveci H., Akcil A., Alp I. // Hydrometallurgy. 2004. V. 73. № 3–4. P. 293–303.
19. Kai T., Suenaga Y.-I., Migita A., Takahashi T. // Chem. Engineering Sci. 2000. V. 55. № 17. P. 3429–3436.

Selective Extraction of Metals from Zinc Concentrate by Association of Chemolithotrophic Bacteria

N. S. Vardanyan and A. K. Vardanyan

*Center of Microbiology and Microbial Depository, National Academy of Sciences of Armenia,
Arznii Highway, Abovyan, Kotayk Marz, 2201 Armenia*

e-mail: nvard@sci.am

Received January 18, 2011

Abstract—Ability for selective extraction of copper and zinc from zinc concentrate using association of chemolithotrophic bacteria was investigated. In the presence of bacterial association, the rate of desalinization of zinc, copper, and iron was increased 3-fold, 4–5-fold, and 2-fold, respectively. Zinc, copper, and iron were levigated with the most significant rate. It was revealed that addition of Fe^{3+} 2 g/l resulted in reduction of iron desalinization and in 3-fold increase of desalinization rate of copper at constant dissolution rate of mineral zinc. It is suggested that the intensification of copper desalinization is connected with the activity of sulfur-oxidizing bacteria able to activate the mineral surface via elimination of passivation layer of elemental sulfur. It was concluded that sulfur-oxidizing bacteria play a significant role in copper desalinization from zinc concentrate. A unique strain of mesophile sulfur-oxidizing bacteria was isolated from desalinization pulp of zinc concentrate; in the perspective, it may serve as efficient candidate for performing of selective extraction of copper from zinc concentrate.

УДК 579.846.2.017.7

ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ МЕДНОЙ РУДЫ УДОКАНСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ АССОЦИАЦИЕЙ АЦИДОФИЛЬНЫХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2011 г. Т. Ф. Кондратьева*, Т. А. Пивоварова*, Л. Н. Крылова**, В. С. Меламуд*,
Э. В. Адамов**, Г. И. Каравайко*

*Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, Москва 117312
e-mail: kondr@inmi.host.ru

**Московский институт стали и сплавов, Москва 119049
e-mail: krulov@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.01.2011 г.

Из сульфидно-окисленной медной руды Удоканского месторождения выделены чистые культуры штаммов аборигенных микроорганизмов, идентифицированных, как *Acidithiobacillus ferrooxidans* TFUd, *Leptospirillum ferrooxidans* LUd, *Sulfobacillus thermotolerans* SUd. Изучены режимы химического и бактериального выщелачивания руды в диапазоне температур от -10 до $+20^{\circ}\text{C}$. Показано влияние на извлечение меди кислотности раствора, температуры и присутствия микроорганизмов. Бактериальное выщелачивание наблюдалось только при положительных значениях температуры, при 20°C намного активнее, чем при 4°C . Процесс шел интенсивнее при более высоком содержании в руде водорастворимых и окисленных минералов. Показана возможность выщелачивания медных руд Удоканского месторождения растворами серной кислоты с pH 0.4 при отрицательных значениях температуры и с применением ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов при положительных значениях температуры и низких значениях pH.

Большая часть исследований процессов выщелачивания цветных металлов проведена на медьсодержащих субстратах [1]. С конца 80-х и начала 90-х годов XX века основным направлением технического прогресса в области переработки низкосортных, окисленных, труднообогащаемых медных руд являлась разработка и применение технологии кучного выщелачивания, когда руда располагается правильными слоями на специально подготовленных площадках, образуя кучи, или выщелачивания в отвалах, формирующихся при добыче руды, с использованием ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов [2]. Было установлено, что кинетика окисления вторичных сульфидных и окисленных медных минералов значительно повышается при бактериальном выщелачивании по сравнению с обработкой серной кислотой и сернокислыми растворами окисного железа [3–5]. Халькопирит (основной медный минерал в медных рудах) – наиболее трудноокисляемый минерал при выщелачивании. Окисленные медные и вторичные сульфидные минералы, халькозин и ковеллин, более легко поддаются выщелачиванию. Извлечение меди из окисленных минералов может достигать 70–90% в течение нескольких недель или месяцев. Извлечение меди из сульфидных минералов обычно длится дольше и достигает меньшего значения.

Технология кучного бактериально-химического окисления испытана на большом количестве типов сульфидных руд и концентратов, содержа-

щих цветные металлы. Примером организации такого процесса бактериального выщелачивания в России является выщелачивание бедных медно-цинковых руд на Николаевском руднике и выщелачивание меди из бедных окисленных отвалов на Коунрадском руднике [2].

Промышленное использование технологий бактериального выщелачивания применяется в основном для бедных медных руд и продуктов их переработки в странах с теплым климатом – Чили, Перу, Австралии, Мексике и др.

Удоканское месторождение, которое является самым крупным неосвоенным месторождением меди в России, находится в Читинской области в районе вечной мерзлоты с холодной продолжительной зимой при отрицательной среднегодовой температуре воздуха.

Цель работы – исследование возможности применения бактериально-химического выщелачивания меди из сульфидно-окисленных руд Удоканского месторождения при пониженных температурах.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. Объектами исследований являлись 3 пробы медной руды Удоканского месторождения, различающиеся по минеральному и химическому составу. В пробе № 1 руды содержится 1.82% меди, из которой 1.05% – в сульфидах (табл. 1). Медная минерализация представлена

Таблица 1. Содержание меди в минеральных фазах проб Удоканской медной руды

№ пробы руды	Содержание меди в руде, %				Степень окисленности, %
	общее	водорастворимые и окисленные минералы меди	вторичные сульфиды меди	первичные сульфиды меди	
1	1.82	0.77	1.04	0.01	42.31
2	10.40	8.06	2.55	0.20	75.05
3	10.29	4.52	5.58	0.22	43.93

сульфидами, содержащими в руде (%): халькозин – 0.7, ковеллин – 0.6, борнит – 0.3, халькопирит – 0.02, а также сульфатами и карбонатами. Содержание брошантита составляет 1.9, малахита – 0.1%. Присутствуют в незначительном количестве силикаты меди, содержание хризоколлы 0.01%. Суммарное содержание медных минералов 3.63%.

Проба № 2 и проба № 3 руды характеризуются высоким содержанием меди, более 10%, и различаются содержанием оксидных и сульфидных минералов меди. Степень окисленности минералов меди в пробе № 2 – 75.05%, в пробе № 3 – 43.93%. Содержание халькопирита одинаково – около 0.02% (табл. 1).

Для выщелачивания использована ассоциация ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, выделенных из накопительных культур, полученных на усредненных пробах руды в качестве источника аборигенных микроорганизмов.

Культивирование. Накопительные культуры аборигенной ассоциации ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов получали из 10 г навесок усредненных проб руды, помещенных в колбы Эрленмейера на 250 мл со 100 мл стерильных сред. Штаммы *A. ferrooxidans* выделяли на среде Сильвермана и Люндгрена 9К [6] (г/л): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 44.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3.0, KCl – 0.1, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.01 при pH 2.0 и 28°C, штаммы *A. thiooxidans* – на среде Ваксмана [7] с элементной серой (г/л): S^0 – 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.2, KH_2PO_4 – 3.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.25, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – следы при pH 3.0 и 20 и 28°C, штаммы *Sulfobacillus* – на среде 9К, содержащей 0.02% дрожжевого экстракта, при температурах 20, 35, 42 и 50°C, штаммы архей – на модифицированной среде 9К, содержащей 3.7 г/л закисного железа при pH 1.8 и температурах 20, 35 и 42°C. Выделение штаммов *Leptospirillum* проводили в том же диапазоне температур на среде следующего состава (г/л): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 13.89, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.4, K_2HPO_4 – 0.1, KCl – 0.1 при pH 1.9–2.4.

Выращивание культур проводили на роторной качалке со скоростью вращения 300 об/мин при разных температурах (от 20 до 50°C). Для выделения культуры доминирующего штамма проводили рас-

сев методом десятикратных предельных разведений. Культуры из пробирок с наибольшим разведением рассевали на твердую среду с 0.8% агарозы (“Promega”, США) и инкубировали в течение 2 нед при 20 и 28°C. Наиболее часто встречающиеся колонии отсевали на скошенную твердую среду того же состава для поддержания чистой линии и на жидкую среду 9К для экспериментальных целей.

Условия экспериментов в перколяторах. Выщелачивание усредненных проб медной руды, измельченных до размера 5 мм (проба № 1) и 15 мм (пробы № 2 и № 3), проводили в перколяторах, которые представляют собой вертикальный цилиндрический стеклянный сосуд диаметром 4 см и высотой 40 см, снабженный устройством для подачи компрессором воздуха, под давлением которого происходит просачивание раствора, содержащего минеральные соли и микроорганизмы, через субстрат, при температурах от –8 до +20°C. Значение pH 0.4 устанавливали для предотвращения замерзания раствора при –10°C. Для бактериального выщелачивания использовали минеральную основу среды 9К без закисного железа. Кислотность раствора регулировали 10 н. раствором серной кислоты и определяли на pH-метр-иономере Эксперт-001 (“Эконикс-Эксперт”, Россия). При снижении степени извлечения меди из руды периодически проводили смену выщелачивающего раствора.

Пробы № 2 и № 3 выщелачивали сначала раствором серной кислоты. Культуральную жидкость с бактериями добавляли на 21 сут после снижения степени извлечения меди.

Аналитические методы. Минеральный и химический состав проб руды анализировали с использованием титриметрического, фотометрического, атомно-абсорбционного методов и оборудования: фотометр КФК-2 (“ЗОМЗ”, Россия), атомно-абсорбционный спектрофотометр Analyst 100 (“Perkin Elmer”, США).

Концентрацию меди в растворах определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре 3100 фирмы “Perkin Elmer” (США).

Концентрацию железа в растворе измеряли модифицированным роданидным методом, исключаяющим влияние меди на определение элементов [8].

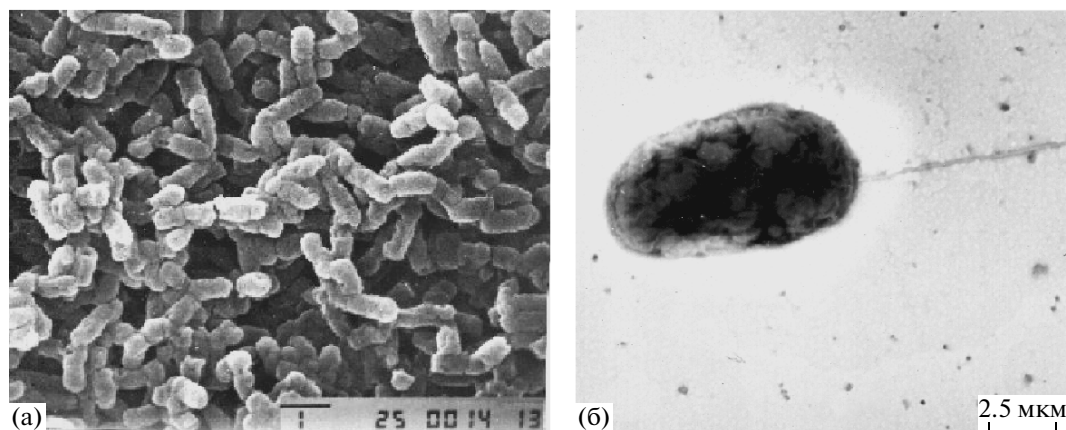


Рис. 1. Штамм *A. ferrooxidans* TFUd, выделенный из накопительной культуры. Вид клеток в электронном микроскопе со сканирующим устройством (а), – в просвечивающем режиме (б).

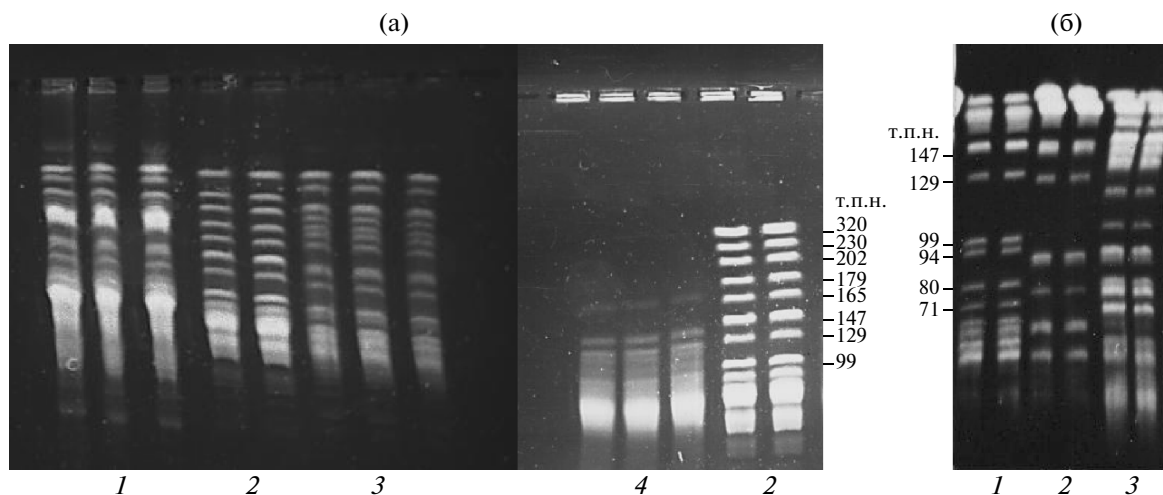


Рис. 2. Профиль фрагментов хромосомной ДНК штаммов бактерий:

а: 1 – *L. ferrooxidans* LUd, 2 – *A. ferrooxidans* ВКМ В-458 (размерный стандарт), 3 – *A. ferrooxidans* TFUd, 4 – *L. ferrooxidans* 97;

б: 1 – *A. ferrooxidans* ВКМ В-458, 2 – *A. ferrooxidans* TFBk, 3 – *A. ferrooxidans* TFUd.

Морфологию клеток микроорганизмов изучали с использованием светового микроскопа Olympus CX41 (“Olympus”, США) с фазово-контрастной приставкой и электронного микроскопа JEM-100C (“JEOL”, Япония) в просвечивающем режиме или со сканирующим устройством.

Структуру хромосомной ДНК штаммов анализировали методом пульс-электрофореза фрагментов нативной ДНК, расщепленной эндонуклеазами рестрикции *Xba*I для *Acidithiobacillus* и *Leptospirillum* [9] и *Not*I – для *Sulfobacillus* [10]. Условия пульс-электрофореза в режиме разделения крупных фрагментов: напряжение 12 В/см, время пульса 25 с, температура 15.5°C, продолжительность – 44 ч. Условия пульс-электрофореза в режиме разделения мелких фрагментов: напря-

жение 13 В/см, время пульса 10 с, температура 15°C, продолжительность – 72 ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика аборигенных кислотофильных хемолитотрофных микроорганизмов, выделенных из медной руды. Из накопительной культуры аборигенных кислотофильных хемолитотрофных микроорганизмов был выделен штамм *A. ferrooxidans*, обозначенный TFUd. Общий вид клеток представлен на рис. 1а и 3а. Клетки имели форму коротких палочек шириной 0.4–0.5 мкм и длиной 0.6–0.8 мкм, снабжены одним полярным жгутиком (рис. 1б). Штамм TFUd является мезофильным организмом с оптимумом температуры 28–30°C, но он также хорошо растет и окисляет закисное железо при 5°C.

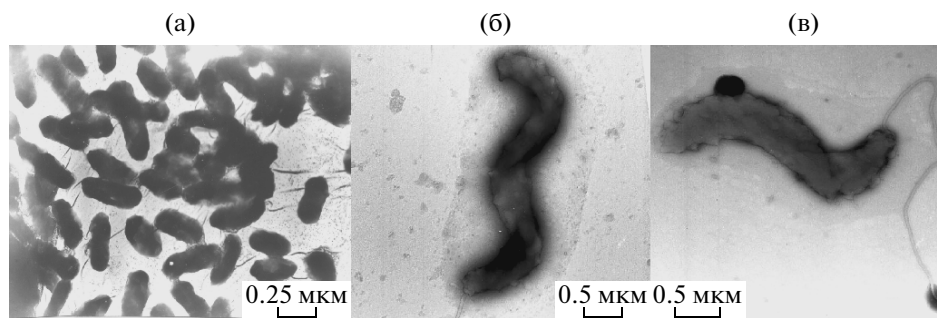


Рис. 3. Штаммы бактерий, выделенных из накопительной культуры. Вид в электронном микроскопе в просвечивающем режиме: *A. ferrooxidans* TFUd (а), *L. ferrooxidans* LUd (б, в).

Особенность этого штамма — устойчивость к низким значениям pH. Окислительная активность при значениях pH 1.1–1.3 была такой же, как и при оптимальных значениях pH 1.8–2.0. При изучении структуры хромосомной ДНК штамма TFUd методом пульс-электрофореза показано его отличие от других известных штаммов *A. ferrooxidans* (рис. 2).

В накопительной культуре при 20°C наряду с *A. ferrooxidans* наблюдали большое количество клеток лептоспирилл (рис. 3б, 3в). Морфологически клетки *L. ferrooxidans* LUd имеют форму вибрионов и спирилл, снабженных полярным жгутиком. По структуре хромосомной ДНК выделенный штамм существенно отличался от штамма *L. ferrooxidans* 97 из музея лаборатории хемолитотрофных микроорганизмов ИНМИ РАН (рис. 2а).

При 20 и 35°C был выделен новый изолят железо- и сероокисляющей бактерии *S. thermotolerans*, обозначенный SUd (рис. 4). Температура 35°C оказалась оптимальной для роста и окисления закисного железа штаммом SUd. Морфология штамма SUd типична для бактерий рода *Sulfobacillus*. Это грамположительные палочки размером 0.7–0.8 × 1.5–3.5 мкм, часто образовывали цепочки из четырех и более клеток, неподвижные. Штамм *S. thermotolerans* SUd в качестве источников энергии ис-

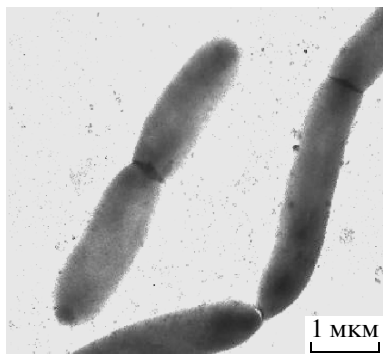


Рис. 4. Штамм *S. thermotolerans* SUd, выделенный из накопительной культуры. Вид в электронном микроскопе в просвечивающем режиме.

пользовал элементарную серу, закисное железо и сульфидные минералы. По строению хромосомной ДНК отличался от известных штаммов *S. thermosulfidooxidans*, *S. thermotolerans* и *S. sibiricus* (рис. 5) [10].

Штаммы бактерий *A. thiooxidans* и археи в пробах медной руды не обнаружены.

Влияние температуры и значения pH раствора на выщелачивание пробы № 1 медной руды. Выщелачивание руды при разных температурах и значениях pH проводили культуральной жидкостью, содержащей микроорганизмы аборигенной ассоциации и трехвалентное железо в концентрации 7.6–8.4 г/л. Результаты выщелачивания меди из пробы № 1 медной руды представлены в табл. 2. При одинаковом значении pH 1.6 извлечение серной кислотой протекало активнее, в среднем на 13%, при температуре +20°C, чем при +4°C. За 4 сут выщелачивания при температуре +20°C извлечение меди составило 35.9%, при +4°C — 24.4%. Более интенсивное извлечение меди в на-

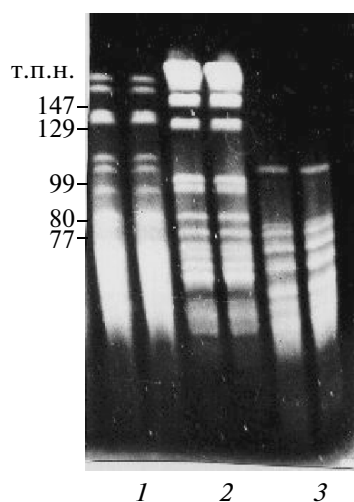


Рис. 5. Профиль фрагментов хромосомной ДНК штаммов *Sulfobacillus*: 1 — *S. sibiricus*, 2 — *A. ferrooxidans* VKM B-458 (размерный стандарт), 3 — *S. thermotolerans* SUd.

Таблица 2. Извлечение меди при бактериально-химическом выщелачивании пробы № 1 Удоканской медной руды в разных температурных режимах

Время выщелачивания, сут	Извлечение меди, %						
	20°C		4°C			0...–2°C	–8...–10°C
	pH 1.6	pH 1.0	pH 1.6	pH 1.0	pH 0.4	pH 0.4	pH 0.4
1	18.6	20.4	17.1	19.3	40.6	38.4	37.2
4	35.9	37.8	24.4	33.5	49.2	41.2	41.7
21	53.9	51.9	36.9	37.8	58.0	44.2	42.1
35	61.3	57.5	46.8	47.3	60.2	45.4	43.7
56	61.4	60.1	58.5	53.4	64.6	45.5	44.3
77	65.4	65.3	60.4	58.1	66.5	46.6	44.9
137	76.0	74.2	74.0	68.1	68.5	51.0	45.3
160	79.3	77.4	75.6	70.4	69.9	53.1	46.7

чале выщелачивания руды при значении pH 1.0 в температурных режимах 20 и 4°C, а также при pH 0.4 и более низких температурах шло за счет большей кислотности раствора. Извлечение меди за 4 сут при температуре от 0 до –2°C составило 41.2%, а от –8 до –10°C – 41.7%, что соответствует 77.6–89.3% меди в окисленных минералах руды. Однако высокая кислотность и низкие температуры ингибировали микроорганизмы – регенераторы окислителя Fe₂(SO₄)₃ в бактериально-химическом процессе, поэтому со временем извлечение меди снижалось. Особенно это заметно при низких температурах: от 0 до –2°C и от –8 до –10°C.

Оптимальной температурой для жизнедеятельности доминирующего микроорганизма *A. ferrooxidans* являлась 28–30°C. Как видно из табл. 2, процесс выщелачивания меди из пробы № 1 шел относительно активно и при более низких, но положительных температурах, так как извлечение меди превышало содержание окисленных минералов. При отрицательных температурах бактерии полностью прекращали свою деятельность, что подтверждалось результатами выщелачивания: извлечение меди в конце процесса не превышало 46.7 и 53.1%, что немного больше содержания меди в окисленных минералах в руде (42.3%).

Извлечение меди из руды возрастало как при повышении температуры, так и при повышении значения pH от 0.4 до 1.6 при положительной температуре.

Влияние температуры на выщелачивание проб № 2 и № 3 медной руды. Выщелачивание меди из проб № 2 и № 3 медной руды проводили при 5 и 20°C при поддержании значения pH 1.6–1.9 (рис. 6).

В первые 5 сут в обоих температурных режимах наблюдали интенсивное растворение меди. В последующие 10 сут выщелачивание меди снижалось и практически прекращалось на 16–21 сут. При 20°C выщелачивание меди кислотой в течение

17 сут активнее происходило из пробы № 2, содержащей больше окисленных фаз меди, чем в пробе № 3 руды (рис. 6а, 6б). После добавления на 21 сут культуральной жидкости, содержащей микроорганизмы и 2.9 г/л Fe³⁺, извлечение меди возрастало, интенсивнее из пробы № 3, что объяснялось окислением сульфидных минералов.

При 5°C характер выщелачивания меди из обеих проб руды одинаков, и, так же, как при 20°C, извлечение меди больше из пробы № 2 (рис. 6в, 6г). После снижения извлечения меди добавление культуральной жидкости, содержащей микроорганизмы и ионы Fe³⁺, повышало растворение медных минералов очень незначительно в отличие от процесса при 20°C.

Извлечение меди при выщелачивании пробы № 2 при 20°C составило 83.61%, что ненамного больше, чем при 5°C – 81.63% (табл. 3). Извлечение меди при выщелачивании пробы № 3 при 20°C составило 60.32%, а при 5°C – 54.16% (табл. 3).

Извлечение меди из пробы № 1 за 35 сут – 46.8% при 4°C и pH 1.6 (табл. 2) ниже, чем при почти той же температуре и значении pH из пробы № 3 – 54.16% (табл. 3) и близкой степени окисленности минералов меди (42–43%) (табл. 1), что объясняется различием режимов выщелачивания и разным минеральным составом руды.

При снижении температуры выщелачивания медной руды извлечение меди уменьшалось на 2.4% из пробы № 2 и на 10.2% из пробы № 3, но повышался расход серной кислоты на извлеченную медь: на 12% на пробу № 2 и на 4% на пробу № 3 (табл. 3). Расход кислоты на выщелачивание меди 0.82–0.92 кг/кг меди из пробы № 2, содержащей больше окисленных минералов меди, больше, чем из пробы № 3 с меньшей степенью окисленности медных минералов – 0.52–0.54 кг/кг меди.

Таким образом, химическое растворение медных минералов происходит во всем диапазоне

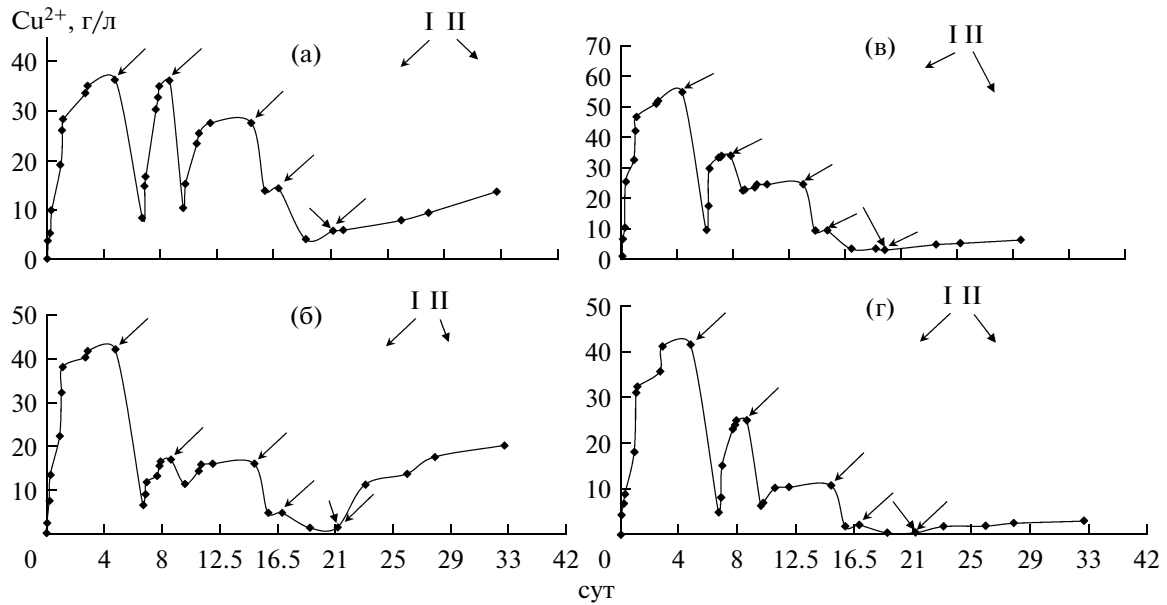


Рис. 6. Выщелачивание меди из пробы руды № 2 при 20°C (а), и из пробы № 3 (б); при 5°C – из пробы руды № 2 (в) и из пробы № 3 (г).

I – смена выщелачивающего раствора, II – внесение культуральной жидкости с бактериями.

температуры от -10 до $+20^{\circ}C$ и интенсифицируется при повышении концентрации серной кислоты от рН 1.6 до 0.4. Ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы участвуют в процессе выщелачивания меди из руды при рН более 1.0 и при положительных температурах. Извлечение меди из руды возрастает при повышении темпе-

ратуры и при увеличении значения рН от 0.4 до 1.6 при положительной температуре. Расход серной кислоты в расчете на извлеченную медь возрастает при снижении температуры.

Проведенная работа показала возможность выщелачивания медных руд Удоканского месторожде-

Таблица 3. Извлечение меди и расход серной кислоты при бактериально-химическом выщелачивании проб № 2 и № 3 Удоканской медной руды в разных температурных режимах

Время выщелачивания, сут	Расход серной кислоты				Извлечение меди, %	
	кг/т руды		кг/кг меди			
	20°C	5°C	20°C	5°C	20°C	5°C
Проба № 2						
5	13.47	18.87	0.48	0.68	24.0	33.82
9	20.70	33.40	0.52	0.75	46.33	54.75
15	30.63	37.03	0.60	0.72	63.22	62.70
17	32.43	38.83	0.61	0.73	72.0	74.70
21	33.33	39.73	0.61	0.74	75.0	76.80
33	51.17	51.63	0.82	0.92	83.61	81.63
Проба № 3						
5	21.33	17.40	0.82	0.44	27.21	26.95
9	24.93	24.63	0.50	0.41	38.42	43.05
15	28.56	30.06	0.42	0.40	49.14	49.92
17	29.46	31.86	0.36	0.39	51.89	51.34
21	31.26	32.76	0.38	0.39	52.86	51.73
33	46.56	48.20	0.52	0.54	60.32	54.16

ния в условиях сурового климата растворами серной кислоты с pH 0.4 при температурах от -10°C и выше и с применением ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, регенерирующих окислитель Fe^{3+} и окисляющих упорные сульфидные минералы, содержащие медь, при положительных значениях температуры и низких значениях pH.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 10-04-00589.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик А.И. 1972. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М.: Наука, 248 с.
2. Биоготехнология металлов. Практическое руководство / Ред. Г.И. Каравайко, Дж. Росси, А. Агате, С. Груднев, З.А. Авакян. М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1989. С. 302–309.
3. Remonsellez F., Galleguillos F., van Rensburg S.J., Rautenbach G.F., Galleguillos P., Castillo D., Demergasso C. // *Advanced Materials Research*. 2007. V. 20–21. P. 539–542.
4. Hawkes R.B., Franzmann P.D., Plumb J.J. // *Proceed. 16th Intern. Biohydrometallurgy Symposium* / Eds. S.T.L. Harrison, D.E. Rawlings, J. Petersen. Cape Town, South Africa: Produced by Compress. 2005. P. 657–666.
5. Galleguillos P.A., Hallberg K.B., Johnson D.B. // *Advanced Materials Research*. 2009. V. 71–73. P. 55–58.
6. Silverman M.P., Lundgren D.G. // *J. Bacteriol.* 1959. V. 77. № 5. P. 642–647.
7. Waksman S.A., Joffe I.S. // *J. Bacteriol.* 1922. V. 7. № 2. P. 239–256.
8. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод / Ред. А.М. Антокольская. М.: Недра, 1970. С. 140–143.
9. Кондратьева Т.Ф., Мунтян Л.Н., Каравайко Г.И. // *Мол. генетика, микробиология и вирусология*. 1993. № 4. С. 19–22.
10. Кондратьева Т.Ф., Меламуд В.С., Цаплина И.А., Богданова Т.И., Сенюшкин А.А., Пивоварова Т.А., Каравайко Г.И. // *Микробиология*. 1998. Т. 67. № 1. С. 19–25.

Leaching of Copper Ore of the Udokanskoe Deposit at Low Temperatures by an Association of Acidophilic Chemolithotrophic Microorganisms

T. F. Kondrat'eva^a, T. A. Pivovarova^a, L. N. Krylova^b, V. S. Melamud^a,
E. V. Adamov^b, and G. I. Karavaiko^a

^a Winogradsky Institute of Microbiology Russian Academy of Sciences, pr. 60-letiya Oktyabrya 7/2, Moscow, 117312 Russia
e-mail: kondr@inmi.host.ru

^b National University of Science and Technology "MISIS," Leninskii pr. 4, Moscow, 119049 Russia
e-mail: krulov@yandex.ru

Received January 19, 2011

Abstract—Pure cultures of indigenous microorganisms *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain TFUd, *Lep-tospirillum ferrooxidans* strain LUd, and *Sulfobacillus thermotolerans* strain SUd have been isolated from the oxidation zone of sulfide copper ore of the Udokanskoe deposit. Regimes of bacterial-chemical leaching of ore have been studied over a temperature range from -10 to $+20^{\circ}\text{C}$. Effects of pH, temperature, and the presence of microorganisms on the extraction of copper have been shown. Bacterial leaching has been detected only at positive values of temperature, and has been much more active at $+20$ than at $+4^{\circ}\text{C}$. The process of leaching was more active when the ore contained more hydrophilic and oxidized minerals. The possibility of copper ore leaching of the Udokanskoe deposit using sulfuric acid with pH 0.4 at negative values of temperature and applying acidophilic chemolithotrophic microorganisms at positive values of temperature and low pH values was shown.

UDC 663.75

INCREASE OF ETHANOL PRODUCTIVITY BY CELL-RECYCLE FERMENTATION OF FLOCCULATING YEAST

© 2011 F. Z. Wang*, T. Xie**, M. Hui*

*School of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001 P.R. China

**Department of Chemical Engineering, Hunan Institute of Engineering, Xiangtan, 411104 P.R. China

e-mail: wangfuzhuan@yahoo.com.cn

Received November 10, 2010

Using the recombinant flocculating Angel yeast F6, long-term repeated batch fermentation for ethanol production was performed and a high volumetric productivity resulted from half cells not washed and the optimum opportunity of residual glucose 20 g l^{-1} of last medium. The obtained highest productivity was $2.07 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, which was improved by 75.4% compared with that of $1.18 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in the first batch fermentation. The ethanol concentration reached 8.4% corresponding to the yield of 0.46 g g^{-1} . These results will contribute greatly to the industrial production of fuel ethanol using the commercial method with the flocculating yeast.

Since the oil crisis of 1973, the biological production of ethanol has become one of the top candidates for the replacement of petrochemicals for energy usage. At the same time the use of bioethanol is considered advantageous from an environmental point of view. However feasible solutions do not guarantee a breakthrough in the usage of the renewable resource unless the prices of products obtained are competitive with those from fossil raw materials. Numerous studies have been performed dealing with various aspects of ethanol fermentation. The raw material represents a major share of the production costs [1], and any improvement ethanol productivity should lead to an improved process economy.

Long-term cell-recycle fermentation showed a higher volumetric productivity of ethanol than a simple batch fermentation, because a shorter fermentation time and higher substrate consumption rates were obtained in cell-recycle fermentation. However, centrifugation is usually too complex to be economically viable on a large scale and is difficult to maintain aseptic conditions. The ability of yeast cells to flocculate is of considerable importance for the fuel ethanol industry, as it provides an effective, environment-friendly, simple and cost-free way to separate yeast cells from the final culture fluid, thus facilitating further downstream processing.

It also is one of the feasible approaches that the production of byproducts should be minimized. Quantitatively, carbon dioxide, glycerol and cell biomass are the most significant byproducts during anaerobic ethanol production by *Sacharomyces cerevisiae* [2]. Carbon dioxide is an inevitable fermentation product, but the off-gas can be sold as a high-quality raw material. Substantial amount of glycerol, up to 10% (w/w) of the carbon source, may be formed under anaerobic conditions for the purpose of reoxidising surplus

NADH being formed in anabolism [3–5]. Another research states that glycerol consumes up to 4% of the carbon source in industrial fermentations [6]. Glycerol is also produced as a compatible solute during osmotic stress [7].

Using the flocculating Angel yeast F6 which was described previously [8], ethanol was attempted to be produced at a high volumetric productivity by cell-recycle fermentation. Although many studies have constructed the flocculation yeast [9–12], the recombinant yeast strain has seldom been applied to ethanol production by cell-recycle fermentation. Therefore, the flocculation Angel yeast F6 was recycled without centrifugation and the experiment performed for 16 recycle rounds and a highest productivity of $2.07 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ during 8th recycle round was achieved.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and media. Angel yeast F6 was constructed previously and maintained in a frozen state at -70°C . The preculture contained (g l^{-1}): yeast extract – 8.5, glucose – 30.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.5, MgSO_4 – 0.1 and CaCl_2 – 0.06. The fermentation medium consisted of (g l^{-1}): yeast extract – 5.0, glucose – 150.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.5, MgSO_4 – 0.65, CaCl_2 – 2.0 and KH_2PO_4 – 1.5 in static Erlenmeyer flasks (250 ml) containing 150 ml. Five percent (v/v) of the seed culture was inoculated, and the initial pH of the medium was adjusted to 5.0.

Batch fermentation. Growing cells of *S. cerevisiae* Angel yeast F6 were precultured in a 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of the growth medium at 30°C with agitation at 200 rpm for 12 h. This seed culture was then inoculated into a 250 ml Erlenmeyer flasks containing 150 ml of the fermentation medium. The initial pH was adjusted to 5.0, although pH was not controlled dur-

Table 1. Choice of re-inoculated opportunity

Indicators	RG of last medium, g/l									
	40		30		20		10		0	
Fermentation time, h	48	56	48	56	48	56	48	56	48	56
EC, %, v/v	6.2	7.0	7.1	7.4	7.7	7.7	6.6	6.6	6.7	6.7
Yield, g/g	0.34	0.40	0.41	0.42	0.44	0.44	0.38	0.38	0.38	0.38

ing the fermentation. Temperature was maintained at 30°C and the fermentation was performed statically.

Cell-recycle fermentation. After the completion of batch fermentation with a working volume of 150 ml in a 250 ml Erlenmeyer flasks, cell-recycled fermentation in the Erlenmeyer flasks was performed. Whenever the glucose concentration fell below about 20 g l⁻¹, the cultural medium was transferred and half of cells were kept. A fresh medium was added to the cells recovered from the Erlenmeyer flasks to give 150 ml in all recycle rounds. Cell-recycle fermentation with the flocculating cell was performed for 16 recycle rounds.

Analytical methods. *Glucose concentration assay.* Glucose concentration was measured by using biosensor analyzer with a glucose oxidase (GOD) coupled enzymatic membrane.

Dry cell weight assay. Dry cell weight (DCW) was obtained after centrifuging at 1500 g for 15 min, washed twice with distilled water, re-centrifuged and dried at 105°C for 24 h.

Ethanol concentration assay. Ethanol concentration was measured by using Shimadzu GC-2010 gas chromatography (Japan) with a PEG20M column (internal diameter 0.25 mm, length 3 m) and a FID detector. Nitrogen was used as the carrier gas at a flow rate of 3 ml/min while n-propanol was used as the internal standard. The column temperature was maintained at 220°C.

RESULTS AND DISCUSSION

Choice of the cell-recycle opportunity. It was proved in the experiment that glucose was the most important factor influencing the ethanol production of the recombinant Angel yeast F6 (data not shown). The residual glucose concentration of the medium was taken as the standard of the choice of the cell-recycle opportunity. As was shown in Table 1, the yeast cells were reused when the residual glucose (RG) of last medium was more than 30 g l⁻¹, the fermentation time was longer than those of the other three ways. The cells were recycled when the residual glucose of last medium decreased to less than 10 g l⁻¹, the ethanol concentrations in the fermentation media were lower and fermentation time were longer. The optimum opportunity for yeast cells to reuse was the residual glucose concentration of 20 g l⁻¹ in the fermentation medium with

the maximum ethanol concentration of 7.7% and yield of 0.44 g g⁻¹ obtained.

Repeated batch fermentation with all and half cells. Repeated batch fermentation means that culture broth is centrifuged at the end of ordinary batch fermentation and centrifuged cells are recycled for the next batch fermentation [13]. In this study, the recombinant Angel yeast F6 flocculated from the early stationary growth phase. At the end of batch fermentation yeast cells sedimented at the bottom of flask and was reused for the next batch by taking the above medium out, without centrifugation.

The effects of the different amount of recycled cells on the ethanol production were investigated. As shown in Fig. 1, the variety of biomass was especially obvious and increased with the rounds of cell-recycle fermentation. The final biomass of the sixth batch fermentation with half recycled cells increased to 4.22 g l⁻¹, which was 1.7-fold compared with the 2.48 g l⁻¹ of the first original batch. However, when repeated batch fermentation performed with all cells to reuse, the final biomass was 5.94 g l⁻¹ of the sixth batch fermentation, which was 2.4-fold compared with the 2.48 g l⁻¹. The ethanol concentration also increased with the rounds of cell-recycle fermentation during the six batch fermentation. But the variety of the ethanol concentration was only improved by 18.3% from 7.1 to 8.4%, not so much as the biomass. In the second repeated batch-ethanol concentration of fermentation with all recycled cells was 7.6%, higher than those with half recycled cells, which was 7.2%. Then they were maintained similar after the third repeated recirculation.

The ethanol concentration could be improved in the fermentation with cell recycled, but had not obvious difference between the fermentations with all and half recycled cells. The repeated fermentation with half recycled cells could reduce the quantity of cells, so one of the most significant byproducts during anaerobic ethanol production was reduced.

Repeated batch fermentation with recycled cells washed and not washed. The influence of washing reused cells on ethanol formation was investigated. Experiments were divided into two groups. In one group (A) recycled cells were washed with distilled water before reuse during six batch fermentation. In the other group (B) recycled

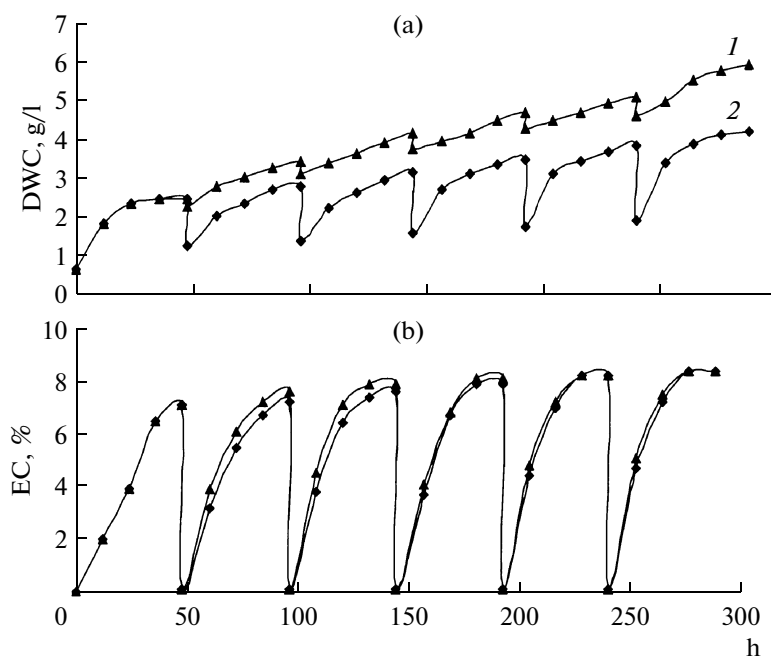


Fig. 1. Time courses of biomass (a) and ethanol (b) concentration in repeated batch fermentation with all (1) and half recycled cells (2).

cells without washing were directly reused. The results were shown in Tables 2 and 3, respectively.

As shown in the two tables, half cells were reused for the next batch fermentation. The final dry cell weight (DCW) in each cycle increased with the rounds of fermentation. The biomass of group A was similar to that of group B. But the ethanol concentration of group A increased from 7.1 to 7.6%, and yield was from 0.39 to 0.42 g g⁻¹. Both were lower than those in group B, which were from 7.1 to 8.1%, and from 0.39 to 0.45 g g⁻¹. Furthermore the highest productivity of 1.90 g l⁻¹ h⁻¹ in group B was higher than that of 1.79 g l⁻¹ h⁻¹ in group A. Fermentation with recycled cells not washed was prior to that with recycled cells washed, which indicated that the activity of washed cells were decreased and the ability of ethanol formation was inhibited.

Repeated batch fermentation with the flocculating Angel yeast F6. Time courses of biomass, glucose and

ethanol concentration in 16 rounds of repeated fermentation with half recycled cells not washed were shown in Fig. 2. The biomass increased with the increase of recycles constantly during the first 11 batches and reached 5.21 g l⁻¹ at the end of 11th batch, which was 2.1 times as the first ordinary batch 2.48 g l⁻¹. The final ethanol concentration kept increasing in the first 10 batches and reached 8.4% at the end of the 10th batch. Although the final ethanol concentration did not change much from 6.5 to 8.4%, the fermentation time varied from 32 h to 48 h, and the volumetric productivity varied from 1.08 to 2.07 g l⁻¹ h⁻¹. In the 8th batch, the final ethanol concentration was 8.3% for 32 h, and corresponded to an ethanol yield of 0.46 g g⁻¹ and a volumetric productivity of 2.07 g l⁻¹ h⁻¹, which was improved by 75.4% compared with that of 1.18 g l⁻¹ h⁻¹ in the first batch fermentation.

Table 2. Repeated batch fermentation with recycled cells washed

Indicators	Round of fermentation					
	1	2	3	4	5	6
Initial DCW, g/l	0.65	1.22	1.45	1.62	1.69	1.81
Final DCW, g/l	2.48	2.88	3.23	3.34	3.52	3.64
Fermentation time, h	48	46	42	38	36	34
EC, %, v/v	7.1	7.0	7.2	7.4	7.5	7.6
Yield, g/g	0.39	0.39	0.40	0.41	0.41	0.42
Productivity, g/l h	1.18	1.22	1.37	1.56	1.66	1.79

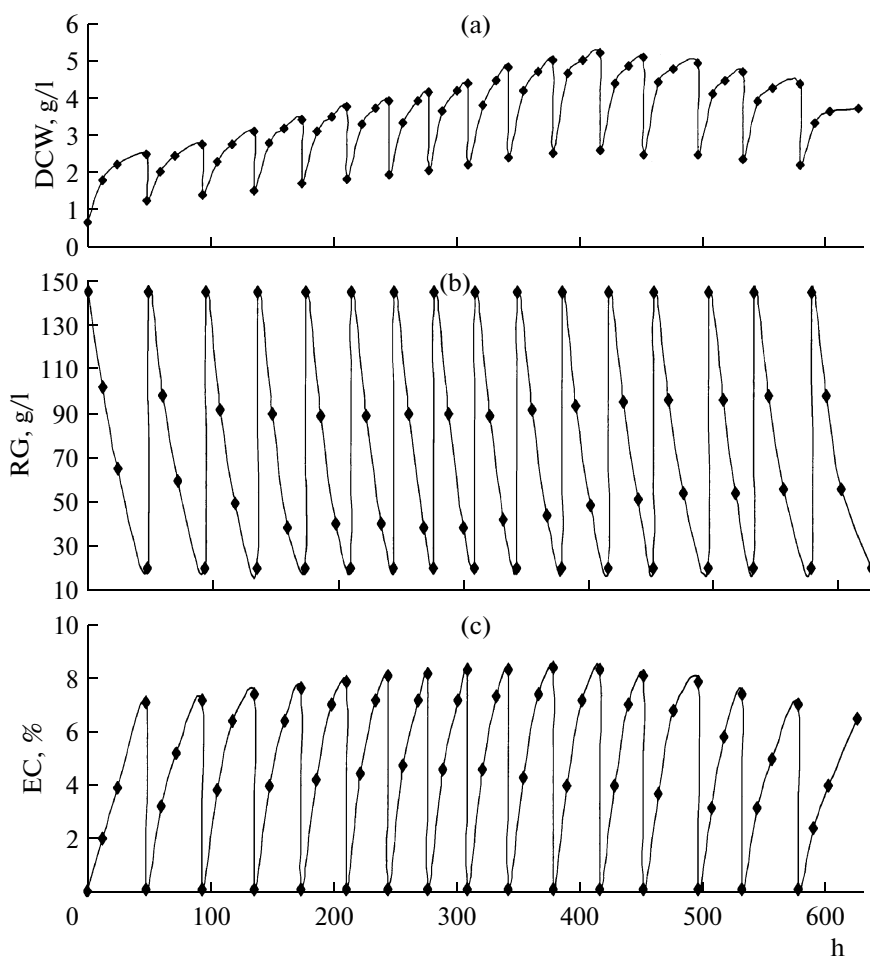
Table 3. Repeated batch fermentation with recycled cells not washed

Indicators	Round of fermentation					
	1	2	3	4	5	6
Initial DCW, g/l	0.65	1.24	1.39	1.52	1.71	1.84
Final DCW, g/l	2.48	2.78	3.11	3.41	3.78	3.95
Fermentation time, h	48	46	42	38	36	34
EC, %, v/v	7.1	7.2	7.4	7.6	7.9	8.1
Yield, g/g	0.39	0.40	0.41	0.42	0.44	0.45
Productivity, g/l h	1.18	1.25	1.41	1.60	1.76	1.90

Actually the recycled fermentation with the recombinant flocculating Angel yeast F6 has been performed for 16 rounds (Fig. 2). From the 6th to 12nd rounds, the final ethanol concentration kept stability of more than 8.0% and each fermentation time did not exceed 48 h of the ordinary batch fermentation. During the 13rd to 16th batches, the ethanol concentrations varied from 7.9 to 6.5%. As the volumetric productivity

declined $1.08 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in the 16th round, which was lower than that of the ordinary batch fermentation, it was not worthy to continue the cell-recycle fermentation and 15 rounds of repeated-batch fermentation were accessible.

Microorganisms were found to actively produce metabolites under anaerobic conditions. Repeated fermentation using the flocculation yeast has been performed

**Fig. 2.** Time courses of repeated fermentation with recycled cells of recombinant Angel yeast F6: a – DCW, g/l, b – RG, g/l; c – EC, %.

under anaerobic condition and high cell mass has been easily obtained, resulting in much higher productivity.

* * *

It was the optimum opportunity for yeast cells of the recombinant Angel yeast F6 to reuse that the residual glucose of the medium decreased to 20 g l⁻¹. The ethanol yield and concentration could be improved in the fermentation with cell recycle, but had not obvious difference between the fermentation with all and half recycled cells. Fermentation with recycled cells not washed was prior to that with recycled cells washed, which indicated that the activity of washed cells decreased and the ability of ethanol formation was inhibited.

Long-term repeated batch fermentation for ethanol production with the recombinant flocculating Angel yeast F6 was performed and a high volumetric productivity resulted from half cells not washed and the optimum opportunity of RG 20 g l⁻¹ of last medium. The obtained highest productivity was 2.07 g l⁻¹ h⁻¹, which was improved by 75.4%, compared with that of 1.18 g l⁻¹ h⁻¹ in the first batch fermentation. The ethanol concentration reached 8.4% corresponding to the yield of 0.46 g g⁻¹. These results will contribute greatly to the industrial production of fuel ethanol using the commercial method with the constructed flocculating yeast.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Introducing Talents Foundation of Henan University of Technology (150411).

REFERENCES

- Galbe, M. and Zacchi, G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, vol. 59, pp. 618–628.
- Brandberg, T., Gustafsson, L., and Franzen, C. J., *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2007, vol. 40, pp. 585–593.
- Albers, E., Larsson, C., Liden, G., Niklasson, C., and Gustafsson, G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996, vol. 62, pp. 3187–3195.
- Oura, E., *Process Biochem.*, 1977, vol. 249, pp. 19–35.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A., and van Dijken, J.F., *J. Gen. Microbiol.*, 1990, vol. 136, pp. 395–403.
- Nissen, T.L., Kielland-Brandt, M.C., Nielsen, J., and Villadsen, J., *Metabolic Engineering*, 2000, vol. 2, pp. 69–77.
- Blomberg, A. and Adler, L., *Adv. Microb. Physiol.*, 1992, vol. 33, pp. 145–212.
- Wang, F.Z., *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2009, vol. 45, no. 5, pp. 586–591.
- Remize, F., Schorr-Galindo, S., Guiraud, J.R., Dequin, S., and Blondin, B., *Biotechnol. Lett.*, 1998, vol. 20, pp. 313–318.
- Watari, J., Nomura, M., Sahara, H., Koshino, S., and Keranen, S., *J. Inst. Brew.*, 1994, vol. 100, pp. 73–77.
- Verstrepen, K.J., Bauer, F.F., Michiels, C., Derdelinckx, G., Delvaux, F.R., and Pretorius, I.S., *Eur. Brew. Conv. Monogr.*, 1999, vol. 28, pp. 30–42.
- Verstrepen, K.J., Michiels, C., Derdelinckx, G., Delvaux, F.R., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Bauer, F.F., and Pretorius, I.S., *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 2001, vol. 59, pp. 69–76.
- Liu, Y.Q., and Liu, D.H., *Process Biochem.*, 2004, vol. 39, pp. 1507–1510.

UDC 577.150.6

PURIFICATION AND CHARACTERISATION OF LIGNIN PEROXIDASE FROM *Pycnoporus sanguineus* MTCC-137

© 2011 J. K. Sharma**, M. Yadav*, N. P. Singh**, and K. D. S. Yadav*

*Department of Chemistry, D.D.U. Gorakhpur University, Gorakhpur, 273 009, India

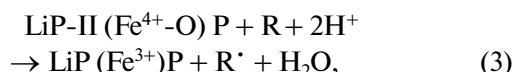
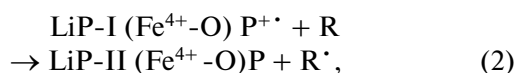
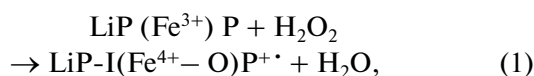
**Department of Chemistry, Udai Pratap College, Varansi, 221002, India

e-mail: kds_chemistry@rediffmail.com

Received November 24, 2010

Extracellular secretion of lignin peroxidase from *Pycnoporus sanguineus* MTCC-137 in the liquid culture growth medium amended with lignin containing natural sources has been shown. The maximum secretion of lignin peroxidase has been found in the presence of saw dust. The enzyme has been purified to homogeneity from the culture filtrate of the fungus using ultrafiltration and anion exchange chromatography on DEAE-cellulose. The purified lignin peroxidase gave a single protein band in sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis corresponding to the molecular mass 40 kDa. The K_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m values of the enzyme using veratryl alcohol and H_2O_2 as the substrate were 61 μM , 2.13 s^{-1} , $3.5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ and 71 μM , 2.13 s^{-1} , $3.0 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ respectively at the optimum pH of 2.5. The temperature optimum of the enzyme was 25°C.

The lignin decomposing basidiomycete white rot fungi secrete a hemeprotein, lignin peroxidases (LiP, EC 1.11.1.7) which in presence of H_2O_2 degrades lignin and lignin model compounds [1]. The sequence of catalysis is given below:



where R is the organic substrate and P is porphyrin. LiP compound I (LiP-I) carries both oxidizing equivalents of H_2O_2 , one as an oxyferryl ($Fe^{4+}\text{-O}$) center and one as a porphyrin π cation radical ($P^{\bullet+}$), whereas LiP compound II (LiP-II) carries only one oxidizing equivalent. The substrate R is oxidized by compound I to an aryl cation radical which with subsequent nonenzymatic reactions yield the final products. LiP is a biotechnologically important enzyme having wide potential applications (I) in delignification of lignocellulosic materials [2] which are seen as an alternative to the depleting oil reserves, (II) in the conversion of coal to low molecular mass fractions [3] which could be used as a feed stock for the production of commodity chemicals, (III) in biopulping and biobleaching [4] in paper industries, (IV) in removal of recalcitrant organic pollutants [5–9] and (V) in the enzymatic polymerization [10] in polymer industries. Keeping in view the biotechnological potential of LiP, the authors have initiated enzymatic studies on the LiP from indigenous fungal strains. LiP of *Phanerochaete chrysosporium* has been ex-

tensively studied [11–13] and LiP of *Trametes versicolor* [12], *Pleurotus ostreatus* [13], *Polyporus ostroiformis* [14], *Ganoderma lucidum* [15], *Aspergillus terreus* [16], *Fusarium oxysporum* [16], *Penicillium citrinum* [16], *Rizopus nigricans* [17], *Pleurotus sajor-caju* [18], *Abortiporus biennis* [19], *Pestalotia bicolor* [19], *Heterobasidium annosum* [19], *Gloephyllum striatum* [19], *Loweporus lividus* [19] have been reported. The fungal strain *Pycnoporus sanguineus* MTCC-137 is a white rot fungus isolated from *Shorea robusta* and is reported to secrete laccase but its lignin peroxidase has not been reported so far. Our research interest in lignin peroxidases has prompted us to screen this fungal strain for the secretion of lignin peroxidase. The culture condition for the maximum secretion of the enzyme has been optimized. The enzyme has been purified and enzymatic characteristics like K_m , pH and temperature optima have been determined.

MATERIALS AND METHODS

Veratryl alcohol, which is 3,4-dimethoxy benzyl alcohol was from Aldrich (USA). Nitroacetate was from Sigma Chemical Co. (USA). The chemicals used in gel electrophoresis including protein molecular weight markers were procured from Bangalore Genei Pvt. Ltd. (India). All other chemicals were either from CDH (Delhi) or Loba Chemie (Mumbai) or SD Fine Chem Limited (Worli, Mumbai) and were used without further purification.

Fungal strain. The fungal strain was procured from Microbial Type Culture Collection Center and Gene Bank, Institute of Microbial Technology, Chandigarh and was maintained on agar slants [20]. The medium used for agar slants for the fungal strain *Pycnoporus*

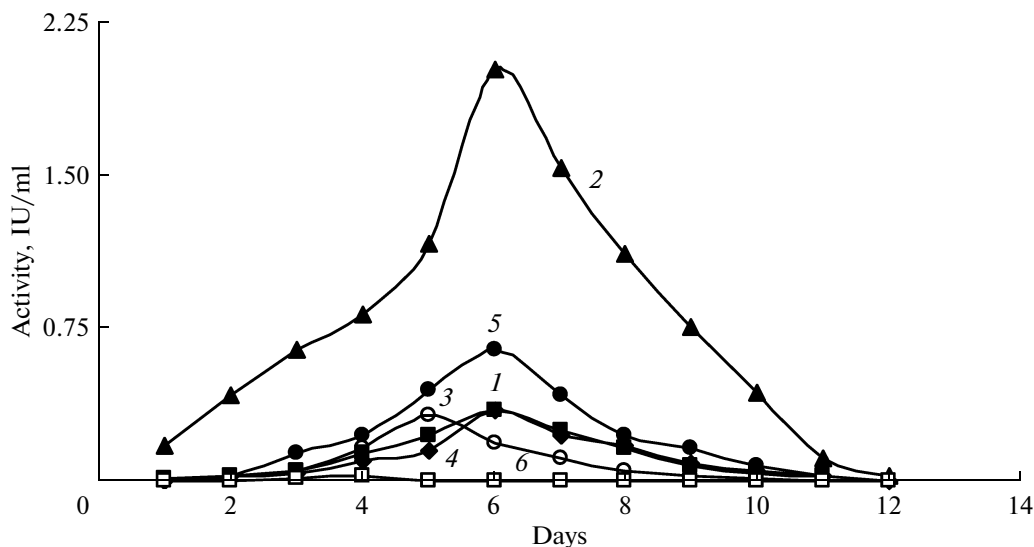


Fig. 1. Secretion of lignin peroxidase by *P. sanguineus* MTCC-37 in the liquid culture medium supplemented with different natural lignin containing substrates: coirdust (1), sawdust (2), bagasse (3), corn-cob (4), wheat straw (5), and without substrate.

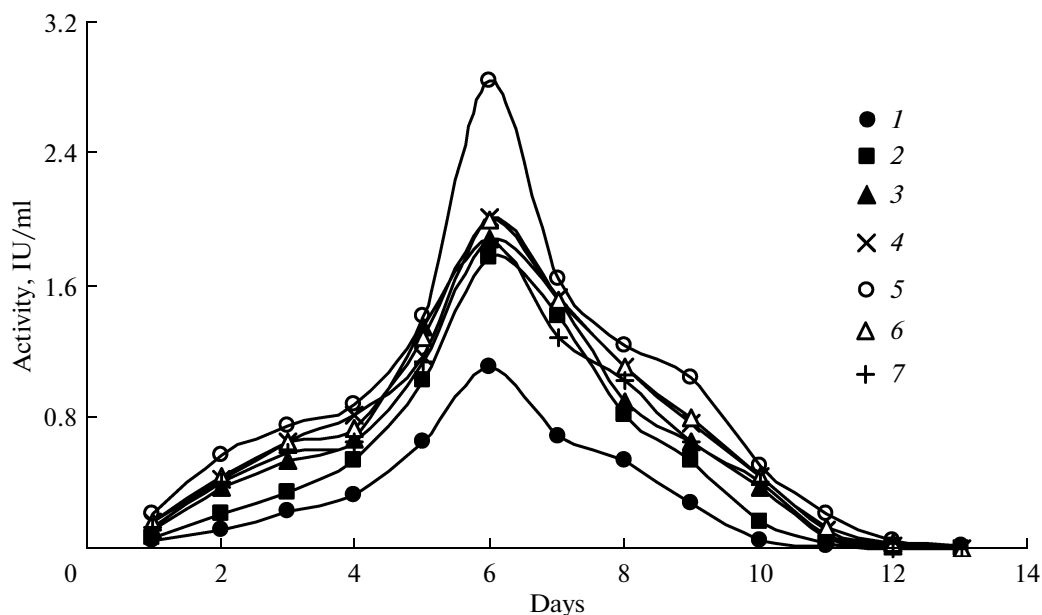


Fig. 2. Optimisation of secretion of lignin peroxidase in the liquid culture medium amended with sawdust (1–7) by the fungal strain *P. sanguineus* MTCC-37.

1 – 100, 2 – 200, 3 – 400, 4 – 500, 5 – 600, 6 – 800, 7 – 1000 mg.

sanguineus MTCC-137 consisted of (g/l): glucose – 10, yeast extract – 5.0 and agar – 15.0, dissolved in double distilled water.

Enzyme assay. The lignin peroxidase activity has been assayed [11] by monitoring the formation of veratraldehyde spectrophotometrically at $\lambda = 310$ nm using veratryl alcohol as a substrate with UV/VIS spectrophotometer Hitachi (Japan) model U-2000, which was fitted with electronic temperature control

unit. Molar extinction coefficient value $9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for veratraldehyde was used to calculate the enzyme unit. One unit (IU) of lignin peroxidase was defined as the amount of enzyme, which converts one μM of veratryl alcohol to veratraldehyde under the standard assay condition. The least count of absorbance measurement was 0.001 absorbance unit.

Secretion and optimization. For the secretion of lignin peroxidase, the fungal strain was grown in a medium

Table 1. Purification steps

Steps	Total volume	Protein, mg/ml	Activity, U/ml	Specific activity, U/mg	Total protein, mg	Total activity, U	Purification fold	Recovery, %
1. Crude enzyme	720	0.20	0.28	1.41	144	203.04	1.00	100
2. Concentrated enzyme	10	1.43	3.12	2.17	14.30	31.16	1.53	15.30
3. Dialysed enzyme	18	0.51	1.35	2.64	9.18	24.30	1.87	11.96
4. DEAE cellulose	30	0.23	0.74	3.19	6.90	22.0	2.26	10.85

containing (g/l): glucose – 10.0, ammonium tartrate – 1.32, KH_2PO_4 – 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 50 mg, CaCl_2 – 10.0 mg, thiamine – 10.0 $\mu\text{g/l}$ and 1.0 ml of a solution containing (g/l): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 3.0, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.5, NaCl – 1.0, and (mg/l): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 100, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 185, CaCl_2 – 80, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 180, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 10.0, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ – 10.0, H_3BO_3 – 10.0, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 12.0 and nitrilotriacetate – 1.5 g. The pH of basal medium was adjusted to 4.5 with 20 mM dimethyl succinate.

Extracellular secretion of lignin peroxidase in the liquid culture medium by *P. sanguineus* MTCC-137, was determined by inoculating a small piece of mycelia of size 5 mm diameter aseptically in 100 ml sterilized culture flask containing 25 ml of the growth medium amended with 500 mg of lignin containing natural substrates like coir-dust, sawdust, bagasse particles, corncob, wheat-straw and one control, the growth medium of which was not amended with natural lignin containing substrate. The culture was grown under stationary condition in a BioChemical Oxygen Demand Incubator (B.O.D., India) at 30°C. 0.5 ml of the growth medium was withdrawn at the regular interval of 24 h, was filtered through Millipore (France) Millex-GS filter (0.22 μm) unit and was assayed using the method described above [11]. Enzyme unit/ml was plotted against the number of days of

growth and the best inducer was decided on the basis of the enzyme activity peak height.

In order to optimise the culture conditions for maximum production of lignin peroxidase by the above mentioned fungal strain, the amount of the best inducer sawdust was varied from 100 to 1000 mg in 25 ml of the growth medium as mentioned above. In this case also the enzyme units/ml of the growth medium was plotted against the number of days after the inoculation of the fungal strain. The amount of the inducer in the growth medium which gave the maximum height of the enzyme activity peak was taken as the optimal amount of the inducer.

Purification. The enzyme was purified by growing the fungal strain in thirty sterilized 100 ml culture flasks each containing 25 ml of the liquid culture growth medium containing optimal amount of sawdust 600 mg. The maximum activity appeared in the growth medium on the 5th day after inoculation of the fungal mycelia. When the maximum activity appeared in the culture flasks, the cultures of all flasks were

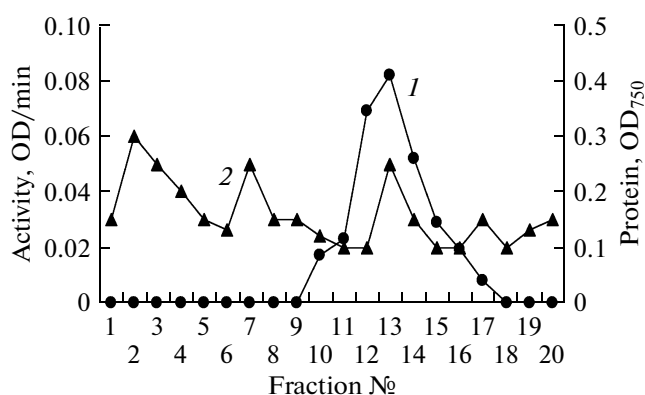


Fig. 3. Elution profile of the lignin peroxidase from DEAE cellulose column.

1 – the activity, D_{310} ; 2 – protein, D_{750} .

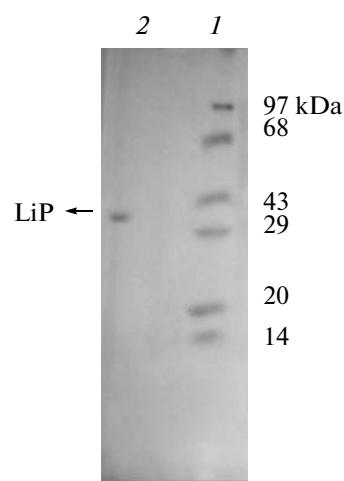


Fig. 4. SDS-PAGE analysis results of the lignin peroxidase. Lane 1 – the molecular weight markers (from top): phosphorylase (97 kDa), bovine serum albumin (68 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), soya bean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and lysozyme (14.3 kDa); Lane 2 – the purified ligninperoxidase (20 μg).

Table 2. The enzymatic characteristics for lignin peroxidases from different sources using veratryl alcohol and H₂O₂ as the substrates

Fungal strains	K_m for veratryl alcohol, μM	K_m for H ₂ O ₂ , μM	Temperature, °C	pH
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	60	80	26	3.0
<i>Penicillium citrinum</i>	69	64	30	4.0
<i>Fusarium oxysporium</i>	64	72	25	2.3
<i>Aspergillus terreus</i>	60	80	22	2.0
<i>Loweporus lividus</i>	58	83	24	2.6
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	55	75	25	2.5
<i>Pycnoporus sanguineus</i> *	61	71	25	2.5

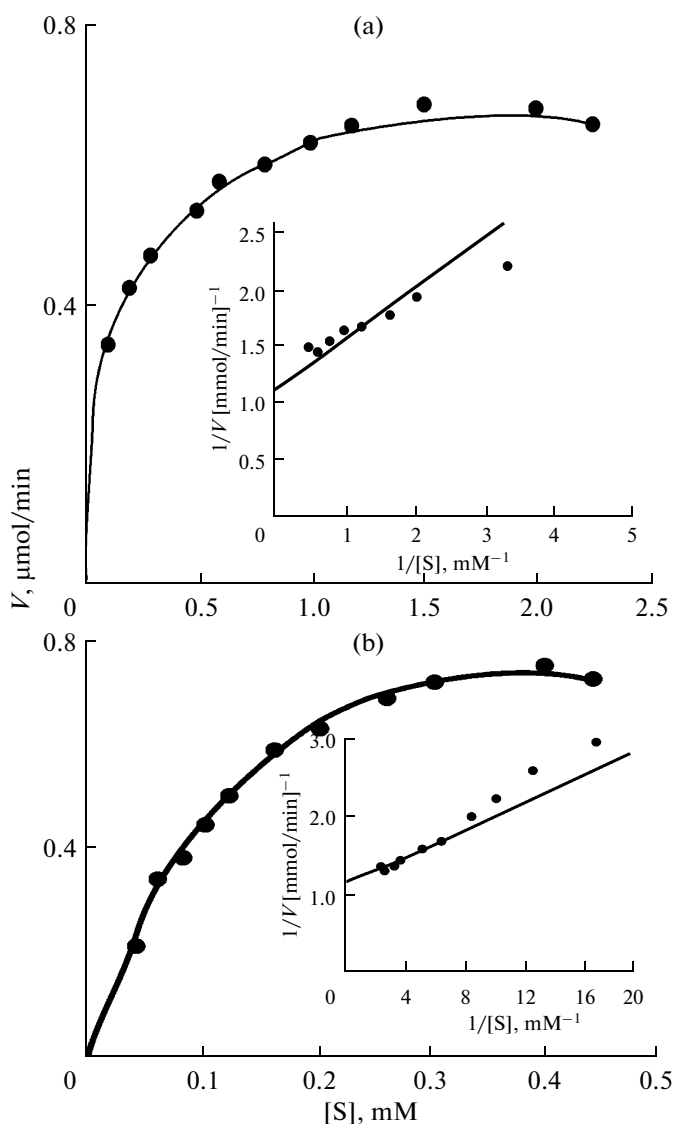
* Present study.

pooled, mycelia was removed by filtration through 4 layers of cheese cloth. The culture filtrate 720 ml with 0.282 IU/ml activity was concentrated with Amicon Concentration Cell Model 8200 (USA) using PM-10 ultrafiltration membrane with molecular weight cut-off value 10 kDa to 10 ml. The concentrated enzyme was dialysed against 1000 times excess of 5 mM sodium succinate buffer pH 5.5 overnight at 20°C. The dialysed enzyme was loaded on a DEAE column of 1 cm diameter and 16 cm height which was preequilibrated with the same buffer. The adsorbed enzyme was washed with 50 ml of the same buffer and was eluted by applying NaCl gradient (0–200 mM; 50 ml/50 ml). Fractions (5 ml) were collected and analysed for lignin peroxidase activity [11] and protein concentration [21]. The active fractions were combined and concentrated with the Amicon Concentration Cell Model 8200, and there after with Model-3 using ultrafiltration membrane PM10. The concentrated enzyme was stored at 4°C and was used for further studies. The enzyme did not loose activity for two months under these conditions.

SDS-Polyacramide gel electrophoresis. The homogeneity of the enzyme preparation was checked by SDS-PAGE analysis using the method of Weber and Osborn [22]. The separating gel was 12% acrylamide in 0.375 M Tris-HCl buffer pH 8.8 and stacking gel was 5% acrylamide in 0.063 M Tris-HCl buffer 6.8. Proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R – 250. The molecular weight markers were phosphorylase (97.4 kDa), bovine serum albumin (68 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), soya bean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and lysozyme (14.3 kDa). Gel was run at a constant current of 20 mA using Technosource (Mumbai, India) mini vertical gel electrophoresis equipment model Monokin.

Steady state enzyme kinetics. The steady state enzyme kinetics of the purified lignin peroxidase was studied by measuring steady state rate of formation of veratraldehyde spectrophotometrically at 310 nm and using the molar extinction coefficient value of 9300 M⁻¹ cm⁻¹ using veratryl alcohol as the substrate. The K_m and V_{max} values for the substrate veratryl alcohol were deter-

mined by measuring the steady state velocity of the enzyme catalysed reaction at different concentrations of veratryl alcohol (range 0.1–2.5 mM) at the fixed enzyme saturating H₂O₂ concentration 0.4 mM in

**Fig. 5.** Michaelis–Menten and double reciprocal plots for veratryl alcohol (a) and for H₂O₂ (b) as the substrate.

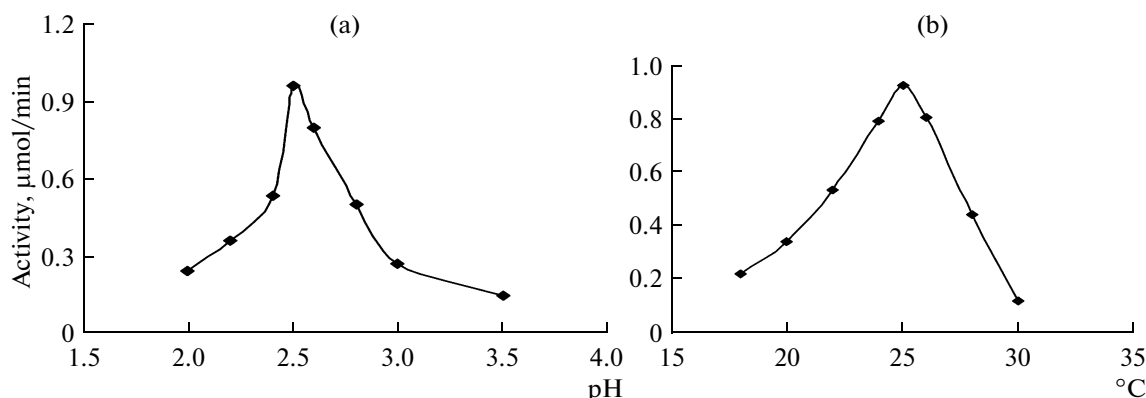


Fig. 6. The pH (a) and temperature (b) optima of the purified lignin peroxidase.

50 mM sodium tartrate buffer pH 2.5 at 25°C. The K_m and V_{max} were calculated by the linear regression analysis of the double reciprocal plot. The same procedure was adopted for the determination of K_m and V_{max} for H_2O_2 except that H_2O_2 concentration was varied in the range 0.05–0.5 mM at the fixed enzyme saturating concentration 2 mM of veratryl alcohol.

The pH optimum of the purified lignin peroxidase was determined by measuring the steady state velocity of the enzyme catalysed reaction in reaction solutions of varying pH values (range 2.0–3.5 pH) at the fixed temperature of 25°C. 1 ml reaction mixture consists of 0.4 mM H_2O_2 , 2 mM veratryl alcohol, in 50 mM sodium tartrate buffer at variable pH. The pH optimum was calculated by plotting steady state velocity at different pH versus pH of the reaction solution. A similar procedure was adopted for the determination of the temperature optimum except that the steady state velocity was determined at the solutions of varying temperature (18°C to 30°C) at a fixed pH of 2.5. 1 ml reaction mixture consists of 0.4 mM H_2O_2 , 2 mM veratryl alcohol in 50 mM sodium tartrate buffer pH 2.5 at variable temperature.

RESULTS AND DISCUSSION

The fungal strain was screened for the secretion of lignin peroxidase in its liquid culture growth medium containing separately sawdust, coirdust, wheatstraw, corncob, bagasse particles and a control experiment in which none of the above mentioned substrates were added. It is obvious from the Fig. 1 that lignin containing natural substrates induce the secretion of lignin peroxidase and sawdust is the best inducer. The culture conditions for the maximum secretion of lignin peroxidase in its liquid culture growth medium were optimized by varying the amount of the best inducer sawdust. The results are shown in Fig. 2. Results show that 600 mg of sawdust contained in 25 ml culture medium in 100 ml culture flask gave the maximum secretion.

The procedure for the purification of lignin peroxidase from *P. sanguineus* culture filtrate has already been described in material and method section. The results of purification procedure are summarized in Table 1. It involved concentration by ultrafiltration and an ion exchange chromatography on anion exchanger DEAE-cellulose. The elution profile of the lignin peroxidase from DEAE cellulose is shown in the Fig. 3. The active fractions were combined, concentrated and analysed by SDS-PAGE for the purity of the enzyme. The results of SDS-PAGE analysis are shown in Fig. 4 in which lane 1 contains protein molecular weight markers and lane 2 contains the purified lignin peroxidase. The presence of single protein band in lane 2 clearly showed that the enzyme was pure. The molecular mass calculated from the SDS-PAGE analysis was 40 kDa. The value of molecular mass of the purified lignin peroxidase lies in the range (38–46 kDa) of molecular masses reported [11] for the different isoenzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium*. In presence of saw-dust in the liquid culture growth medium, *P. sanguineus* secretes only one form of lignin peroxidase whereas in case of *P. chrysosporium* 10 isoenzymes of varying molecular masses and specific activities have been reported [11].

The Michaelis Menten and double reciprocal plots using veratryl alcohol and H_2O_2 as variable substrates are shown in Fig. 5. 1 ml reaction mixture consists of 0.1–2.5 mM veratryl alcohol as the variable substrate, 0.4 mM H_2O_2 in 50 mM sodium tartrate buffer pH 2.5 at 25°C or 1 ml reaction mixture consists of 0.05–0.5 mM H_2O_2 as the variable substrate, 2 mM veratryl alcohol, in 50 mM sodium tartrate buffer pH 2.5 at 25°C.

The K_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m values for veratryl alcohol and H_2O_2 are 61 μM, 2.13 s⁻¹, 3.5 × 10⁴ M⁻¹ s⁻¹ and 71 μM, 2.13, 3.0 × 10⁴ M⁻¹ s⁻¹ respectively. The K_m values for the lignin peroxidase of *P. chrysosporium* using veratryl alcohol and H_2O_2 as the variable substrates have been reported [11] to be 60 and 80 μM respectively. The k_{cat}

and k_{cat}/K_m values calculated from the available data in the literature for different isozymes of lignin peroxidase of *P. chrysosporium* have also been found in the same range (3.5×10^4 to $17.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) assuming that all isozymes have the same K_m value for veratryl alcohol and H_2O_2 of 60 and 80 μM as reported in the literature [11]. The pH and temperature optima (Fig. 6) of the purified lignin peroxidase were also in the same range as the values reported for the lignin peroxidases from other sources given in Table 2.

In conclusion, this communication reports a lignin peroxidase of *P. sanguineus* MTCC-137 secreted in culture medium containing sawdust. Only one form of the enzyme is secreted in the culture medium and the enzymatic properties of the enzyme are similar to the properties reported for lignin peroxidases of *P. chrysosporium* ATCC-24725.

ACKNOWLEDGEMENT

The financial support of DBT, Government of India, New Delhi through its Project no. BT/PR2052/PID/24/082/2000 and DST, Government of India, New Delhi through its Project no. SR/WOS-A/CS-27/2004 to Dr. Meera Yadav as a Woman Scientist are thankfully acknowledged.

REFERENCES

1. Edwards, S.L., Raag, R., Wariishi, H., and Michael, H.G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, pp. 750–754.
2. Harley, B.S., Brodo, P.M.A., and Senior P.J., *Proceeding of Royal Society Discussion Meeting on Utilisation of Lignocellulosic Wastes*, Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1988.
3. Catcheside, D.E.A. and Ralph, J.P., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, vol. 53, pp. 16–24.
4. Eriksson, K.E. and Kirk, T.K., *FEMS Microbiol. Rev.*, 1994, vol. 13, pp. 351–364.
5. Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D., and Aust, S.D., *Science*, 1985, vol. 228, pp. 1434–1436.
6. Kwant, S.S. and Chang, J.K., *Biotechnol. Letters*, 1998, vol. 20, pp. 569–572.
7. Satwinder, S.M., Rajesh, G., Chand, P., and John, F.K., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1998, vol. 73, pp. 292–296.
8. Levin, L., Papinutti, L., and Forchiassin, F., *Biores. Technol.*, 2004, vol. 94, pp. 169–176.
9. Cenek, N., Katerina, S., Pavla, E., Tomas, C., Aparna, K., Elke, L., and Vaclav, S., *Soil Biol. Biochem.*, 2004, vol. 36, pp. 1545–1551.
10. Hiroshi, U. and Shiro, K., *CHEMTECH*, 1999, vol. 29, p. 22.
11. Tien, M. and Kirk, T.K., *Methods in Enzymology*, 1988, vol. 161, pp. 238–249.
12. Vyas, B.R.M., Vole, J., and Saaek, V., *Folia Microbiol.*, 1994, vol. 39, pp. 235.
13. Kang, S., Shin, K.S., Han, Y.H., Youn, H.D. and Hah, Y.C., *Biochem. Biophys. Acta*, 1993, vol. 1163, p. 158.
14. Satyahari, D., Tapas K. Maity, and Bhattacharyya, B.C., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, vol. 60, pp. 4216–4218.
15. Perumal, K. and Kalaichelvan, P.T., *Indian. J. Expt. Biol.*, 1996, vol. 34, pp. 1121–1125.
16. Meera, K., Yadav, R.S.S., and Yadav, K.D.S., *Indian. J. Expt. Biol.* 2002, vol. 40, pp. 802–806.
17. Shanmugan, V. and Yadav, K.D.S., *Indian. J. Microbiol.*, 1997, vol. 37, pp. 105–106.
18. Shanmugan, V. and Yadav, K.D.S., *Indian. J. Expt. Biol.*, 1996, vol. 34, pp. 1164–1165.
19. Patel, V.K., Yadav, R.S.S., and Yadav, K.D.S., *Indian J. Biotechnol.*, 2007, vol. 6, pp. 553–556.
20. Microbial Type Culture Collection, Catalogue of Strains-2000, 5-th Ed., Chandigarh, India., Institute of Microbial Technology, 2000.
21. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, pp. 265–275.
22. Werber, K. and Osborn, M., *J. Biol. Chem.*, 1969, vol. 244, pp. 4406–4412.

UDC 582.284:688.811

GC-MS AND SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS OF BIODEGRADATION OF NEW DISAZO DYE BY *Trametes versicolor*

© 2011 H. Ardag Akdogan*, A. Demircali*, C. Aydemir*, N. Pazarlioglu**, F. Karci*

*The University of Pamukkale, Faculty of Science & Arts, Department of Chemistry, P.O. 286, 20017, Denizli, Turkey
e-mail: hardag@pamukkale.edu.tr

**Ege University, Faculty of Science, Department of Biochemistry, 35100 Izmir, Turkey

Received January 09, 2010

In this study; sub-tropical white rot fungi, *Trametes versicolor* was investigated for its ability to degrade 4-(3'-methyl-4'-(4"-nitrophenyl)azo-1'H-pyrazol-5'-ylazo)-3-methyl-1H-pyrazol-5-on in the mediums containing glucose and different concentrations of degrade dye in batch systems. This dye was synthesized at Pamukkale University of Organic Chemistry research laboratory. Samples were collected on 10 days, and was detected by Shimadzu UV-1600A spectrophotometry. Decolorization study showed that this disazo dye was removed by more than 70% in 10 days. Laccase enzyme activity was detected in samples and then last sample was analyzed by GC-MS. Metabolites weren't showed in GC-MS result. It was concluded that *T. versicolor* could achieve the biodegradation of this new disazo dye.

Azo dyes account for the majority of all textile dye stuffs produced and have been the most commonly used synthetic dyes in the textile, food, paper making, color paper printing, leather and cosmetic industries [1–3]. Synthesis of most azo dyes involves diazotization of primary aromatic amines followed by coupling with one or more nucleophiles [4]. Benzidine (BZ)-based azo dyes have been found to be tumorigenic [5] and carcinogenic [6, 7] due to their biotransformation to BZ [8]. Azo dyes are recalcitrant xenobiotics and therefore, conventional aerobic wastewater treatment processes usually cannot efficiently decolorise and degrade azo dye bearing effluents to the regulatory levels [2].

The growing interest in the pyrazole chemistry lies in designing new synthetic approach, theoretical calculations and applications of newer spectroscopic techniques. The usage of many pyrazole derivatives has undoubtedly created considerable attention in developing many different synthetic procedures in pharmaceuticals, agrochemicals, dyestuff. The recent developments in the synthetic routes and the chemistry of pyrazoles have been thoroughly reviewed [9–15]. The use of heterocyclic intermediates in the synthesis of azo disperse dyes is well established and the resultant dyes exhibit good tinctorial strength and brighter dyeing than those derived from aniline-based diazo components. For instance, amino-substituted thiazole, benzothiazole [16–19] and benzoisothiazole [20] compounds afford highly electronegative diazo components and consequently, provide a pronounced bathochromic effect compared to the corresponding benzoid compounds.

At present, there is no satisfactory method to economically and reliably decolorize and detoxify textile

wastewater. Recent research points toward the potential of fungal wastewater treatment for textile industries. The satisfactory ability of white rot fungi to depolymerize lignin is well known. Their ability to degrade synthetic chemicals, such as azo dyes, is also very important because these dyes are usually recalcitrant to microbial degradation and cause problems in biotreatment of industrial effluents. The most studied white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium* has been reported to decolorize dyes with enzymes involved in lignin degradation, such as lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) and laccase. Other white rot fungi, such as *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera fumosa*, *Thelephora* sp., have been reported to be able to decolorize various classes of dyes [21].

In the present study, new disazo dye, acetonitrile soluble, disazo based azo dye (Fig. 1), was selected for carrying out microbial decolorisation and biodegradation studies. Also, a comparative study of the toxicity potential of the dye before and after degradation treatment was carried out.

MATERIALS AND METHODS

Dye solution preparation. New disazo dye (Fig. 1) was dissolved in acetonitrile to prepare a stock solution (100 mg/l). Solutions of the desired concentrations were obtained by successive dilution.

Organism and culture conditions. The white rot fungus *T. versicolor* (ATCC 11 235) was maintained on 2% (w/v) malt agar slants at 4°C and the fungus was activated at 26°C, for 3 days. The mycelium were harvested with sterile 0.9% NaCl solution and then inoculated into 100 ml of 2% malt extract broth (pH 4.5) in 250 ml Er-

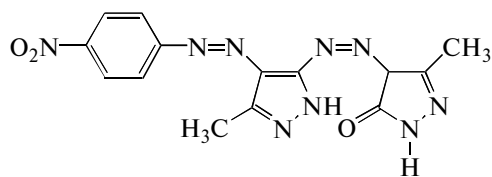


Fig. 1. Molecular structure of new disazo dye.

lenmeyer flasks at 26°C and 175 rpm for 4 days. Pellets were inoculated into the medium consisting of (g/l): glucose – 10.0, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, CaCl_2 – 0.01, yeast extract – 0.025. Cultivation was carried out in an orbital shaker incubator, at 26°C 175 rpm [22]. At the beginning of the fourth day of incubation, 4-(3'-methyl-4'-(4''-nitrophenyl)azo-1'H-pyrazol-5'-ylazo)-3-methyl-1H-pyrazol-5-on was added to the flasks aseptically at the desired concentrations. Aliquots were assayed for the laccase activity.

Sampling. Samples (1 ml) were taken every day (total 10 day). Samples were centrifuged to remove suspended biomass and ligninolytic (laccase) activities in supernatants were determined. All experiments were performed in triplicate.

Analytical methodology. Spectrophotometric analysis. Aliquots of 1–2 ml volume of clear dye solution were taken from each reaction flask at regular time intervals and measured immediately using a UV-Vis recording double beam spectrophotometer (Shimadzu, Japan). Because of the low water solubility of this dye, an equal volume of acetonitrile was mixed with the analytical solution to ensure complete solubilization prior to measurement. Decolorization was determined spectrophotometrically by monitoring the absorbance at the wavelength maximum for this dye, and by the reduction of the major peak area in the visible region for new disazo dye.

Extraction procedure. Fluorene extraction and analysis was performed as described in Yuan et al. [23] and Chang et al. [24]. Briefly, 1 ml of n-hexane was added 1 ml sample. The organic phase was collected. The combined crude extracts of organic phase were dried. The residue was dissolved in acetonitrile (1.5 ml), filtered through a 0.45 μm membrane filter and an aliquot of 5 μl was taken for GC-MS analysis.

GC-MS analysis. Shimadzu GC-2010, gas chromatograph equipped with MS-QP2010 plus mass spectrometer, AOC-20s auto sampler and AOC-20i auto injector were used for analysis. A 30 m \times 0.25 mm I.D. \times 0.25 μm HP-5MS fuse-silica capillary column was employed. The column temperature program was set as follows: 60°C hold for 1 min, at 10°C/min to 200°C hold for 15 min. The GC injector was held isothermally at 250°C with a splitless period of 3 min. All injection volumes were 1 μl in the splitless mode. The solvent delay time was

set at 5 min. Helium was used as the carrier gas, at a flow rate of 10 ml min^{-1} by using electronic pressure control. The GC/MS interface temperature was maintained at 250°C. The MS was operated in electron impact (EI) ionization mode with electron energy of 70 eV and scan ranged from 50 to 500 amu (atom to mass unit) to determine appropriate masses for selected ion monitoring.

Enzyme assays. Laccase (Lac) production was assessed by measurement of enzymatic oxidation of 2,2'-azinobis-(3 ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) at 420 nm ($\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) [25]. The reaction mixture contained 300 ml of extracellular fluid, 300 ml of 1 mM ABTS and 0.1 M Na-acetate buffer (pH 4.5). One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that oxidizes 1 mmol ABTS in 1 min.

RESULTS AND DISCUSSION

¹H-NMR and FT-IR analysis of new disazo dye. The infrared spectra of new synthesized disazo dye (in KBr) showed pyroazol and pyrozone (N–H) bands at 3169 ve 3103 cm^{-1} , aromatic C–H band at 3068 cm^{-1} , pyroazol and pyrozone (–CH₃) band 2971 cm^{-1} , carbonyl (C=O) bands at 1678 cm^{-1} (Fig. 2).

The ¹H-NMR spectra measured in DMSO-*d*₆ at 25°C showed a singlet peak for pyrozone at 2.08 ppm (–CH₃), a singlet peak for pyroazol at 2.54 ppm (–CH₃), a multiplet from 8.30–8.10 ppm for aromatic protons (Aro-H), a broad peak for enol tautomer (–OH) or hydrozo tautomer (–NH) at 11.61 ppm, a singlet peak for pyrozone proton (–NH) at 13.34 ppm, a singlet peak for pyroazol proton (–NH) at 14.03 ppm (Fig. 3).

UV-visible spectrophotometric analysis. The ultraviolet and visible absorbance (from 200 to 800 nm) of dye samples were monitored by a UV-Vis spectrophotometer to examine the biodegradation rate of disazo dye by *T. versicolor*. A visible decolorization occurred in the medium of *T. versicolor* for this dye. Most color removal in the first day may due to dye absorption by mycelium of fungi, which took on the color of the dye. To accurately reflect the full degree of decolorization, both the wavelength maximum of the dye and the area under the curve in the visible regions (400–800 nm) were employed in the calculation. 4-(3'-methyl-4'-(4''-nitrophenyl)azo-1'H-

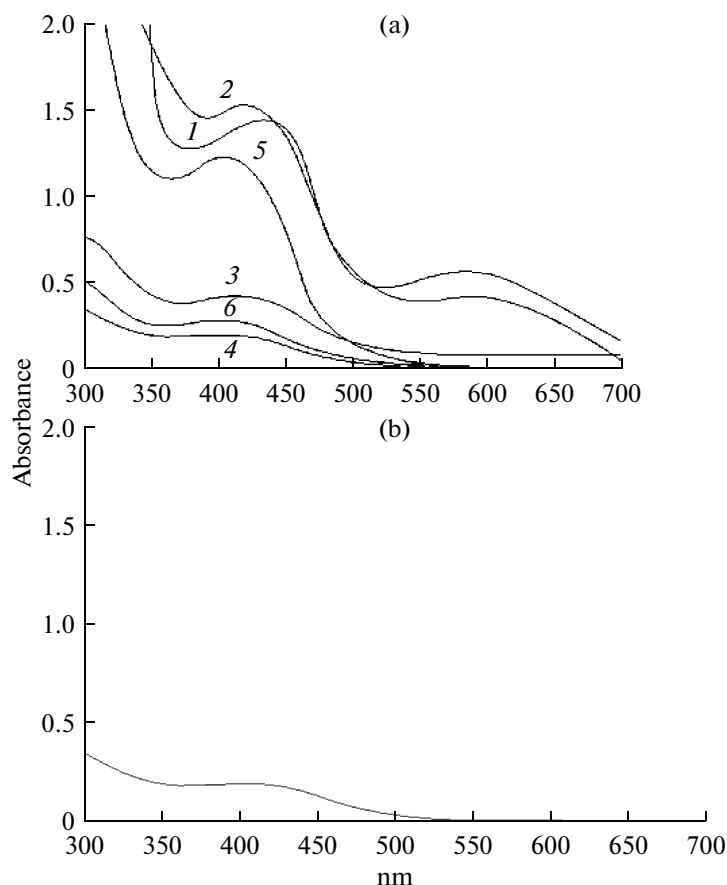


Fig. 2. FT-IR spectrum (a) and the ^1H -NMR spectrum (b) of new synthesized disazo dye: 1 – DMSO, 2 – DMF, 3 – acetonitrile, 4 – metanol, 5 – acetic acid, 6 – chloroform.

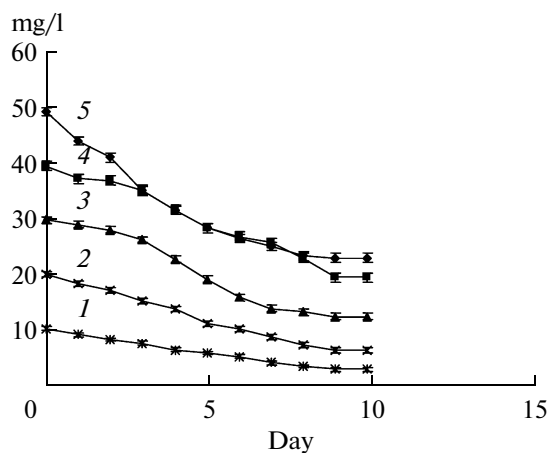


Fig. 3. Biodegradation of disazo dye: 1 – 10, 2 – 20, 3 – 30, 4 – 40, 5 – 50 mg/l of disazo dye.

pyrazol-5'-ylazo)-3-methyl-1H-pyrazol-5-on (Fig. 1) contains one substituted aromatic rings, one with an amino group and the other with a nitro substituent, typical of disazo disperse dye. The visible portion of the dye spec-

trum shows a major peak at 408 nm in acetonitrile. The biggest color removal occurred in the first 6 day. The maximum wavelength of absorbance decreased by 78% (table). In different concentration of this new disazo dye

removal was exhibited in Fig. 2. Spectrum of new disazo dye and spectrum of medium after degradation were shown Fig. 3.

Ligninolytic enzyme activities in different fluorene concentrations. In this study, laccase activities were measured daily (Fig. 4). Laccase (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC.1.10.3.2) from white-rot fungi are part of the complex enzymatic system for lignin degradation [26, 27] catalyse the oxidation of a wide variety of organic and inorganic substrates, including mono-, di- and polyphenols, aminophenols, methoxyphenols, aromatic amines and ascorbate with the reduction of oxygen [28, 29]. In this study, in order to determine the role of ligninolytic enzymes on new disazo dye degradation, laccase was monitored during the degradation of this compound.

GC-MS analysis. Total ion chromatograms (TIC) obtained from GC-MS analysis of the degradation products. TIC shown in Fig. 5 was also present in the control cultures. In order to verify the presence of cell-bound metabolites, the fungal mycelium was extracted with hexane. When the supernatant was extracted with hex-

Biodegradation results

Concentration of dye, mg/l	Biodegradation, %	Standard deviation
50	54.22	±0.2
40	52.9	±0.5
30	60.22	±0.4
20	70.79	±0.3
10	78.12	±0.6

ane, no metabolites other than those obtained when the extraction was carried out.

In our assay of 4-(3'-methyl-4'-(4'-nitrophenyl)azo-1'H-pyrazol-5'-ylazo)-3-methyl-1H-pyrazol-5-on, minor products were detected (Fig. 6). The identification of these minor metabolites could not be determined by

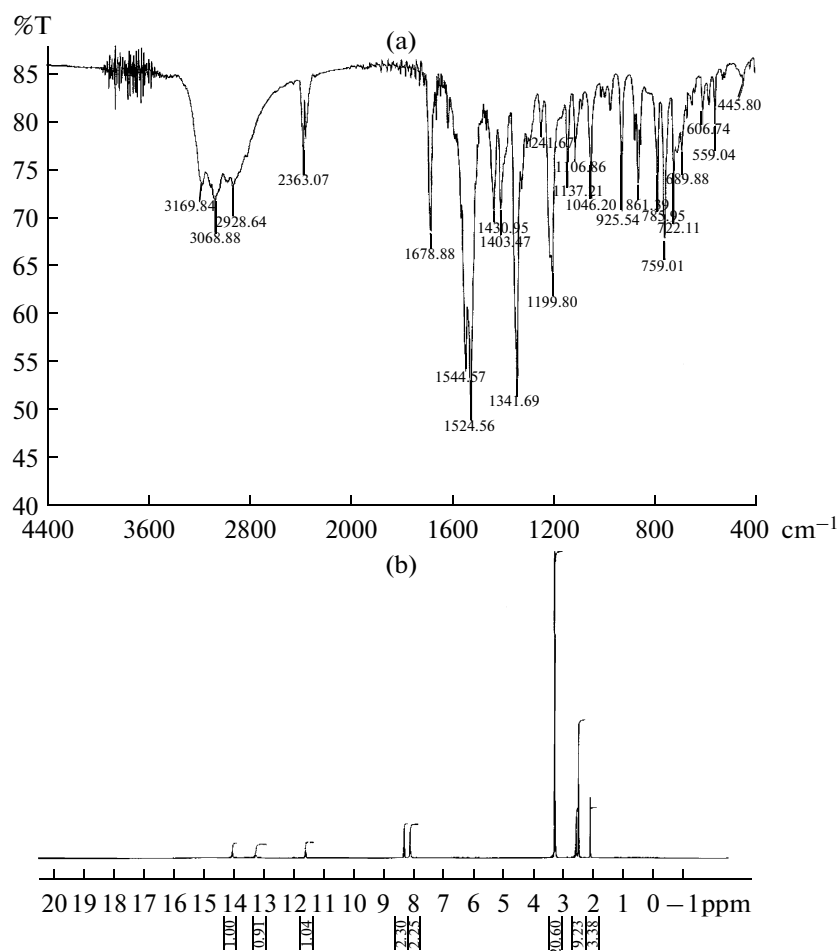


Fig. 4. Spectrum of new disazo dye (a) and of medium after degradation (b).

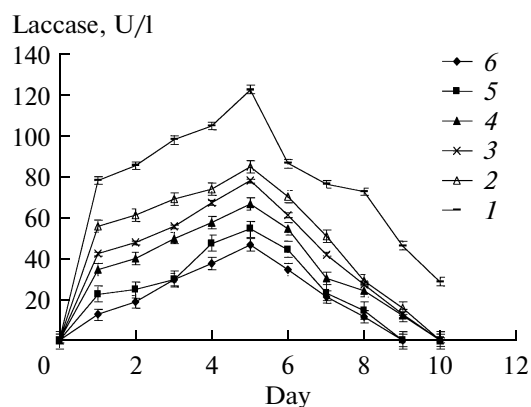


Fig. 5. Laccase activities in different disazo dye concentrations: 1 – 0, 2 – 10, 3 – 20, 4 – 30, 5 – 40, 6 – 50 mg/l.

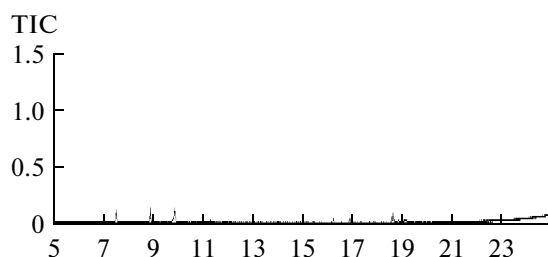


Fig. 6. GC chromatogram of new disazo dye biodegradation products.

mass spectrometry. Our study showed that *T. versicolor* could degrade this new disazo dye, enzymatic and non-enzymatic systems involved in the decolorization with liquid medium.

REFERENCES

- Powell, R., Murray, M., Chen, C., and Lee, A., EPA Report Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA., 1979, vol. 560, no. 13, pp. 79–105.
- Carliell, C.M., Barclay, S.J., Naidoo, N., Buckley, C.A., Mulholland, D.A., and Senior, E., *Water*, 1995, vol. 21, pp. 61–69.
- Chang, J., Chou, C., Lin, Y., Lin, P., Ho, J., and Hu, T.L., *Water Research*, 2001, vol. 35 pp. 2841–2850.
- Zollinger, H., *Color Chemistry-Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments*. New York: VCH Publ., 1991, pp. 92–102.
- Haley, T.J., *Clinic Toxicology*, 1975, vol. 8, pp. 13–42.
- Brown, J.P., *Food Science and Nutrients*, 1977, vol. 8, pp. 229–336.
- Hassanien, A.Z.A., Hafiz, I.S.A., and Elnagdi, M.H., *J. Chemical Res. (S)* 1999, vol. 1, pp. 8–10.
- Heiss, G.S., Gowan, B., and Dabbs, E.R., *FEMS Microbiol. Letters*, 1992, vol. 99, pp. 221–226.
- Elnagdi, M.H., Sallam, M.M.M., Fahmy, H.M., Ibrahim, S.A.M., and Elias, M.A.M., *Helvetica Chimica Acta*, 1976, vol. 59, no. 2, pp. 551–557.
- Elnagdi, M.H., Elgemeie, G.E.H., and Abdelaal, F.A.E., *Heterocycles*, 1985, vol. 23, no. 12, pp. 3121–3153.
- Freeman, F., *Synthesis-Stuttgart*, 1981, vol. 12, pp. 925–954.
- Tominaga, Y., Honkawa, Y., Hara, M., and Hosomi, A., *J. Heterocyclic Chemistry*, 1990, vol. 27, no. 3, pp. 775–783.
- Mohareb, R.M., Sherif, S.M., Gaber, H.M., Ghabrial, S.S., and Aziz, S.I., *Heteroatom Chemistry*, 2004, vol. 15, no. 1, pp. 15–20.
- Al-Saleh, B., El-Asasery, M.A., and Elnagdi, M.H., *J. Chem. Res.*, 2004, vol. 8, pp. 578–580.
- Hassanien, A.Z.A., Hafiz, I.S.A., and Elnagdi, M.H., *J. Chem. Res.*, 1999, no. 1, pp. 8–10.
- Penchev, A., Simov, D., and Gadjev, N., *Dyes and Pigments*, 1991, vol. 16, no. 1, pp. 77–81.
- Peters, A.T. and Gbadamosi, N.M.A., *Dyes and Pigments*, 1992, vol. 18, no. 2, pp. 115–123.
- Kraska, J. and Sokolwska-Gajda, J., *Dyes and Pigments*, 1987, vol. 8, no. 5, pp. 345–352.
- Sokolwska-Gajda, J., *Dyes and Pigments*, 1991, vol. 15, no. 4, pp. 239–245.
- Sokolwska-Gajda, J., *Dyes and Pigments*, 1992, vol. 19, no. 2, pp. 149–156.
- Zhao, X. and Hardin, I.R., *Dyes and Pigments*, 2007, vol. 73, pp. 322–325.
- Kasikara Pazarlioglu, Sariisik, N.M., and Telefoncu, A., *Process Biochemistry*, 2005, vol. 40, pp. 1673–1678.
- Yuan, S.Y., Wei, S.H., and Chang, B.V., *Chemosphere*, 2000, vol. 41, pp. 1463–1468.
- Chang, B.V., Chang, J.S., and Yuan, S.Y., *Bulletin Environ. Contamination Toxicol.*, 2001, vol. 67, pp. 898–905.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F., and Eriksson, K.E., *FEBS Letters*, 1996, vol. 391, pp. 144–148.
- Hatakka, A., *FEMS Microbiol. Reviews*, 1994, vol. 13, pp. 125–135.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., and Agathos, S.N., *Biotechnol. Advances*, 2003, vol. 22, pp. 161–187.
- Dominguez, A., Gomez, J., Lorenzo, M., and Sanroman, A., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, vol. 23, pp. 367–373.
- Paszczynski, A., Huynh, V.B., and Crawford, R.L., *FEMS Microbiol. Letters*, 1985, vol. 29, pp. 37–41.

УДК 577.151.54

ВЛИЯНИЕ ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЛАККАЗЫ ГРИБОМ БЕЛОЙ ГНИЛИ *Pleurotus ostreatus* D1

© 2011 г. Н. Н. Позднякова, С. В. Никифорова, О. Е. Макаров, О. В. Турковская

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, 410049

e-mail: nataliapozdnyakova@yahoo.com; ecbio@ibppm.sgu.ru

Поступила в редакцию 28.12.2010 г.

Исследовано влияние полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) на динамику продукции лакказы грибом *Pleurotus ostreatus* D1 в условиях погруженного культивирования на среде Кирка. Показано, что фенантрен, флуорантен, пирен и хризен активно индуцировали этот фермент, тогда как флуорен и антрацен влияли в меньшей степени. Дополнительное внесение ионов Mn^{2+} в среду культивирования увеличивало активность лакказы в 2 и более раз в присутствии всех исследованных ПАУ. Электрофорез в неденатурирующих условиях показал индукцию ксенобиотиками дополнительных форм лакказы. Активности лигнинолитических пероксидаз в данных условиях обнаружено не было.

Грибы белой гнили — наиболее активные деструкторы лигнина в природе. Процесс деградации лигнина катализирует внеклеточный ферментный комплекс этих грибов, включающий лигнинпероксидазу (КФ 1.11.1.14), Mn-пероксидазу (КФ 1.11.1.13), гибридную Mn-пероксидазу (КФ 1.11.1.16) и лакказу (КФ 1.10.3.2). Состав лигнинолитического ферментного комплекса у разных видов грибов белой гнили варьирует, однако наиболее широко распространены Mn-пероксидазы и лакказы [1]. Именно последние считаются самыми важными среди лигнинолитических ферментов [2].

Две наиболее вероятные биологические функции, приписываемые грибным лакказам — их участие вместе с лигнинолитическими пероксидазами в деградации лигнина и их участие в вирулентности гриба как ключевого агента в патогенезе по отношению к растению-хозяину [3]. Кроме того, считают, что грибы белой гнили секретируют лакказу для удаления токсичных фенолов, образующихся при деградации лигнина или различных ксенобиотиков ароматической природы [4–6].

Как было показано, лакказы у многих грибов могут быть как конститутивными, так и индуцибельными [3]. Индукторами лакказ обычно являются вещества, сходные по структуре с субстратами этого фермента, а также соединения, аналогичные природным ростовым субстратам грибов [3]. Так, например, Скоробогатько с соавт. [7] показали увеличение продукции лакказы в 10 раз в присутствии известного лакказного субстрата — синрингальдазина. Галловая и феруловая кислоты

со структурой, подобной модельным соединениям лигнина, также являются индукторами этого фермента [3]. В лабораторных экспериментах для увеличения продукции лакказы часто используют 2,5-ксилидин [8]. Ряд веществ, индуцирующих активность лакказы, все время пополняется, некоторые ксенобиотики и ионы металлов могут выступать в роли индукторов [9–11].

Грибы белой гнили изначально исследовались как активные деструкторы лигнина. Позднее было обнаружено, что, кроме лигнина, они способны деградировать широкий спектр ксенобиотиков ароматической природы, включая полихлорированные фенолы, нитро- и аминозамещенные фенолы, синтетические красители и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) [2, 12–14]. Участие лакказ в деградации ПАУ обсуждается многими авторами [14, 15]. Показано, что чистый фермент может катализировать окисление ПАУ с образованием соответствующих хинонов [14, 16, 17]. Однако до настоящего времени роль лакказы в деградации ПАУ точно не определена. Сведения о влиянии этих ксенобиотиков на продукцию лигнинолитических пероксидаз и лакказ все еще ограничиваются выявлением их активности в процессе деградации ПАУ [18, 19].

Цель работы — исследование влияния ПАУ на продукцию внеклеточных лигнинолитических ферментов грибом белой гнили *Pleurotus ostreatus* D1.

МЕТОДИКА

Pleurotus ostreatus D1 был получен из Лаборатории микробиологии и микологии ИБФРМ РАН [20]. Для получения инокулята гриб культивировали на богатой среде для базидиомицетов, pH 6.0

Сокращения: ПАУ — полициклические ароматические углеводороды; АБТС — диаммонийная соль 2,2'-азино-бис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография.

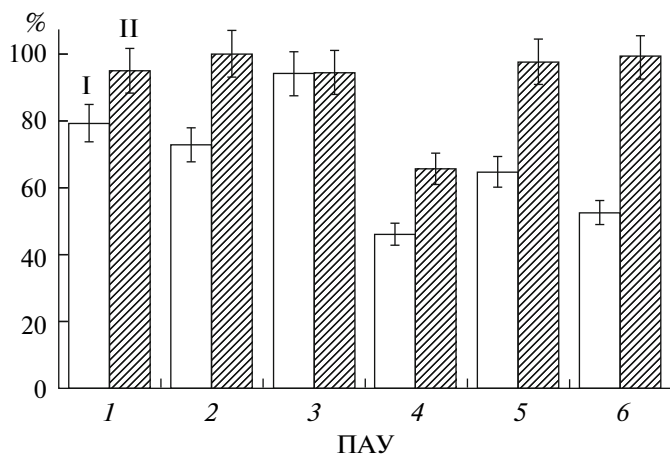


Рис. 1. Убыль (%) ПАУ через 14 сут культивирования на среде Кирка при pH 4.5 (I) и pH 6.0 (II): 1 – фенантрен, 2 – антрацен, 3 – флуорен, 4 – пирен, 5 – хризен, 6 – флуорантен.

[21], при 26°C и постоянной аэрации на качалке при 150 об/мин. Исследование влияния ПАУ на продукцию ферментов проводили на среде Кирка [22]; pH среды поддерживали Na,K-фосфатным буфером (pH 6.0) или Na-титратным буфером (pH 4.5). В качестве ростового субстрата использовали 2%-ную мальтозу; в качестве ПАВ – 0.2%-ный Tween-80. Культивирование осуществляли в 250 мл колбах со 100 мл среды при 26°C в условиях постоянной аэрации на качалке при 150 об/мин. ПАУ вносили на 3 сут в 200 мкл хлороформа до конечной концентрации 50 мг/л, в контрольные варианты (без ПАУ) добавляли 200 мкл хлороформа. Mn^{2+} вносили в виде водного раствора $MnCl_2$ также на 3 сут культивирования до конечной концентрации 0.1 мМ. Активность ферментов измеряли ежедневно в течение 25 сут. Для каждого варианта были проведены 3 отдельных эксперимента, каждый эксперимент был в трех повторностях, ошибка не превышала 7%.

Остаточные ПАУ экстрагировали из среды культивирования трижды равным объемом этилацетата. Экстракты объединяли и упаривали до минимального объема. Убыль ПАУ анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (Spectra Series P200, “Spectra-Physics Analytical, Inc.”, США) на колонке Spherisorb S5 РАН с детектором Spectra Series UV 100 (“Thermo Separation Products”, США) [23]. Продукты деградации ПАУ анализировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах Silufol UV-254 (“Kavalier”, Чехия) в системе бензол–этанол (9 : 1) и методом газовой хроматографии (Shimadzu 2010, Япония) на колонке Equity-1 (“Supelco”, США) с пламенно-фотометрическим детектором [23]. Перед проведением газовой хроматографии метаболиты метилировали CH_3COCl [24].

Продукцию лакказы тестировали по окислению диаммонийной соли 2,2'-азино-бис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты (АБТС) при 436 нм ($\epsilon = 29300 M^{-1} cm^{-1}$) согласно Нику-Паавола с соавт. [25]. Активность лигнинолитических пероксидаз измеряли по реакции окисления 2,6-диметоксифенола в присутствии Mn^{2+} (Mn-пероксидаза) и без Mn^{2+} (гибридная Mn-пероксидаза) и рассчитывали, как разницу между реакциями в присутствии H_2O_2 и без H_2O_2 [26].

За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль продукта в 1 мин и выражали в условных единицах – мкмоль/мин мл ферментного препарата (ед./мл).

Электрофорез в неденатурирующих условиях проводили согласно методу Лэммли в 12%-ном полиакриламидном геле [27] с исключением из растворов додецилсульфата натрия и β -меркаптоэтанола и последующим окрашиванием геля о-дианизидином (для выявления активности лакказы) и о-дианизидином в присутствии 100 мкМ H_2O_2 и 100 мкМ $MnSO_4$ (для выявления активности пероксидаз).

Диаммонийная соль АБТС и 2,6-диметоксифенол – производства “Sigma-Aldrich” (Германия); фенантрен, антрацен, флуорен, пирен, флуорантен и хризен – производства “Fluka” (Швейцария). Остальные реактивы – “Реахим” (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было исследовано влияние 3- и 4-кольцевых ПАУ на продукцию лигнинолитических ферментов на среде Кирка. Эту среду часто используют для изучения метаболизма лигнина и ксенобиотиков ароматической природы, а также исследования продукции лигнинолитических ферментов [23, 28]. *P. ostreatus* D1 относится к группе грибов белой гнили, продуцирующих Mn-пероксидазу, гибридную Mn-пероксидазу и лакказу. Лигнинпероксидаза у грибов, относящихся к этому роду, до настоящего времени не обнаружена [29]. Оптимумы этих ферментов находятся в кислом диапазоне pH, поэтому на первом этапе исследований нами была использована среда Кирка с pH 4.5.

В этих условиях гриб метаболизировал все исследованные ПАУ. Использование методов ВЭЖХ, ТСХ и газовой хроматографии позволило нам выявить и идентифицировать ряд образующихся метаболитов [23, 30, 31]. К 14 сут культивирования убыль (рис. 1) составляла от 46 (для пирена) до 94% (для флуорена). Дегградация ПАУ сопровождалась продукцией лакказы в течение всего времени эксперимента, активностей лигнинолитических пероксидаз обнаружено не было. В контрольном варианте (без ПАУ) не было выявлено ни лакказы, ни пероксидаз (рис. 2а). Макси-

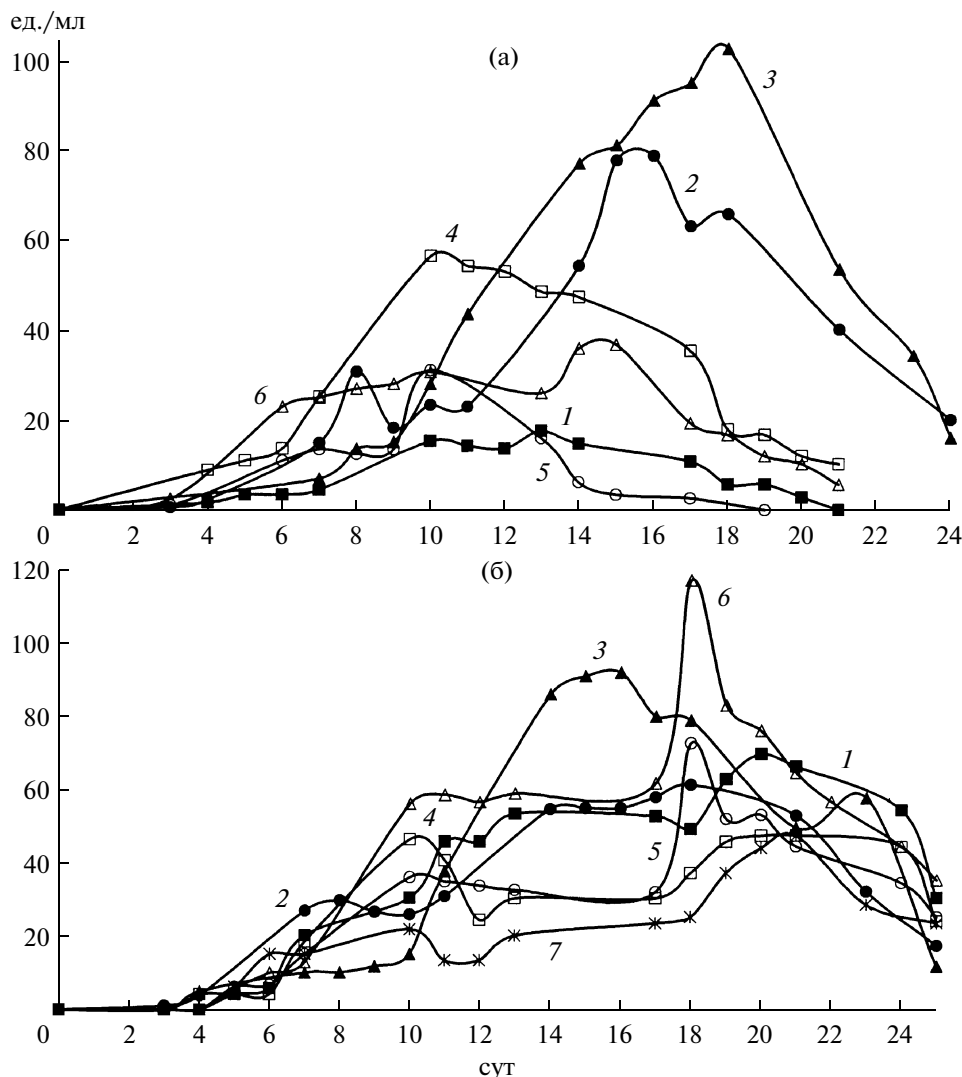


Рис. 2. Динамика продукции лакказы (ед./мл) на среде Кирка без Mn^{2+} при pH 4.5 (а) и pH 6.0 (б): 1 – фенантрен, 2 – антрацен, 3 – флуорен, 4 – пирен, 5 – хризен, 6 – флуорантен, 7 – контроль (без ПАУ).

мальная активность лакказы и время ее достижения зависели от использованного ПАУ. Наиболее активными индукторами лакказы оказались 3-кольцевые флуорен (102.5 ед./мл) и антрацен (78.7 ед./мл). В то же время активность лакказы, выявленная в присутствии фенантрена, не превышала 18.0 ед./мл. Из 4-кольцевых ПАУ наиболее активным оказался пирен, в присутствии которого активность лакказы достигала максимума 56.4 ед./мл на 10 сут (рис. 2а).

По нашим данным [23, 30–32], при культивировании гриба *P. ostreatus* D1 на богатой среде для базидиомицетов при pH 6.0 деградация ПАУ проходила более активно и сопровождалась продукцией двух лигнинолитических ферментов – лакказы и гибридной Mn-пероксидазы. Поэтому на следующем этапе мы исследовали деградацию ПАУ и продукцию внеклеточных ферментов на

среде Кирка при pH 6.0. Эти условия оказались более пригодными для деградации ПАУ: практически 100% исходно добавленных субстратов было разрушено уже к 7 сут культивирования. Исключение составил только пирен, убыль которого достигала 65.6% к 14 сут (рис. 1). В контрольном варианте (без ПАУ), в отличие от варианта с pH 4.5, обнаружена продукция лакказы (рис. 2б). Активность лакказы при pH 6.0 незначительно увеличивалась, а в присутствии некоторых ПАУ (пирен) даже уменьшалась по сравнению с соответствующими значениями активности лакказы при pH 4.5. Однако время продукции этого фермента увеличивалось. Активность лакказы при pH 4.5 к 21 сут снижалась (рис. 2а), в то время как активность при pH 6.0 была значительно выше и, в присутствии фенантрена, пирена и хризена, достигала третьего пика к 18–20 сут (рис. 2б). Вме-

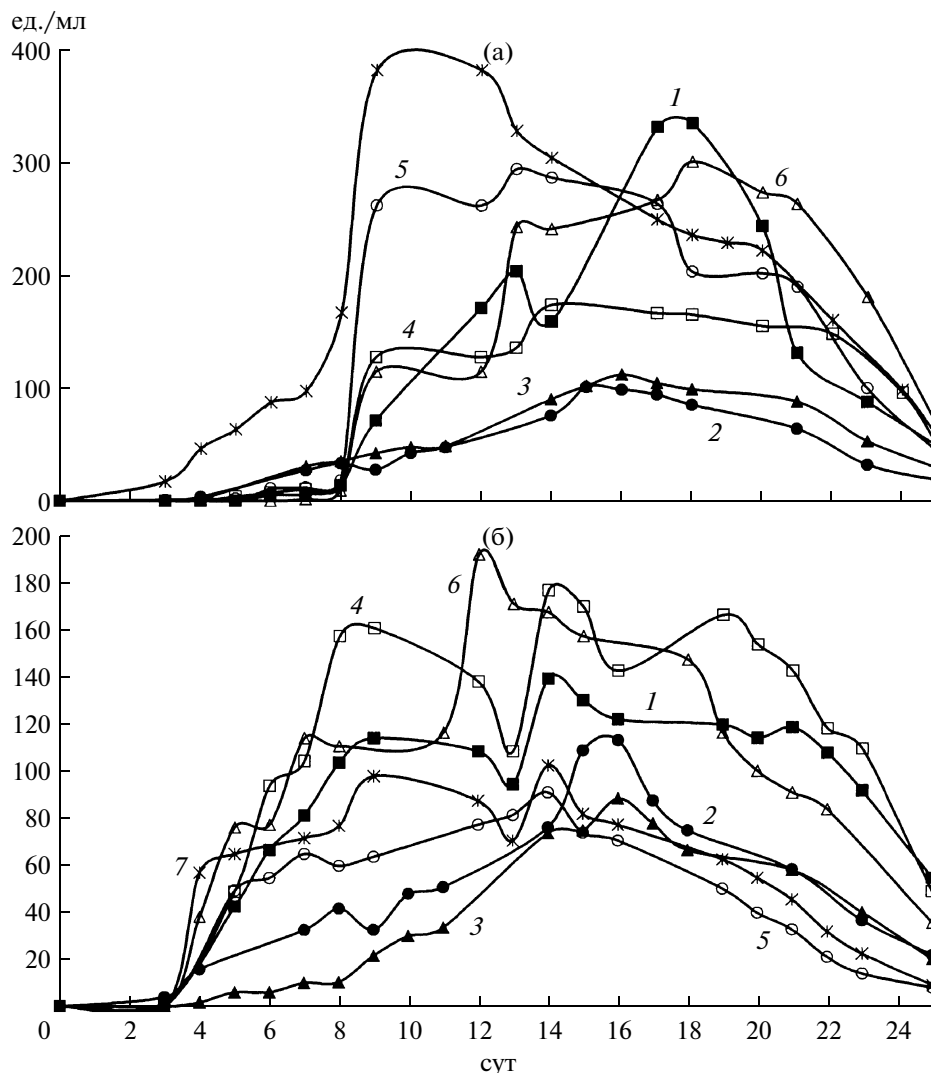


Рис. 3. Динамика продукции лакказы (ед./мл) на среде Кирка в присутствии Mn^{2+} при pH 4.5 (а) и pH 6.0 (б): 1 – фенантрен, 2 – антрацен, 3 – флуорен, 4 – пирен, 5 – хризен, 6 – флуорантен, 7 – контроль (без ПАУ).

сте с тем в этих условиях, так же, как и при pH 4.5, нами не было обнаружено продукции Mn-пероксидазы и(или) гибридной Mn-пероксидазы.

Наши предварительные исследования показали, что в условиях продукции и лакказы, и гибридной Mn-пероксидазы деградация ПАУ проходила без накопления соответствующих ПАУ-хинонов с образованием метаболитов, включающихся в основной обмен [23, 30, 31]. Принимая во внимание эти данные, мы посчитали целесообразным исследовать возможность индукции и лакказы, и лигнинолитических пероксидаз в ходе деградации ПАУ на среде Кирка. В качестве возможного индуктора был использован Mn^{2+} , который, как известно, может индуцировать продукцию не только лигнинолитических пероксидаз, но и лакказ у ряда грибов белой гнили [10].

Показано, что добавление ионов Mn^{2+} в среду культивирования увеличивало активность лакказы, однако пероксидазной активности при этом не обнаружено. Продукция лакказы увеличивалась в 2 и более раз по сравнению с вариантом без добавления Mn^{2+} со всеми исследуемыми ПАУ. Увеличивалась скорость достижения максимума и количество пиков активности. Первый пик активности смещался на более ранние сроки – 9 сут и достигал максимального значения в присутствии хризена 261.3 ед./мл (рис. 3а). Второй приходился на 13–14 сут и достигал максимального значения также в присутствии хризена 293.7 ед./мл (рис. 3а). Третий пик фиксировался на 17–18 сут и достигал максимума в присутствии фенантрена 334.7 ед./мл (рис. 3а). Однако следует отметить, что все эти значения были ниже, чем в контрольном варианте (без ПАУ), из чего можно предположить, что одновре-

менное присутствие ПАУ и Mn^{2+} в среде культивирования снижало продукцию лакказы.

Так же, как при pH 4.5, добавление ионов Mn^{2+} в среду культивирования с pH 6.0 значительно увеличивало активность лакказы и количество пиков ее активности до 5. Активности пероксидазы при этом не было обнаружено. Активность лакказы в присутствии флуорантена (рис. 3б) возросла почти в 2 раза по сравнению с контролем, и это было максимальное значение в данных условиях (191.7 ед./мл). Ферментативная активность в присутствии пирена (рис. 3б) увеличивалась в 1.5 раза по сравнению с соответствующим контролем и в 3.5 раза — по сравнению с вариантом без добавления ионов Mn^{2+} и составляла 176.5 ед./мл. Это значение было максимальным по сравнению с соответствующими показателями активности в других условиях в присутствии этого ПАУ. Активность фермента в присутствии фенантрена и антрацена (рис. 3б) увеличивалась незначительно по сравнению с контролем. Хризен и флуорен ингибировали продукцию лакказы в данных условиях (рис. 3б).

В доступной нам литературе обнаружены лишь единичные сообщения о влиянии ПАУ на продукцию лигнинолитических ферментов. Так, Безалел с соавт. показали, что продукция лакказы другим штаммом гриба *P. ostreatus* не зависела от наличия в среде культивирования фенантрена, а флуорен увеличивал продукцию этого фермента примерно в 1.5 раза [19]. Флуорен также стимулировал продукцию лакказы *Trametes versicolor* в 4.3 раза [18]. На богатой среде для базидиомицетов *P. ostreatus* продуцировал лакказу независимо от наличия в среде культивирования пирена, а флуорантен и бенз[а]пирен примерно в 1.5 раза ингибировали ее продукцию [19]. В то же время другие авторы показали, что бенз[а]пирен не оказывал сколько-нибудь заметного влияния на продукцию лакказы грибами *Fusarium solani* и *F. oxysporum* [33] и *T. versicolor* [18]. Во всех этих исследованиях активность лакказы тестировалась в определенные моменты времени и динамика активности этого фермента не выявлялась. В недавно опубликованной нами работе представлена динамика продукции лакказы и гибридной Mn-пероксидазы в процессе деградации ПАУ *P. ostreatus* D1, однако в этом случае культивирование гриба проводили на богатой среде [32].

Лакказы в основном синтезируются как ряд изоферментов, которые кодируются семейством генов. В ответе на индукторы экспрессия лакказных генов у разных грибов варьирует. Например, в случае *Fomes annosus*, *Pholiota mutabilis*, *P. ostreatus*, и *T. versicolor* лакказы, выделенные из культур, индуцированных ксилитином, заметно отличались от неиндуцированных форм. В каждой индуцированной культуре этих грибов появлялась только одна форма индуцированного фермента, независимо от количе-

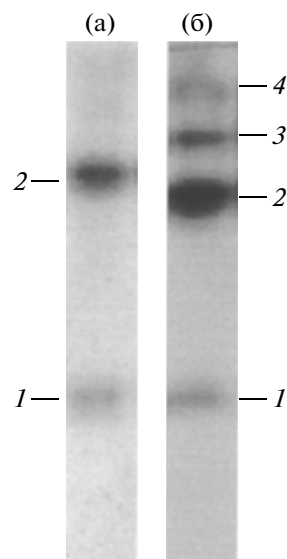


Рис. 4. Электрофореграмма лакказ (1–4), продуцируемых *P. ostreatus* D1, при культивировании на среде Кирка при pH 6.0: а — контроль (без ПАУ), б — в присутствии ПАУ (фенантрен).

ства конститутивных. Индуцированные формы лакказы из *F. annosus*, *P. ostreatus* и *T. versicolor* мигрировали в геле быстрее, чем конститутивные, тогда как индуцированный фермент из *P. mutabilis* мигрировал медленнее, чем его конститутивная форма. Вместе с тем новые формы лакказы не появлялись в индуцированных культурах *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia praticola* и *Podospora anserine* [8]. Наличие двух форм лакказы было показано в присутствии феруловой и 4-гидроксibenзойной кислот, п-гидроксibenзальдегида, вератровой кислоты, $CuSO_4$ и ксилитина у гриба *Volvariella volvacea*, тогда как без добавления индуктора фермент не продуцировался [34].

Нами был проведен электрофоретический анализ ферментов, продуцируемых *P. ostreatus* D1 в ходе деградации ПАУ. На протяжении всего времени культивирования, независимо от использованного ПАУ и(или) Mn^{2+} , обнаружена активность только лакказы. Дополнительное окрашивание геля о-дианизидином в присутствии Mn^{2+} и H_2O_2 не выявило наличия дополнительных полос, что также подтверждало отсутствие Mn-пероксидазы и(или) гибридной Mn-пероксидазы в данных условиях.

Показано, что в контрольном варианте при pH 6.0 гриб продуцировал 2 формы лакказы (рис. 4а). Внесение в среду культивирования ПАУ и(или) Mn^{2+} приводило к появлению двух дополнительных форм (независимо от pH среды), мигрирующих в геле медленнее конститутивных (рис. 4б). Аналогичные данные были получены нами при электрофоретическом исследовании лакказ, про-

дуцируемых грибом на богатой среде. В этом случае присутствие ПАУ в среде культивирования также приводило к появлению дополнительной формы лакказы [32].

Таким образом, наши исследования показали, что, независимо от использованного рН среды, деградация ПАУ сопровождалась продукцией только лакказы на протяжении всего времени культивирования. Максимальная активность, время достижения пика активности фермента, а также количество пиков зависели от использованного ПАУ и условий культивирования (рН среды и наличие Mn^{2+}). Присутствие ПАУ и(или) Mn^{2+} в среде культивирования гриба индуцирует продукцию нескольких форм лакказы, по меньшей мере, четырех. Продукции лигнинолитических пероксидаз в данных условиях выявлено не было.

Авторы благодарят В.Е. Никитину (ИБФРМ РАН) за предоставленный штамм гриба *Pleurotus ostreatus* D1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wong D.W.S. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2009. V. 157. № 1. P. 174–209.
2. Field J.A., de Jong E., Feijoo-Costa G., de Bont J.A.M. // Trends Biotechnol. 1993. V. 11. № 1. P. 44–49.
3. Baldrian P. // FEMS Microbiol. Rev. 2006. V. 30. № 2. P. 215–242.
4. Rama R., Mougin C., Boyer F.-D., Kollmann A., Malosse G., Sigoillot J.-C. // Biotechnol. Lett. 1998. V. 20. № 9. P. 1101–1104.
5. Jolivat C., Raynal A., Caminade E., Kokel B., Le Coffic F., Mougin C. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 51. № 5. P. 676–681.
6. Mougin G., Boyer F.-D., Caminade E., Rama R. // J. Agric. Food Chem. 2000. V. 48. № 10. P. 4529–4534.
7. Скоробогатько О.В., Степанова Е.В., Гаврилова В.П., Ярополов А.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 1996. Т. 32. № 6. С. 524–528.
8. Bollag J.-M., Leonowicz A. // Appl. Environ. Microbiol. 1984. V. 48. № 4. P. 849–854.
9. Lee I.-Y., Jung K.-K., Lee C.-K., Park Y.-H. // Biotechnol. Lett. 1999. V. 21. № 11. P. 965–968.
10. Scheel T., Hofer M., Ludwig S., Holker U. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2000. V. 54. № 5. P. 686–691.
11. Crowe J.D., Olsson S. // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. № 5. P. 2088–2094.
12. Reddy C.A. // Curr. Opin. Biotechnol. 1995. V. 6. № 3. P. 320–328.
13. Wesenberg D., Buchon F., Agathos S.N. // Biotechnol. Lett. 2002. V. 24. № 12. P. 989–993.
14. Pickard M.A., Roman R., Tinoco R., Vazquez-Duhalt K. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 9. P. 3805–3809.
15. Cajthaml T., Erbanova P., Kollmann A., Novotny G., Sasek V., Mougin C. // Folia Microbiol. 2008. V. 53. № 4. P. 289–294.
16. Majcherczyk A., Johannes C., Huttermann A. // Enzyme Microb. Technol. 1998. V. 22. № 5. P. 335–341.
17. Pozdnyakova N., Rodakiewicz-Nowak J., Turkovskaya O., Haber J. // Enzyme Microb. Technol. 2006. V. 39. № 6. P. 1242–1249.
18. Mougin C., Kollmann A., Jolivat C. // Biotechnol. Lett. 2002. V. 24. № 2. P. 139–142.
19. Bezalel L., Hadar Y., Cerniglia C.E. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 1. P. 292–295.
20. Никитина В., Маринина Н., Болдырев В., Озеров П. // Бюллетень ботанического сада Саратовского государственного университета. 2003. Т. 2. С. 169–176.
21. Bezalel L., Hadar Y., Fu P.P., Freeman J.P., Cerniglia C.E. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 7. P. 2547–2553.
22. Kirk T.K. // Holzforschung. 1975. V. 29. № 2. S. 99–107.
23. Pozdnyakova N.N., Nikiforova S.V., Makarov O.E., Chernyshova M.P., Pankin K.E., Turkovskaya O.V. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 26. № 1. P. 205–211.
24. Горяев М.И., Евдакова Н.А. Справочник по газовой хроматографии органических кислот. Алма-Ата: “Наука” Казахской ССР, 1977. 552 с.
25. Niku-Paavola M.-L., Karhunen E., Salola P., Paunio V. // Biochem. J. 1988. V. 254. № 6. P. 877–883.
26. Heinfling A., Martinez M.J., Martinez A.T., Bergbauer M., Szewzyk U. // FEMS Microbiol. Lett. 1998. V. 165. № 1. P. 43–50.
27. Laemmli U.K. // Nature (London). 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
28. Morgan P., Lewis T., Watkinson R.J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1991. V. 34. № 5. P. 693–696.
29. Ruiz-Duenas F.J., Camarero S., Perez-Boada M., Martinez M., Martinez A. // Biochem. Soc. Transact. 2001. V. 29. № 2. P. 116–122.
30. Никифорова С.В., Позднякова Н.Н., Макаров О.Е., Чернышова М.П., Турковская О.В. // Микробиология. 2010. Т. 79. № 4. С. 481–485.
31. Позднякова Н.Н., Турковская О.В., Макаров О.Е., Никитина В.Е. // Труды междунар. конф. “Грибы в природных и антропогенных экосистемах”, Россия, Санкт-Петербург, 2005. Т. 2. С. 87–92.
32. Pozdnyakova N., Nikiforova S., Turkovskaya O. // Cent. Eur. J. Biol. 2010. V. 5. № 1. P. 83–94.
33. Verdin A., Sahraoui A.L.-H., Durand R. // Int. Biodeteriorat. Biodegradat. 2004. V. 53. P. 65–70.
34. Chen S., Ma D., Ge W., Buswell J.A. // FEMS Microbiol. Lett. 2003. V. 218. № 1. P. 143–148.

Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Laccase Production by White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus* D1

N. N. Pozdnyakova, S. V. Nikiforova, O. E. Makarov, and O. V. Turkovskaya

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia
e-mail: nataliapozdnyakova@yahoo.com, ecbio@ibppm.sgu.ru

Received December 28, 2010

Abstract—The effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on the dynamics of laccase production by the fungus *Pleurotus ostreatus* D1 under conditions of submerged cultivation on Kirk's medium has been studied. It has been shown that phenanthrene, fluoranthene, pyrene, and chrysene actively induce this enzyme, whereas fluorene and anthracene had a smaller effect. Addition of Mn²⁺ ions to cultivation medium elevates the laccase activity twofold and more in the presence of all the studied PAHs. Electrophoresis under non-denaturing conditions demonstrates induction of additional laccase species by xenobiotics. Ligninolytic peroxidase activities are undetectable under the conditions used.

УДК 577.1:632.938.1

САЛИЦИЛОВАЯ И ЖАСМОНОВАЯ КИСЛОТЫ В РЕГУЛЯЦИИ ПРО-АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА ЛИСТЬЕВ ПШЕНИЦЫ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *Septoria nodorum* Berk.

© 2011 г. Л. Г. Яруллина, Н. Б. Трошина, Е. А. Черепанова, Е. А. Заикина, И. В. Максимов

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, 450054
e-mail: yarullina@bk.ru

Поступила в редакцию 09.12.2010 г.

Исследовано влияние медиаторов сигнальных систем салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот и их смеси на образование АФК (супероксидного радикала $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2), активность оксидоредуктаз (оксалатоксидазы, пероксидазы, каталазы) в листьях пшеницы *Triticum aestivum* L., инфицированных возбудителем септориоза *Septoria nodorum* Berk. Предпосевная обработка семян СК и ЖК снижала степень развития гриба на листьях пшеницы. СК оказывала более ранний индуцирующий эффект на синтез $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 по сравнению с ЖК. Защитное действие салициловой и жасмоновой кислот против возбудителя септориоза было обусловлено активацией оксалатоксидазы, индукцией анионных и катионных пероксидаз и снижением активности каталазы. Способность соединений стимулировать образование АФК в растительных тканях можно использовать в качестве критерия для оценки иммуномодулирующей активности новых средств защиты растений.

Индукция защитного ответа в растениях против патогенов осуществляется с помощью различных сигнальных систем [1]. Известными их медиаторами являются салициловая (СК) и жасмоновая (ЖК) кислоты [2, 3]. Доказано, что СК, как интермедиат НАДФН-оксидазной системы, стимулирует защитные реакции растений против болезней, вызываемых биотрофными патогенами, посредством индуцирования в них компонентов системно-приобретенной устойчивости (СПУ), в том числе регуляции активности ферментов про-антиоксидантной системы, накопления фенольных соединений, укрепления клеточной стенки в зоне инфицирования за счет отложения лигнина [4, 5]. В отношении ЖК–интермедиата липоксигеназной сигнальной системы, показано, что в обработанных ею растениях в ответ на поранение насекомыми-вредителями и некротрофную инфекцию индуцируется системная индуцированная устойчивость (СИУ), компонентами которой являются активация ингибиторов протеиназ и ферментов антиоксидантной защиты [6]. Поскольку в некоторых случаях тип питания у возбудителей грибных болезней бывает смешанным (гемибитрофы), как у *Septoria nodorum* Berk., то представляет значительный интерес выяснение роли СК и ЖК в таких системах.

Ранее нами была выявлена важная роль оксалатоксидазы в генерации H_2O_2 и формировании защитного ответа растений пшеницы к грибным патогенам [7]. Ее активация и сопряженная генерация H_2O_2 под воздействием СК и хитоолигосахаридов повышали устойчивость пшеницы к возбудителям твердой головни и корневой гнили

[8, 9]. Предобработка растений интермедиатами сигнальных систем и их смесями с элиситорами весьма перспективна в сельском хозяйстве для защиты растений, поскольку такие компоненты эффективны даже в наномолярных концентрациях [10]. Однако для создания подобных препаратов необходимы новые сведения о механизмах индуцирования сигнальными молекулами устойчивости к патогенам при участии про-антиоксидантной системы растений, поскольку в некоторых случаях они могут обладать супрессорным эффектом на иммунную систему растений.

Цель работы – изучение образования различных форм АФК, изменений активности оксалатоксидазы, каталазы, изоферментного спектра пероксидазы в связи с формированием устойчивости растений пшеницы к грибу *Septoria nodorum* Berk. под воздействием салициловой и жасмоновой кислот, а также их смеси.

МЕТОДИКА

Объект исследования. Опыты проводили на отрезках листьев *Triticum aestivum* L. сорта Башкирская 24, выращенной из предобработанных (3 ч) растворами 10^{-6} М салициловой (ч.д.а., “Реахим”, Россия) и 10^{-7} М жасмоновой (ч.д.а., “Реахим”, Россия), а также их смесью (1 : 1). Семена проращивали на фильтровальной бумаге при комнатной температуре. Полностью развернутые листья 7 сут проростков срезали, помещали во влажную камеру на фильтровальную бумагу, срезы прикрывали ватой, смоченной в растворе бензимидазола (40 мг/л) [11]. Отрезки листьев инокулировали суспензией

пикноспор *S. nodorum* Berk. (10^6 спор/мл), которые были выделены авторами из местной популяции гриба. Инокулированные листья выдерживали при комнатной температуре в темноте в течение 24 ч, после чего переносили на искусственное освещение с фотопериодом 16 ч/сут. Интенсивность развития гриба на эпидермисе листьев оценивали через 24 ч, генерацию H_2O_2 в мезофилле листьев — через 48 ч, интенсивность симптомов болезни — через 72 ч после инокуляции. В качестве контроля использовали неинфицированные и инфицированные листья растений, не обработанные СК и ЖК.

Определение H_2O_2 и $O_2^{\cdot-}$. Отрезки листьев гомогенизировали в 0.025 М фосфатном буфере, pH 6.2 (ФБ), в соотношении 1 : 3, центрифугировали 20 мин при 10000 g на центрифуге фирмы “Eppendorf” (Германия). Супернатант использовали для определения содержания H_2O_2 и $O_2^{\cdot-}$. Концентрацию $O_2^{\cdot-}$ определяли при длине волны 530 нм с использованием 0.6 мМ нитротетразолия синего (НТС) фирмы “Sigma” (США). Коэффициент молярного поглощения формазана, образовавшегося при восстановлении НТС супероксидным радикалом, принимали равным $15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [12]. Содержание H_2O_2 оценивали при 560 нм с использованием ксиленолового оранжевого [13]. Реагент содержал 0.074% соли Мора в 5.81% серной кислоте и 0.009% ксиленолового оранжевого в 1.82% сорбита (в соотношении 1 : 100). Оптическую плотность продуктов реакции измеряли на спектрофотометре Biospek-Mini фирмы “Shimadzu” (Япония).

Интенсивность образования H_2O_2 оценивали также на гистологических срезах по окислению 3,3-диаминобензидина (ДАБ) по методу, изложенному в работе [14]. Синтез H_2O_2 оценивали по количеству окрашенных клеток через 48 ч после инокуляции.

Активность оксалактоксидазы (КФ 1.2.3.4). Цитоплазматическую (свободнорастворимую) фракцию фермента выделяли с использованием 0.05 М сукцинатного буфера, pH 3.8 (СБ) [15]. Для этого отрезки листьев гомогенизировали в СБ при соотношении массы навески листьев к объему СБ (1 : 3). Экстракт центрифугировали 20 мин при 12000 g (“Eppendorf”, Германия). Реакционная смесь для определения активности оксалактоксидазы содержала 100 мкл СБ, 0.0025 М щавелевую кислоту (“Реахим”, Россия), 50 мкл ферментной вытяжки и коммерческой пероксидазы хрена фирмы (“Диаэм”, Россия) в концентрации 15 ед./мл и 0.08%-ный хромогенный субстрат *o*-фенилендиамин (ОФД, “Реахим”, Россия).

Активность каталазы (КФ 1.11.1.6). Растительную ткань растирали в 50 мМ растворе ФБ, pH 7.8. Отношение массы навески к объему буфера ФБ 1 : 10. После центрифугирования 25 мин при 12000 g на центрифуге 5415К (“Eppendorf”, Германия) супернатант использовали для анализа активности фермента. Реакцию инициировали добавлением 0.1 мл супернатанта к 2 мл 0.03%-ного раствора

H_2O_2 . В контрольную пробу вместо супернатанта вносили 0.1 мл дистиллированной воды. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 1 мл 4%-ного молибдата аммония. Интенсивность развившейся окраски измеряли на спектрофотометре (“Shimadzu”, Япония) при длине волны 410 нм против контрольной пробы.

Активность каталазы рассчитывали по формуле: $E = (A_k - A_o) / VtK$, где E — активность каталазы (мкМ H_2O_2 /мг белка мин), A_k и A_o — поглощение контрольной и опытной проб соответственно, V — объем вносимой пробы, 0.1 мл, t — время инкубации, 600 с, K — коэффициент миллимолярного поглощения H_2O_2 , равный $22.2 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Активность пероксидазы (КФ 1.11.1.7). Для выделения цитоплазматической фракции пероксидазы отрезки листьев гомогенизировали в 0.01 М Na-фосфатном буфере, pH 6.2 (ФБ). Отношение массы навески листьев к объему ФБ 1 : 3. Экстракт центрифугировали 25 мин при 12000 g на центрифуге 5415К (“Eppendorf”, Германия). Супернатант использовали для анализа активности пероксидазы. Активность фермента определяли по окислению 0.15%-ного ОФД в присутствии 0.0015% H_2O_2 в 0.01 М ФБ.

Оптическую плотность окисленного ОФД при определении оксалактоксидазы и пероксидазы оценивали при 490 нм на приборе для иммуноферментного анализа Benchmark Microplate Reader (“BioRad”, США). Единица активности фермента соответствовала количеству окисленного субстрата, вызывающему увеличение единицы оптической плотности ΔA за 1 мин. Для сравнительного анализа активность выражали в отн. ед. на 1 г сырой мысы.

Изоферментный спектр пероксидазы. Изоэлектрофокусирование (ИЭФ) белковых экстрактов проводили на приборе фирмы “Хийу-Калтур” (Эстония) с использованием 7%-ного полиакриламидного геля (ПААГ) и 2.5% изолинов фирмы “MP Biomedicals” (США). Перед нанесением на гель образцы выравнивали по содержанию белка и диализовали против дистиллированной воды. Активность изопероксидаз в геле выявляли 0.01%-ным раствором 3,3-диаминобензидина солянокислого с 0.005% H_2O_2 в 0.1 М ФБ. После проявления ферментативной активности гели анализировали с использованием сканера (“Genius”, США). Определение pI пероксидаз пшеницы проводили с использованием диагностических наборов белков с диапазоном pI от 3.5 до 10.6 (“Sigma”, США).

Статистическая обработка данных. Опыты проводили в 3 биологических повторах. В каждом варианте опыта фиксировали по 10 листьев. На рисунках приведены средние результаты опыта и их стандартные ошибки.

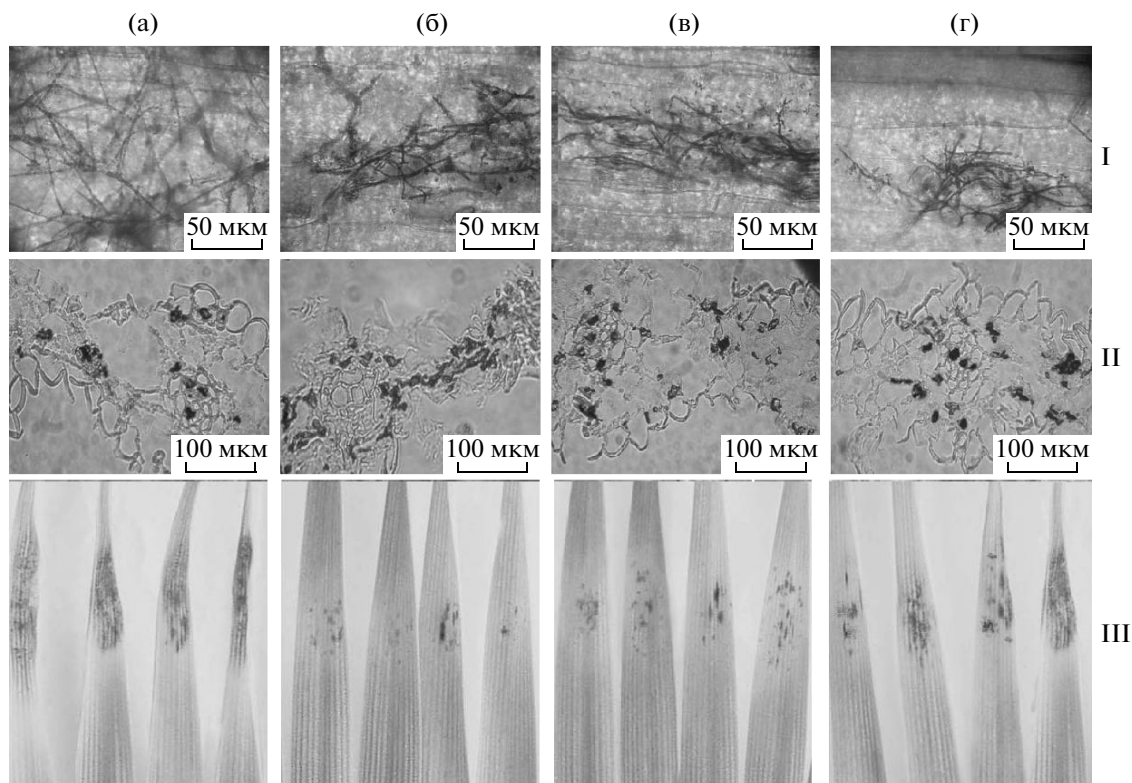


Рис. 1. Влияние салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот и их смеси на интенсивность прорастания спор (I), генерацию H_2O_2 в клетках мезофилла в зоне инфицирования (II) и развитие симптомов септориоза (III) в листьях пшеницы: а – контроль, б – обработка СК; в – обработка ЖК, г – обработка смесью СК + ЖК. I, II, III – 24, 48 и 72 ч после инокуляции соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние СК и ЖК на развитие гриба *S. nodorum* на листьях пшеницы. Наблюдение за ростом возбудителя септориоза на эпидермисе листьев показало, что в контроле уже через 24 ч после инокуляции мицелий гриба густо покрывал поверхность листа (рис. 1а, I). В вариантах опыта с применением СК, ЖК и их смеси прорастание спор было менее интенсивным (рис. 1б, 1в, 1г, I). Признаки развития септориоза в контрольных листьях наблюдались через 24 ч после инфицирования в виде слабого обесцвечивания листьев с последующим их побурением, а через 72 ч после инокуляции симптомы септориоза проявлялись в виде крупных бурых пятен (рис. 1а, III). В листьях растений, предобработанных СК и ЖК, симптомы болезни были выражены слабее, чем в контроле (рис. 1б, 1в, III). Однако в варианте со смесью СК + ЖК через 72 ч после инокуляции симптомы болезни проявлялись практически с той же интенсивностью, что и в контрольном варианте (рис. 1г, III). Таким образом, при обработке семян как СК, так и ЖК наблюдался слабый рост гриба на листьях в течение 72 ч наблюдений, что указывает на индуцирование устойчивости пшеницы к септориозу в этих вариантах опыта. В то же время в варианте опыта с предобработкой растений смесью СК + ЖК в начале

инфекционного процесса гриб развивался медленно, но затем его развитие ускорилось.

Влияние СК и ЖК на образование АФК в листьях пшеницы при инфицировании *S. nodorum*. Образование АФК является одним из наиболее ранних ответов растительных клеток на контакт с патогеном, в результате чего индуцируются защитные реакции растения. Известно, что первым звеном в патоген-индуцируемой окислительной вспышке является активация связанной с клеточной мембраной НАДФН-оксидазы и генерация супероксидного радикала, который при участии супероксиддисмутазы преобразуется в H_2O_2 [1]. Так, подавление образования $O_2^{\cdot-}$ приводило к восприимчивости растений пшеницы к возбудителю ржавчины [16].

Исследования показали, что в ответ на инфицирование возбудителем септориоза в листьях пшеницы наблюдалось повышение концентрации $O_2^{\cdot-}$ через 24 ч после инокуляции (таблица). В предобработанных СК и ЖК листьях синтез всех форм АФК усиливался (таблица). Причем при инфицировании под воздействием СК индуцируется более раннее повышение уровня АФК (24 ч после инокуляции) по сравнению с обработкой ЖК. В варианте СК + ЖК высокий уровень обра-

Влияние салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот и их смеси на накопление супероксидного радикала ($O_2^{\cdot-}$) и H_2O_2 в листьях пшеницы сорта Башкирская 24 при инфицировании грибом *S. nodorum*

Вариант	Время после инфицирования, ч		
	24	48	72
$O_2^{\cdot-}$, нМ/мг сырой массы			
Контроль	73.0 ± 3.7	81.1 ± 3.2	62.0 ± 3.9
<i>S. nodorum</i>	98.1 ± 4.1	92.3 ± 4.6	79.1 ± 2.1
СК	99.2 ± 3.7	88.1 ± 6.1	74.2 ± 2.4
СК+ <i>S. nodorum</i>	165.0 ± 6.8	118.2 ± 9.9	98.1 ± 5.5
ЖК	89 ± 3.7	124.3 ± 5.8	96.3 ± 3.9
ЖК+ <i>S. nodorum</i>	126.2 ± 8.7	149.0 ± 7.2	94.1 ± 4.3
СК + ЖК	101 ± 3.9	112 ± 6.7	80.2 ± 3.4
СК + ЖК + <i>S. nodorum</i>	131 ± 8.6	123 ± 5.9	107.3 ± 4.2
H_2O_2 , мкМ/мг сырой массы			
Контроль	18.3 ± 0.7	10.1 ± 0.6	7.2 ± 0.3
<i>S. nodorum</i>	22.7 ± 1.5	15.9 ± 0.9	8.6 ± 0.2
СК	21.0 ± 1.3	14.1 ± 0.7	9.7 ± 0.3
СК + <i>S. nodorum</i>	38.8 ± 2.5	20.7 ± 0.8	10.8 ± 0.5
ЖК	20.4 ± 0.8	21.9 ± 0.5	11.3 ± 0.2
ЖК + <i>S. nodorum</i>	29.2 ± 1.6	26.8 ± 1.3	12.1 ± 0.4
СК + ЖК	24.3 ± 1.4	28.3 ± 1.7	15.2 ± 0.7
СК + ЖК + <i>S. nodorum</i>	30.1 ± 1.7	34.3 ± 1.2	21.3 ± 0.9

зования АФК прослеживался на протяжении 48 ч после инфицирования. В литературе имеются сведения об индуцировании СК раннего образования супероксидного радикала в клетках мезофилла листьев пшеницы при инфицировании возбудителем бурой ржавчины [17] и значительном увеличении содержания H_2O_2 под воздействием обработки ЖК на более поздних стадиях патогенеза [18].

Генерация H_2O_2 в клетках мезофилла листьев под воздействием исследуемых соединений и их смеси была исследована также с помощью красителя диаминобензидина. Обнаружено, что и в инфицированном контроле, и во всех вариантах опыта H_2O_2 -продуцирующие клетки наблюдались в мезофилле листьев спустя 48 ч после инокуляции (рис. 1, II). Причем в опытных вариантах количество H_2O_2 -продуцирующих клеток было больше (рис. 1б, 1в, 1г, II), чем в контроле (рис. 1а, II).

Влияние СК и ЖК на активность оксалаксоксидазы при инфицировании грибом *S. nodorum*. В ответ на инокуляцию листьев возбудителем септориоза происходило повышение активности оксалаксоксидазы (рис. 2а, 2). СК оказывала эффективное индуцирующее действие на активность оксалаксоксидазы как в здоровых растениях (рис. 2а, 3), так и при инфицировании, особенно на ранних этапах патогенеза (рис. 2а, 4). Так, в предобработанных СК листьях че-

рез 24 ч после инокуляции активность этого фермента превышала показатель контрольного варианта в 3 раза (рис. 2а, 4). Подобное действие ЖК на индукцию фермента проявлялось на более поздних этапах взаимоотношений растительных клеток с грибом (48 ч после инокуляции) (рис. 2а, 6). Индуцирующее действие смеси СК + ЖК на активность оксалаксоксидазы проявлялось на протяжении 48 ч после инокуляции (рис. 2а, 8).

Изменение уровня АФК в растительных тканях происходит в результате многих метаболических процессов, в том числе изменения в активности про-4-антиоксидантных ферментов. Известно, что наибольший вклад в накопление АФК вносит активация оксидаз, среди которых оксалаксоксидаза является патоген-индуцируемым белком и важнейшим компонентом прооксидантной системы растений [19]. Ранее нами была выявлена активация оксалаксоксидазы и повышение уровня H_2O_2 в тканях пшеницы под влиянием возбудителей корневых гнилей, твердой головни и обработке индукторами устойчивости [4, 20]. Таким образом, одним из возможных механизмов индуцируемого сигнальными молекулами накопления H_2O_2 в листьях пшеницы при инфицировании *S. nodorum* является активация оксалаксоксидазы.

Влияние СК и ЖК на активность каталазы при инфицировании *S. nodorum*. Ранее нами было по-

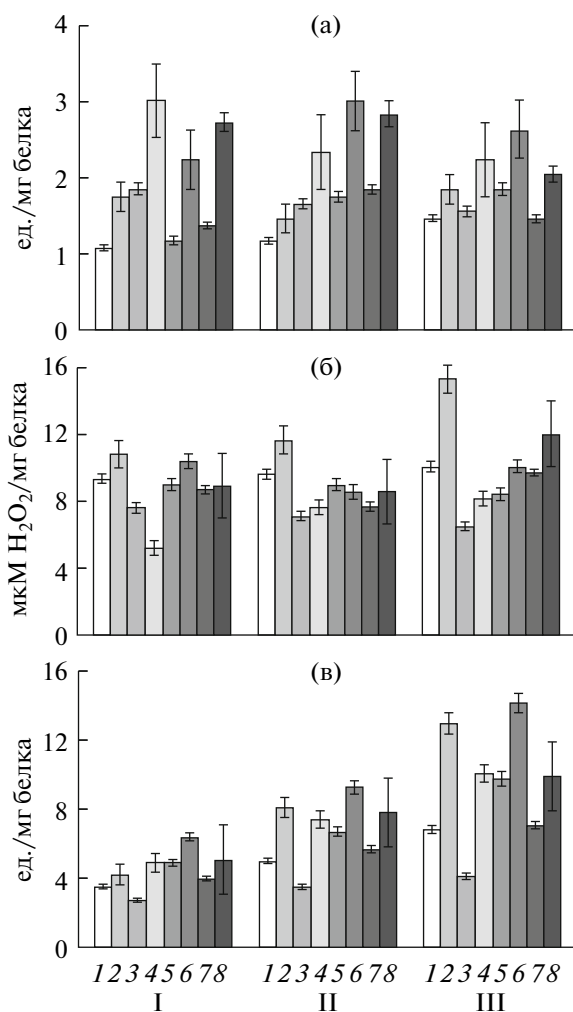


Рис. 2. Влияние салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот на активность оксалатоксидазы (а), каталазы (б) и пероксидазы (в) в листьях пшеницы при инфицировании *S. nodorum*: 1 – контроль, 2 – инфицирование *S. nodorum*, 3 – обработка СК; 4 – обработка СК + инфицирование *S. nodorum*; 5 – обработка ЖК, 6 – обработка ЖК + инфицирование *S. nodorum*, 7 – обработка смесью СК + ЖК, 8 – обработка смесью СК + ЖК + инфицирование *S. nodorum*. I – 24, II – 48, III – 72 ч после инокуляции.

казано, что возбудитель септориоза способен секретировать каталазу в среду культивирования, причем высокоагрессивные штаммы *S. nodorum* характеризовались более активным синтезом внеклеточной каталазы по сравнению с слабоагрессивными [21]. Предполагается, что за счет секреции в растительные ткани каталазы гриб подавлял генерацию АФК в местах локализации и обеспечивал себе успешный рост и развитие.

Исследования показали, что в инфицированных листьях пшеницы активность каталазы постепенно возрастала, достигая максимального значения через 72 ч после инокуляции (рис. 2б, 2). СК оказывала ингибирующее действие на каталазную активность,

как в здоровых (рис. 2б, 3), так и в инфицированных листьях пшеницы (рис. 2б, 4). В ходе эксперимента под воздействием СК каталазная активность снижалась уже через 24 ч после инокуляции (рис. 2б, 4). Ингибирующее действие ЖК на каталазную активность проявлялось спустя 48 ч после инокуляции (рис. 2б, 6). При совместном использовании СК и ЖК активность каталазы на протяжении 24 ч незначительно отличалась от контрольного варианта (рис. 2б, 7, 8). Поскольку H_2O_2 является необходимым компонентом развития локальной и системной устойчивости растений, то подавление каталазной активности под воздействием СК и ЖК способствует индукции защитного ответа пшеницы к *S. nodorum* (рис. 1б, 1в, III).

Влияние СК и ЖК на активность и изоферментный состав пероксидазы в листьях пшеницы при инфицировании грибом *S. nodorum*. В инфицированных листьях пшеницы под влиянием возбудителя септориоза наблюдалось повышение активности пероксидазы (рис. 2в, 2). Предобработка растений пшеницы СК, ЖК и их смесью оказывала существенное влияние на активность и изоферментный спектр пероксидаз как неинфицированных, так и инфицированных растений. Так, если в предобработанных СК здоровых растениях активность фермента была ниже, чем в контроле на всем протяжении опыта (рис. 2в, 3), то в предобработанных и инфицированных она плавно возрастала в ходе эксперимента (рис. 2в, 4). Ранее нами было также обнаружено подобное действие СК на активность пероксидазы при инфицировании растений пшеницы возбудителем септориоза [8]. В предобработанных ЖК как здоровых (рис. 2в, 5), так и инфицированных (рис. 2в, 6) листьях, пшеницы активность пероксидазы поддерживалась на весьма высоком уровне. В сочетании с СК индуцирующее действие ЖК на активность пероксидазы снижалось (рис. 2в, 7, 8).

Анализ влияния СК, ЖК и их смеси выявил определенные различия в спектре изоформ пероксидазы инфицированных растений (рис. 3, 4, 6, 8). Вероятно, повышение активности фермента в растениях при инфицировании под воздействием сигнальных молекул происходило как за счет активации анионной пероксидазы с $pI \sim 3.5$, так и катионной изоформы пероксидазы с $pI \sim 9.6$ (рис. 3, 4, 6). Интересно, что ЖК, в отличие от СК, индуцировала появление катионной изоформы фермента с $pI \sim 9.8$ (рис. 3, 6). При совместном применении смеси сигнальных молекул активировались как анионные изоформы пероксидазы ($pI \sim 3.5$), участвующие в лигнификации [22], так и катионной изоформы с $pI \sim 9.6$ (рис. 3, 8).

Особенностью гриба *S. nodorum* является гембиотрофный тип паразитизма. Свое развитие возбудитель септориоза начинает на живых растительных тканях, но на определенном этапе патогенеза может колонизировать погибшие ткани растения-хозяина [23]. Предполагается, что в зависимости от типа паразитизма возбудителя болезни растения активируют различные сигнальные системы с целью

обеспечить оптимальную защиту своих тканей. В наших исследованиях обработка СК индуцировала генерацию АФК на более ранней стадии патогенеза по сравнению с ЖК. Вероятно, усиление образования $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 под действием сигнальных молекул, обнаруживаемое как на эктофитной, так и эндофитной стадиях развития *S. nodorum*, неблагоприятно отражалось на его развитии.

В настоящее время не вызывает сомнения, что АФК важны в защитных реакциях растений на воздействие различных стрессоров, в том числе и патогенов. Так, в клубнях картофеля иммунного сорта при инфицировании возбудителем фитофтороза выявлена генерация H_2O_2 , сопровождающаяся реакцией сверхчувствительности [24], при инфицировании устойчивых растений пшеницы возбудителем бурой ржавчины установлена интенсивная генерация $O_2^{\cdot-}$ в замыкающих клетках устьиц и в мезофилле листа, подавление которой способствовало росту и развитию патогена в растительных тканях [16].

Важная роль в генерации H_2O_2 и формировании устойчивости растений пшеницы к грибным патогенам принадлежит растительному ферменту оксалатоксидазе [19], секреция которого в апопласт под влиянием СК усиливается [8]. В то же время, если учитывать, что возбудители септориоза способны к синтезу и секреции в растительные ткани щавелевой кислоты, являющейся фактором патогенности [25], то индукция активности данного фермента способствует развитию устойчивости растений.

Особое место в регуляции взаимоотношений растений и патогенов занимают каталазы. Они способствуют усилению вирулентности грибных патогенов за счет снижения концентрации АФК в зоне инфицирования и подавления окислительного взрыва [26]. В наших исследованиях обработка СК и ЖК снижала каталазную активность в листьях пшеницы при инфицировании *S. nodorum*, что положительно отражалось на накоплении H_2O_2 и подавлении степени развития патогена.

Жасмоновая кислота и ее циклические предшественники составляют семейство биоактивных оксипиридов, участвующих в регуляции ответа растений на различные стрессы, в том числе на поражение фитофагами и некоторыми микроорганизмами [27]. Защитный эффект ЖК против фитопатогенов обусловлен ее способностью регулировать синтез патоген-индуцируемых белков [9]. В наших исследованиях ЖК индуцировала появление катионной изоформы пероксидазы с $pI \sim 9.8$. Учитывая полифункциональность пероксидазы, а также способность изоформы фермента с $pI \sim 9.8$ сорбироваться на мицелии патогенных грибов [22], можно сказать, что под воздействием ЖК генерация АФК и утилизация их избытка может происходить в процессе лигнификации непосредственно на инфекционных структурах патогена.

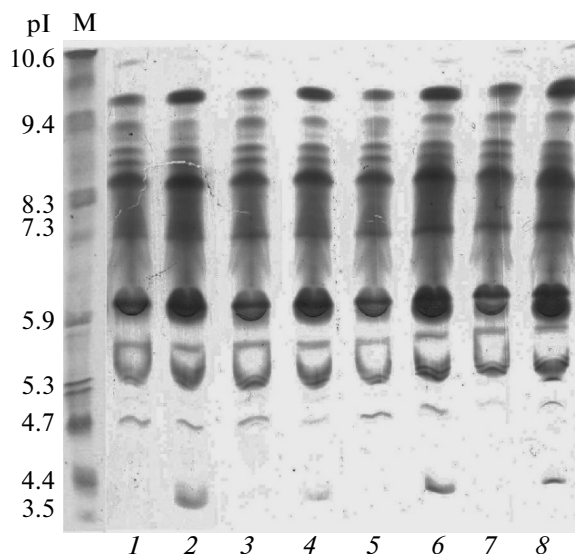


Рис. 3. Влияние салициловой (СК) и жасмоновой (ЖК) кислот на изоферментный спектр пероксидаз в листьях пшеницы: 1 – контроль, 2 – инфицирование *S. nodorum*, 3 – обработка СК; 4 – обработка СК + инфицирование *S. nodorum*; 5 – обработка ЖК; 6 – обработка ЖК + инфицирование *S. nodorum*, 7 – обработка смесью СК + ЖК, 8 – обработка смесью СК + ЖК + инфицирование *S. nodorum*, 48 ч после инокуляции. М – расположение маркерных белков в ПААГ; pI – изоэлектрические точки.

В индукции защитных механизмов определяющим является восприятие сигнала и его распространение по тканям растения, которое происходит при участии сигнальных молекул, таких, как СК и ЖК [1]. На растениях арабидопсиса показано, что СК индуцирует устойчивость против облигатных патогенов, а ЖК – против некротрофных, однако при совместном применении вместо защитного ответа может быть индуцирована восприимчивость, вызванная антагонизмом сигнальных систем [2]. В наших исследованиях обе сигнальные молекулы – СК и ЖК оказывали пролонгированное защитное действие на растения пшеницы при инфицировании *S. nodorum*, индуцируя в них генерацию супероксидного радикала и H_2O_2 . Причем СК оказывала более раннее индуцирующее действие на уровень АФК, чем ЖК. Защитное действие сигнальных молекул против возбудителя септориоза было обусловлено активацией оксалатоксидазы, индукцией анионных и катионных пероксидаз и снижением активности каталазы в период 24–48 ч после инфицирования. Ослабление защитного эффекта под воздействием смеси СК и ЖК на растения пшеницы при инфицировании *S. nodorum*, вероятно, обусловлено как биологическими особенностями гембиотрофного патогена, так и возможным перекрыванием сигнальных путей.

Работа выполнена при поддержке программы АЦВП № 2.1.1/5676, Госконтракта Министерства образования и науки № П-339, ФЦП “Научные и

научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы проект № 16.740.110061.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы растений. М.: Наука, 2002. 294 с.
2. *Koorneef A., Verhage A., Leon-Reyes A., Snetselaar R., Van Loon, L.C., Pieterse C.M.* // *Plant Signaling and Behavior*. 2008. V. 3. № 8. P. 543–546.
3. *Ayoung L., Kyoungwon C., Sungkuk J., Rakwal R., Iwahashi H., Ganesh K.F., Shim J., Oksoo H.* // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2004. V. 318. № 3. P. 734–738.
4. *Mur L.A.J., Kenton P., Atzorn R., Miersch O., Wasternack C.* // *Plant Physiol.* 2006. V. 140. № 1. P. 249–262.
5. *Flors V., Ton J., Van Doorn R., Jakab G., Garsia-Agustin P., Mauch-Mani B.* // *Plant J.* 2008. V. 54. № 1. P. 81–92.
6. *Han S.K., Terrence P.D.* // *Plant Cell.* 2002. V. 14. № 7. P. 1469–1482.
7. *Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Максимов И.В., Хайруллин Р.М.* // *Агрехимия*. 2003. № 12. С. 55–59.
8. *Трошина Н.Б., Яруллина Л.Г., Валеев А.Ш., Максимов И.В.* // *Изв. РАН. Сер. биол.* 2007. Т. 34. № 5. С. 545–550.
9. *Бурханова Г.Ф., Яруллина Л.Г., Максимов И.В.* // *Физиология растений*. 2007. Т. 54. № 1. С. 104–110.
10. *Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И., Панина Я.С., Чаленко Г.И.* // *Физиология растений*. 2006. Т. 53. № 4. С. 546–553.
11. *Пыжикова Г.В., Карасева Е.В.* // *Сельхоз. биология*. 1985. № 12. С. 112–114.
12. *Vaidyanathan H., Sivakumar P., Chakrabarty R., Thomas G.* // *Plant Sci.* 2003. V. 165. № 6. P. 1411–1418.
13. *Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P.* // *New Phytol.* 2001. V. 151. № 1. P. 185–194.
14. *Caliskan M., Cuming A.C.* // *Plant J.* 1998. V. 15. № 12. P. 165–171.
15. *Vuletic M., Sukalovich V.H.* // *Plant Sci.* 2000. V. 157. № 2. P. 257–263.
16. *Плотникова Л.Я.* // *Физиология растений*. 2009. Т. 56. № 2. С. 200–209.
17. *Плотникова Л.Я.* // *Микол. и фитопатол.* 2009. Т. 43. № 3. С. 63–77.
18. *Лиу Ю., Пан Ц.Х., Ян Х.Р., Лиу Ю.Ю., Хуан В.Д.* // *Физиология растений*. 2008. Т. 55. № 6. С. 851–862.
19. *Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И.* Клеточные механизмы формирования устойчивости растений к грибным патогенам. Уфа: Гилем, 2006. 232 с.
20. *Трошина Н.Б., Максимов И.В., Яруллина Л.Г., Сурина О.Б., Черепанова Е.А.* // *Цитология*. 2004. Т. 46. № 11. С. 1001–1005.
21. *Максимов И.В., Валеев А.Ш., Черепанова Е.А., Яруллина Л.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2009. Т. 46. № 4. С. 481–486.
22. *Максимов И.В., Черепанова Е.А., Хайруллин Р.М.* // *Биохимия*. 2003. Т. 68. № 1. С. 131–136.
23. *Морозов Ю.М.* // *Микология и фитопатология*. 1992. Т. 26. № 1. С. 67–75.
24. *Васюкова Н.И., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Валеева Т.А., Озерецковская О.Л.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2008. Т. 44. № 2. С. 236–240.
25. *Liang H., Maynard C.A., Allen R.D., Powell W.A.* // *Plant. Mol. Biol.* 2001. V. 45. № 6. P. 619–629.
26. *Гесслер Н.Н., Аверьянов А.А., Белозерская Т.А.* // *Биохимия*. 2007. Т. 72. № 10. С. 1342–1364.
27. *Ayoung L.* // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2004. V. 318. № 3. P. 734–738.

Salicylic and Jasmonic Acids in Regulation of the Proantioxidant State in Wheat Leaves Infected by *Septoria nodorum* Berk.

L. G. Yarullina, N. B. Troshina, E. A. Cherepanova, E. A. Zaikina, and I. V. Maksimov

Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia
e-mail: yarullina@bk.ru

Received December 9, 2010

Abstract—Influence of mediators of the signal systems of salicylic (SA) and jasmonic (JA) acids and their mixture on reactive oxygen species' (ROS) (superoxide radical $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2) generation and activity of oxidoreductases (oxalate oxidase, peroxidase and catalase) in leaves of wheat *Triticum aestivum* L. infected by Septoria leaf blotch pathogen *Septoria nodorum* Berk. has been studied. Presowing treatment of seeds by SA and JA decreased the development rate of fungus on wheat leaves. SA provided earlier inductive effect on production of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 compared with JA. The protective effect of the salicylic and jasmonic acids against Septoria leaf blotch pathogen was caused by activation of oxalate oxidase, induction of anion and cation peroxidases, and decrease of catalase activity. Ability of compounds to stimulate ROS in the plant tissues can be used as criteria for evaluation of immune-modulating activity of new substances for protection of the plants.

UDC 577.156.2

APPLICATION OF STANDARD ADDITION FOR THE DETERMINATION OF CARBOXYPEPTIDASE ACTIVITY IN *Actinomucor elegans* BRAN KOJI

© 2011 J. Fu^{*,**}, L. Li^{*}, X. Q. Yang^{*}, M. J. Zhu^{***}

^{*}Research and Development Center of Food Proteins, College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou, 510641, China

^{**}Bio-resources Key Laboratory of Shaanxi Province, Shanxi University of Technology, Hanzhong, 723001, China

^{***}College of Bioscience and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou, 510006, China
e-mail: lili@scut.edu.cn

Received December 15, 2010

Leucine carboxypeptidase (EC 3.4.16) activity in *Actinomucor elegans* bran koji was investigated via absorbance at 507 nm after stained by Cd-ninhydrin solution, with calibration curve A, which was made by a set of known concentration standard leucine, calibration B, which was made by three sets of known concentration standard leucine solutions with the addition of three concentrations inactive crude enzyme extract, and calibration C, which was made by three sets of known concentration standard leucine solutions with the addition of three concentrations crude enzyme extract. The results indicated that application of pure amino acid standard curve was not a suitable way to determine carboxypeptidase in complicate mixture, and it probably led to overestimated carboxypeptidase activity. It was found that addition of crude exact into pure amino acid standard curve had a significant difference from pure amino acid standard curve method ($p < 0.05$). There was no significant enzyme activity difference ($p > 0.05$) between addition of active crude exact and addition of inactive crude kind, when the proper dilute multiple was used. It was concluded that the addition of crude enzyme extract to the calibration was needed to eliminate the interference of free amino acids and related compounds presented in crude enzyme extract.

The basic system for detecting carboxypeptidase activity includes two steps: the first peptide bond from the carbon termini was broken and resulted in the release of a free amino acid. The released free amino acid was detected by colorimetric ninhydrin method, the quantity of the released free amino acids per unit time was then calculated and regarded as carboxypeptidase activity, the more the free amino acids were released, the higher the enzyme activities were obtained.

Most of the compounds with α -NH₂ acid could easily react with ninhydrin. Classic colorimetric ninhydrin methods to detect amino acids and related compounds were developed and Modified by Moore and Stein [1, 2]. There were several modified methods about detection of free amino acids formed during certain reaction, but most of them need special precision instrument such as chromatography [3], electrochemiluminescence [4] or fluorophotometer [5] or some special reagents or substrate [6, 7], couple enzyme [8] or unsafe reducing reagent [9], and some modified method was only limited to assay certain amino acid [10], so the above procedures were cost- and time- consuming to some extent, especially without broad application. On the base of conventional methods, Dio et al. in 1981 reported that modified colorimetric Cd-ninhydrin methods was suitable for the determination of peptidase activities on peptides, because Cd-ninhydrin was more sensitive to and selective for amino acids, comparing with peptides [11]. To

date, several explorations have been performed to assay the formation of free amino acids and to assay the carboxypeptidase activity during cheeses proteolysis using modified Cd-ninhydrin method [12–14]. However, application of modified Cd-ninhydrin method was still not capable to assure sensitive or objective for the assay of certain carboxypeptidase in crude extract without purification for there were large amount of free ammonia, primary and secondary amines of protein, peptides and free amino acids presented in the crude enzyme extract which came from the culture media such as bran koji and cheese, and consequently interfered with the detection of the free amino acid generated by the action of carboxypeptidase on specific substrate peptide. Therefore, there was still no precise method for the determination of carboxypeptidase activity in crude microbial culture.

Carboxypeptidase (EC 3.4.16) is a useful tool to eliminate the bitterness presented in protein hydrolysate or some fermented foods which were mainly derived from soybean protein [15–17] and casein [18]. On our previous research, we found that the bitterness of the soybean protein hydrolysate was significantly decreased after treatment of *Actinomucor elegans* extract, which had the carboxypeptidase activity [19]. In order to explore the role of the carboxypeptidase from this mucor in the bitterness decreasing function and the characteristic of the enzyme, it was of great importance that the carboxypeptidase activity assay method

should be objective and accurate. However, complicated compounds presented in crude enzyme extract would give high color yield background according to our preliminary experiment.

Standard addition was frequently used in atomic absorption spectroscopy [20] and gas chromatography [21] and can be applied to most analytical techniques to solve the matrix effect problem [22]. On present research, several sets of leucine calibration curves with the addition of crude enzyme solution were made to assay carboxypeptidase activity in *Actinomucor elegans* crude enzyme extract to meet the demand of analytic precise.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Z-Trp-Leu (N-Carbobenzoxy-Trp-Leu) was purchased from Bachem Inc., (USA); Z-Ala-Leu (N-Carbobenzoxy-Ala-Leu), Z-Phe-Leu (N-Carbobenzoxy-Phe-Leu) and ninhydrin were obtained from Sigma Chemical Co. (USA); L-leucine was purchased from Beijing Dingguo Biotechnology Co. (China).

Leucine (2.0 mM) in distilled water was served as standard amino acid solution in this experiment. Substrates of Z-Trp-Leu, Z-Ala-Leu and Z-Phe-Leu were dissolved in pH 7.0, 0.1 M/l potassium phosphate buffer to a final concentration of 2.0 mM/l. 0.8 g ninhydrin was dissolved in a mixture of 80 ml of 99.5% ethanol and 10 ml of acetic acid, and 1.0 g CdCl₂ was dissolved in 1 ml water, after both of the reagent were fully dissolved, they were mixed and kept in brown reagent bottle at room temperature [9].

Sample. Culture and culture conditions. *Actinomucor elegans* AS3.2778 was generously provided by Wang Zhihe Sufu Co. (Beijing, China). The inoculum culture was prepared by inoculating the *A. elegans* spores with an inoculating needle from a slope culture into the tofu cake medium in a 250 ml flask, which was previously sterilized at 121°C for 15 min. The culture was incubated at 28°C for 72 h. The spore suspension was prepared by suspending the contents of inoculum culture into 100 ml sterile water. Wheat bran (10 g) with water (12 ml) in a 250 ml flask was autoclaved for 45 min at 121 °C. After the spore suspension (2 ml; containing about 3 × 10⁶ viable propagules/ml) was uniformly dispensed into the wheat bran medium in the flasks, the flask containers were then incubated at 28°C for 2 days.

Crude enzyme extract. After incubation, the solid mould medium was mixed thoroughly with 100 ml sterile distilled water and left to soak at 4°C overnight. The fermented extract was then squeezed out through a cheese cloth and centrifuged at 4020 g and 4°C (Hitachi CR 22G, Japan) to remove the insoluble. The clear supernatant of the extract was the crude enzyme extract.

Dilute enzyme solutions with different concentrations for enzyme-substrate reaction. 8.0, 2.0 and 1.0 ml fresh crude enzyme extract was diluted with pH 7.0, 0.1 M potassium phosphate buffer to 10.0 ml in volumetric

flasks separately to prepare 1.25, 5 and 10 dilute folds of crude enzyme extract, then half (5 ml) of the dilute enzyme extracts were transferred to another 3 tubes which were then put into boiling water and kept for 5 min to prepare 1.25, 5 and 10 folds inactive dilute crude enzyme extract.

Dilute enzyme extract with different concentrations for calibration curves making. 200.0, 50.0 and 25.0 µl fresh crude enzyme extract was diluted with pH 7.0, 0.1 M potassium phosphate buffer to 10 ml in volumetric flasks separately to prepare 50, 200 and 400 folds dilute crude enzyme extract (the dilute folds were calculated according to the dilute folds for enzyme-substrate reaction), then half (5 ml) of the dilute enzyme extracts were transferred to another 3 tubes which were then put into boiling water and kept for 5 min to prepare 50, 200 and 400 folds inactive dilute crude enzyme extract.

Procedure. Determination of carboxypeptidase activities. The reaction mixture, consisting of 1.8 ml substrate solution (2.0 mM) and 0.2 ml diluted crude enzyme extracts which were provided by three dilute solutions: 1.25, 5.0 and 10.0 respectively, was incubated at 37°C for up to 6 h. Aliquots (50.0 µl) were taken and mixed with 950 µl distilled water and 2.0 ml Cd-ninhydrin reagent, then incubated at 84°C for 5 min, amino acids were assayed by measuring the absorbance at 507 nm and calculated according to the calibration curves. The blank consisted of 1 ml H₂O and 2 ml Cd-ninhydrin reagent and monitored under the same incubation conditions. The carboxypeptidase activity was expressed as µmol of leucine h⁻¹ ml⁻¹ crude enzyme extract.

Preparation of calibration curves. Calibration curve A was made in the conventional standard curve way. 0, 12.5, 25, 37.5, 50, 62.5, 75 µl leucine solution (2.0 mM) was transferred to a set of tubes separately, and mixed with 1000, 987.5, 975, 962.5, 950, 937.5, 925 µl distilled water in turn. The final leucine concentration of the set was 0, 25, 50, 75, 100, 125 and 150 µM which was stained by 2.0 ml Cd-ninhydrin reagent respectively and the absorbance was read at 507 nm. The blank consisted of 1 ml H₂O and 2 ml Cd-ninhydrin reagent. The Calibration curve A was made according to the leucine concentration and absorbance at 507 nm which was showed in Fig. 1.

Calibration curve B was made with the addition of inactive dilute crude enzyme extract. 0, 12.5, 25, 37.5, 50, 62.5, 75 µl leucine solution (2.0 mM) was transferred to a set of tubes separately, then 200 µl of diluted inactive crude enzyme solution was added into each tube, and mixed with 800, 787.5, 775, 762.5, 750, 737.5, 725 µl distilled water in turn. The final Leu concentration of the set was 0, 25, 50, 75, 100, 125 and 150 µmol/l which was stained by 2.0 ml Cd-ninhydrin reagent respectively and the absorbance was read at 507 nm. The blank I consisted of 1 ml H₂O and 2 ml Cd-ninhydrin reagent. Calibration a, b and c were showed in Fig. 2.

Calibration curve C was made with the addition of active dilute crude enzyme extract. 0, 12.5, 25, 37.5,

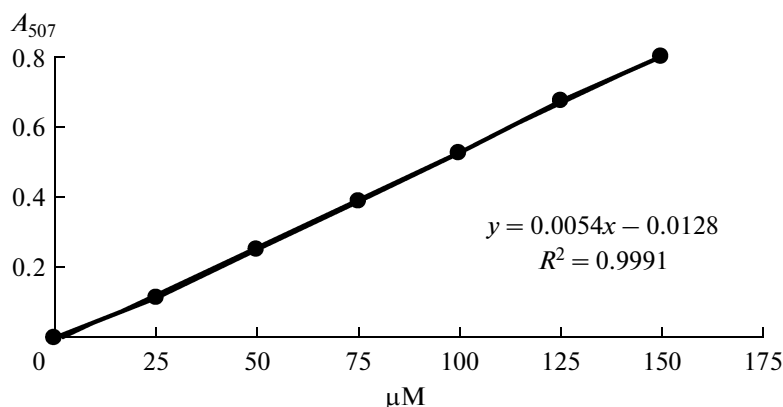


Fig. 1. Calibration curve A: A_{507} vs. leucine ($\mu\text{mol/l}$).

2.0 mM leucine was diluted to a set of concentration in the range of 0–150.0 μM with distilled water, to 1.0 ml of final volume, then 2.0 ml Cd-ninhydrin reagent was added to the leucine solutions respectively.

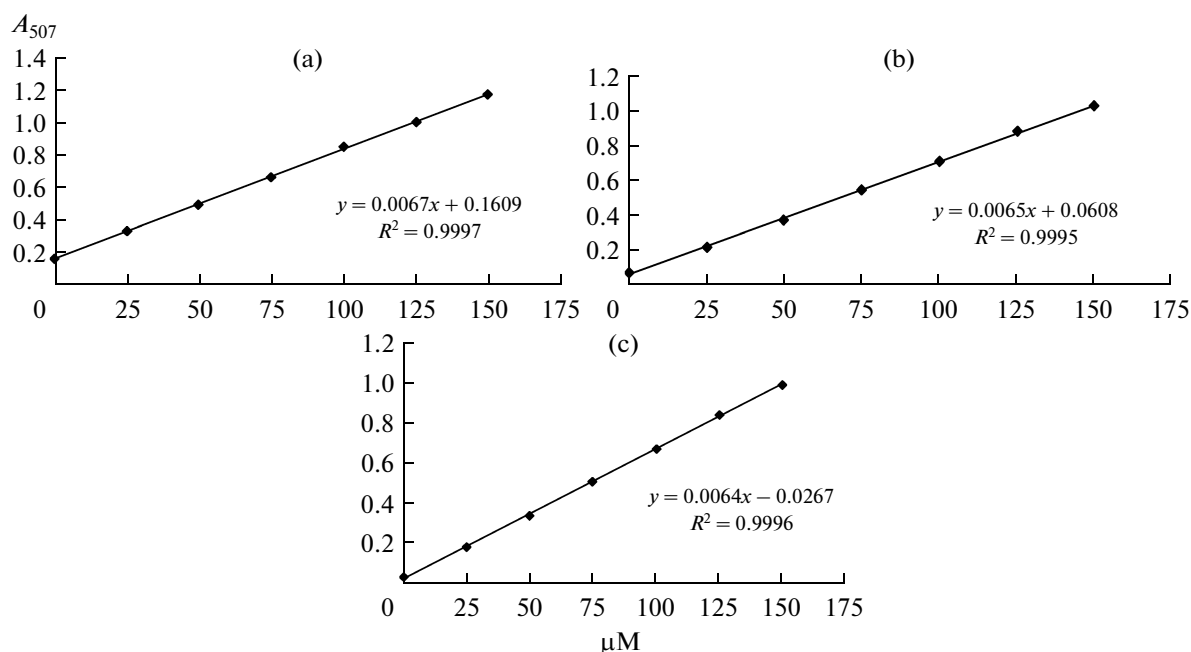


Fig. 2. Calibration curves B: A_{507} vs. leucine (μM) with the addition of inactive crude enzyme.

2.0 mM leucine was diluted to 3 sets of concentration in the range of 0–150.0 μM with 200.0 μl three concentrations dilute inactive crude enzyme extract (diluent fold was 50, 200, or 400 respectively) and distilled water, to 1.0 ml of final volume. Dilute multiple of the inactive crude enzyme extract was 50 (a), 200 (b), 400 (c).

50, 62.5, 75 μl leucine solution (2.0 mmol/l) was transferred to a set of tubes separately, then 200 μl of diluted active crude enzyme solution was added into each tube, and mixed with 800, 787.5, 775, 762.5, 750, 737.5, 725 μl distilled water in turn. The final Leu concentration of the set was 0, 25, 50, 75, 100, 125 and 150 $\mu\text{mol/l}$ which was stained by 2.0 ml Cd-ninhydrin reagent respectively and the absorbance was read at 507 nm. The blank consisted of 1 ml H₂O and 2 ml Cd-ninhydrin reagent. (As on Figs. 1 and 2). Calibration C (a–c) were showed in Fig. 3.

Statistical analysis. All the tests were done 3 times and the data were averaged. Standard deviation was also calculated. SAS V.9.0 was used to evaluate significantly different ($p < 0.05$) means for each sample.

RESULTS AND DISCUSSION

Differences among Calibration curve A, calibration curve B and calibration curve C. Figure 1 showed the calibration curve A which was the general linear relationship between leucine concentration and absorbance, the

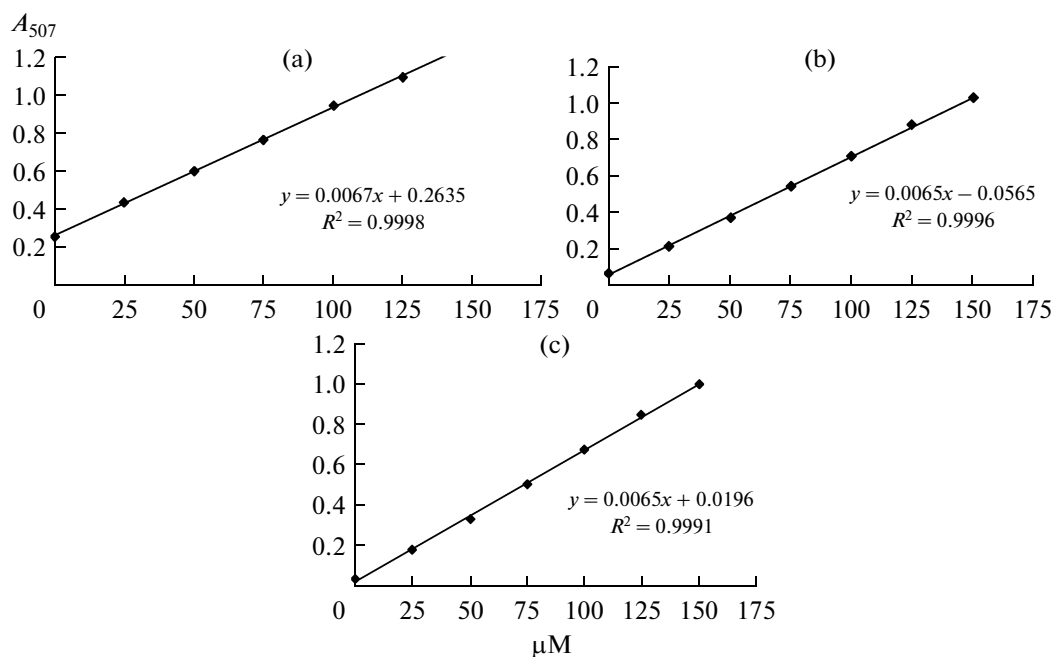


Fig. 3. Calibration curves C: A_{507nm} vs. leucine (μM) with the addition of active crude enzyme.

2.0 mM leucine was diluted to 3 sets of concentration in the range of 0–150.0 μM with 200.0 μl three concentrations dilute crude enzyme extract (diluent fold was 50, 200, or 400 respectively) and distilled water, to 1.0 ml of final volume. Dilute multiple of the active crude enzyme extract was 50 (a), 200 (b), 400 (c).

equation was $y = 0.0054x - 0.0128$ which meant that the slope was 0.0054 and the intercept was -0.0128 . Figure 2 showed that the linear relationships were obtained between increasing concentrations of leucine and their color yields with the addition of three concentrations of inactive crude enzyme extract, in which a was $y = 0.0067x + 0.1609$ when the enzyme was diluted by 50 times, b was $y = 0.0065x + 0.0608$ when the enzyme was diluted by 200 times, c was $y = 0.0064x + 0.0267$ when the enzyme was diluted by 400 times (the dilute multiple of enzyme here was corresponding to the dilute multiple of enzyme–substrate reaction), the results indicated that the slopes of the three set of calibration curves were nearly the same but the intercepts were different which gradually became small when the dilute multiple of enzyme was big. Figure 3 showed that the linear relationships were obtained between increasing concentrations of leucine and their color yields with the addition of three concentrations of active crude enzyme extract, in which a was $y = 0.0067x + 0.2635$ when the enzyme was diluted by 50 times, b was $y = 0.0065x + 0.0565$ when the enzyme was diluted by 200 times, c was $y = 0.0065x + 0.0196$ when the enzyme was diluted by 400 times, the results suggested that the slopes of the three sets of calibration curves were nearly the same but the intercepts were different too. These results indicated that the addition of crude enzyme extract did greatly affect the color yield no matter whether the enzyme was active or inactive.

Absorbance after enzyme–substrate reaction and stain reaction. Table 1 showed the absorbance at 507 nm after

enzyme–substrate reaction and followed stain reaction with Cd-ninhydrin, the results indicated that the absorbance was different when different enzyme concentrations were used, and it was also found that the color yield was still high even though the inactive crude enzyme extract was used as blank under the same determination condition suggesting that the crude enzyme extract itself had great influence on the color yield.

Carboxypeptidase activities. Table 2 showed the carboxypeptidase activities which were calculated according to different calibration curves, the results indicated that the calibration curves had great influence on the carboxypeptidase activity. Calibration curve A was responsible for the highest carboxypeptidase activities for all substrates because it was a pure leucine standard curve. Using such a curve, the yield color was considered to be from one source, that is, leucine was liberated from the C-terminal of Z-Xaa-Leu substrate during the enzyme–substrate reaction. However, certain unknown components in crude enzyme extract had chance to react with Cd-ninhydrin reagent and increase color development, consequently, carboxypeptidase activities could be overestimated if calibration curve A was utilized; It was a common method that an inactive enzyme was utilized to replace the active enzyme as a blank to minimize the influence of sample components which had possibility to increase the color yield under the same enzyme–substrate reaction condition and the determination condition, but the data from Table 2 indicated that the enzyme activity

Table 1. A_{507} after enzyme-substrate reaction and followed stain reaction with Cd-ninhydrin

Substrate	Diluent fold	* $A_{507\text{nm}}$	** $A_{507\text{nm}}$ of inactive enzyme	*** $\Delta A_{507\text{nm}}$	
Z-Phe-Leu	1.25	0.858	0.294	0.564	
		0.836	0.279	0.557	
		0.851	0.309	0.542	
	5	0.473	0.070	0.402	
		0.487	0.071	0.416	
		0.493	0.071	0.422	
		0.225	0.020	0.205	
		10	0.245	0.034	0.211
			0.239	0.023	0.216
Z-Trp-Leu	1.25	0.799	0.293	0.506	
		0.793	0.290	0.500	
		0.790	0.296	0.497	
	5	0.228	0.067	0.161	
		0.220	0.065	0.155	
		0.222	0.069	0.153	
		0.096	0.030	0.063	
	10	0.093	0.036	0.060	
		0.100	0.033	0.067	
Z-Ala-Leu	1.25	0.451	0.263	0.188	
		0.448	0.266	0.182	
		0.445	0.260	0.185	
	5	0.109	0.063	0.046	
		0.113	0.061	0.050	
		0.114	0.066	0.051	
		0.056	0.029	0.026	
	10	0.054	0.030	0.024	
		0.063	0.030	0.033	

* $A_{507\text{nm}}$: Absorbance at 507 nm from solution of active crude enzyme and substrate, colored by Cd-ninhydrin reagent.

** $A_{507\text{nm}}$ of inactive enzyme: Absorbance at 507 nm from solution of inactive crude enzyme and substrate, colored by Cd-ninhydrin reagent.

*** $\Delta A_{507\text{nm}} = {}^1A_{507\text{nm}} - {}^2A_{507\text{nm}}$.

calculated with this method was still higher than the enzyme activity calculated with calibration curve B and calibration curve C suggesting that this method could not eliminate the influence effectively; There was no significant difference between the enzyme activity calculated with calibration curve B and the enzyme activity calculated with calibration curve C when proper dilute multiple of enzyme was applied, suggesting that the standard addition method was needed to

eliminate the influence of background of crude enzyme extract on the activity determination.

Effect of enzyme dilute folds on absorbance and carboxypeptidase activity. The determination of enzyme activity was usually affected by dilute folds, as displayed in Tables 1 and 2. As could be seen from the results of substrate Z-Phe-Leu, the absorbance value was high when the enzyme was diluted 1.25 times, while the enzyme activity was so low, but there was no

Table 2. Carboxypeptidase activities* in *Actinomucor elegans* crude enzyme extract calculated by calibration curve A, calibration curve B and calibration curve C

Substrate	Diluent fold	Calibration curve A	**Calibration curve A (ΔA_{507nm})	Calibration curve B	Calibration curve C
Z-Phe-Leu	1.25	6.65 ± 0.09	4.62 ± 0.09	4.28 ± 0.07	3.61 ± 0.05
	5	15.34 ± 0.32	13.18 ± 0.32	10.86 ± 0.26	10.97 ± 0.26
	10	15.89 ± 0.34	13.86 ± 0.34	11.35 ± 0.29	10.54 ± 0.29
Z-Trp-Leu	1.25	6.22 ± 0.04	4.20 ± 0.03	3.94 ± 0.03	3.30 ± 0.03
	5	7.29 ± 0.12	5.13 ± 0.13	4.17 ± 0.11	4.28 ± 0.11
	10	6.74 ± 0.22	4.70 ± 0.22	4.17 ± 0.18	3.93 ± 0.18
Z-Ala-Leu	1.25	3.56 ± 0.03	1.53 ± 0.02	1.79 ± 0.02	1.15 ± 0.02
	5	3.85 ± 0.08	1.91 ± 0.09	1.31 ± 0.06	1.42 ± 0.06
	10	4.35 ± 0.29	2.50 ± 0.29	2.19 ± 0.24	1.95 ± 0.25

* Carboxypeptidase activities expressed as μmol of leucine $\text{h}^{-1} \text{ml}^{-1}$ of the *A. elegans* extract.

** Carboxypeptidase activities calculated by calibration curve A and ΔA_{507nm} ; $\Delta A_{507nm} = A_{507nm}$ after enzymatic reaction between active crude enzyme and substrate – A_{507nm} after enzymatic reaction between inactive crude enzyme and substrate.

significant difference between the enzyme activity monitored using 5 times dilution enzyme solution and the enzyme activity monitored using 10 times dilution enzyme solution, because both of the dilute folds were all suitable for the enzyme-substrate reaction of this substrate. The carboxypeptidase activity for substrate Z-Trp-Leu and Z-Ala-Leu further obtained from Table 2 conformed that there were at least 2 times of dilute folds were suitable for the determination of enzyme activity which has already been applied on the peptidase activity determination [11].

The results obtained from present study indicated that the standard addition method was necessary for the determination of carboxypeptidase in *Actinomucor elegans* bran koji, and maybe suitable for the determination of other enzyme activity in crude extract without purification to meet the demand of precision and objectivity.

ACKNOWLEDGEMENTS

This Project was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 30770056).

REFERENCES

- Moore, S. and Stein, W.H., *J. Biol. Chem.*, 1948, vol. 176, pp. 367–388.
- Moore, S. and Stein, W.H., *J. Biol. Chem.*, 1954, vol. 211, pp. 907–913.
- Chikuma, T., Kishii, M., Taguchi, K., Yajima, R., Kato, T., Loh, Y.P., Ishii, Y., and Tanaka, A., *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 1997, vol. 703, pp. 45–51.
- Mao, S.S., Colussi, D., Bailey, C., Bosserman, M.M., Burlein, C., Gardell, S.J., and Carroll, S.S., *Anal. Biochem.*, 2003, vol. 319, pp. 159–170.
- Banerjee, S., Kaplan, H., Yagodnik, C., Breuil, C., and Brown, D.L., *Biotechnol. Tech.*, 1995, vol. 9, pp. 241–246.
- Heylen, E., Augustyns, K., and Hendriks, D., *Anal. Biochem.*, 2010, vol. 403, pp. 114–116.
- Hendriks, D., Scharpe, S., Sande, van M., Lommaert, M.-P., and Kasahara, Y., *Anal. Biochem.*, 1987, vol. 164, pp. 90–95.
- Logan, D.A. and Disanto, M.E., *Arch. Microbiol.*, 1992, vol. 155, pp. 492–498.
- Yemm, E.W. and Cocking, E.C., *Analyst (Cambridge, U. K.)*, 1955, vol. 80, pp. 209–214.
- Yokoyama, S. and Hramatsu, J.I., *J. Biosci. Bioeng.*, 2003, vol. 95, pp. 204–205.
- Doi, E., Shibata, D., and Matoba, T., *Anal. Biochem.*, 1981, vol. 118, pp. 173–184.
- Baer, A., Ryba, I., Meyer, J., and Bütikofer, U., *Lebensm. Wiss. Technol.*, 1996, vol. 29, pp. 58–62.
- Macedo, A.C., Vieira, M., Pocas, R., and Malcata, F.X., *Int. Dairy J.*, 2000, vol. 10, pp. 769–774.
- Folkertsma, B. and Fox, P.F., *J. Dairy Res.* 1992, vol. 59, pp. 217–224.
- Liu, F. and Yasuda, M., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, vol. 32, pp. 487–489.
- Arai, S., Yamashita, M., Kato, H., and Fujimaki, M., *J. Food Sci.*, 1970, vol. 35, pp. 392–395.
- Komai, T., Kawabata, C., Tojo, H., Gocho, S., and Ichishima, E., *Fisheries Sci.*, 2007, vol. 73, pp. 404–411.
- Umetsu, H., Matsuoka, H., and Ichishima, E., *J. Agric. Food Chem.*, 1983, no. 31, pp. 50–53.
- Li, L., Yang, Z.Y., Yang, X.Q., Zhang, G.H., Tang, S.Z., and Chen, F., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol. 35, pp. 41–47.
- Ozcan, M. and Akman, S., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2005, vol. 60, pp. 399–402.
- Zhu, Y.H., Li, G.R., Duan, Y.P., Chen, S.Q., Zhang, C., and Li, Y.F., *Food Chem.*, 2008, vol. 109, pp. 899–908.
- Ito, S. and Tsukada, K., *J. Chromatogr. A*, 2002, vol. 943, pp. 39–46.

ПОЗДРАВЛЯЕМ ЛЕНУ ИВАНОВНУ ВОРОБЬЁВУ С ЮБИЛЕЕМ



1 июня 2011 г. отметила свой юбилей доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова Лена Ивановна Воробьева.

Лена Ивановна Воробьева — один из ведущих ученых российской науки в области общей и промышленной микробиологии, физиологии и биохимии бактерий, Соросовский профессор, лауреат конкурса “Грант Москвы” в области естественных наук, почетный работник высшего профессионального образования, член Международного комитета “Food Micro” и национальный представитель Международного комитета по пищевой микробиологии и гигиене, награждена Международной премией “За вклад в науку” (2002 г., Цюрих).

Лена Ивановна окончила биолого-почвенный факультет МГУ, кафедру микробиологии, затем аспирантуру в Институте микробиологии АН СССР, защитив в 1958 г. кандидатскую диссертацию. С 1958 по 1963 гг. работала в том же институте научным сотрудником. В 1963 г. была приглашена на должность доцента кафедры микробиологии МГУ им. М.В. Ломоносова, где работает в течение 48 лет по настоящее время, успешно совмещая преподавательскую работу с научной. В 1973 г. защитила докторскую диссертацию и получила звание профессора кафедры. С 1983 г. в течение 25 лет Лена Ивановна читала курс “Общая микробиология” для студентов биологического факультета и спецкурсы “Промышленная микро-

биология”, “Микробиологический синтез витаминов”, “Археи” студентам кафедры.

Эти курсы лекций прочитаны также в Пермском государственном университете в 1992 г., на Кубе для преподавателей Гаванского университета в 1987–1989 гг., в Словакии — студентам Политехнического Института Братиславы в 1987 и в 1989 гг., в Индии курс лекций “Биотехнология” был прочитан студентам университета г. Дели в 1990 г.

Л.И. Воробьева — автор 8 книг, включая 4 учебных пособия и 4 монографии, и 235 научных статей. Монография “*Propionibacteria*” (290 с.) написана на английском языке и издана в Нидерландах (Kluwer Academic Publishers) в 1999 г. В 2007 г. ею была опубликована первая книга об археях (“Археи”, Академкнига, 450 с.).

Под руководством профессора Л.И. Воробьевой создана научная школа микробиологов-физиологов. Эту школу прошли более 70 дипломников и 33 аспиранта, защитившие кандидатские диссертации. Два сотрудника Воробьевой Л.И. стали докторами наук, ее бывшие ученики работают как в России, так и в Канаде, Египте, Иране, США, Индии, во Вьетнаме.

Более 40 лет научной деятельности профессора Л.И. Воробьевой связано с изучением пропионовокислых бактерий. Кафедра микробиологии, благодаря проводимым под ее руководством исследованиям, стала известным в мире центром по изучению этой уникальной формы жизни.

Л.И. Воробьева — один из немногих в стране специалистов в области микробного синтеза витаминов. Ее исследования в области биосинтеза витамина B_{12} известны как в нашей стране, так и за рубежом и суммированы в монографии “Пропионовокислые бактерии и образование витамина B_{12} ”, а также и в учебном пособии “Микробиологический синтез витаминов”.

Открыты новые функции витамина B_{12} . На основании проведенных исследований Л.И. Воробьевой создана концепция, сущность которой состоит в том, что метаболизм пропионовых бактерий настроен на высокий уровень витамина B_{12} в клетках, который служит не только кофактором в брожении, но и, что впервые было продемонстрировано, участвует также в важнейших реакциях конструктивного обмена: в репликации ДНК, синтезе рибонуклеотид-редуктазы, защите тиоловых групп ферментов от окисления и клеток от УФ-облучения. Вместе с тем установлено, что пропионовые бактерии имеют аль-

тернативные B_{12} -независимые системы синтеза метионина, ДНК, стабилизации тиоловых групп, что допускает адаптацию к таким условиям, когда синтез корриноидов невозможен. Развитие исследований привело автора к открытию нового явления в микробиологии, имеющего аналогию с эффектом Пастера, но касающегося не энергетических, а конструктивных процессов в клетке.

Штамм—суперпродуцент витамина B_{12} был передан в производство для промышленного получения витамина. Специально селекционированные штаммы пропионовых бактерий используются в составе заквасок в производстве крупных сыров и в хлебопечении. Обнаружены также активные продуценты биотина и предложен оригинальный микробиологический промышленный способ его получения для нужд животноводства.

В последние годы профессор Л.И. Воробьева руководит работами по изучению антимутагенных и реактивирующих свойств бактерий. Антимутагенные свойства бактерий ранее никем не изучались. В ее работах установлено, что антимутагенез ряда бактерий проявляется против мутагена, индуцированного мутагенами с различным механизмом действия и связан с участием внеклеточного белка. Впервые показано, что бактерии и низшие эукариоты проявляют не только протекторное, но также реактивирующее перекрестное действие в отношении клеток, подвер-

гаемых воздействию различных стрессорных факторов, что связано с участием внеклеточного сигнального полипептида.

Полученные результаты и проводимые исследования имеют фундаментальное значение для понимания защитных и адаптационных реакций у микроорганизмов и вносят вклад в биотехнологию и профилактику здоровья людей.

Свыше 10 лет Л.И. Воробьева работала в качестве председателя секции “Физиология микроорганизмов” Микробиологического общества, являлась членом Научного совета ВАК, членом двух Ученых Советов по защите кандидатских и докторских диссертаций на Биологическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова и в государственном аграрном университете — МСХА им. К.А. Тимирязева.

В течение многих лет Лена Ивановна была активным членом редколлегии журнала “Прикладная биохимия и микробиология”.

Профессор Л.И. Воробьева — высококвалифицированный педагог и исследователь, организатор и воспитатель молодежи. И сегодня она полна творческой энергии и жизненных сил, по-прежнему продолжает исследования на современном научном уровне, подавая пример молодым специалистам честного творческого отношения к делу.

Редколлегия