

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В ТЕХНОЛОГИЯХ ПЕРЕРАБОТКИ И УТИЛИЗАЦИИ ТЕХНОГЕННЫХ ОТХОДОВ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ (ОБЗОР) Куликова Н.А., Кляйн О.И., Степанова Е.В., Королёва О.В.	619	15
<input type="checkbox"/>	ГИСТОНОПОДОБНЫЕ БЕЛКИ БАКТЕРИЙ (ОБЗОР) Анучин А.М., Гончаренко А.В., Демидёнок О.И., Капрельянц А.С.	635	0
<input type="checkbox"/>	CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF COMPLETE GENE ENCODING AN ALKALINE LIPASE FROM PENICILLIUM CYCLOPIUM Zhang H.M., Wu M.C., Guo J., Li J.F.	642	0
<input type="checkbox"/>	КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ STREPTOMYCES NOGALATER LV65 С ПОВЫШЕННЫМ УРОВНЕМ СИНТЕЗА НОГАЛАМИЦИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ Климишин Д.А., Рабык М.В., Грень Т.П., Нимець О.Я., Гончар М.А., Громыко А.Н., Федоренко В.А.	650	0
<input type="checkbox"/>	РАЗЛОЖЕНИЕ СМЕСИ (ТРИ-ГЕКСА) ХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ ШТАММАМИ РОДА RHODOCOCCLUS Егорова Д.О., Демаков В.А., Плотникова Е.Г.	655	5
<input type="checkbox"/>	БИОГИДРОМЕТАЛЛУРГИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ МЕДИ ИЗ СЛОЖНОГО МЕДНОГО КОНЦЕНТРАТА Муравьёв М.И., Фомченко Н.В., Кондратьева Т.Ф.	663	1
<input type="checkbox"/>	КОРРОЗИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ЕСТЕСТВЕННЫХ МИКРОБНЫХ АССОЦИАЦИЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ Родин В.Б., Жиглецова С.К., Жиркова Н.А., Александрова Н.В., Чугунов В.А., Холоденко В.П.	672	0
<input type="checkbox"/>	МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ (TRITICUM AESTIVUM L.) ПРИ ДЕЙСТВИИ БИОРЕГУЛЯТОРА СТИФУНА Яхин О.И., Лубянов А.А., Яхин И.А., Вахитов В.А., Ибрагимов Р.И., Юмагузин М.С., Калимуллина З.Ф.	679	3
<input type="checkbox"/>	ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ЭКСПРЕССНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМПИЦИЛЛИНА В МОЛОКЕ И КИСЛО-МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ Бызова Н.А., Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.	685	3
<input type="checkbox"/>	МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННЫЕ ГИДРОФИЛЬНЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ СОРБЦИИ ЭРИТРОМИЦИНА Ежова Н.М., Гаркушина И.С., Писарев О.А.	694	4
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА Местечкина Н.М., Безбородова О.А., Ильина А.В., Левов А.Н., Клеймёнов С.Ю., Немцова Е.Р., Якубовская Р.И., Щербухин В.Д., Варламов В.П.	699	3

УДК 582.264:577.158

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В ТЕХНОЛОГИЯХ ПЕРЕРАБОТКИ И УТИЛИЗАЦИИ ТЕХНОГЕННЫХ ОТХОДОВ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ (ОБЗОР)

© 2011 г. Н. А. Куликова**, О. И. Кляйн*, Е. В. Степанова*, О. В. Королёва*

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

e-mail: evst@inbi.ras.ru, koroleva@inbi.ras.ru

**Факультет почвоведения Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова Москва, 119992

Поступила в редакцию 16.12.2010 г.

В обзоре представлен анализ современных данных о механизмах деградации лигноцеллюлозных материалов и ксенобиотиков базидиальными грибами. Особое внимание уделено анализу современного состояния исследований лигнолитических ферментов и их участия в процессе деградации ксенобиотиков. Систематизированы данные о практическом использовании базидиомицетов для биоконверсии техногенных отходов. Рассмотрены наиболее перспективные направления технологии биоконверсии — очистка загрязненных вод (в том числе сточных), загрязненных ксенобиотиками и тяжелыми металлами почв, разложение труднодеградируемых субстратов: лигнина и лигнинцеллюлозных отходов, низкоэнергетических углей и синтетических полимеров.

Базидиомицеты — высшие грибы с многоклеточным мицелием, насчитывающие около 30 тыс. видов как микроскопических грибов, так и грибов с крупными плодовыми телами. Хотя базидиомицеты встречаются в самых разнообразных экосистемах, включая луга, степи, пустыни, наиболее широко они представлены в лесных экосистемах. Основная функция базидиомицетов в природе — разложение лигнина и целлюлозы, и именно эта способность привлекает пристальное внимание исследователей как с точки зрения понимания механизмов данного процесса, так с целью разработки биотехнологий утилизации древесных и растительных отходов [1–5].

Уникальной особенностью базидиомицетов является способность к синтезу экстрацеллюлярных ферментов: лигнинпероксидаз, Mn-пероксидаз, полифункциональных пероксидаз, лакказ, обладающих широкой субстратной специфичностью [6, 7], что позволяет им разлагать не только органические вещества природного происхождения, но и различные ксенобиотики. К наиболее опасным органическим поллютантам, разложение которых можно ускорить с помощью базидиомицетов, относятся полициклические ароматические углеводороды, хлорфенолы, полихлорированные бифенилы, пестициды и муниципальные отходы. Основные механизмы разложения ксенобиотиков базидиальными грибами к настоящему времени достаточно хорошо изучены, а применение базидиомицетов в качестве биологических агентов для переработки и утилизации техногенных образований и отходов освещено в

ряде обзоров [8, 9]. Тем не менее постоянно появляются новые данные, детализирующие механизмы разложения ксенобиотиков базидиомицетами, а также примеры использования как базидиомицетов, так и их лигнолитических ферментов для детоксификации и деградации загрязняющих веществ в различных отраслях промышленности.

Цель обзора — анализ современного состояния технологий биоконверсии лигноцеллюлозных материалов и ксенобиотиков базидиомицетами.

Основные пути трансформации лигноцеллюлозных материалов и ксенобиотиков базидиальными грибами. Исследование разложения лигноцеллюлозных материалов и ксенобиотиков грибами “белой гнили” показало возможность их использования в технологиях переработки и утилизации труднодеградируемых техногенных образований и отходов. Последние данные экспериментальных работ в данной области суммированы в ряде обзоров [2, 6–10]. Установлено, что процессы деградации лигноцеллюлозного материала и ксенобиотиков грибами “белой гнили” включают действие сложного мультиферментного комплекса, синтез которого зависит от субстрата, на котором растет гриб, его физиолого-биохимических особенностей и геномной организации. Эффективность деградации обеспечивается комбинацией внеклеточных лигнолитических ферментов, органических кислот, медиаторов и сопутствующих ферментов. Согласно современным представлениям существует три основных пути разложения природных полимеров и ксенобиотиков базидиомицетами: ферментативная деградация,

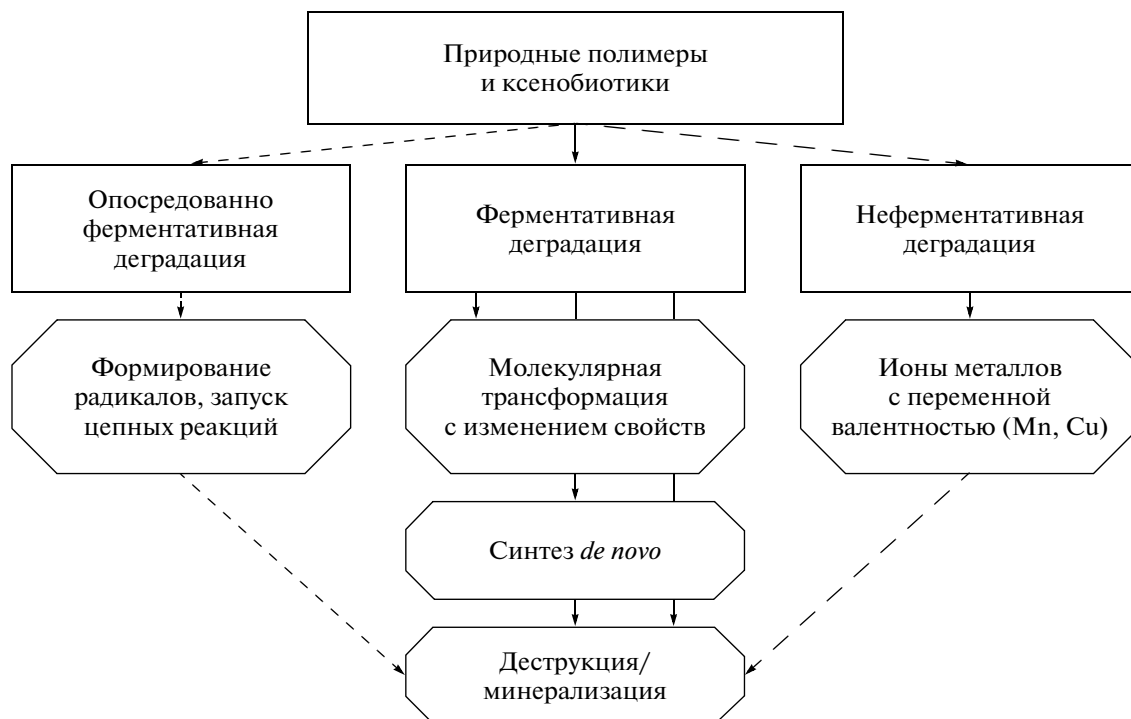


Рис. 1. Основные пути разложения природных полимеров и ксенобиотиков базидиомицетами.

опосредованно ферментативная и неферментативная деградация (рис. 1).

Каждый из перечисленных путей характеризуется наличием собственных механизмов разложения труднодеградируемых веществ. Ферментативный путь включает молекулярную трансформацию субстрата с изменением его свойств и полное разложение, а так же сопутствующий синтез соединений *de novo*. Опосредованная ферментативная деградация базируется на формировании радикалов в качестве основных и побочных продуктов ферментативных реакций с последующим запуском радикальных процессов. Неферментативная деградация осуществляется за счет реакционноспособных радикалов и ионов металлов переменной валентности. В природных условиях процессы деградации базидиомицетами являются многостадийными и реализуются, как правило, с участием всех перечисленных выше механизмов. Тем не менее, как ферментативная, так и опосредованная ферментативная деградация осуществляются преимущественно с участием оксидоредуктаз и гидролаз, что предопределяет значимость данных ферментов в деградации ксенобиотиков и биополимеров. Наибольшее практическое значение, на наш взгляд, имеет ферментативный путь разложения; примеры, подтверждающие данное предположение, будут рассмотрены ниже.

Характеристика лигнолитических ферментов базидиальных грибов. Базидиомицеты могут синтезировать множество внеклеточных ферментов, принимающих участие в процессе модификации и разру-

шения лигнина. В настоящее время общее название этих ферментов – лигниназы [2, 12], хотя ряд авторов относит этот термин к лигнинпероксидазе [10, 11]. Лигниназы могут быть разделены на 2 группы: фенолоксидазы – лакказы (ЛАК, КФ 1.10.3.2) и гемсодержащие пероксидазы, а именно лигнинпероксидаза (ЛП, КФ 1.11.1.14), марганецпероксидаза (МнП, КФ 1.11.1.13) и полифункциональная (*versatile*) пероксидаза (ПП, КФ 1.11.1.16) [11, 12]. Эти две группы ферментов различаются акцепторами электронов: молекулярный кислород для лакказы и пероксид водорода для гемовых пероксидаз (табл. 1).

Лигнинпероксидаза. ЛП представляет собой гликопротеин, содержащий 1 моль железопорфирина IX на 1 моль фермента и от 6 до 20% углеводов (табл. 1). Молекулярная масса (ММ) ЛП варьируется в диапазоне от 39–43 кДа, а изоэлектрические точки изоферментов от 3.0 до 4.5 [13, 14]. Впервые ЛП была обнаружена у *Phanerochaete chrysosporium* [15, 16] в 1983 г. В последующие годы установлено наличие ЛП у различных штаммов *P. chrysosporium* и *Trametes versicolor* [17]. Скрининг базидиомицетов показал наличие генов ЛП у *Panus* sp., *P. coccineus*, *P. sanguineus*, *Perenniporia medulla-panis* [18]. ЛП относительно неспецифична к субстратам – окисляет широкий круг ароматических субстратов фенольной природы и нефенольных компонентов лигнина с редокс-потенциалом до 1.4 В (относительно нормального водородного электрода) в присутствии пероксида водорода. Каталитический цикл ЛП сходен с таковыми для других гемовых пероксидаз (рис. 2).

Таблица 1. Общая характеристика литнолитических ферментов

Фермент	Структура активного центра	Локализация	Катализируемая реакция	ММ, кДа	Гликозилирование	pH-оптимум	Медиаторы	Ссылка []
ЛАК	Ансамбль из четырех ионов меди: Т-1 медный центр и медный кластер, состоящий из иона меди Т2 и антиферромагнитной пары Т3	Внутриклеточный и (или) внеклеточный фермент	$4 \text{ бензендиол} + \text{O}_2 = 4 \text{ бензосемихинон} + 2\text{H}_2\text{O}$	50–70	N-гликозилирование	2–10	АБТС, ГБТ, ТМПО, комплексы переходных металлов	[2], [21], [28], [31], [45]
ЛП	Железопропорфирин IX	Внеклеточный фермент	1. $\text{ЛП[Fe(III)]} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{ЛП-И[Fe(IV)]} = \text{O}^{*+} + \text{H}_2\text{O}$ 2. $\text{ЛП-И} + \text{АН} \rightarrow \text{ЛП-III[Fe(IV)]} = \text{O}^{*+} + \text{A}^{*+}$ $\text{ЛП-II} + \text{АН} \rightarrow \text{ЛП} + \text{A}^{*+}$	39–43	N-гликозилирование	1–5	Вератровый спирт	[8], [10], [11], [20], [21]
MnП	Железопропорфирин IX	Внеклеточный фермент	$\text{MnП} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{MnП-I} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{MnП-I} + \text{Mn}^{2+} = \text{MnП-II} + \text{Mn}^{3+}$ $\text{MnП-II} + \text{Mn}^{2+} = \text{MnП} + \text{Mn}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$	38–62.5	N-гликозилирование	2.5–6.5	Органические кислоты в качестве хелаторов, толы, ненасыщенные жирные кислоты	[2], [8], [10], [21]
ПП	Гем	Внеклеточный фермент	$\text{Донор} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{Донор (окисл)} + 2\text{H}_2\text{O}$	42–45	Тип гликозилирования не установлен	3–5	Те же вещества, что и для ЛП и MnП	[2], [8], [11], [29]

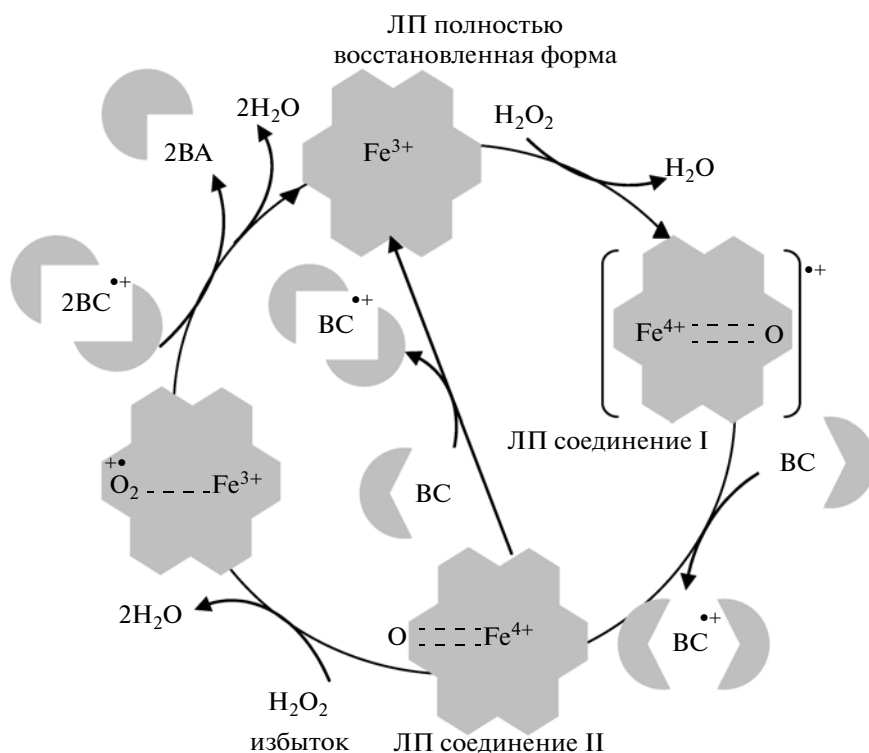


Рис. 2. Каталитический цикл ЛП.

Уникальной особенностью ЛП, отличающей ее от других пероксидаз, является способность окислять метоксилированные подструктуры лигнина с высокими редокс-потенциалами. Для фенольных субстратов скорость окисления выше, чем для нефенольных субстратов, причем в результате окисления образуются феноксильные радикалы. В присутствии кислорода феноксильные радикалы могут взаимодействовать с различными соединениями, приводя к разрыву ароматического кольца и/или полимеризации.

Особое значение для функционирования лигниназы имеет вератровый спирт, продуцируемый лигнинолитическими грибами как вторичный метаболит. Это соединение предохраняет лигниназу от инактивации пероксидом водорода, может индуцировать синтез фермента в культуральной жидкости и служить в качестве редокс-медиатора при окислении различных субстратов, в том числе и полимерного лигнина [19]. В процессе катализа образуются катион-радикалы вератрового спирта, обладающие высокой реакционной способностью и вступающие в неферментативные реакции.

В настоящее время установлена способность лигниназы катализировать следующие реакции [10–12]:

- расщепление С–С-связей в димерных моделях лигнина;
- окисление бензиловых спиртов;

- окисление метильных заместителей в бензильных соединениях;
- гидроксирование бензильных метильных групп;
- гидроксирование олефиновых связей;
- декарбоксилирование фенолуксусной кислоты;
- расщепление эфирных связей;
- раскрытие ароматического кольца;
- полимеризацию фенолов.

Кристаллическая структура ЛП показывает, что гемовая группа находится внутри структуры и соединяется с поверхностью канала, размер которого явно недостаточный для проникновения больших полимерных структур лигнина, однако вполне достаточный для проникновения малых молекул и их связывания [20].

Марганецпероксидаза. MnП также как ЛП представляет собой гликопротеин и содержит протогем IX (железопропорфирин IX), который легко отделяется от апофермента даже при электрофорезе в неденатурирующих условиях. ММ MnП колеблется в диапазоне от 38 до 62.5 кДа, но большинство очищенных ферментов имеют массу около 45 кДа [21]. Базидиомицеты продуцируют значительное число изоформ. Так, для грибного штамма *Ceriporiopsis subvermispora* описано 11 изоформ [22]. Значения изоэлектрических точек варьирует в пределах 2.5–6.8 [23].

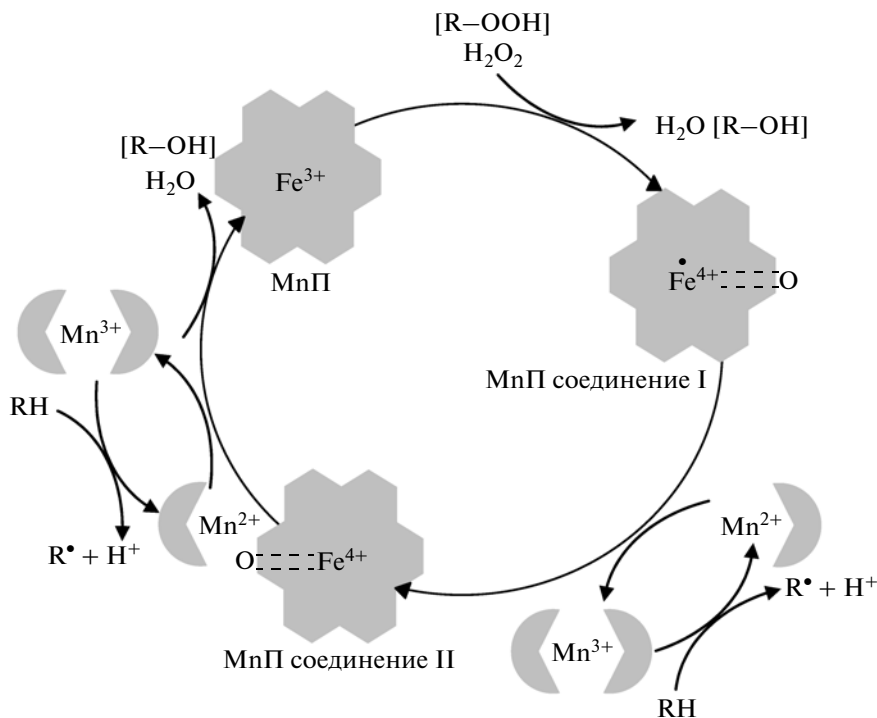


Рис. 3. Каталитический цикл MnP.

MnP образуется большинством грибов “белой гнили” (семейства *Polyporaceae*, *Meruliaceae*, *Coriolaceae*) и некоторыми грибами, обитающими на почвенной подстилке (семейства *Strophariaceae* и *Tricholomataceae*). В настоящее время известно уже 56 грибов – продуцентов MnP [23].

MnP катализирует окисление Mn²⁺ до Mn³⁺ в присутствии пероксида водорода. Каталитический цикл MnP в присутствии соответствующего хелатора (оксалат, малонат, малат, тартрат, лактат) ведет к образованию высоко реакционного Mn³⁺-хелатного комплекса, который способен окислять многие фенольные субстраты по одноэлектронному механизму, включая фенольные лигниновые соединения с образованием феноксирадикалов (рис. 3).

Реакция инициируется связыванием H₂O₂ с нативным ферментом и образованием железо-пероксидного комплекса. Последующий разрыв – O–O–связи приводит к переносу 2 электронов и образованию соединения I MnP, которое является Fe⁴⁺-оксо-порфирин-радикальным комплексом. Затем, после разрыва связи происходит образование одной молекулы воды. Дальнейшая реакция включает образование MnP соединения II (Fe⁴⁺-оксо-порфириновый комплекс). Монохелатированный ион Mn²⁺ действует как одноэлектронный донор для этого порфиринового комплекса и окисляется в Mn³⁺. Восстановление соединения II происходит аналогично, и другой ион Mn³⁺ образуется из Mn²⁺, приводя к образованию нативной формы фермента

и высвобождению второй молекулы воды. Ион Mn³⁺ стабилизируется органическими кислотами, такими как оксалат, и действует как низкомолекулярный редокс-медиатор, который атакует субстрат неспецифическим путем через отщепление иона водорода и одного электрона. Происходит окисление фенольных и аминокислотных соединений с образованием феноксильных и аминокислотных радикалов соответственно [23]. Окислительный потенциал комплекса Mn³⁺-хелатор недостаточен для окисления фенольных структур лигнина. Окисление нефенольных субстратов MnP может происходить только в присутствии второго редокс-медиатора с образованием реакционноспособных радикалов. Органические кислоты, такие как оксалат и малонат, действуют как такие редокс-медиаторы. В отсутствие ферментативной системы, генерирующей H₂O₂, образующиеся радикалы могут быть использованы MnP как источник пероксида водорода и повышать эффективность деградации лигнина грибом.

MnP способна катализировать реакции разрыва: в нефенольных структурах лигнина по связям C_α–C_β, алкил-арил и участвовать в C_α-окислении модельных структур лигнина сиригильного типа β–1. Кроме того, предполагают, что MnP окисляет нефенольные структуры лигнина путем образования высокоактивных радикалов из ненасыщенных жирных кислот, а также тиолов [24]. Наконец, в ряде работ было высказано предположение о возможном окислении нефенольных структур лигнина MnP после предваритель-

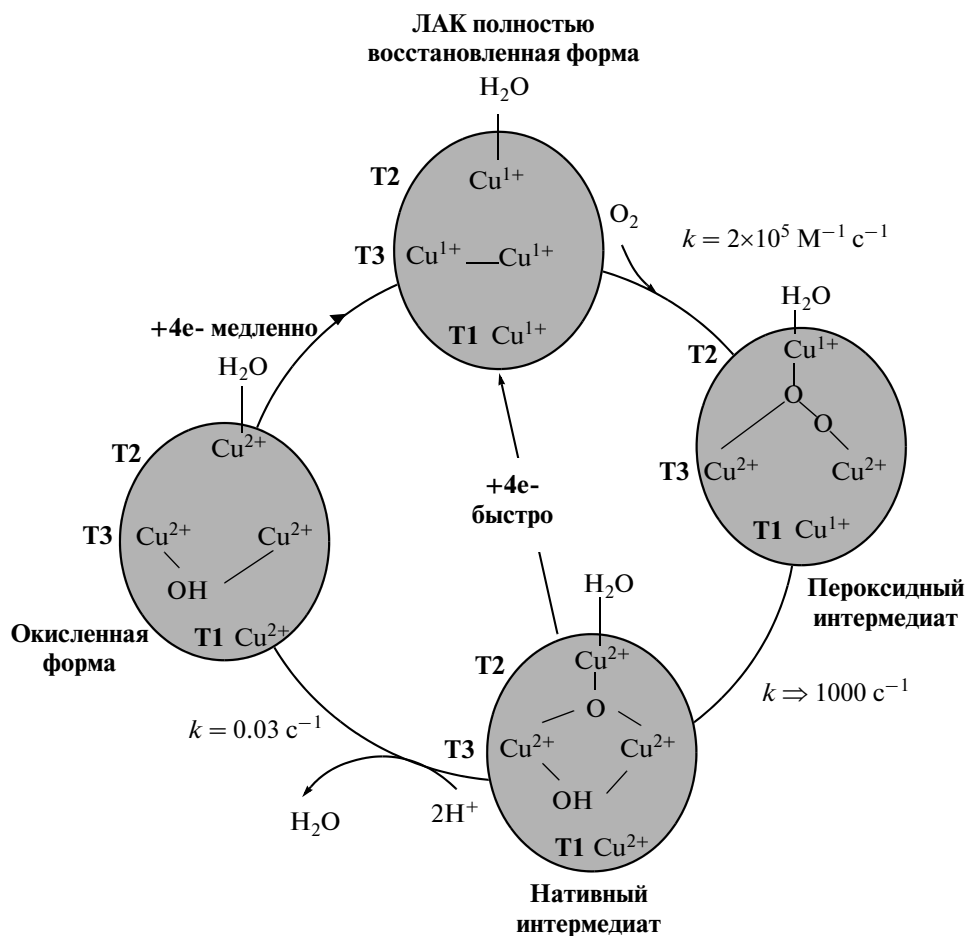


Рис. 4. Каталитический цикл лакказы [28].

ного отщепления метанола от ароматических колец молекул лигнина при участии целлюбиозодегидрогеназы [25].

Кристаллическая структура МнП, также как и строение активного центра (гема), имеет значительное сходство с ЛП. Основное отличие от классических пероксидаз и ЛП – наличие марганецсвязывающего сайта. Связанный Mn^{2+} координирован тремя аминокислотными остатками, остатком пропионата в положении б гема и атомами кислорода от двух молекул воды. Сайт связывания локализован на поверхности фермента и легко доступен [26].

Лакказа. ЛАК являются гликопротеинами, содержащими от 10 до 45% углеводов на молекулу фермента [27]. Многие исследователи считают, что углеводная часть молекулы обеспечивает конформационную стабильность белковой глобулы. ММ грибных лакказ составляет 50–70 кДа [28], изоэлектрические точки лежат обычно при рН 3–5 [23, 30, 31]. Лакказы были обнаружены в грибах, бактериях и насекомых [31], в настоящее время основным источником фермента, в том числе и для промышлен-

ных целей, являются грибы. Известно значительное количество грибов, продуцирующих этот фермент. К наиболее изученным следует отнести *Podospora anserina*, *Agaricus bisporus*, *Rhizoctonia praticola*, *Pholiota aegerita*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* [32], *Coriolus hirsutus* [33, 34], *Neurospora crassa* [35, 36]. Все грибные лакказы мономеры или димеры, кроме изоформы 1 *Podospora anserina*, которая, по-видимому, тетрамер. Большинство грибов продуцируют как внутри- так и внеклеточный фермент.

Семейство лакказ, открытых более столетия назад, по-прежнему остается предметом фундаментальных исследований, что обусловлено, прежде всего, отсутствием детального механизма действия фермента. Каталитический цикл (рис. 4) включает окисление субстрата – донора электронов и перенос электрона на Т1 центр фермента. После переноса 4 электронов с иона меди Т1 на кластер Т2/Т3 начинается последовательное восстановление всех трех ионов меди кластера, причем первым восстанавливается ион меди Т3 α , который имеет самое высокое сродство к электрону. Параллельно восстановлению Т3 α идет протонирование μ 3-оксоцентра и μ ОН-лиганда, причем протоны затем дис-

социируют из восстановленного T3 α центра. Следующей стадией является восстановление T2-центра. Ключевым шагом в этом процессе является образование “мостикового” гидроксила между T2 и T3 β , благодаря которому возможен быстрый электронный перенос на T2 центр. Следовательно, эта модель предполагает образование пары ионов меди смешанной валентности. Дальнейшее восстановление иона меди T3 β постулируется как быстрый процесс переноса электрона по дипептиду цистеин–гистидин между T1 и T3 и сопровождается протонированием “мостикового” гидроксила с последующей диссоциацией двух молекул воды из кластера [28].

Лакказы обладают широкой субстратной специфичностью, катализируя окисление различных соединений, в том числе *o,n*-дифенолы, аминифенолы, полифенолы, полиамины, лигнин, некоторые неорганические ионы, арилдиамины с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды [37, 38]. Лакказы способны осуществлять прямой биоэлектрокатализ, то есть прямой перенос электрона с электрода на активный центр.

Существует предположение, что ЛАК окисляет фенольные гидроксилы субстратов с образованием феноксильного радикала, который вступает в неферментативные реакции димеризации лигнина и метоксилигнинных кислот, а также реакции образования хинонов и окислительного элиминирования карбоксильных групп.

Структуры лакказ, выделенных из различных источников, очень похожи [39–41]. Молекулы лакказ в основном представляют собой мономеры, состоящие из трех последовательно соединенных купредоксинподобных доменов, скрученных в плотную глобулу. T1-медный центр расположен в третьем домене и координирован двумя иммидазолами гистидина и сульфгидрильной группой цистеина, которые образуют тригональную структуру. Он входит в состав субстратсвязывающего «кармана» и удален от поверхности белка на 6.5 Å. Как правило, T1 центр удален от T2/T3 кластера на 12 Å и связан с ним высококонсервативным среди лакказ трипептидом His – Cys – His. Трехъядерный кластер T2/T3 расположен между первым и третьим доменами и имеет аминокислотные лиганды в каждом из них. Три иона меди кислород-восстанавливающего кластера T2/T3 образуют почти правильный треугольник с расстояниями от 3.7 до 5.1 Å. Ион меди T2 имеет два N ϵ 2 лиганда от двух гистидиновых аминокислотных остатков и один кислородный лиганд O₂, образуя тригональную плоскую конфигурацию. В качестве кислородного лиганда может выступать молекула воды или OH- группа. Каждый из ионов меди T3-пары координируется тремя гистидиновыми аминокислотными остатками и кислородным лигандом, расположенным между двумя ионами T3. Координация каждого из них может быть описана как искаженный тетраэдр.

Полифункциональная пероксидаза. ПП является гликопротеином, обладающим гибридными свойствами ЛП и MnП. До сих пор существует путаница в определении этих ферментов: в ряде случаев они называются гибридными пероксидазами, иногда их обозначают аббревиатурой. В настоящее время к ПП относят ферменты, катализирующие окисление типичных пероксидазных субстратов, включая Mn²⁺ и вератровый спирт. ПП были выделены из *Bjerkandera adusta*, *Bjerkandera* sp. (BOS55), *Bjerkandera* sp. (B33/3), *B. fumosa*, *Pleurotus eryngii*, *P. ostreatus* и *P. pulmonarius* [42, 43]. Это крайне привлекательная с точки зрения практического использования группа ферментов из-за своей способности окислять Mn²⁺, также фенольные и нефенольные ароматические соединения. Предполагается, что ПП может окислять широкий круг субстратов с различными потенциалами – от низких до высоких, сравнимых с таковыми для ЛП. ПП более эффективным по сравнению с ЛП и MnП, которые не способны к эффективному окислению фенольных компонентов в отсутствие вератрового спирта или окислению фенолов в отсутствие Mn²⁺ соответственно. Такая субстратная специфичность обусловлена их гибридной молекулярной структурой. Каталитические циклы ПП подобны таковым для MnП и ЛП [29].

Как и у других гемсодержащих пероксидаз, гем локализован внутри глобулы и соединяется с поверхностью 2 каналами. Функция первого канала, который высококонсервативен у гемовых пероксидаз, аналогична таковой у ЛП, а второй канал является особенностью ПП и MnП и в нем происходит окисление Mn²⁺ до Mn³⁺.

Биодеструкция биополимеров и ксенобиотиков с участием ферментов лигнолитического комплекса. Деградация биополимеров и ксенобиотиков в природе под действием лигнолитических ферментов базидиальных грибов является процессом, интенсивное изучение которого, прежде всего, вызвано потребностями создания экологически безопасных биотехнологий. Поэтому к настоящему времени накоплен значительный фактический материал о биодеструкции с участием ЛП, MnП и лакказы как по прямому, так и по опосредованному пути. Перечень соединений, деградируемых по пути прямого и опосредованного окисления лигнинпероксидазой, MnП и лакказой, представлен в табл. 2.

Анализируя данные литературы можно сделать ряд заключений: прямое окисление лигнолитическими ферментами возможно только в том случае, если по химической структуре деградируемое соединение может быть его субстратом и окислительно-восстановительный потенциал которого ниже редокс-потенциала фермента [11]. Так, сравнение эффективности окисления пероксидазой хрена, ЛП, MnП и лакказой гомологичного ряда метоксибензолов, отличающихся окислительно-восстановительными потенциалами (от 0.81 до

Таблица 2. Возможность деструкции природных соединений и ксенобиотиков с участием ЛП, MnП и лакказы при прямом (1) и опосредованном (2) окислении

Соединения	ЛП		MnП		Лакказа	
	1	2	1	2	1	2
Лигнин и его модельные компоненты	+	+	+	+	+	+
Фенольные компоненты лигнина	+	+	+	+	+	+
Нефенольные компоненты лигнина (ароматические спирты)	+	+	+	+		+
Спирты	+					
Аминокислоты, белки	+				+	+
Ароматические амины	+					
Гидроксифенилуксусная кислота и ее производная		+			+	+
Непредельные жирные кислоты		+		+		
Коричные кислоты		+		+	+	+
Углеводы и их производные						+
Гуминовые вещества		+		+	+	+
Неорганические ионы	+		+		+	
Ксенобиотики						
ПАУ	+	+	+	+	+	+
ПХБ	+				+	+
Пестициды	+	+	+	+		+
Красители	+	+		+		+
Галогенпроизводные фенолов	+	+	+	+	+	+
Азосоединения, анилин, акриламид, гидразин, бензотриазолы	+		+	+	+	+
Амины (Арилдиамины, гидроксилдиамин)					+	+
Нафтолы					+	+
Гомологи бензола						+

1.76 В при рН 3.0) показало, что из 12 исследованных соединений 10 окисляются ЛП, 4 (редокс-потенциалы 0.81 до 1.12 В) пероксидазой хрена и MnП и только одно – 1,2,4,5-тетраметоксибензол (редокс-потенциал 0.81 В) – лакказой [44]. Таким образом, ЛП окисляет широкий круг ароматических соединений с окислительно-восстановительными потенциалами до 1.4 В и по увеличению эффективности окисления субстратов лигнолитические ферменты могут быть расположены в ряд: лакказа, MnП и ЛП. Однако, ситуация меняется, когда рассматривается возможность использования системы фермент–редокс-медиатор для деградации и/или детоксификации биополимеров и ксенобиотиков. Эффективность такой системы определяется стабильностью фермента в процессе катализа и свойствами редокс-медиатора, в том числе стабильностью образующихся свободных радикалов, временем их жизни и реакционной способностью. Наиболее эффективной системой фермент–редокс-медиатор является система лакказа–редокс-медиатор [45]. Прежде всего, это свя-

зано с тем, что пероксид водорода инактивирует все гемовые пероксидазы после прохождения нескольких каталитических циклов. Лакказа, использующая молекулярный кислород как ко-субстрат, достаточно стабильна. Кроме того, рН и термоинактивация лигнолитических пероксидаз, связанная с высвобождением 2 ионов Ca^{2+} из молекул ферментов, также снижает эффективность такой системы.

Наибольший интерес сейчас вызывает полифункциональная пероксидаза из-за каталитической полифункциональности; способности деградировать широкий круг соединений в реакциях прямого окисления, которые не могут быть окислены ЛП и MnП. В последнее время показана эффективность применения ПП для деградации полициклических ароматических углеводородов [42], загрязняющих веществ фенольной и нефенольной природы [46], пестицидов [47], промышленных красителей [48], а также активного синего 38 и других азокрасителей, активного черного 5 и других фталоцианиновых красителей, антрацена и его производных, бензопи-

рена, пирена, 2,4-дихлорфенола и пентахлорфенола. Тем не менее все ограничения для использования пероксидаз в технологиях деградации ксенобиотиков относятся и к ПП. Таким образом, наиболее перспективной системой для использования в технологиях детоксификации и деградации в настоящее время является система лакказы—редокс-медиатор.

Неферментативный путь деструкции лигноцеллюлозных материалов и ксенобиотиков базидиомицетами. Неферментативные пути деградации полисахаридов, лигнина и ксенобиотиков привлекают внимание исследователей на протяжении последних десятилетий. В основе всех механизмов неферментативной деградации лежат радикальные процессы [1, 11, 12]. Аналогично процессам деградации лигноцеллюлозных материалов, разложение ксенобиотиков базидиомицетами может включать на первой стадии процесса продукцию низкомолекулярных высокорекреакционных соединений, играющих роль окислителей. Именно такие соединения осуществляют “обработку” древесины и обеспечивают доступность лигнина для ферментативной атаки. Основными радикалами, принимающими участие в этих процессах, являются гидроксильные радикалы (ОН*).

Основными путями генерации ОН* базидиомицетами являются: реакции, катализируемые целлюлозодегидрогеназой (ЦДГ), низкомолекулярные пептиды/хиноновый редокс-цикл и редокс-реакции, катализируемые гликопептидами (реакции Фентона, катализируемые гликопептидами). Кроме того, практически все базидиомицеты обладают системами генерации пероксида водорода, который не только используется ферментами в качестве ко-субстрата, но и вступает в реакцию Фентона с образованием ОН*-радикалов. Последние атакуют лигноцеллюлозный материал и/или полисахариды клеточной стенки, вызывая расщепления биополимеров и способствуя проникновению лигниназ. Аналогичный механизм можно предположить и для деградации ксенобиотиков.

Основные направления использования базидиальных грибов в технологиях утилизации и переработки техногенных образований и отходов. В настоящее время базидиальные грибы наиболее востребованы в технологиях, требующих разложения лигнина и его модификаций. Лигнин- и лигнинцеллюлозные отходы образуются, главным образом, в результате сельскохозяйственной деятельности (солома), а также составляют значительную часть бытовых отходов и отходов деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности [49].

Разложение лигнина и лигнинцеллюлозных отходов сельского хозяйства. Наиболее распространенным отходом сельского хозяйства, содержащим лигнин и лигнинцеллюлозу, является солома. Солома — ценное органическое удобрение [50], однако оставлен-

ная в поле и запаханная на месте из-за низкого содержания доступного для микроорганизмов источника углерода и высокого содержания клетчатки и кремнийорганических соединений имеет длительный период разложения. В пахотном горизонте ее остатки сохраняются на протяжении 3–5 лет, поэтому для лучшей утилизации соломы предложено проводить ее инокулирование ассоциацией азотфиксирующих и полисахаридобразующих бактерий, а также базидиальными грибами, обладающих высокой целлюлозолитической активностью.

Кроме того, сельскохозяйственные лигноцеллюлозные отходы плохо усваиваются при скармливании скоту [49, 51], присутствие лигнина препятствует доступу гидролитических ферментов — целлюлаз и гемицеллюлаз к их субстратам. Предварительная биоделигнификация растительных кормов — наиболее перспективный способ повышения их качества. Оправданность такого подхода была показана в ходе многочисленных исследований с использованием рисовой и пшеничной соломы, а также хлопковых стеблей и картона [52]. Способ получения кормового продукта на основе соломы, делигнифицированной с помощью *Panus tigrinus* [53] и *Pleurotus ostreatus* [54], описан в патентах [53, 54].

Переработка отходов лесной и лесоперерабатывающей промышленности. Щепа, опилки и другие отходы лесопереработки, как правило, нигде не используются или используется незначительно. Большая доля этого сырья годами накапливается возле лесоперерабатывающих предприятий. Общепринятой практикой утилизации древесных отходов с использованием базидиальных грибов в настоящее время является выращивание на них съедобных грибов. Наибольшее распространение получила вешенка *Pleurotus ostreatus* — вкусный и питательный гриб, снискавший себе популярность во всем мире благодаря относительно несложной агротехнике его культивирования и устойчивости этого гриба к вредителям и болезням.

Среди древесных отходов особую проблему представляют деревянные шпалы. Срок их эксплуатации — от 6 до 40 лет в зависимости от породы дерева, из которого изготовлены шпалы, климатических условий в той области, где находится железнодорожная ветка и степени рабочей загруженности путей. Особенностью этого вида древесных отходов является то, что они пропитаны антисептиком креозотом, предотвращающим их гниение, а, следовательно, и возможность биологической деградации. За рубежом запатентовано несколько способов разложения древесных остатков, содержащих креозот. В качестве биологических агентов предложено использовать целый ряд базидиальных грибов, таких как *Antrodia radiculosa*, *Meruliparia incrassata*, *Neolentinus lepideus*, *Melanoporia niger*, *Polyporus* sp., *Crustoderma dryinum*, *Gloeophyllum*

Таблица 3. Запатентованные способы очистки сточных вод ЦБК с использованием базидиальных грибов

Вид гриба	Деградируемое соединение	Источник
<i>Alternaria alternata</i>	Воднорастворимый сульфатный лигнин	[66]
<i>Phlebia tremellosa</i>	Лигнин и лигносмолы в бумажной пульпе	[69]
<i>Scytinostroma galactinum</i>	Деградация отходов, содержащих лигнин, целлюлозу, хлор ароматические вещества	[70]
<i>Scytinostroma galactinum strain F361</i>	Деградация лигнина, целлюлозы и хлор ароматических соединений	[71]
<i>Schizophyllum commune</i> , <i>Trichaptum biforme</i> , <i>Phanerochaete gigantea</i>	Лигнин и лигносмолы в бумажной пульпе	[72]
Грибы “белой” и “бурой гнили”	Разложение лигнина в бумажной пульпе	[73]

subferrugineum, *Phanerochaete sordida*, *Peniphora pseudopini* и *Ceriporia spissa* [55–57].

Из других лигноцеллюлозных отходов, биодеградация которых может быть осуществлена с помощью базидиальных грибов, следует также упомянуть утилизацию коксовых волокон с помощью *P. ostreatus* [58], разложение парковых отходов с использованием *Coriolus versicolor*, *P. ostreatus* и *Ganoderma applanatum* [59], а также разложение кокосовых волокон и мульчирующих материалов с помощью консорциума базидиальных грибов, включающего *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. dryinus*, *P. tuberregium*, *Piptoporus betulinus*, *Fomitopsis pinicola*, *F. officinalis*, *Trametes versicolor*, *Hypsizygus ulmarius*, *Ganoderma lucidum*, *G. applanatum*, *G. curtisii*, *G. oregonense* и *G. tsugae* [60].

В заключении хотелось бы отметить тот факт, что прогресс в изучении процессов деградации лигноцеллюлозных отходов сделал возможным разработку такого будущего направления их применения как использование в космических путешествиях [49]. Возможно, что в ближайшем будущем транспортировка лигноцеллюлозных отходов на космические станции приведет к значительному сокращению расходов. Лигноцеллюлоза может стать сырьем для получения всего необходимого: топлива, энергии, химического сырья, пищи и воды. Эксперименты, проведенные в рамках программы “Закрытая экологическая система жизнеобеспечения” (Closed Ecological Life Support System, CELSS), показали перспективность переработки растительных отходов грибом белой гнили *P. ostreatus* в этих целях [61].

Очистка сточных вод ЦБК. На предприятиях, использующих для отбеливания целлюлозы молекулярный хлор, образуются полихлорированные дибензо-*p*-диоксины (ПХДД) и дибензофураны (ПХДФ) – высокотоксичные, канцерогенные соединения, которые являются представителями хлорированных циклических ароматических эфиров [62]. Способность детоксицировать образующуюся на ЦБК пульпу была показана для целого ряда базидиомицетов, включая *Phanerochaete chrysosporium*, *T. versicolor*, *Fomes lividus* и *Thelephora*

sp. [63, 64]. В нашей стране в качестве биологического метода обезвреживания твердых отходов ЦБК, содержащих хлорорганические ароматические соединения, также было рекомендовано использовать метод утилизации шлам-лигнина с использованием штамма дереворазрушающего базидиомицета *Trametes pubescens* [65]. Расчеты авторов показали, что эффективность разрушения фенолов и хлорсодержащих соединений в штаммом *T. pubescens* отходов Байкальского ЦБК достигала 100%. Кроме *T. pubescens*, в РФ запатентован способ биологической очистки сточных вод целлюлозно-бумажной промышленности от водорастворимого сульфатного лигнина с помощью *Alternaria alternata* [66].

Определяющую роль в детоксикации сточных вод ЦБК в большинстве случаев играет выделяемая грибами лакказа [62, 67], а ведущая роль MnП была показана только для определенных штаммов (например, *T. versicolor*) [68]. В технологиях биологической очистки сточных вод ЦБК нашли применение базидиальные грибы, относящиеся к следующим родам: *Alternaria*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Scytinostroma* и *Trichaptum* (табл. 3).

Очистка сточных вод от текстильных красителей. Способность базидиомицетов обесцвечивать различные красители, присутствующие в сточных водах текстильной промышленности, хорошо изучена [43, 48, 74–83]. Суммируя существующие данные, можно сказать, что обесцвечивание красителей показано для 31 вида базидиальных грибов и 77 красителей и их смесей. При этом среди исследованных базидиальных грибов роды *Phanerochaete* и *Trametes* охарактеризованы наиболее подробно, как способные к разложению широкого класса красителей. Однако запатентованным в настоящее время является только препарат на основе *Flavodon flavus* [84], что свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения базидиальных грибов, родов *Phanerochaete* и *Trametes*, которые могут быть использованы для биоремедиации сточных вод текстильной промышленности.

Очистка сточных вод, содержащих тяжелые металлы и радионуклиды. Биологическая очистка вод

Таблица 4. Виды базидиомицетов и аккумулируемые ими металлы

Гриб	Металл	Источник
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Phellinus sanguineus</i> , <i>Pleurotus ostreiformis</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Volvariella volvacea</i>	Cd	[90], [92–103]
BDT-14 (DSM 15396), <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Pleurotus ostreiformis</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Volvariella volvacea</i>	Cr	[92], [93], [104]
<i>Coriolopsis strumosa</i> , <i>Daedalea tenuis</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Lentinus strigosus</i> , <i>Lenzites malaccensis</i> , <i>Lepista nuda</i> , <i>Oudemansiella mucida</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Phellinus sanguineus</i> , <i>Phellinus xeranticus</i> , <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>Rigidoporus lineatus</i> , <i>Rigidoporus microporus</i> , <i>Trametes lactenia</i> , <i>Trametes versicolor</i>	Cu	[86], [93–95], [97], [103], [105], [106]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Hg	[108, 109]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Pleurotus ostreiformis</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Volvariella volvacea</i>	Ni	[92], [93], [110], [111]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Phellinus badius</i> , <i>Phellinus sanguineus</i> , <i>Pleurotus ostreiformis</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Volvariella volvacea</i>	Pb	[92–97], [103], [107]
<i>Innonotus mikadoi</i> , <i>Tricholoma conglobatum</i>	U, Th	[112]

от радионуклидов и тяжелых металлов с помощью базидиальных грибов основана на их способности интенсивно поглощать токсиканты. При этом поглощение металлов грибами может происходить не только вследствие адсорбционных процессов, как в случае бактерий, но также и благодаря активному транспорту металлов в клетки [85, 86]. Эта уникальная особенность базидиальных грибов делает их в ряде случаев оптимальными агентами биологической очистки от металлов и радионуклидов.

В нашей стране это направление использования грибов в биологической очистке получило большое развитие в конце прошлого века, о чем свидетельствуют полученные тогда патенты, в настоящее время прекратившие свое действие [87, 88]. В качестве грибов, способных к интенсивному поглощению радионуклидов и тяжелых металлов, рекомендовали аскомицеты (*Aspergillus*, *Penicillium* и *Phizopus*). В последнее время, однако, все большее внимание уделяется изучению в качестве потенциальных биосорбентов базидиальных грибов, что объясняется, по-видимому, их меньшей патогенностью. В работе [89] была продемонстрирована перспективность использования щелелистника (*Schizophyllum commune*) для очистки от урана, а в работе [90] — использование *Phanerochaete chrysosporium* для очистки от кадмия. Высокие концентрации тяжелых металлов в среде токсичны для базидиальных грибов, поэтому при выборе штамма необходимо исследование чувствительности конкретного вида гриба. Согласно данным, полученным в работе [91], высокой устойчивостью к металлам обладают *P. ostreatus*, *P. cystidiosus*, *Stereum hirsutum* (устойчивы к Cd и Hg) и *T. ver-*

sicolor (устойчив к Cd, Zn, Ni, Co, Cr, Mo, Pb, Hg, Sn). Базидиальные грибы, обладающие способностью к накоплению различных металлов, приведены в табл. 4. Способностью аккумулировать наиболее широкий спектр тяжелых металлов обладают грибы родов *Pleurotus*, *Trametes* и *Phanerochaete*, что делает представителей этих родов наиболее перспективными с точки зрения использования в технологиях биологической очистки сточных вод от тяжелых металлов.

Очистка сред, загрязненных нефтяными углеводородами. В классической схеме очистки от нефти и нефтепродуктов биологические методы использовали только на завершающей стадии очистных мероприятий, однако сейчас отмечается тенденция к замене многостадийных схем очистки на одностадийные. В основе разрабатываемых подходов лежит использование консорциумов микроорганизмов, к которым относятся представители мицелиальных грибов, дрожжей и бактерий, эффективно трансформирующих компоненты нефти в нетоксичные и малотоксичные вещества. При этом очистка нефтезагрязненных сред в *in situ* может осуществляться как с помощью поддержания и стимулирования естественной нефтеокисляющей микрофлоры путем создания оптимальных условий для ее развития (аэрация, внесение в очаг загрязнения азотно-фосфорных удобрений), так и введением активного штамма деструктора в место загрязнения.

Для очистки водной поверхности от нефтяных загрязнений в нашей стране разработан комплексный микосорбент, содержащий штаммы грибов-аскомицетов *Fusarium solani*, *F. moniliforme*, *Trichoderma*

Таблица 5. Запатентованные способы разложения различных ксенобиотиков с использованием базидиальных грибов

Вид гриба	Деградируемое соединение	Источник
<i>Antrodia radiculosa</i> <i>Meruliporia incrassata</i>	Пентохлорфенолы (в древесине)	[119]
<i>Marasmiellus troyanus</i>	Бенз(а)пирен	[120]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Gloeophyllum striatum</i>	Антибиотики хинолон и нафтиридон	[121]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Галогенпроизводные углеводов, ДДТ	[122]
	Диоксин, гептахлор, ДДТ, дильдрин, токсифен	[123]
	ПАУ	[124]
	ПХБ	[125]
	Галогенпроизводные углеводов, пентахлорфенол	[126]
<i>Phanerochaete gigantea</i> <i>Resinicium bicolor</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	Диоксины, полихлорфенилы, бифенилы	[127]

harzianum и *Cladosporium resinae*. Указанные грибы иммобилизуют на гидрофобных носителях и используют в качестве сорбентов и деструкторов нефти [113]. Для очистки почвы и водных поверхностей от нефти и нефтепродуктов разработан и применяется комплексный препарат, содержащий как грибы класса аскомицеты (*Aspergillus niger*), так и базидиомицеты (*Phanerochaete chrysosporium*), предназначенный для распыления по водной поверхности в смеси с детергентами и сорбентами [114]. Аналогичные препараты, содержащие штамм *Phanerochaete chrysosporium* и предназначенные для очистки сред, загрязненных нефтяными углеводородами, зарегистрированы в США [115].

Для очистки почв от нефтяных загрязнений применяют биопрепараты, содержащие в своем составе, главным образом, бактерии, такие как *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Alkaligenes*, *Mycobacterium*, а также дрожжи *Candida* и нитевидные актиномицеты *Streptomyces*. В препаратах грибного происхождения используются преимущественно аскомицеты родов *Aspergillus* и *Penicillium* [116], а среди базидиальных грибов высокая нефтедеструктивная способность показана только для родов *Phanerochaete*, *Pleurotus* и *Trametes*. Согласно [117], в присутствии *P. chrysosporium*, *P. ostreatus* и *T. (Coriolus) versicolor* через 12 мес после инокуляции количество нефтяных углеводородов снижалось на 68,7, 53,1 и 78,1%, соответственно. Особенностью биоразложения нефтяных углеводородов базидиальными грибами является их способность метаболизировать ароматическую фракцию ароматических углеводородов, тогда как бактерии разрушают преимущественно парафино-нафтеновые углеводороды [118]. Патентов, содержащих описание препаратов на основе базидиальных грибов и предназначенных для очистки почв, загрязненной

нефтью, в РФ нет. В США зарегистрирован единственный патент, содержащий описание способа очистки нефтезагрязненных сред с использованием *P. chrysosporium* [115].

Очистка загрязненных почв. К настоящему времени разработаны подходы к рекультивации с помощью базидиомицетов почв, загрязненных самыми различными ксенобиотиками, включая ПАУ, полихлорбифенилы (ПХБ), нитроароматические соединения и пестициды. Наиболее изученные роды базидиальных грибов, способные к деградации ксенобиотиков различной природы – *Phanerochaete*, *Trametes* и *Pleurotus*. Список базидиальных грибов, на основе которых запатентованы препараты для разложения различных ксенобиотиков, приведен в табл. 5. Наиболее востребованным видом, используемым для разложения различных ксенобиотиков, является *P. chrysosporium*.

Разложение низкоэнергетических углей. Виды базидиальных грибов, которые способны деградировать угольные отходы и экстрагируемые из них гуматы, были выделены преимущественно из древесины (стволы деревьев, бревна, ветки и пни) и, следовательно, не могут быть конкурентоспособными в почвенных условиях [128]. Другими словами, нерешенной остается проблема оценки возможности проведения деполимеризации угольных отходов *in situ* [129]. Существующие на сегодняшний день запатентованные способы биосолоубилизации угля основаны на использовании *P. chrysosporium* [130, 131] и *Polyporus versicolor* [132] и подразумевают обработку угля *ex situ*.

Актуальна проблема поиска видов базидиальных грибов, способных не только разлагать угольные отходы, но и активно осуществлять процессы деструкции в почвах. В настоящее время известен только один вид гриба (*Collybia dryophila*), удовлетворяю-

ший этим условиям [133]. При проведении скрининга следует учитывать способность гриба к синтезу и выделению экстрацеллюлярных ферментов, так как именно они отвечают за деградацию угля.

Разложение синтетических полимеров. Наряду с разложением природных полимеров (лигнин, целлюлоза, гуминовые вещества), в литературе встречаются данные о способности базидиальных грибов разлагать синтетические полимеры.

Синтетические полимеры (пластмассы) широко используются в современном мире. Вследствие их чрезвычайной устойчивости и постоянное накопление в окружающей среде актуален поиск путей биodeградации. Возможность применения для этой цели базидиальных грибов еще мало изучена, однако есть отдельные исследования в этом направлении. В частности, для семи видов грибов “белой гнили” была установлена их способность деполимеризовать поливинилхлорид (ПВХ) — широко распространенную синтетическую ткань [134]. Выраженная деполимеризация, регистрируемая по уменьшению количества С—Н-связей, была продемонстрирована для *P. chrysosporium*, *P. sajor caju*, и *Polyporus versicolor*; наименьший деполимеризационный потенциал был отмечен для видов, принадлежащих к роду *Pleurotus*. Согласно данным [135], гриб *Pycnoporus cinnabarinus* обладал способностью к разложению другого синтетического полимера — поливинилового спирта — применяемого в качестве клея. Авторами была показана взаимосвязь разложения полимера с продукцией лакказы. Для грибов *P. chrysosporium* и *Trametes versicolor* была продемонстрирована способность разлагать такой полимер как нейлон (нейлон-66), широко используемый в текстильной промышленности [136]. Позднее выделение и характеристика фермента, ответственного за разложение полимера, показали его сходство с МнП [137].

В работе [138] была показана способность базидиальных грибов разлагать остатки резиновых покрышек. Было установлено, что наиболее эффективным, по-видимому, является *Resinicium bicolor*. При обработке используемых в качестве добавок к резине ароматических соединений *Resinicium bicolor* было отмечено усиление роста на резине бактерий *Thiobacillus ferrooxidans*, а также ускорение процессов девулканизации. На основании полученных результатов авторы приходят к выводу о перспективности совместного культивирования базидиальных грибов и бактерий для целей биоразложения отходов резины.

Несмотря на показанную принципиальную возможность применения базидиальных грибов для деградации синтетических полимеров, практического применения это направление использования базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов пока еще не нашло.

Таким образом, на протяжении последних лет интерес к использованию базидиомицетов для де-

градации лигноцеллюлозных материалов и ксенобиотиков значительно вырос. По-прежнему много исследований посвящено лигнолитическим ферментам, причем большинство работ посвящено разработке подходов к деградации ксенобиотиков и лигноцеллюлозных материалов, получению рекомбинантных штаммов продуцентов этих ферментов и увеличению эффективности катализа, рН- и термостабильности.

Проведенный анализ выявил, что в настоящее время использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов возможно по следующим основным направлениям:

- очистка загрязненных вод (в том числе сточные воды текстильной промышленности и ЦБК; воды, загрязненные нефтяными углеводородами; сточные воды, образующиеся при производстве оливкового масла; жидкие отходы, образующиеся при производстве сахара из сахарной свеклы или сахарного тростника; водная суспензия, остающейся после коагуляции латекса при производстве резины; сточные воды, содержащие тяжелые металлы и радионуклиды);

- очистка загрязненных почв, в том числе, загрязненных ксенобиотиками и, тяжелыми металлами;

- разложение труднодеградируемых субстратов, в том числе лигнин- и лигнинцеллюлозных отходов, низкоэнергетических углей и синтетических полимеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Государственные контакты П211 от 22.07.2009, 16.512.11.2028 от 11.02.2011) и гранта РФФИ 08-04-01612.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sanchez C. // Biotechnol. Adv. 2009. V. 27. P. 185–194.
2. Dashtban M., Schraft H., Qin W. // Int. J. Biol. Sci. 2009. V. 5. № 6. P. 578–595.
3. Martinez A.T., Speranza M., Ruiz-Duenas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillen F., Martinez M.J., Gutierrez A. del Rio J.C // Int. Microbiol. 2005. V. 8. P. 195–204.
4. Lacina C., Germin G., Spiros A. // Afr. J. Biotechnol. 2003. V. 2. P. 620–635.
5. Mougín C., Boukcim H., Jolivald C. Advances in Applied Bioremediation (Soil Biology). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2009. V. 17. P. 123–149.
6. Kumar R., Singh S., Singh O.V. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 35. P. 377–391.
7. Baldrian P., Valaskova V. // FEMS Microbiol. Rev. 2008. V. 32. P. 501–521.
8. Asgher M., Bhatti H.N., Ashraf M., Legge R.L. // Biodegradation. 2008. V. 19. P. 771–783.
9. Roblez-Hernandez L., Cecilia-Gonzalez-Franco A., Crawford D.L., Chun W.W.C. // Tecnociencia Chihuahua. 2008. V. 2. № 1. P. 32–40.

10. Рабинович М.Л., Болобова А.В., Кондращенко В.И. Древесина и разрушающие ее грибы. М.: Наука, 2001. 264 с.
11. Wong D.W.S. // *Enzymes Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009. V. 157. P. 174–209
12. Ruiz-Duenas F.J., Martinez A.T. // *Microbial Biotechnol.* 2009. V. 2. № 2. P. 164–177.
13. Tien M. // *Crit. Rev. Microbiol.* 1987. V. 161. P. 141–168.
14. Tien M., Kirk T. // *Methods Enzymol.* 1988. V. 161. P. 238–249.
15. Kuwahara M., Glenn J.K., Morgan M.A., Gold M.H. // *FEBS Letters.* 1984. V. 169. № 2. P. 247–250.
16. Tien M., Kirk T. // *Sci.* 1983. V. 221. P. 661–663.
17. Johanson T., Welinder K.G., Nyman P.O. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1993. V. 300. P. 57–62.
18. Pointing S.B., Pelling A.L., Smith G.J., Hyde K.D., Reddy C.A. // *Mycol. Res.* 2005. V. 109. P. 115–124.
19. Tonon F., Odier E. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 233. P. 650–658.
20. Piontek K., Smith A.T., Blodig W. // *Biochem. Soc. Trans.* 2001. V. 29. P. 111–116.
21. Hatakka A. // *FEMS Microbiol. Rev.* 1994. V. 13. P. 125–135.
22. Lobos S., Larram J., Salas L., Cullen D., Vicuna R. // *Microbiol.* 1994. V. 14. P. 2691–2698.
23. Hofrichter M. // *Enzyme Microb. Technol.* 2002. V. 30. P. 454–466.
24. Kawai S., Jensen K.A., Hammel K.E. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V. 61. P. 3407–3414.
25. Hilden L., Johansson G., Pettersson L.J., Ljungquist P., Henriksson G. // *FEBS Lett.* 2000. V. 477. P. 79–83
26. Sundaramoorthy M., Youngs H.L., Gold M.H., Poulos T.L. // *Biochem.* 2005. V. 44. P. 6463–6470.
27. Malmstrom B.G. *Multi-Copper Oxidases.* Ed. A. Messerschmidt. Singapore: World Scie. Publ. Co. Inc. 1997. P. 1–22.
28. Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. // *Chem. Rev.* 1996. V. 96. № 7. P. 2563–2606.
29. Ruiz-Duenas F.J., Morales M., Garcia E., Miki Y., Martinez M.J., Martinez A.T. // *J. Experiment. Botany.* 2009. V. 60. P. 441–452.
30. Thurnston C.F. // *Microbiol.* 1994. V. 140. № 1. P. 19–26.
31. Baldrian P. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2006. V. 30. № 2. P. 215–242.
32. Youn H.-D., Kim K.-J., Maeng J.-S., Han Y.H., Jeong I.-B., Jeong G., Kang S.-O., Hah Y.C. // *Microbiol.* 1995. V. 141. № 2. P. 393–398.
33. Koroljova (Skorobogat'ko) O., Stepanova E., Gavrilova V., Morozova O., Lubimova N., Dzchafarova A., Jaropolov A., Makower A. // *J. Biotechnol. Appl. Biochem.* 1998. V. 28. № 1. P. 47–54.
34. Гиндилис А., Жажина Е., Баранов Ю., Карякин А., Гаврилова В., Ярополов А. // *БИОХИМИЯ.* 1988. Т. 53. № 5. P. 735–739.
35. Lerch K., Deinum J., Reinhammer B. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1978. V. 534. № 1. P. 7–14.
36. German U.A., Muller G., Hunziker P.E., Lurch K. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 2. P. 885–896.
37. Xu F., Shin W., Brown S.H., Wahleithner J.A., Sundaram U.M., Solomon E.I. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. V. 1292. № 2. P. 303–311.
38. Quintanar, L., Stoj C., Taylor A.B., Hart P.J., Kosman D.J., Solomon E.I. // *Acc. Chem. Res.* 2007. V. 40. № 6. P. 445–452.
39. Piontek K., Antorini M., Choinowski T. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 40. P. 37663–37669.
40. Lyashenko A.V., Zhukhlistova N.E., Gabdoulkhakov A.G., Zhukova Y.N., Voelter W., Zaitsev V.N., Bento I., Stepanova E.V., Kachalova G.S., Koroleva O.V., Cherkashyn E.A., Tishkov V.I., Lamzin V.S., Schirwitz K., Morgunova E.Y., Betzel C., Lindley P.F., Mikhailov A.M. // *Acta Crystallogr. Sect. F.* 2006. V. 62. № 10. P. 954–957.
41. Polyakov K.M., Fedorova T.V., Stepanova E.V., Cherkashin E.A., Kurzev S.A., Strokopytov B.V., Lamzin V.S., Koroleva O.V. // *Acta Crystallogr. D.* 2009. V. 65. № 6. P. 611–617.
42. Wang Y., Vazquez-Duhalt R., Pickard M.A. // *Canad. J. Microbiol.* 2003. V. 49. P. 675–682.
43. Moreira P., Duez G., Dehareng D., Antunes A., Almeida-Vara E., Frere J.M. // *J. Biotech.* 2005. V. 118. P. 339–352.
44. Kersten P.J., Kalyanaraman B., Hammel K.E., Reinhammer B. // *Biochem. J.* 1990. V. 268. P. 475–480.
45. Kunamneni A., Plou F.J., Ballesteros A., Alcalde M. // *Recent. Pat. Biotechnol.* 2008. V. 2. № 1. P. 10–24.
46. Rodriguez E., Nuevo O., Guillen F., Martinez A.T., Martinez M.J. // *Soil. Biol. Biochem.* 2004. V. 36. P. 909–916.
47. Davila-Vazquez G., Tinoco R., Pickard M.A., Vazquez-Duhalt R. // *Enzyme Microb. Technol.* 2005. V. 36. P. 223–231.
48. Heinfling A., Martinez M.J., Martinez A.T., Bergbauer M., Szewzyk U. // *Appl Environ Microbiol.* 1998. V. 64. P. 2788–2793.
49. Malherbe S., Cloete T.E. // *Environ. Sci. & Biotechnol.* 2002. V. 1. P. 105–114.
50. Довбан К.И. Зеленое удобрение. М.: Агропромиздат, 1990, с. 169.
51. Cohen R., Persky L., Hadar Y. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 58. P. 582–594.
52. Hüttermann A., Hamza A.S., Chet I., Majcherczyk A., Fouad T., Badr A., Cohen R., Persky L., Hadar Y. // *Agro-Food Ind. Hi-Tech.* 2000. V. 6. P. 29–32.
53. Патент РФ. 2003. № 2001117048/13.
54. Патент США. 2007. № 20070227063.
55. Патент США. 2003. № 2003064502.
56. Патент США. 2002. № 20000541893.
57. Патент США. 2003. № 20020097810.
58. Патент США. 2005. № 20050176583.
59. Патент США. 2006. № 20060104939.
60. Патент США. 2008. № 20080264858.
61. Sarikaya A., Ladisch M.R. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1997. V. 62. P. 131–149.
62. D'Souza D.T., Tiwari R., Sah A.K., Raghukumar C. // *Enzyme Microb. Technol.* 2006. V. 38. P. 504–511.
63. Selvam K., Swaminathan K., Myung Hoon Song M.H., Chae K. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 18. P. 523–526.

64. *Selvam K., Swaminathan K., Rasappan K., Rajendran R., Pattabhi S.* // *Ecol. Environ. Conserv.* 2006. V. 12. P. 223–226.
65. *Чхенкелу В.А., Николаева Л.А.* // Тезисы международной научной конференции “Микроорганизмы и биосфера” Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. 2007. С. 147–149.
66. Патент РФ. 1994. № 4071008/26.
67. *Font X., Caminal G., Gabarrell X., Vicent T.* // *Environ. Technol.* 2006. V. 27. P. 845–854.
68. *Driessel B.V., Christov L.* // *J. Biosci Bioeng.* 2001. V. 92. P. 271–276.
69. Патент США. 1994. № 19940247130.
70. Патент США. 1996. № 19950471126.
71. Патент США. 1996. № 19940330874.
72. Патент США. 1998. № 19950536536.
73. Патент США. 2003. № 6923912.
74. *Novotny C., Rawal B., Bhatt M., Patel M., Sasek V., Molitoris H.P.* // *J. Biotechnol.* 2001. V. 89. P. 113–122.
75. *Michniewicz A., Ledakowicz S., Ullrich R., Hofrichter M.* // *Dyes Pigm.* 2008. V. 77. P. 295–302.
76. *Gill P.K., Arora D.S., Chander M.* // *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 2002. V. 28. P. 2001–2003.
77. *Baldrian P.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. V. 63. P. 560–563.
78. *Mazmanci M.A., Unyayar A.* // *Proc. Biochem.* 2005. V. 40. P. 337–342.
79. *Cameron M.D., Timofeevski S., Aust S.D.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000. V. 54. P. 751–758.
80. *Balan D.S.L., Monteiro R.T.R.* // *J. Biotechnol.* 2001. V. 89. P. 141–145.
81. *Chagas E.P., Durrant L.R.* // *Enzyme Microb Technol.* 2001. V. 29. P. 473–477.
82. *Jain N., Kaur A., Singh D., Dahiya S.* // *J. Environ. Biol.* 2000. V. 21. P. 179–183.
83. *Kapdan I., Kargi F., McMullan G., Marchant R.* // *Bioprocess Eng.* 2000. V. 22. P. 347–351.
84. Патент США. 2005. № 20020124580.
85. *Gutnick D.L., Bach H.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000. V. 54. P. 451–460.
86. *Gabriel J., Baldrian P., Hladikova K., Hakova M.* // *Lett. Appl. Microbiol.* 2001. V. 32. P. 194–198.
87. Патент РФ. 1994. № 5048003/25.
88. Патент РФ. 1994. № 5048033/25.
89. *Merten D., Kothe E., Büche G.* // *Mine Water Environment.* 2004. V. 23. P. 34–43.
90. *Iqbal M., Saeed A., Edyvean R.G.J., O’Sullivan B., Styrring P.* // *Biotechnol. Letters.* 2005. V. 27. P. 1319–1323.
91. *Baldrian P.* // *Enzyme Microbial Technol.* 2003. V. 32. P. 78–91.
92. *Dey S., Rao P.R.N., Bhattacharyya B.C., Bandyopadhyay M.* // *Bioprocess Eng.* 1995. V. 12. P. 273–277.
93. *Yetis U., Özcengiz G., Dilek F.B., Ergen N., Dölek A.* // *Water Sci. Technol.* 1998. V. 38. P. 323–330.
94. *Day R., Denizli A., Arica M.Y.* // *Biores Technol.* 2001. V. 76. P. 67–70.
95. *Say R., Denizli A., Arica M.Y.* // *Biores Technol.* 2001. V. 76. P. 67–70.
96. *Cihangir N., Saglam N.* // *Acta Biotechnol.* 1999. V. 19. P. 171–177.
97. *Mashitah M.D., Zulfadhly Z., Bhatia S.* // *Immobil. Biotechnol.* 1999. V. 27. P. 441–445.
98. *Gabriel J., Vosáhl J., Baldrian P.* // *Biotechnol. Tech.* 1996. V. 10. P. 345–348.
99. *Zhou J.L., Kiff R.J.* // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1991. V. 52. P. 317–330.
100. *Bayramoglu G., Denizli A., Bektas S., Arica M.Y.* // *Microchem J.* 2002. V. 72. P. 63–76.
101. *Arica M.Y., Kacar Y., Genc Ö.* // *Biores Technol.* 2001. V. 80. P. 121–129.
102. *Yalcinkaya Y., Soysal L., Denizli A., Arica M.Y., Bektas S., Genc Ö.* // *Hydrometallurgy.* 2002. V. 63. P. 31–40.
103. *Zulfadhly Z., Mashitah M.D., Bhatia S.* // *Environ. Pollut.* 2001. V. 112. P. 463–470.
104. *Trivedi B.D., Patel K.C.* // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 23. P. 683–689.
105. *Muraleedharan T.R., Venkobachar L.I.* // *Environ. Technol.* 1994. V. 15. P. 1015–1027.
106. *Muraleedharan T.R., Iyengar L., Venkobachar C.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. V. 61. P. 3507–3508.
107. *Wu J., Li Q.* // *J. Environ. Sci.* 2002. V. 14. P. 108–114.
108. *Saglam N., Say R., Denizli A., Patir S., Arica M.Y.* // *Process Biochem.* 1999. V. 34. P. 725–730.
109. *Saglam A., Yalcinkaya Y., Denizli A., Arica M.Y., Genc Ö., Bektas S.* // *Microchem. J.* 2002. V. 71. P. 73–81.
110. *Ceribasi I.H., Yetis U.* // *Water S.A.* 2001. V. 27. P. 15–20.
111. *Dilek F.B., Erbay A., Yetis U.* // *Process Biochem.* 2002. V. 37. P. 723–726.
112. *Nakajima A., Sakaguchi T.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1993. V. 38. P. 574–578.
113. Патент РФ. 2007. № 2005125503/13.
114. Патент РФ. 2006. № 2004123329/13.
115. Патент США. 2001. № 19990417571.
116. *Злотников А.К., Садовникова Л.К., Баландина А.В., Злотников К.М., Казаков А.В.* // *Вестник РАСХН.* 2007. № 1. С. 65–67.
117. *Yateem A., Balba M.T., Al-Awadhi N., El-Nawawy A.S.* // *Environ. Int.* 1998. V. 24. P. 181–187.
118. *Позднякова Н.Н., Никитина В.Е., Турковская О.В.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2008. Т. 44. № 1. С. 69–75.
119. Патент США. 2002. № 20000541944.
120. Патент США. 2001. № 19960599260.
121. Патент США. 2000. № 19951039445.
122. Патент США. 1990. № 19880183114.
123. Патент США. 1994. № 19910687368.
124. Патент США. 1988. № 19860899000.
125. Патент США. 2000. № 19970939464.
126. Патент США. 1994. № 19930074643.
127. Патент США. 2004. № 2004067730.
128. *Dix N.J., Webster J.* *Fungal Ecology.* London, UK: Chapman & Hall, 1995. 128 p.

129. *Kastner M., Hofrichter M.* Biopolymers. Lignin, Humic Substances and Coal, V. 1 / Ed. M. Hofrichter, A. Steinbuechel. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. P. 349–378.
130. Патент США. 1995. № 19930065563.
131. Патент США. 1997. № 19950477410.
132. Патент США. 1989. № 19870069709.
133. *Steffen K.T., Hatakka A., Hofrichter M.* // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 3442–3448.
134. *Kirbas Z., Keskin N., Guner A.* // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1999. V. 63. P. 335–342.
135. *Larking D.M., Crawford R.L., Christie G.B.Y., Lonergan G.T.* // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 1798–1800.
136. *Deguchi T., Kakezawa M., Nishida T.* // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63 P. 329–331.
137. *Deguchi T., Kitaoka Y., Kakezawa M., Nishida T.* // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 1366–1371.
138. *Bredberg K., Andersson B.E., Landfors E., Holst O.* // Biores. Technol. 2002. V. 83. P. 221–224.

Use of Basidiomycetes in Industrial Waste Processing and Utilization Technologies: Fundamental and Applied Aspects (Review)

N. A. Kulikova^b, O. I. Klein^a, E. V. Stepanova^a, and O. V. Koroleva^a

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

^b *Faculty of Soil Science, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia*

e-mail: evst@inbi.ras.ru, koroleva@inbi.ras.ru

Received December 16, 2010

Abstract—This review provides an analysis of recent data on the mechanisms of degradation of lignocellulosic materials and xenobiotics by basidiomycetes. Special attention is given to the analysis of the current state of research of ligninolytic enzymes and their involvement in the degradation of xenobiotics. Data on the practical use of basidiomycetes for bioconversion of industrial wastes are systematized. The most promising areas of bioconversion technologies are considered, such as contaminated water purification (including wastewater), cleanup of soils contaminated with heavy metals and xenobiotics, and degradation of difficult-to-degrade substrates (lignin and lignocellulose wastes, low-energy coal, and synthetic polymers).

УДК 577.11

ГИСТОНОПОДОБНЫЕ БЕЛКИ БАКТЕРИЙ (ОБЗОР)

© 2011 г. А. М. Анучин, А. В. Гончаренко, О. И. Демидёнок, А. С. Капрельянец

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

e-mail: demidenoksana@gmail.com

Поступила в редакцию 8.12.2010 г.

Рассмотрены четыре основных семейства гистоноподобных белков бактерий: HU, IHF, H-NS и FIS, объединенных на основании структурного сходства, выполняющих в клетке специфические структурные и регуляторные функции. Гистоноподобные белки осуществляют топологическую модификацию хромосомы (скручивание, изгибание, компактизация) и непосредственно регулируют функционирование промоторов отдельных оперонов. Гистоноподобные белки являются важным звеном в регуляции метаболизма клетки, участвующим в ответе на изменения внешних условий и играющим существенную роль в переходе и поддержании покоящегося состояния у бактерий.

Роль гистонов в организации хроматина является предметом подробных, имеющих длительную историю исследований в молекулярной биологии эукариотических организмов. Помимо того, что они играют роль структурных регуляторных элементов, называемых “архитектурными” белками (нуклеосомный уровень компактизации обеспечивает 6-кратное уменьшение длины фибриллы ДНК). Гистоны эукариот выступают также в роли регуляторов, конкурируя с факторами транскрипции за места связывания [1]. По аналогии с эукариотическими гистонами у прокариот выделена группа так называемых гистоноподобных белков. Это основные, ассоциированные с ДНК белки, которые характеризуются невысокой молекулярной массой (16–20 кДа) с относительно высоким содержанием в клетке [2]. Первоначальные представления о гистоноподобных белках, как организаторах бактериального нуклеоида, оказались неполными. В настоящее время накопилось достаточно данных, позволяющих утверждать, что белки этого семейства играют роль как в регуляции активности отдельных генов, так и других процессов, связанных с ДНК, таких, как рекомбинация и репликация. Выделяют четыре основные группы гистоноподобных белков, объединенных по степени гомологии аминокислотной последовательности: HU (histone-like proteins *Escherichia coli*, U93), H-NS (histone-like nucleoid structuring proteins), IHF (integration host factors), FIS (factors for inversion stimulation). Также существуют гистоноподобные белки, не имеющие гомологии с представителями четырех основных групп.

Семейство HU. Впервые HU охарактеризован в 1975 г., как гистоноподобный белок штамма *E. coli* U93 [3]. Белки семейства HU, обнаруженные практически у всех эубактерий (таблица составлена с ис-

пользованием базы данных NCBI и программы BLAST), образованы двумя субъединицами, HU α и HU β [4]. Субъединица HU представлена α -спиралью, накрытой β -слоями, которые продолжают в β -тяжи, формирующие подвижные “руки”. Эти “руки” содержат на конце остаток пролина, который позволяет изгибать ДНК путем встраивания между парами оснований [5]. По-видимому, одной молекулы HU достаточно для образования изгиба ДНК [6]. Связывание HU с ДНК имеет неспецифический характер, но существует предпочтение в связывании со структурными искажениями, такими, как разрывы одной или двух цепей, а также с репликативными вилками [7, 8]. Помимо остатков пролина, в образование изгиба ДНК, по-видимому, вносят вклад белок-белковые взаимодействия между димерами. Такие взаимодействия, например, облегчают формирование циклических молекул ДНК *in vitro* [9]. Функциональная роль HU, как полагают, состоит в участии в процессах суперскручивания ДНК. Так хромосомы и плазмиды *E. coli*, экспрессирующей мутантный HU, частично расплетены [3, 10]. Суперскручивание ДНК, вызванное HU, приводит к стабилизации ДНК-белковых комплексов [11]. HU может быть заменен эукариотическим гистоновым белком семейства HMG1/2. Физиологические дефекты мутантов *E. coli* по генам *hupA*, *hupB* могут быть устранены продукцией митохондриального белка дрожжей HM и ядерного белка дрожжей NHP6A/B. Так же, как HU, эти белки способны связываться с ДНК, вызывая изгибы [12, 13].

Однако, кроме структурной роли, HU принимают участие в регуляции активности ряда промоторов. Так, например, HU участвуют в обеспечении GalR-зависимой репрессии промотора *E. coli galP2*. Взаимодействие HU с ДНК позволяет тетрамеру GalR формировать петлю на месте промотора. При

Степень гомологии гистоноподобных белков в некоторых таксонах бактерий по сравнению с гистоноподобными белками *E. coli*

Таксон	HU	IHF	H-HS	FIS
Actinobacteria	32–47%	–	–	–
Bacteroidetes	59–60%	–	–	Обнаружен только у <i>Parabacteroides distasonis</i> (41%)
Chlamidiae	–	25–35%	–	–
Cyanobacteria	41–47%	–	–	–
Bacillales	37–47%	–	–	–
Clostridia	32–46%	–	–	Обнаружен только у <i>Thermoanaerobacter</i> sp. (35–43%)
Lactibacillales	44–39%, у <i>Carinobacterium</i> sp. и <i>Enterococcus</i> sp. не обнаружен	–	–	–
Mollicutes	22–39%	–	–	–
Rickettsiales	27–32%	–	–	–
Bordetella	42%	65%	–	40–45%
Burkholderia	38–40%	75%	–	–
Neisseriaceae	36–40%	69–73%	–	Обнаружен только у <i>Chromobacterium violaceum</i> (47%)
Enterobacteriales	61–100%	–	48–100%	41–100%

этом имеет место специфичное соединение димера HU и GalR [14]. Подобный механизм определяет локализацию начала Mu-транспозиции [4].

Для некоторых бактерий продемонстрирована важность белков семейства HU для деления. Так, показана невозможность получения ноль-мутантов по гену гистоноподобного белка HLP (гомологу HU) для *Streptococcus intermedius*, штамм которого с индуцированной транскрипцией антисмысловой Si-*hlp* РНК терял способность к росту и демонстрировал значительные изменения морфологии клеток и клеточной стенки [15]. Стоит заметить, что инактивация генов *hu* у ряда других бактерий приводила к дефектам их роста, но, тем не менее, такие клетки оставались способны к делению. Было также показано участие HU в процессах репарации ДНК *in vitro* [16].

Микобактерии также синтезируют гистоноподобные белки – HLP (HupB, MDP1), близкие к белкам HU других зубактерий, но отличающиеся от них аминокислотной последовательностью. HLP больше по размеру других HU белков, N-концевая последовательность HLP микобактерий гомологична N-концевой последовательности HU, C-концевой домен, богатый пролином, аланином и лизином, содержит мотив, соответствующий эукариотическому гистону H1, который включает повторяющиеся по-

следовательности PAKKA, обеспечивающие специфическое связывание белка с ДНК [17].

Белки HLP микобактерий, по-видимому, необходимы для переживания стрессовых условий. Так, холодный шок у *Mycobacterium smegmatis* приводит к усилению экспрессии *hlp* генов [18]. Ноль-мутант по гистоноподобному белку оказался неспособным к росту при 10°C [19]. Усиление уровня экспрессии *hlp* также было выявлено у покоящихся клеток *M. smegmatis* в микроаэрофильных условиях (модель Вэйна) [20]. По-видимому, это обусловлено необходимостью структурной перестройки нуклеоида при формировании состояния покоя. Тем не менее, ноль-мутанты по гену *hlp* оказались способны переходить в нерепликативное состояние, и жизнеспособность клеток в этом состоянии не отличалась от дикого типа *M. smegmatis*. Авторы предположили, что это может быть связано с наличием других ДНК-связывающих белков, способных компенсировать недостаток HLP [20]. Этим данным противоречат результаты экспериментов, полученных на другой модели покоя *M. smegmatis*. Было продемонстрировано, что некультивируемые формы ноль-мутанта по гену *hlp* неспособны к реактивации в отличие от клеток дикого штамма, что свидетельствует о важнейшей роли белка HLP в формировании состояния покоя микобактерий [21]. На модели образования культивируемых покоящихся форм,

морфологически отличных от вегетативных клеток, показано, что отсутствие HLP не влияет на образование морфологически отличных форм, но его отсутствие приводит к потере устойчивости этих форм к стрессовым факторам таким, как повышенная температура и ультрафиолет [22]. Удивительным является факт, что HLP, помимо присутствия в цитоплазме, возможно, локализуется также и на внешней поверхности клеточной стенки микобактерий (заметим, ген *hlp* не содержит сигнальной последовательности, обеспечивающей секрецию белка). Более того, показано, что HLP регулирует функцию миколтрансфераз, непосредственно связываясь как с ними, так и с субстратом — трегалозомономиколатом на поверхности клеточной стенки [19]. HLP играет роль в колонизации тканей *S. intermedius* и *Mycobacterium leprae*. Возможно, именно с клеточной стенкой связано участие HLP в одном из ключевых этапов патогенеза — адгезии [23, 24]. Однако такая связь HLP с бактериальной стенкой *M. smegmatis* не была обнаружена [24].

Семейство IHF. Белок IHF первоначально был открыт как кофактор сайт-специфической системы рекомбинации [2]. По своей структуре IHF является гомологом HU (30–40% идентичности).

В отличие от HU, IHF — облигатный гетеродимер. Его способность к неспецифическому связыванию с ДНК значительно слабее, чем у HU [25]. IHF специфически связывается с сайтами, содержащими последовательность вида WATCARXXXTTTR. Где W — это А или Т; X — это А, Т, С или G; R — это А или G. Такая связь очень прочна [5]. IHF, по-видимому, играет важную роль в организации нуклеоида. Было показано, что IHF может конденсировать линейную молекулу ДНК в более компактную произвольно скрученную структуру [4]. Помимо организации нуклеоида, IHF участвует в некоторых регуляторных процессах. Так, этот белок играет важную роль в горизонтальном переносе генов. Активация бактериального транспозона Tn10 обеспечивается индуцированной IHF перестройкой ДНК и связыванием белка с транспозосомой.

IHF присоединяется к специфическим сайтам в промоторной области, формируя петли ДНК, позволяющие взаимодействовать РНК-полимеразе и удаленным регуляторным белкам. Подобным образом, он облегчает сборку комплексов инициации в *ori*-сайтах плазмид [6]. Так же, как и HU, IHF стимулирует расплетание ДНК в области *oriC* у *E. coli*, регулируя сборку пререпликативного комплекса [26]. У *Pseudomonas fluorescens* IHF участвует в регуляции экспрессии оперона *styABCDE*, ответственного за синтез стиренов. IHF связывается с участком промотора, конкурируя с StyR-P и препятствуя формированию петли ДНК, подавляющей экспрессию *styABCDE* [27]. Аналогичным образом у *E. coli* IHF

обеспечивает регуляцию промотора *hpaGEDFHI* оперона, ответственного за катаболизм ароматических соединений. IHF конкурирует с CRP (catabolite repression protein), который подавляет транскрипцию *hpaGEDFHI* оперона [28].

Семейство H-NS. Размеры белков H-NS близки к HU (15.5 кДа). Молекула содержит 136 аминокислот и состоит из двух независимых доменов. Первые 64 остатка формируют структуру, способную блокировать активный центр полноразмерной молекулы в результате белок-белковых взаимодействий (образуется гетеродимер). Оставшиеся аминокислоты формируют антипараллельный β -слой, α -спираль и 3_{10} -спираль, формирующую гидрофобное ядро. Именно этот домен ответственен за взаимодействие H-NS с ДНК [29]. Во многих бактериальных таксонах H-NS кодируется несколькими генами, значительно отличающимися друг от друга (до пяти копий у *Pseudomonas putida* и *Shigella flexneri*) [30]. Это дает возможность предположить, что в одной клетке может находиться несколько типов таких молекул, которые способны формировать гетеродимеры и олигомеры [31, 32]. Связывание H-NS с ДНК не специфично, однако области с высоким содержанием АТ оказываются более предпочтительными [4]. Решающее значение для связывания с H-NS имеет степень изогнутости ДНК. *In vitro* было показано, что H-NS плохо садится на слабо изогнутый участок ДНК, но демонстрирует очень высокую аффинность к сильно изогнутым участкам молекулы. [33]. Следует отметить, что эффективность связывания H-NS с транспозоном оказалась независимой от степени изогнутости ДНК [25].

Основными функциональными единицами H-NS являются димеры, которые, в свою очередь, олигомеризуются, формируя сложные структуры и связывая различные участки ДНК. H-NS способен соединять два участка ДНК наподобие застёжки-молнии [2].

По-видимому, H-NS является антагонистом HU, выполняя противоположные функции в формировании структуры нуклеоида и в регуляции экспрессии генов. При низких концентрациях HU умеренно компактизирует ДНК, формируя подвижные изгибы и суперскрученность.

При увеличении концентрации белка HU ДНК приобретает форму жестких, спиральных тяжей, при этом HU не вызывает значительной конденсации ДНК, а обеспечивает открытое состояние циклическим молекулам ДНК (например, плазмиде pUC19). Молекула приобретает форму идеального кольца, которое поддерживается за счет белок-белкового взаимодействия между димерами. В то же время в присутствии H-NS происходит компактизация таких плазмид до гантелеобразной структуры.

Белок HU способен локально обращать вызванную H-NS конденсацию ДНК [10].

Активность РНК полимеразы фага T7 значительно выше в присутствии HU, в то же время H-NS, как правило, работает в качестве репрессора транскрипции. Помимо этого, у ноль-мутантов по HU наблюдается усиление подавления транскрипции некоторых генов, по-видимому, за счет действия белков H-NS. HU способен ослабить такое подавление транскрипции [34]. Было показано, что H-NS подавляет экспрессию многих, не связанных между собой генов грамотрицательных бактерий [35, 30], что позволяет рассматривать H-NS в качестве глобального репрессора. Редкие случаи усиления экспрессии генов H-NS, видимо, объясняются его непрямым действием, вероятно, за счет взаимодействия со специфическим для данного гена репрессором [36]. Существует ряд общих черт в механизмах подавления H-NS транскрипции разных генов. Последовательно происходят следующие события. Белок садится на изогнутый участок ДНК, содержащий промотор, причем сайтов связывания H-NS, как минимум, два. При этом часть ДНК, “отсеченная” H-NS комплексом, формирует петлю, в которой оказывается захваченной РНК полимеразы [4, 10].

Способность H-NS образовывать ДНК петли обусловлена его структурой. N-конец обеспечивает возможность формирования олигомеров, а два функциональных домена на C-конце позволяют образовывать связи с ДНК. Олигомеры H-NS замыкают смежные области растянутых участков ДНК, в результате образуется петля [31]. Эти структуры могут быть разрушены другими гистонподобными белками (HU) или обычными транскрипционными факторами, а также температурным воздействием и изменениями осмотических характеристик среды. Таким образом, многим генам необходимо внешнее воздействие для преодоления H-NS репрессии [37]. Следует отметить, что H-NS может образовывать гетеромеры с другими белками. Так, у некоторых грамотрицательных бактерий этот гетеромер включает белок StpA, последовательность которого имеет 58% сходства с последовательностью H-NS. Влияние подобных комплексов на активность H-NS в настоящее время не ясно [4]. Накоплено большое количество данных, свидетельствующих о ключевой роли H-NS в обеспечении “молчания” генов, входящих в так называемые “острова патогенности” PI (pathogenity islands), например у *Yersinia* и *Salmonella* [38].

По-видимому, H-NS, так же, как и белки IHF, принимает участие в горизонтальном переносе генов. Так, у мутантов с поврежденным геном *hns* частота транспозиции Tn10 значительно снижалась

[39], а добавление H-NS в реакцию транспозиции *in vitro* стимулировало ее [40].

Семейство FIS. FIS является гомодимером, каждая субъединица которого состоит из 98 аминокислот. N-конец гибок и неорганизован. Он переходит в 4 α -спирали, соединенные с двумя спиралями C-конца, ответственного за связывание с ДНК [41]. В высоких концентрациях FIS способен связываться с ДНК неспецифически, однако в клетке FIS связывает и изгибает только определенные ДНК мишени [42]. Относительное содержание в клетке FIS наиболее велико в экспоненциальной фазе роста, а с наступлением стационарной фазы его количество резко падает [43–45].

FIS играет существенную роль в регуляции ДНК-связанных процессов. Этот белок рассматривается как глобальный регулятор метаболизма, влияющий на физиологию клетки путем изменения структуры хромосомы [44]. Так, FIS способствует усилению транскрипции путем уменьшения уровня негативной суперспирализации ДНК. Связь FIS с ДНК обеспечивает выделение петли из суперскрученной молекулы. Предполагается, что FIS локально регулирует уровень суперскручивания ДНК, для обеспечения его на уровне, оптимальном для функционирования промоторов, которые располагаются на апексах сформированной петли [46]. Уровень суперскручивания ДНК контролируется двумя противоположными процессами: работой ДНК-гиразы и топоизомераз. FIS подавляет экспрессию генов *gyrA* и *gyrB*, кодирующих ДНК-гиразу у *E. coli*. Он связывается с комплексом инициации транскрипции *gyrA* и *gyrB* и препятствует его переходу в открытое, активное состояние, блокируя экспрессию [47]. Он также активирует один из промоторов *topA*, кодирующий топоизомеразу I, в ответ на действие окислительного стресса [48].

FIS участвует в регуляции генов вирулентности бактерий. Он подавляет вызванную H-NS репрессию, например, активируя гены вирулентности у *Shigella*. Повышение концентрации FIS приводит к отсоединению H-NS от ДНК и индуцирует экспрессию *virF* [49]. Уровень транскрипции гена *fis* зависит от концентрации FIS белка, который подавляет собственный промотор по принципу негативной ауторегуляции [50]. FIS увеличивает скорость транскрипции в промоторах некоторых генов *E. coli*, взаимодействуя с α -субъединицей РНК-полимеразы [51]. Так, FIS обеспечивает регуляцию промоторов рибосомальных генов, вызывая увеличение уровня их транскрипции [52]. Кроме того, FIS может работать в качестве репрессора транскрипции, например, ослабляя действие промотора, контролирующего *guaBA* оперон, ответственный за синтез ГМФ [53].

Наряду с IHF, FIS регулирует промотор оперона *hpaGEDFHI*, ответственного за катаболизм ароматических соединений у *E. coli*. На богатой среде (LB), FIS подавляет работу этого промотора, выключая данный катаболический путь [28]. Работа многих промоторов обеспечивается путем взаимодействия с IHF и FIS. Так, активация *nir* оперона *E. coli* (кодирует NADH-зависимую нитритредуктазу) регуляторным FNR белком модулируется IHF и FIS. Промотор *nir* содержит два сайта связывания IHF. Связывание IHF с первым приводит к репрессии, со вторым – к активации транскрипции. Связывание FIS с этим промотором подавляет транскрипцию [54]. Подавление транскрипции оперона вызвано нарушением связывания РНК-полимеразы с промотором после связывания с IHF и FIS. Баланс между активацией и репрессией оперона белками IHF и FIS обеспечивает тонкую регуляцию процесса синтеза нитритредуктазы [55].

Существует ряд малоизученных гистоноподобных белков, которые невозможно отнести ни к одному из пяти описанных семейств из вышеприведенной классификации. Так, у *Mycobacterium tuberculosis* был обнаружен гистоноподобный белок Lsr2. Его последовательность не является гомологичной ни одному другому гистоноподобному белку. Это небольшой основной белок с массой 12 кДа, способный образовывать мультимерные структуры. Lsr2 неспецифически связывается с ДНК, отдавая предпочтение ее циклическим вариантам, вызывая суперспирализацию. Этот белок ответственен за подавление экспрессии *efpA* и *iniBAC*, вызывающих устойчивость *M. tuberculosis* к антибиотикам (multi-drug tolerance). Инактивация *lsr2*, как и в случае с HLP, приводила также к изменению липидного состава клеточной стенки [56].

Гистоноподобные белки Hc1 и Hc2 (H1-like proteins) хламидий обеспечивают структурные перестройки хроматина. Жизненный цикл хламидий характеризуется наличием двух форм, – ретикулярных тел (внутриклеточная форма), и элементарных тел (внеклеточные, по-видимому, покоящиеся формы) [57]. Белок Hc1 консервативен, в то время как масса Hc2 варьирует у разных видов, а у некоторых видов он отсутствует [58]. Гиперэкспрессия Hc1 и Hc2 в *E. coli* приводит к повышенной компактизации хроматина, что делает невозможным транскрипцию, трансляцию и деление. Однако снять летальный эффект такой гиперэкспрессии этих белков оказалось возможным путем внесения в *E. coli* плазмиды, несущей ген *ispE* хламидии, кодирующий один из промежуточных метаболитов немевалонатного пути синтеза изопреноидов [58]. Предполагается, что белки Hc1 и Hc2 участвуют в переходе клеток хламидий в покоящееся состояние (внеклеточные формы), а метаболит немевалонатного пути контролирует обратимость этого состоя-

ния. Возможно, эта схема работает и в других случаях образования покоящихся форм. Так, было обнаружено, что гиперэкспрессия гена *ispE M. smegmatis* приводит к спонтанной реактивации покоящихся форм, что может говорить о влиянии продукта этого гена на предполагаемую компактизацию ДНК у микобактерий, вызванную гистоноподобными белками [59].

Бактериальный нуклеоид – сложная структура, имеющая несколько уровней организации от первичной последовательности пар оснований нуклеотидов до третичной структуры бактериальной хромосомы. На протяжении жизненного цикла бактерии происходит структурная реорганизация нуклеоида с образованием суперскрученных участков ДНК. Структура доменов непостоянна и в процессе метаболизма изменяется, что обеспечивает постоянную реорганизацию хромосомы, необходимую для изменения физиологического статуса клетки. Гистоноподобные белки играют ключевую роль в этом процессе, принимая участие в организации отдельных суперскрученных петель, поддерживая “топологический гомеостаз” в клетке [60]. Эта функция осуществляется гистоноподобными белками за счет различных механизмов, в числе которых изгибание (белки типа “benders”), скручивание (белки типа “wrappers”) и формирование петель-сшивок (белки типа “bridgers”). Гистоноподобные белки прокариот представлены несколькими семействами основных белков с малой молекулярной массой, объединенных по особенностям структуры и связывания с ДНК. Представители разных семейств гистоноподобных белков осуществляют различные функции, хотя иногда у них наблюдается и их перекрывание. Кроме структурной функции гистоноподобных белков, которая хорошо изучена у эукариот, у бактерий эти белки участвуют непосредственно в регуляции отдельных оперонов. В этом смысле функция гистоноподобных белков прокариот значительно шире, чем у эукариотических гистононов. Показано, что результат функционирования гистоноподобных белков как регуляторов может быть противоположен, например, стимуляция и репрессия транскрипции, что позволяет осуществлять тонкую регуляцию экспрессии генов.

Особая роль гистоноподобных белков состоит в их участии в глубокой реорганизации хромосомы (стабилизации ее структуры) при переходе клеток в состояние покоя. Потеря способности микобактерий к реактивации в отсутствие гистоноподобного белка позволяет рассматривать соответствующий делеционный мутант в качестве потенциального вакцинного препарата.

Наши знания о бактериальных гистоноподобных белках в настоящее время ограничены, но оче-

видно, что их детальное исследование важно для понимания молекулярных основ адаптации бактерий к изменяющимся условиям их существования.

Работа выполнена при поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России”. Государственные контракты № 14.740.11.0801, № 14.740.11.1056, № 14.740.11.0246.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lewin B. Genes. N.-Y., Tokyo: Oxford Univ. Press, 1994. 1272 p.
- Thanbichler M., Wang S.C., Shapiro L. // J. Cell. Biochem. 2005. V. 96. № 3. P. 506–521.
- Rouviere-Yaniv J., Gros F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 9. P. 3428–3432.
- Dorman C.G., Deighan P. // Curr. Opin. Genet. Dev. 2003. V. 13. № 2. P. 179–184.
- Swinger K.K., Rice P.A. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2004. V. 14. № 1. P. 28–35.
- Goodman S.D., Nickolson S.C., Nash H.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. № 24. P. 11910–11914.
- Kamashev D., Balandina A., Rouviere-Yaniv J. // EMBO J. 1999. V. 18. № 19. P. 5434–5444.
- Benevides J.M., Danahy J., Kawakami J., Thomas G.J. // Biochemistry. 2008. V. 47. № 12. P. 3855–3862.
- Hodges-Garcia Y., Hagerman P.J., Pettijohn D.E. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 25. P. 14621–14623.
- Dame R.T., Goosen N. // FEBS Lett. 2002. V. 529. № 2–3. P. 151–156.
- Lavoie B. D., Chaconas G. // Genes Dev. 1993. V. 7. № 12B. P. 2510–2519.
- Megraw T., Chae C. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. № 17. P. 12758–12763.
- Megraw T.T., Kao L.R., Chae C.B. // Biochimie. 1994. V. 76. № 10–11. P. 909–916.
- Aki T., Adhya S. // EMBO J. 1997. V. 16. № 12. P. 3666–3674.
- Liu D., Yumoto H., Murakami K., Hirota K., Ono T., Nagamune H., Kayama S., Matsuo T., Miyake Y. // Mol. Microbiol. 2008. V. 68. № 5. P. 1268–1282.
- Pontigga A., Negri A., Beltrame M., Bianchi M.E. // Mol. Microbiol. 1993. V. 7. № 3. P. 343–350.
- Mukherjee A., Bhattacharyya G., Grove A. // Biochemistry. 2008. V. 47. № 33. P. 8744–8753.
- Shires K., Steyn L. // Mol. Microbiol. 2001. V. 39. № 4. P. 994–1009.
- Katsube T., Matsumoto S., Takatsuka M., Okuyama M., Ozeki Y., Naito M., Nishiuchi Y., Fujiwara N., Yoshimura M., Tsuboi T., Torii M., Oshitani N., Arakawa T., Kobayashi K. // J. Bacteriol. 2007. V. 189. № 22. P. 8241–8249.
- Lee B.H., Murugasu-Oei B., Dick T. // Mol. Gen. Genet. 1998. V. 260. P. 475–479.
- Anuchin A.M., Goncharenko A.V., Demina G.R., Mulyukin A.L., Ostrovsky D.N., Kaprelyants A.S. // FEMS Microbiol. Lett. 2010. V. 308. № 2. P. 101–107.
- Anuchin A.M., Goncharenko A.V., Galon I.V., Demidenok O.I., Kudykina Iu.K., Moisenovich M.M., Muliukin A.L., Kaprelyants A.S. // Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 2010. V. 46. № 3. P. 308–314.
- Stinson M.W., McLaughlin R., Choi S.H., Juarez Z.E., Barnard J. // Infect. Immun. 1998. V. 66. № 1. P. 259–265.
- Portugal M.I., Todeschini A.R., Lima C.S., Silva C.A., Mohana-Borges R., Ottenhoff T. H., Mendonca-Previato L., Previato J., Pessolani M. C. // BMC Microbiol. 2008. V. 8. P. 72.
- Mukherjee A., DiMario P.J., Grove A. // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 291. № 2. P. 232–240.
- Ryan V.T., Grimwade J.E., Nievera C.J., Leonard A.C. // Mol. Microbiol. 2002. V. 46. № 1. P. 121–124.
- Rampioni G., Leoni L., Pietrangeli B., Zennaro E. // BMC Microbiol. 2008. V. 8. P. 92.
- Balan B., Kolb A., Garcia J.L., Prieto M.A. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 40. P. 37060–37068.
- Rimsky S. // Curr. Opin. Microbiol. 2004. V. 7. № 2. P. 109–114.
- Tendeng C., Bertin P.N. // Trends Microbiol. 2003. V. 11. № 11. P. 511–518.
- Dorman C.J., Hinton J.C., Free A. // Trends Microbiol. 1999. V. 7. № 3. P. 124–128.
- Ceschini S., Lupidi G., Coletta M., Pon C.L., Fioretti E., Angeletti M. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 2. P. 729–734.
- Dame R.T., Wyman C., Goosen N. // Biochimie. 2001. V. 83. № 2. P. 231–234.
- Morales P., Rouviere-Yaniv J., Dreyfus M. // J. Bacteriol. 2002. V. 184. № 6. P. 1565–1570.
- Hommais F., Krin E., Laurent-Winter C., Soutonina O., Malpertuy A., Le Caer J.P., Danchin A., Bertin P. // Mol. Microbiol. 2001. V. 40. № 1. P. 20–36.
- Schröder O., Wagner R. // Biol. Chem. 2002. V. 383. № 6. P. 945–960.
- Yu R.R., DiRita V.J. // Mol. Microbiol. 2002. V. 43. № 1. P. 119–134.
- Navarre W.W., McClelland M., Libby S.J., Fang F.C. // Genes Dev. 2007. V. 21. № 12. P. 1456–1471.
- Swingle B., O’Carroll M., Haniford D., Derbyshire K.M. // Mol. Microbiol. 2004. V. 52. № 4. P. 1055–1067.
- Wardle S.J., O’Carroll M., Derbyshire K.M., Haniford D.B. // Genes Dev. 2005. V. 19. № 18. P. 2224–2235.
- Kostrewa D., Granzin J., Koch C., Choe H.W., Raghunathan S., Wolf W. // Nature. 1991. V. 349. № 6305. P. 178–180.
- Shao Y., Feldman-Cohen L.S., Osuna R. // J. Mol. Biol. 2008. V. 380. № 2. P. 327–339.
- Ball A., Osuna R., Ferguson K.C., Jonson R.C. // J. Bacteriol. 1992. V. 174. № 24. P. 8043–8056.
- Azam T.A., Ishihama A. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 46. P. 33105–33113.
- Ninnemann O., Koch C., Kahmann R. // EMBO J. 1992. V. 11. № 3. P. 1075–1083.
- Travers A., Schneider R., Muskhelishvili G. // Biochimie. 2001. V. 83. № 2. P. 213–217.
- Schneider R., Travers A., Kutateladze T., Muskhelishvili G. // Mol. Microbiol. 1999. V. 34. № 5. P. 953–964.

48. *Weinstein-Fischer D., Elgrably-Weiss M., Altuvia S.* // *Mol. Microbiol.* 2000. V. 35. № 6. P. 1413–1420.
49. *Falconi M., Prosseda G., Giangrossi M., Beghetto E., Colonna J.* // *Mol. Microbiol.* 2001. V. 42. № 2. P. 439–452.
50. *Walker K.A., Atkins C.L., Osuna R.* // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. № 4. P. 1269–1280.
51. *Ailyar S.E., McLeod S.M., Ross W., Hirownen C.A., Thomas M.S., Jonson R.C., Gourse R.L.* // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 316. № 3. P. 501–516.
52. *Hirvonen C.A., Ross W., Wozniac C.E., Marasco E., Anthony J.R., Aiyar S.E., Newburn V.H., Gourse R.L.* // *J. Bacteriol.* 2001. V. 183. № 21. P. 6305–6314.
53. *Husnain S.I., Thomas M.S.* // *Microbiology.* 2008. V. 154. № 6. P. 1729–1738.
54. *Browning D.F., Cole J.A., Busby J.W.* // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 53. № 1. P. 496–510.
55. *Browning D.F., Cole J.A., Busby S.J.* // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. № 21. P. 7258–7267.
56. *Chen J.M., Ren H., Shaw J.E., Wang Y.J., Li M., Leung A.S., Tran V., Berbenetz N.M., Kocíncová D., Yip C.M., Reyrat J.M., Liu J.* // *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36. № 7. P. 2123–2135.
57. *Grieshaber N.A., Sager J.B., Dooley C.A., Hayes S.F., Hackstadt T.* // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. № 14. P. 5289–5292.
58. *Baaklini I., Usongo V., Nolent F., Sanscartier P., Hraiky C., Drlica K., Drolet M.* // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. № 22. P. 7346–7356.
59. *Luijsterburg M.S., White M.F., Driel R., Dame R.T.* // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2008. V. 43. № 6. P. 393–418.
60. *Dame R.T., Wyman C., Wurm R., Wagner R., Goosen N.* // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 3. P. 2146–2150.

Histone-Like Proteins of Bacteria (Review)

A. M. Anuchin, A. V. Goncharenko, O. I. Demidenok, and A. S. Kaprelyants

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

e-mail: demidenoksana@gmail.com

Received December 8, 2010

Abstract—Four major families of bacterial histone-like proteins (HU, IHF, H-NS, FIS), united on the basis of structural similarity and performing specific structural and regulatory functions in the cell, are discussed. Histone-like proteins perform topological modification of the chromosome (twisting, bending, and folding) and directly regulate the functioning of promoters of individual operons. Histone-like proteins are critical for the regulation of cell metabolism, are involved in the response to environmental changes, and play a key role in the transition to and maintenance of the quiescent state of bacteria.

UDC 582.28:577.153

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF COMPLETE GENE ENCODING AN ALKALINE LIPASE FROM *Penicillium cyclopium*

© 2011 H. M. Zhang*, M. C. Wu**, J. Guo**, J. F. Li*

* School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, PR China

** School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, PR China

e-mail: biowmc@126.com

Received

The complete gene (PG37 *lipI*) encoding an alkaline lipase (PG37 LipI) was cloned from the genomic DNA of *Penicillium cyclopium* PG37. The cloned PG37 *lipI* is 2020 bp in length, consisting of 632 bp of the 5' flanking promoter region and 1388 bp of the downstream fragment that contains 6 exons and 5 short introns. The promoter region harbors putative TATA box, CAAT box and several transcription factor binding sites. The open reading frame (ORF) encodes a PG37 LipI of 285 amino acid residues, which was predicted to contain a 20-aa signal peptide, a 7-aa propeptide and a 258-aa mature peptide with a conserved motif Gly-X-Ser-X-Gly. However, PG37 LipI shows only 32%, 30%, 28% and 26% identity with lipases of *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium camembertii*, *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei*, respectively. It was predicted that the main secondary structures of PG37 LipI are α -helix and random coil. Three amino acid residues, Ser¹³²-Asp¹⁸⁸-His²⁴¹, compose the enzymatic active center in the tertiary structure.

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3), which exist ubiquitously in living organisms, can catalyze the hydrolysis of triacylglycerols into diacylglycerols, monoacylglycerols, free fatty acids and glycerol at the oil-water interface, as well as the synthesis of lipids, esterification, transesterification and aminolysis reaction in organic solvents [1, 2]. Recently, the enzymes have been widely applied in food, detergent, pharmaceutical and cosmetic industries, and also used as biosensors, diagnostic tools and in bioremediation, etc [3]. During the past decades, lipases have been produced and purified from mammalian, bacterial, fungal and plant sources [4, 5]. Their physicochemical properties such as molecular weight, amino acid composition, metal ion-binding capacity and substrate specificity have also been studied in detail. A number of lipase genes have been cloned from yeast, *Bacillus subtilis*, and *Rhizopus* species [6–8]. Although there are wide differences in their primary structures and characteristics, most of the lipases share the same core topology in the tertiary structure, known as the α/β hydrolase fold [9]. All lipases studied so far share a conserved motif Gly-X-Ser-X-Gly in the primary structure, where the serine residue is considered as the catalytic residue that is one of catalytic triad Ser-Asp-His, and the 2 flanking glycine residues are essential for topology [10]. The catalytic triad locates in the hydrophobic cleft of the lipase, where the fatty acyl chain inserts and gets cleaved.

Until now, it has been found that over 60 genera of microorganisms can produce lipases [11]. In contrast to animal and plant lipases, extracellular microbial lipases can be produced by fermentation in large quantities and rela-

tively inexpensively [12]. But further commercialization of the microbial lipases is hindered by their low stability, activity or specificity. In order to make the use of lipases more economical and efficient, more attention has been focused on modifying their structures and improving their catalytic properties with chemical or physical approaches and, recently, through genetic engineering means [1]. Recombinant DNA and genetic engineering technology not only provided the most powerful tools for deciphering the relationship between the structure and function of lipases, but also made it possible for their rational modification and higher production. Niu et al. [13], utilized error-prone PCR to introduce mutations in the *Rhizopus arrhizus* lipase. Through screening, one of the mutant lipases, A9T-E190V-M225I with improved thermostability was obtained. The optimum temperature of the mutant lipase was 10°C higher than that of the wild-type. In addition, the half-life of the mutant lipase at 50°C exceeded that of wild-type by 12-fold. Cox et al. [14] successfully increased the *Pseudomonas alcaligenes* lipase production by 15% through introducing a mutation, C-14T, in the promoter region of *P. alcaligenes* lipase gene.

In previous studies, we isolated the strain of *Penicillium cyclopium* PG37 that is able to secrete an alkaline lipase with high activity. Recently, the cDNA sequence encoding PG37 LipI was cloned based on the determined N-terminal amino acid sequence (GenBank accession AF274320) [15]. However, knowledge of the transcriptional regulation of PG37 *lipI* is still unclear. The aim of this work was cloning of the complete DNA gene *lipI* encoding PG37 LipI from the genomic DNA of *P. cyclopi-*

um PG37 by two steps of PCR amplification, usual PCR and ligation-mediated PCR. Furthermore, the DNA sequence of PG37 *lipI* and its deduced amino acid sequence were analyzed by bioinformatics. To our knowledge, this is the first report on the cloning and sequence analysis of a complete lipase gene from *P. cyclopium*.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids, and media. *Penicillium cyclopium* PG37 strain, isolated from soil in China as reported previously [15], was used for the alkaline lipase production, as well as for genomic DNA preparation. The following liquid medium was used for *P. cyclopium* PG37 strain culture (g/l): soybean phospholipids – 7.5, of corn steep liquor – 30, soybean meal hydrolyzate – 300 ml, K_2HPO_4 – 10.0, $MgSO_4$ – 1.0, trisodium citrate (pH 7.5) – 0.5. *Escherichia coli* JM109 strain was used as host cell for gene cloning and DNA sequencing, and it was cultured on Luria-Bertani medium [16]. pUCm-T vector for cloning of PCR products was purchased from Sangon (China).

Reagents. Restriction enzymes used for gene cloning, X-gal, IPTG, T4 DNA ligase, *Taq* DNA polymerase and DNA marker were purchased from TaKaRa (China). EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit and EZ-10 Spin Column Plasmid Mini-Preps Kit were purchased from BBI (Canada). All other chemicals were of analytical grade.

Primers for PCR amplification. With the information of the cDNA sequence encoding PG37 LipI (GenBank accession AF274320), PCR primers F1 (5'-ATGTTGT-TCAACTACCAATC-3'), R1 (5'-CAAATCAGATG-TATTTTTAT-3'), R2 (5'-CCTCGACTCCAAAATAG-GTG-3') and R3 (5'-GATTGGTAGTTGAACAA-CAT-3') were designed. Based on the principle of the ligation-mediated PCR, the oligonucleotides LD (5'-ATCCCTTCACTCTCAAGTGG-3') and 8-N (5'-AATTC CAC-3') were designed and used as an adaptor to be ligated to the genomic DNA digested with restriction enzyme *EcoR*. F1 and R1 were used for PCR amplification of the downstream fragment of PG37 *lipI*, while LD and R2 or R3 were used for PCR amplification of the promoter region (upstream fragment of PG37 *lipI*). All primers were synthesized by Sangon (China).

Genomic DNA extraction. Extraction of genomic DNA from *P. cyclopium* PG37 was performed according to the method [17] with appropriate modification. *P. cyclopium* PG37 was cultivated on above mentioned liquid medium at 28°C for 24 h on a rotary shaker at 220 rpm. The mycelia were collected through filtration and washed three times with SE buffer (0.15 mM NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0). The washed mycelia were homogenized in 10 volumes (w/v) of DNA extraction buffer (0.2 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 2% SDS, pH 8.0) for 3–5 min, and then incubated at 65°C for 1 h with shaking at 100 rpm. The homogenate was cooled at room tem-

perature and mixed with isovolumic phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1), followed by vigorous vortexing for 15 s. The supernatant was collected by centrifugation at 15000 rpm at 4°C for 10 min and re-extracted with isovolumic chloroform/isoamylalcohol (24 : 1). 2.5 volumes (v/v) of ethanol were added to the resulting supernatant and then allowed to stand at –20°C for 30 min, followed by centrifugation at 15000 g for 10 min. After washed twice with 75% ethanol and air dried, the resulting DNA precipitate was dissolved in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) supplemented with 50 µg/ml RNase.

Cloning of the downstream fragment. The downstream fragment of PG37 *lipI* was amplified from genomic DNA of *P. cyclopium* PG37 using primers F1 and R1, which were located at the 5'- and 3'-ends of the cDNA sequence. The aimed band was purified with DNA Gel Extraction Kit and ligated to pUCm-T vector. The resulting mixture was transformed into *E. coli* JM109 competent cells, followed by blue-white screening. The recombinant plasmid was identified by PCR amplification.

Cloning of the promoter region. Ligation-mediated PCR amplification of the promoter region was performed by four steps, as shown in Fig. 1. The genomic DNA of *P. cyclopium* PG37 was digested with restriction enzyme *EcoRI*. The derived DNA was ligated with an adaptor, which was an equimolar mixture of two oligonucleotides, 8-N and LD. The ligated DNA sample was amplified with primers LD and R2, and then subjected to a second round of PCR amplification with primers LD and R3 for confirmation. The purified PCR product was ligated to pUCm-T vector for sequencing.

DNA sequence analysis. By aligning the nucleotide sequences of the 2 cloned DNA fragments, the complete gene encoding PG37 LipI was obtained. The sequence of PG37 *lipI* was analyzed by bioinformatics. The prediction of promoter region and its characterization was carried out using the TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), along with the PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>). For the exact localization of the exon/intron boundaries, the GeneMark (<http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/eukhmm.cgi>) was used. The ORF was determined by the program of NCBI ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

Amino acid sequence analysis. The deduced amino acid sequence of PG37 LipI was analyzed by the Expert Protein Analysis System (<http://www.expasy.org/>). The ProtScale (<http://au.expasy.org/tools/protscale.html>) and the TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) were used for predicting the hydrophobic regions and the transmembrane domains, respectively. The SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) was used to identify the signal peptide of PG37 LipI. The physicochemical properties of PG37 LipI were analyzed by ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>). Motifs of PG37 LipI were

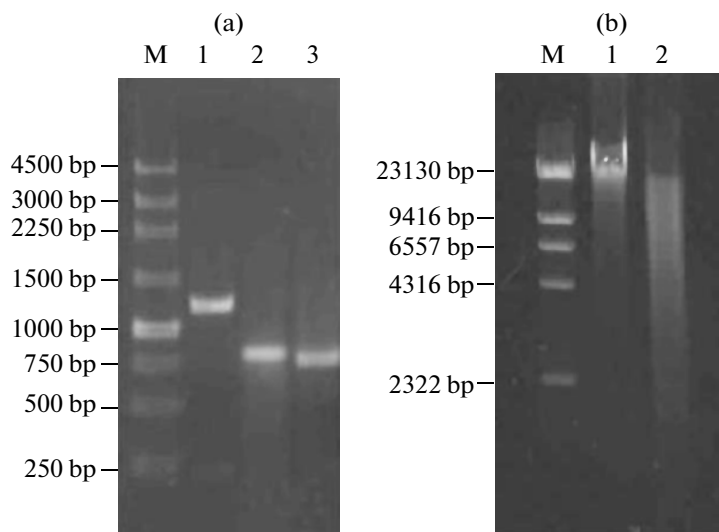


Fig. 2. Cloning of PG37 *lipI* from *P. cyclopium* PG37. (a) Amplification of the downstream fragment and promoter region of *lipI* from *P. cyclopium* PG37 by usual PCR and ligation-mediated PCR: M – 250 bp DNA marker; lane 1 – the usual PCR amplification of the downstream fragment of PG37 *lipI*; lane 2 – the first round of ligation-mediated PCR amplification of the promoter region of PG37 *lipI*; lane 3 – the second round of PCR amplification of the promoter region of PG37 *lipI*. (b) The genomic DNA of *P. cyclopium* PG37 and the DNA digested with restriction enzyme *EcoRI*: M, λ -*HindIII* digest DNA marker; lane 1 – PG37 genomic DNA; lane 2 – PG37 genomic DNA digested with restriction enzyme *EcoRI*.

CAAT box at about -75 bp position, although it does contain 3 CAAT boxes at -13 , -384 and -590 bp, respectively. The CAAT at -384 or -590 bp of PG37 *lipI* was identified as putative CAAT box.

Bioinformatics analysis indicated that the promoter region possesses several putative transcription factor binding sites. 5 HSF (heat shock factor) binding sites (-5 , -46 , -242 , -433 and -584 bp); four ADR1 (alcohol dehydrogenase gene regulator 1) binding sites (-16 , -56 , -272 and -437 bp); and several other *cis*-elements (data not shown) were found in PG37 *lipI* promoter region in response to various stresses. The fact that many *cis*-elements present in promoter region suggests that PG37 *lipI* is controlled by a complicated regulatory mechanism.

Amino acid sequence characterization of PG37 LipI.

SignalP predicted an unambiguous signal peptide cleavage site between Ser²⁰ and Ala²¹, indicating PG37 LipI as a secretory protein. The preprolipase of 285 amino acid residues was predicted to contain a 20-aa signal peptide, a 7-aa propeptide and a 258-aa mature peptide [15]. Propeptide also exists in *Rhizopus oryzae* [21], *Fusarium heterosporum* [22] and many other microbial lipases. In fungal lipases, it has been shown that the propeptide that is normally removed from the lipase during its maturation eliminates the phospholipolytic activity of the proenzyme while increasing the lipolytic activity [1]. It was predicted by TMHMM that there is no obvious transmembrane domain in PG37 LipI. The hydrophobicity of PG37 LipI was analyzed using ProtScale. As shown in Fig. 4, the minimum and maximum hydrophobic values

were -2.389 and 2.478 , respectively; and four major hydrophobic regions are MLFNYQSLLVGVSLISQALS (1–20 aa), VHRPWSAV (126–133 aa), AHVALA (168–173 aa) and AVTPGHIA (263–270 aa).

Molecular weight of 27291.8 Da and isoelectric point (pI) of 6.16 are calculated from the mature PG37 LipI, and its formula is C₁₂₁₅H₁₈₈₇N₃₂₃O₃₇₄S₉. The total number of negatively charged residues (Asp, Glu) is 22, while for the positively charged residues (Arg, Lys) it is 19. The hydrophobic residues (Ala, Ile, Phe, Leu, Met, Pro, Val and Trp) and uncharged residues (Asn, Cys, Gln, Gly, Ser, Thr and Tyr) occupy 44.9% and 35.1% of the total number, respectively. According to extremely low average of hydrophilicity (0.057), PG37 LipI is identified as a hydrophobic protein. Estimated instability index of 17.03 that is less than 40 and half-life of 4.4 h both suggest that PG37 LipI is a stable protein. Molecular weight of the native PG37 LipI was estimated to be about 29 kD by gel filtration using Sephadex G-150 and that of the denatured PG37 LipI was determined to be about 27.5 kD by its mobility on SDS-PAGE, which were almost in agreement with the calculated molecular weight. Nevertheless, the calculated pI is different from the pI (5.4) of native LipI determined by isoelectric focusing gels [15]. Post-translational modifications and higher structures of protein may account for the different pIs [23].

The result of motifs predicted by InterProScan showed that PG37 LipI contains a Lipase_3 motif and belongs to α/β hydrolase superfamily. Analyzed by ProtFun, PG37 LipI was supposed to possess the function of fatty acid metabolism and amino acid biosynthesis.

Fig. 3. Nucleotide sequence of PG37 *lipI*. DNA sequences of introns are shown in gray shadows. The letters in boxes, TTATTT and CAAT, indicate the putative TATA box and CAAT box, respectively; the letter G marked with "+1" indicates the starting point of transcription; the start codon and stop codons are shown in italic; the polyadenylation signal, AATAAA, is shown as underlined letters.

BLAST analysis of PG37 LipI showed 32, 30, 28 and 26% identity with lipases of *A. parasiticus* (GenBank: AAO17920), *P. camemberti* (PDB: 1TIA), *T. lanuginosus* (Swiss-Prot: O59952) and *R. miehei* (Swiss-Prot: P19515), respectively. The result of alignment showed that the pentapeptide sequence, G-H-S-L-G, in 5 lipases mentioned above is identical, with the consensus sequence in PG37 LipI locating at from 157 to 161 residue (Fig. 5). A catalytic triad, Ser¹³²-Asp¹⁸⁸-His²⁴¹ which exists in almost all lipases, was also found in PG37 LipI.

Structure analysis of PG37 LipI. The secondary structure was analyzed by SOPMA and the result showed that the PG37 LipI contains 31.78% α -helix, 19.77% extended strand, 5.81% β -turn, and 42.64% random coil. The α -helix and random coil constitutes the main part of the secondary structure. *P. camemberti* lipase crystal structure (PDB: 1TIA) was selected as a suitable template by a BLAST search. The tertiary structure of PG37 LipI was predicted in EsysPred3D Protein Modelling Server (Fig. 6). The core structure of PG37 LipI, where β -sheets are surrounded by α -helices, is in accordance with α/β hydrolase fold.

Although the overall homology between lipases is low, all known lipases share a comparable tertiary structure which is common to the α/β hydrolase family [21]. In

most lipase structures, the active center, Ser-Asp-His, is inaccessible due to coverage by a flexible alpha helical lid (residues Thr⁶⁶ to Val⁷²). The lid would most likely be involved in a conformational change that allows the substrate access to the active site [24]. These studies provided a structural basis for the well-known phenomenon of interfacial activation. On the contrary, Karkhane et al. [25] used site-directed mutagenesis to introduce mutation that Phe¹⁸¹ was substituted with alanine in the lid domain of *Bacillus thermocatenulatus* lipase. F181A mutation increased the distance between Phe¹⁸¹ and catalytic Ser¹¹⁴, which led to a decrease in steric hindrance. F181A mutation increased overall lipase activity by up to 2.6-fold (4670 U/mg) toward C8 substrate. It also resulted in optimal lipase activity at 65°C rather than 55°C.

In this study, we reported the cloning of the complete DNA gene encoding an alkaline lipase of *P. cyclopium* and bioinformatics analysis of the DNA sequence of PG37 *lipI* and its deduced amino acid sequence. The elucidation of the primary structure of the lipase of *P. cyclopium* with bioinformatics approaches provided us with a solid basis not only for the regulation and expression of PG37 *lipI*, but also for PG37 LipI rational modification.

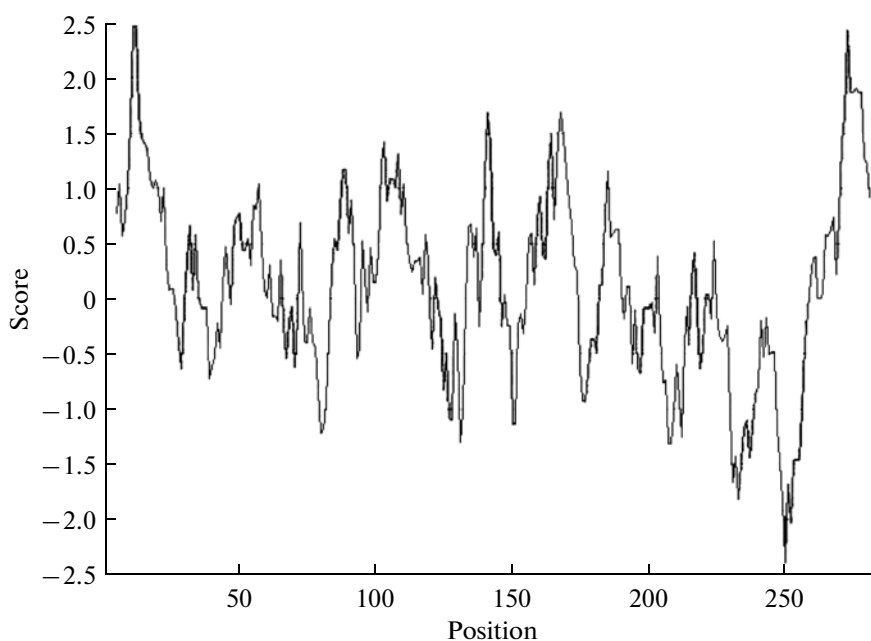


Fig. 4. Prediction of hydrophobicity by ProtScale.

APALMRFLSGFVSVLSSVA	15
PCAL	0
PCYL	0
RMIL	MVLKQRANYLGLFLIVFFTAFLVEAVPIKRQSNSTVDSLPLIPSRTSAPSSSPSTTDPEAPAMSRNGPLPSDEVETKYGMA	80
TLALMRSSLVLF	9
Consensus		
APAL	LLGYAYPTAIDVRDIPTTQLEDFKFWVQYAAATYCPNNYVAKDGEKLNCSVGNCPDVEAADSTVKLSFSDDTITITAGFV	95
PCALDVSTSELDQFEFWVQYAAASYEADYTAQVGDKLCSKGNCFEVEATGATVSYDFSESTITITAGYI	67
PCYL	.MLFNYQSLLVGVSLSQALSAPILESRATADAAAFFDLHR..AAKLSAAAYTGCIGKAFDVTITKRIYD.LVDTINGFV	76
RMIL	LNATSYDPSVQAMSIDGGIRAATSQEIINELTYTTLSANSYCRVIVPGATWDCIHCDATEDLKIIRKWTSLIYDTNAMV	160
TLAL	VSAWTALASPIRREVSQDLFNQFNLFAQYSAAYCYGKNNDAAGTNIITCTGNACPEVERADATFLYSFEDSGVGVITGFL	89
Consensus		d
APAL	AVDNTNKAIVVAEESYSIRNWWVDATFPQTD.....GLCDGCKAELEFWTAWKVRDRIIKTLDELKPEHSDKIVVV	170
PCAL	AVDHTNSAVVLAEEESYSVRNWWADATFVHTNP.....GLCDGLAELEFWSSWKLVRDIIKELKEVVAQNPNDELVVV	142
PCYL	GYSLEKRTIIVIMESSTITITDFVNDIDIALITPELSGVTFPSVVKIMREYHRPWSAVHDTIITEVKALIAKYPDTLEAV	156
RMIL	ARGDSEKTIYIVFEESIRNWIADLTFVPSV.....PPVSGTKVHKELFDSYGEQNELVATVLDQFKQYPSKVAVT	235
TLAL	ALDNTNKLIVLSFEESRSIENWIGNLNFLLKEIN.....DICSGCRGHLEFTSSWRSSADTLRQKVEDAVREHPEIRVVFT	165
Consensus		g v y
APAL	GRSLGAVIASLAAADR...TKNY.DAILYAYAAPRVANKPDEFITNQ..GNNYRFTHND..EPEKLPPLLTMG.YVEI	241
PCAL	GRSLGAVVATLAADR...GKGYPSAKLYAYASPRVGNAALEKYITAQ..GNNFRFTHN..EPEKLPLLSMG.YVEV	214
PCYL	GRSLGGVLTSLAHVAIAQ...NFPDKSLVSNALNAFFIGNQAWDFGTIAQ..AGTFNRGNVLEGFENMYSSPLVNFKEY	231
RMIL	GRSLGGVITALLCALDLYQREGLSSSNLFLYTQGGPRVGEPAFFNYVVST..GIPYRRTVNERLIDPEHLPPAAFV.FLEA	312
TLAL	GRSLGGVLATVAGADR...NGY.DIDVFSYGAPRVGNRAPEEFLTVQGGTLYRITHN..EPEERLPPREFG.YSES	238
Consensus	ghslg	a l a d vp h
APAL	SEFYIITAPDNTITDQVTVLGGYVNFEGNTGTSGGLPDLLEAFHSVWYFIHADACKRGHGLPFR.	306
PCAL	SEFYIITSPNNATITSDIKVIDGEVDFDNTGT..GLPLLDLFEAFIWFYVQVDAGKGPGLPFR	278
PCYL	GTIYIYSSGTEASTAKCEGQRDKSC.....SAGN...GMYAVTPGFIASEFGVVMLTAGCGYLS..	285
RMIL	SEFYIITENSPEITQVCTSELETS.....DCSN..SIVPFTSVLDELSEYEGINTGLCT.....	363
TLAL	SEFYIIRKSGTLVETIRNDEIVKIEG...IDATGGN..NQPNIPDIPAEIWFYGLIGTCL.....	291
Consensus	usey	v h f

Fig. 5. Alignment of lipases from *A. parasiticus* (APAL), *P. camemberti* (PCAL), *P. cyclopium* (PCYL), *R. miehei* (RMIL) and *T. lanuginosus* (TLAL). The identical amino acid residues are highlighted in shadow.

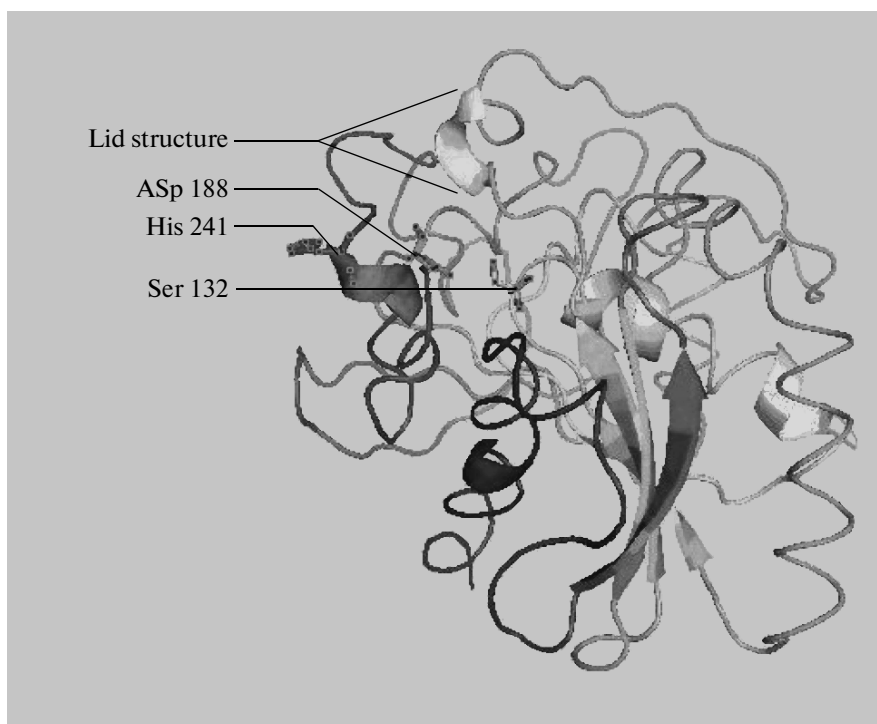


Fig. 6. Prediction of the tertiary structure of PG37 LipI. Ser¹³²-Asp¹⁸⁸-His²⁴¹, three amino acid residues compose the active center in the tertiary structure. The alpha helical lid structure was marked.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (No. 20776061). We are grateful to Prof. Weida Huang (Department of Biochemistry, School of Life Sciences, Fudan University) for providing technical assistance.

REFERENCES

- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille, J., and Haas, M.J., *J. Mol. Catal. B:Enzym.*, 2000, vol. 9, pp. 113–148.
- Sun, S.Y., Xu, Y., and Wang, D., *Bioresour. Technol.*, 2009, vol. 100, pp. 2607–2612.
- Hasan, F., Shah, A.A., and Hameed, A., *Enzyme Microb. Technol.*, 2006, vol. 39, pp. 235–251.
- Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B., and Davidson, W.S., *J. Microbiol. Methods*, 2003, vol. 52, pp. 1–18.
- Korneeva, O.S., Popova, T.N., Kapranchikov, V.S., and Motina, E.A., *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2008, vol. 45, pp. 349–355.
- Beer, H.D., McCarthy, J.E.G., Bornscheuer, U.T., and Schmid, R.D., *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, vol. 1399, pp. 173–180.
- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M., and Schäfer, W., *Arch. Microbiol.*, 2000, vol. 174, pp. 362–374.
- Eggert, T., Van Pouderoyen, G., Pencreach, G., Douchet, I., Verger, R., Dijkstra, B.W., and Jaeger, K.E., *Colloid Surf. B: Biointerface*, 2002, vol. 26, pp. 37–46.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verschuere, K.H.G., and Goldman, A., *Protein Eng.*, 1992, vol. 5, pp. 197–211.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G.G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Norskov, L., Thim, L., and Menge, U., *Nature*, 1990, vol. 343, pp. 767–770.
- Zhang, B., Yang, J.K., and Yan, Y.J., *Biotechnol. Bulletin*, 2007, vol. 2, pp. 52–57.
- Sharma, R., Soni, S.K., Vohra, R.M., Gupta, L.K., and Gupta, J.K., *Process Biochem.*, 2002, vol. 37, pp. 1075–1084.
- Niu, W.N., Li, Z.P., Zhang, D.W., Yu, M.R., and Tan, T.W., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2006, vol. 43, pp. 33–39.
- Cox, M., Gerritse, G., Dankmeyer, L., and Quax, W.J., *J. Biotechnol.*, 2001, vol. 86, pp. 9–17.
- Wu, M.C., Qian, Z.K., Jiang, P.H., Min, T.S., Sun, C.R., and Huang, W.D., *Lipids*, 2003, vol. 38, pp. 191–199.
- Sambrook, J. and Russell, D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor, 2001.
- Wendland, J., Lengeler, K.B., and Kothe, E., *Fungal Genet. Newsletter*, 1996, vol. 43, pp. 54–55.
- Reed, D.S. and Gibson, J.B., *Biochem. Genet.*, 1994, vol. 32, pp. 161–179.
- Lampidonis, A.D., Stravopodis, D.J., Voutsinas, G.E., Messini-Nikolaki, N., Stefos, G.C., Margaritis, L.H., Argyrokastritis, A., Bizelis, I., and Rogdakis, E., *Gene*, 2008, vol. 427, pp. 65–79.
- Wenkel, S., Turck, F., Singer, K., Gissot, L., Le Gourrierec, J., Samach, A., and Coupland, G., *Plant Cell*, 2006, vol. 18, pp. 2971–2984.
- Sayari, A., Frikha, F., Miled, N., Mtibaa, H., Ben Ali Y., Verger, R., and Gargouri, Y., *FEBS Lett.*, 2005, vol. 579, pp. 976–982.
- Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A., and Tominaga, Y., *J. Ferment. Bioeng.*, 1996, vol. 81, pp. 488–492.
- Ishida, Y. and Leal, W.S., *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2002, vol. 32, pp. 1775–1780.
- Tyndall, J.D.A., Sinchaikul, S., Fothergill-Gilmore, L.A., Taylor, P., and Walkinshaw, M.D., *J. Mol. Biol.*, 2002, vol. 323, pp. 859–869.
- Karkhane, A.A., Yakhchali, B., Jazii, F.R., and Bambai, B., *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2009, vol. 61, pp. 162–167.

УДК 575.224+577.21

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ *Streptomyces nogalater* LV65 С ПОВЫШЕННЫМ УРОВНЕМ СИНТЕЗА НОГАЛАМИЦИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ

© 2011 г. Д. А. Климишин**, М. В. Рабык*, Т. П. Грень*, О. Я. Нимець*, М. А. Гончар**, А. Н. Громыко*, В. А. Федоренко*

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Львов 79005, Украина
e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

**Институт биологии животных Национальной академии аграрных наук, Львов 79034, Украина
Поступила в редакцию 10.03.2011 г.

Исследовано влияние клонированных регуляторных генов на биосинтез ногаламицина у *Streptomyces nogalater* LV65. Ген *snorA* из генома *S. nogalater* был клонирован в составе мультикопийной репликативной плазмиды pSOKA и интегративной – pR3A. Введение этих плазмид в клетки штамма дикого типа *S. nogalater* LV65 приводило к увеличению синтеза ногаламицина. Подобный эффект наблюдался при гетерологической экспрессии гена *ppGpp*-синтетазы *relA*, клонированного из *S. coelicolor* A3(2). В то же время гетерологическая экспрессия генов *absA2* из *S. ghanaensis* ATCC14672 и *IndYR* из генома *S. globisporus* 1912 снижала уровень синтеза антибиотика. Полученный результат указывает на наличие в хромосоме *S. nogalater* гомологов этих генов и их возможное участие в регуляции биосинтеза ногаламицина, а также открывает возможности генетического конструирования штаммов с повышенным уровнем синтеза этого антибиотика.

Биосинтез антибиотиков у актиномицетов строго координирован с ростом культуры и морфологической дифференциацией, а также контролируется регуляторными элементами разных уровней [1]. Изучение механизмов регуляции биосинтеза антибиотиков и манипуляции с отдельными генами или элементами регуляторных систем является одним из важнейших направлений исследований, которое открывает возможности направленного поиска и создания штаммов с повышенным уровнем биосинтеза антибиотиков [1–4].

Streptomyces nogalater LV65 (=IMET43360) синтезирует антрациклиновый противоопухолевый антибиотик ногаламицин (рис. 1). Он состоит из поликетидного агликона, гликозилированного остатками ногалозы и ногаламина. Ногаламицин угнетает рост грамположительных бактерий, а также ряд клеток опухолевых линий [5]. Отдельные гены биосинтеза этого антибиотика эффективно используются в комбинаторном биосинтезе поликетидов [6–8]. Ранее в хромосоме *S. nogalater* идентифицирован ген *snorA*, который кодирует транскрипционный активатор экспрессии структурных генов биосинтеза ногаламицина и имеет высокую степень гомологии с регуляторными белками SARP-семейства (*Streptomyces* antibiotic regulatory protein), контролирующими биосинтез антибиотиков у ряда стрептомицетов [8, 9]. Однако эксперименты по целенаправленному использованию гена *snorA* для получения продуцентов с повышенным уровнем синтеза антибиотика не проводились, а от-

сутствуют также данные о роли генов глобальной регуляции в биосинтезе ногаламицина.

Цель работы – изучение влияния гена *snorA*, клонированного в составе мультикопийной и интегративной плазмиды, а также гетерологической экспрессии глобальных регуляторов вторичного метаболизма у актиномицетов на уровень синтеза ногаламицина штаммом *S. nogalater* LV65.

МЕТОДИКА

В работе использовали штаммы дикого типа *S. nogalater* LV65 (продуцент ногаламицина), его производные, *S. ghanaensis* ATCC14672 (продуцент

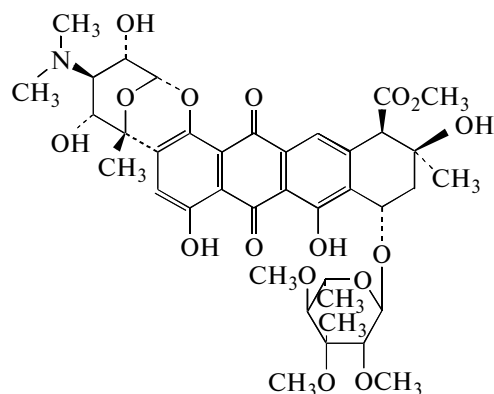


Рис. 1. Структурная формула ногаламицина.

Характеристика плазмидных ДНК, использованных в работе

Плазмида	Характеристика	Источник получения
pRT801 5.2 т.п.н.	Конъюгационная интегративная плазмида, содержащая ген устойчивости к апрамицину <i>apm^r</i> , систему интеграции фага φBT1	Р. Тил, Ноттингемский ун-т, Великобритания
pSOK101, 7.1 т.п.н.	Конъюгационная челночная плазмида, содержащая гены устойчивости к апрамицину <i>apm^r</i> и тиостриптону <i>tsr^r</i> ; репликон плазмиды pIJ101	С. Зотчев, ун-т г. Тронхейм, Норвегия
pKC1139, 6.5 т.п.н.	<i>lacZ α ori^{pUC19} ori^{T^{RP4}} ori^{pSG5} aac(3)IV</i>	[11]
pBluesnorA, 5.4 т.п.н.	pBluescript II KS/SK (+), с клонированным фрагментом хромосомы <i>S. nogalater</i> размером 2.5 т.п.н., содержащим ген <i>snorA</i>	[9]
pR3A, 8.1 т.п.н.	pRT801, несущая 2.9 т.п.н. PvuII-фрагмент плазмиды pBluesnorA	создана в работе
pSOCA, 9.5 т.п.н.	pSOK101, несущая 2.5 т.п.н. EcoRI–HindIII-фрагмент pKCEA	то же
pKCEA, 8.4 т.п.н.	pKC1218E, несущая ген <i>snorA</i> под контролем промотора гена устойчивости к эритромицину <i>ErmEr</i> , <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	[9]
pKCabsA2, 9.5 т.п.н.	pKC1139, несущая фрагмент хромосомы <i>S. ghanaensis</i> размером 3.0 т.п.н., содержащий ген <i>absA2</i>	создана в работе
pIJ8647, 5.5 т.п.н.	pOJ260, несущая N-терминальный 0.8 т.п.н. фрагмент гена <i>absA2</i> под контролем промотора <i>tipAp</i>	М. Бибб, Джон Иннес центр, Норвич, Великобритания
pKCEafsS, 8.9 т.п.н.	pKC1218E, несущая ген <i>afsS</i> под контролем промотора гена устойчивости к эритромицину <i>ErmEr</i> , <i>S. erythraea</i>	Л. Горбаль, ЛНУ им. И. Франко, Украина
pKC1218EIndY2-2, 7.1 т.п.н.	pKC1218E, несущая ген <i>IndYR</i> под контролем промотора гена устойчивости к эритромицину <i>ErmEr</i> , <i>S. erythraea</i>	[16]

моеномицина А), а также штаммы *Escherichia coli*: *E. coli* DH5α (F-φ80d Δ(*lacZ*)M15 *recA1 endA1gyrA96thi1deoR(lacZYA-argF) U169*) и *E. coli* ET12567 (*dam–13::Tn9(Cm^r) dcm–6 hsdM*), содержащий конъюгативную плазмиду pUB307 (производную плазмиды RK2). Штаммы актиномицетов, а также *E. coli* и *Sarcina lutea* КА37 хранятся в Коллекции культур микроорганизмов – продуцентов антибиотиков Львовского национального университета имени Ивана Франко. Используемые в работе плазмидные ДНК представлены в таблице.

Штаммы стрептомицетов культивировали на овсяной, кукурузной [10] и в жидких средах TSB, SG [11] при температуре 28°C, а *E. coli*, и *S. lutea* – на LA и LB при температуре 37°C [11].

Трансформацию *E. coli* проводили согласно стандартной “кальциевой” методики [10]. Конъюгацию *E. coli* – *S. nogalater* LV65 осуществляли, как описано в работе [12]. Апрамицин (50 мкг/мл) использовали для селекции трансконоггантов, налидиксовую кислоту (100 мкг/мл) – для удаления штамма-донора. В контроле определяли частоту появления спонтанных апрамицин-устойчивых мутантов *S. nogalater*. Стабильность наследования

плазмид клонами трансконоггантов определяли, как отношение числа колоний, сохранивших устойчивость к антибиотику, детерминированную маркерным геном плазмид, после пяти пассажей в неселективных условиях к общему числу колоний.

Антибиотическую активность штаммов *S. nogalater* изучали методом диффузии в агар с использованием тест-культуры *Sarcina lutea*. Штаммы стрептомицетов выращивали в жидкой среде SG, ногаламицин экстрагировали из культуральной среды хлороформом в соотношении культурная жидкость–хлороформ 1 : 1. Экстракты сушили при температуре 37°C, сухой остаток растворяли в метаноле, наносили на диски из фильтровальной бумаги одинакового диаметра и накладывали на среду LA с 0.7%-ным агаром, содержащим клетки тест-культуры (10⁹ КОЕ). Чашки инкубировали при температуре 28°C в течение 12 и 72 ч. Индекс продуктивности определяли по методике, описанной в работе [10].

Тонкослойную хроматографию экстрактов антибиотиков проводили на силикагелевых пластинках Silufol UV254 (Чехия), в системе растворителей хлороформ–метанол–этанол–дистиллированная вода

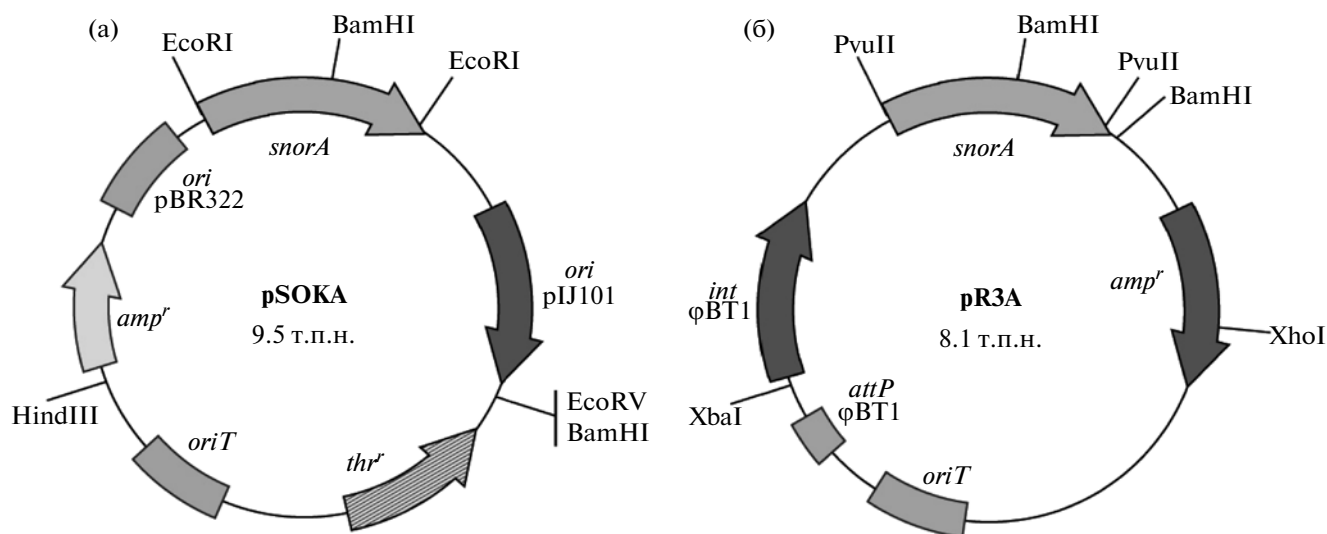


Рис. 2. Схема плазмид рSOKA (а) и рR3A (б): *amp^r* – ген устойчивости к апрамицину, *ori* pBR322 – репликон плазмиды pBR322, *oriT* – участок инициации конъюгационного переноса, *int* (фВТ1) – ген фага фВТ1, обеспечивающий интеграцию плазмиды рR3A в хромосому. Указаны сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции, которые использовались в этой работе.

(120 : 25 : 6 : 4.5). Определение антибиотиков проводили при 254 нм.

Все молекулярно-биологические процедуры выполняли по стандартным протоколам [11]. EcoRI-фрагмент плазмиды рKCEA (таблица) размером 2.5 т.п.н. клонировали в вектор рSOK101. В результате получена плазмида рSOKA размером 9.5 т.п.н (рис. 2а). Для конструирования рR3A плазмиду рBlues*snorA* (таблица) обработали эндонуклеазой рестрикции PvuII и элюировали фрагмент размером 2.9 т.п.н, содержащий ген *snorA*. Этот фрагмент клонировали в уникальный EcoRV-сайт плазмиды рRT801. В итоге получена плазмида рR3A (рис. 2б). Строение этих плазмид подтверждено рестрикционным анализом. Пару праймеров 5'-AAAGGATCCGCCCGAGATCGATCTTG-CAG-3' и 5'-TTTAAGCTTCGCTGTTCAGC-CTCTCCTAC-3 (в которые введены сайты BamHI и HindIII соответственно) использовали для амплификации из генома *S. ghanaensis* ATCC14672 фрагмента, несущего ген *absA2*. Ампликон размером 3.0 т.п.н. перенесли в рKC1139 как BamHI/HindIII-фрагмент. В результате получена плазмида рKC*absA2*.

Первичный анализ последовательностей нуклеотидов и определение сайтов узнавания для эндонуклеаз рестрикции проводили с помощью программ DNA-Star и VECTOR NTI.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для введения в штамм *S. nogalater* LV65 дополнительных копий гена *snorA* использовали мультикопийную плазмиду рSOKA и интегративную – рR3A (таблица). Плазмида рR3A, полученная на

основе интегративного вектора рRT801, который интегрируется в два сайта хромосомы *S. nogalater*, не утрачивается трансконъюгантами при выращивании в неселективных условиях, не влияет на уровень продукции ногаламицина и морфологические признаки бактерий [13], что делает ее использование удобным инструментом для генно-инженерных манипуляций в клетках *S. nogalater*. Плазмида рSOKA создана на основе мультикопийного вектора рSOK101. Эффективность использования этого вектора для введения дополнительных копий регуляторных генов продемонстрирована для ряда стрептомицетов, в частности продуцента ландомицина E – *S. globisporus* 1912 [14].

Плазмиды рSOKA и рR3A перенесены в клетки штамма дикого типа *S. nogalater* LV65 при помощи конъюгационных скрещиваний с *E. coli* ET12567. Частота образования трансконъюгантов рR3A⁺ и рSOKA⁺ в среднем составляла 4.0×10^{-6} и 1.7×10^{-7} соответственно. Фенотип апрамицин-устойчивости наследовался трансконъюгантами с частотой 100% рR3A⁺ после пяти пересевов в жидкой среде TSB при отсутствии селективного давления. В тех же условиях трансконъюганты *S. nogalater*, несущие автономную плазмиду, полностью теряли рSOKA. Однако она стабильно наследовалась при выращивании штаммов в присутствии апрамицина в конечной концентрации 50 мкг/мл. Для последующих исследований отобрано по одному независимому трансконъюганту, содержащему плазмиды рR3A и рSOKA.

При анализе экстрактов, полученных из мицелия антибиотиков штаммов *S. nogalater* рR3A⁺ и *S. nogalater* рSOKA⁺, было показано увеличение

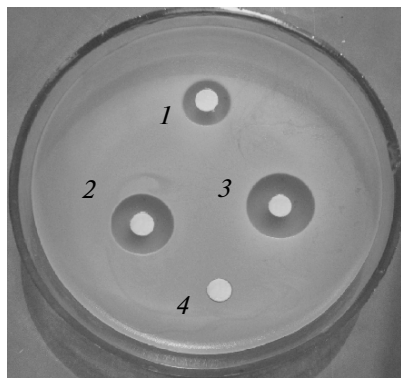


Рис. 3. Зоны угнетения роста тест-культуры экстрактами антибиотиков штаммов: 1 – *S. nogalater* LV65, 2 – *S. nogalater* pR3A⁺, 3 – *S. nogalater* pSOKA⁺, 4 – негативный контроль (метанол, использованный как растворитель ногамицина). Тест-культура – *Sarcina lutea*. В эксперименте антибиотики экстрагировали из одинакового количества биомассы.

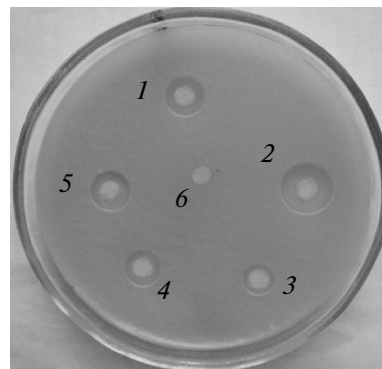


Рис. 4. Зоны угнетения роста тест-культуры экстрактами антибиотиков штаммов: 1 – *S. nogalater* LV65, 2 – *S. nogalater* *relA*⁺, 3 – *S. nogalater* *IndYR*⁺, 4 – *S. nogalater* *absA2*⁺, 5 – *S. nogalater* *afsS*⁺, 6 – негативный контроль (метанол, использованный как растворитель ногамицина). Тест-культура – *S. lutea*. В эксперименте антибиотики экстрагировали из одинакового количества биомассы.

уровня синтеза ногамицина в случае обоих штаммов (рис. 3). Это свидетельствовало об эффективности примененного подхода клонирования дополнительных копий гена *snorA* для создания штаммов *S. nogalater* с повышенным уровнем синтеза ногамицина. Использование плазмиды pR3A для конструирования таких штаммов было более эффективным, поскольку она интегрировалась в хромосому и стабильно поддерживалась в геноме в неселективных условиях.

Можно предположить, что увеличение уровня экспрессии гена *snorA* за счет увеличения его копийности приводило к увеличению пула соответствующего регуляторного белка–активатора транскрипции структурных генов биосинтеза ногамицина у *S. nogalater* в клетке, которое обеспечивало повышенную экспрессию регулируемых им генов. Похожий эффект клонирования регуляторов–активаторов транскрипции структурных генов показан для ряда актиномицетов [1, 2, 4].

В связи с отсутствием информации относительно глобальной регуляции вторичного метаболизма у *S. nogalater* необходимо было изучить влияние гетерологической экспрессии этих генов в клетках продуцента ногамицина. С этой целью использовали гены: *absA2* [15], клонированный из генома *S. ghanaensis* ATCC14672, *IndYR* [16] – из генома *S. globisporus* 1912, *relA* [17, 18] и *afsS* [19] – из генома *S. coelicolor* A3(2), продукты которых хорошо изучены у этих актиномицетов. В условиях гетерологической экспрессии глобальных регуляторов можно ожидать как увеличения уровня биосинтеза ногамицина, так и ингибирования процессов антибиотикообразования у *S. nogalater* LV65.

Изучение влияния гена *relA* на характер синтеза ногамицина у *S. nogalater* показало, что введение этого регулятора в составе плазмиды pIJ8647 повы-

шало уровень синтеза ногамицина (рис. 4). Возможно, это объясняется взаимосвязью между скоростью роста бактерий и биосинтезом их вторичных метаболитов [17, 18]. В частности, у *S. coelicolor* важную роль в этих процессах играет полифосфорилированный нуклеотид – *ppGpp* [17]. Он образуется при участии связанной с рибосомами *ppGpp*-синтетазы, которая кодируется геном *relA*. Возможно, что результатом накопления *ppGpp* и является значительное изменение экспрессии отдельных регуляторных генов у *S. nogalater*, что объясняет увеличение уровня синтеза ногамицина.

В результате введения дополнительных копий глобальных регуляторов *absA2* в плазмиде pKC*absA2* и *IndYR* в составе pKC1218E*IndY2-2* мы обнаружили, что экспрессия этих генов приводила к снижению уровня синтеза ногамицина (рис. 4). Подобный эффект ингибирования процессов антибиотикообразования продуктами этих генов также описан для ряда актиномицетов [15, 16]. Можно предположить, что этот результат свидетельствовал о наличии гомологов *absA2* и *IndYR* в геноме *S. nogalater*. Идентификация таких ингибиторов с целью их направленной инактивации является важным механизмом получения генетически стабильных штаммов с повышенным уровнем биосинтеза антибиотиков.

Введение гена *afsS* в клетки *S. nogalater* LV65 не повлияло на синтез ногамицина (рис. 4). Возможно, его гомологи отсутствуют у *S. nogalater* либо для их активации необходимы дополнительные факторы, например определенные источники питания или регуляторные механизмы [19].

Таким образом, введение дополнительных копий гена *snorA* в клетки *S. nogalater* LV65 в состав автономной мультикопийной pSOKA и интегративной – pRT801 плазмид приводит к повышению уровня синтеза антибиотика. Похожий эффект на-

блюдался также в результате гетерологической экспрессии гена *relA*, клонированного из хромосомы *S. ghanaensis*. Экспрессия этих генов не влияла на морфологические характеристики *S. nogalater*. Следовательно, используя эти регуляторные гены, можно получать генетически стабильные штаммы с повышенным уровнем синтеза ногаламицина. Подавление процессов антибиотикообразования у *S. nogalater* LV65 наблюдается вследствие гетерологической экспрессии *absA2* и *IndYR*. Очевидно, что гомологи *absA2* и *IndYR* в хромосоме *S. nogalater* LV65 ингибируют синтез ногаламицина, а их идентификация и направленная инактивация будет способствовать увеличению уровня биосинтеза антибиотика. Генетические манипуляции с отдельными регуляторными элементами в клетках *S. nogalater*, путем введения их дополнительных копий либо инактивации дает возможность конструировать штаммы с повышенной способностью к синтезу важного противоопухолевого антибиотика ногаламицина.

Авторы выражают благодарность М. Биббу, Р. Тилу и С. Зотчеву за любезно предоставленные плазмиды.

Работа частично финансировалась грантом Бг-33П Министерства образования и науки Украины (для В.А. Федоренко) и международным грантом WUBMRC (для Д.А. Климишина).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bibb M.J. // Microbiology. 2005. V. 8. P. 208–215.
2. Bignell D., Tahlan K., Colvin K.R., Jensen S.E., Leskiw B.K. // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. V. 49. P. 1529–1541.
3. Rebets Yu., Ostash B., Luzhetskyy A., Kushmir S., Fukuhara M., Bechthold A., Nashimoto M., Nakamura T., Fedorenko V. // Microbiology. 2005. V. 151. P. 281–290.
4. Rebets Y., Dutko L., Ostash B., Luzhetskyy A., Kulachkovskyy O., Yamaguchi T., Nakamura T., Bechthold A., Fedorenko V. // Arch. Microbiol. 2008. V. 189. P. 111–120.
5. Li H., Krueger C. // Pharm. Ther. 1991. V. 51. P. 239–255.
6. Torkkell S., Kunnari T., Palmu K., Mantsala P., Ylihonko K. // Mol. Gen. Genet. 2001. V. 266. P. 276–288.
7. Torkkell S., Ylihonko K., Hakala J., Mantsala P. // Mol. Gen. Genet. 1997. V. 256. P. 203–209.
8. Ylihonko K., Tuikkanen J., Jussila S., Cong L., Mantsala P. // Mol. Gen. Genet. 1996. V. 251. P. 113–120.
9. Климишин Д., Грень Т., Федоренко В. // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2009. Т. 36. С. 3–10.
10. Федоренко В.А., Остап Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. Практикум з генетики, генетичної інженерії і аналітичної біотехнології мікроорганізмів. Львів: Вид. центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. 277 с.
11. Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F. Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics. Norwich: John Innes Found., 2000. 634 p.
12. Luzhetskyy A., Fedoryshyn M., Gromyko O., Ostash B., Rebets Y., Bechthold A., Fedorenko V. // Rus. J. Genet. 2006. V. 42. № 5. С. 595–601.
13. Климишин Д., Громько О., Федоренко В. // Цитология и генетика. 2007. Т. 41. № 5. С. 263–267.
14. Патент України. 2003. № UA62200A.
15. McKenzie NL, Nodwell JR. // J. Bacteriol. 2007. V. 189. P. 5284–5292.
16. Ostash B., Rebets Y., Myronovskyy M., Tsypik O., Ostash I., Kulachkovskyy O., Datsuk Y., Nakamura T., Walker S., Fedorenko V. // Microbiology. 2011. V. 157. № 4. P. 1241–1250.
17. Hesketh A., Chen J., Ryding J., Chang S., Bibb M.J. // Genome Biology. 2007. V. 8. R 161 p.
18. Gomez-Escribano J.P., Martin J.F., Hesketh A., Bibb M.J., Liras, P. // Microbiology. 2008. V. 154. P. 744–755.
19. Santos B. F., Rodriguez G. A., Sola L. A., Martin J.F. // Mol. Microbiol. 2009. V. 72. P. 53–68.

Design of *Streptomyces nogalater* LV65 Strains with Higher Synthesis of Nogalamycin Using Regulatory Genes

D. A. Klimishin^b, M. V. Rabyk^a, T. P. Gren^a, O. Ya. Nimets^a, M. A. Gonchar^b,
A. N. Gromyko^a, and V. A. Fedorenko^a

^a Ivan Franko National University of L'vov, L'vov, 79005 Ukraine

e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

^b Institute of Animal Biology, National Academy of Agrarian Sciences, Lvov, 79034 Ukraine

Received March 10, 2011

Abstract—Influence of cloned regulatory genes on biosynthesis of nogalamycin by *Streptomyces nogalater* LV65 strains has been studied. Gene *snorA* from the *S. nogalater* genome was cloned in multicopy replicative plasmid pSOKA and integrative plasmid pR3A. Introduction of these plasmids into the cells of wild type strain of *S. nogalater* LV65 resulted in higher synthesis of nogalamycin. A similar effect was observed at heterologous expression of gene *ppGpp* of synthetase *relA* cloned in *S. coelicolor* A3(2). Heterologous expression of genes *absA2* from *S. ghanaensis* ATCC14672 and *IndYR* from genome *S. globisporus* 1912 decreased synthesis of antibiotic. The study results indicate the presence of homologs of these genes in chromosome of *S. nogalater*, their possible participation in regulation of nogalamycin biosynthesis, and provide us with a possibility for genetic design of the strains with higher synthesis of this antibiotic.

УДК 579.87:579.222.2:579.222.4

РАЗЛОЖЕНИЕ СМЕСИ (ТРИ-ГЕКСА)ХЛОРИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ ШТАММАМИ РОДА *Rhodococcus*

© 2011 г. Д. О. Егорова, В. А. Демаков, Е. Г. Плотникова

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081

e-mail: daryao@rambler.ru

Поступила в редакцию 7.04.2011 г.

Исследовано разложение полихлорированных бифенилов (ПХБ) штаммами-деструкторами *Rhodococcus ruber* P25, *Rhodococcus* sp. B7a и *Rhodococcus* sp. G12a. Показано, что эти штаммы разлагают 78–95% смеси ПХБ, содержащей в своем составе (три-гекса)хлорированные бифенилы. Родоккокки осуществляют деструкцию всех присутствующих в смеси три-, тетра-, пента- и гексахлорбифенилов без накопления токсичных хлорированных метаболитов. Исследуемые бактерии способны разлагать наиболее устойчивые к окислению ПХБ: 2,5,2',5'-ХБ, 3,4,3',4'-ХБ и 2,4,5,2',4',5'-ХБ. *R. ruber* P25, *Rhodococcus* sp. B7a и *Rhodococcus* sp. G12a – перспективные бактерии-деструкторы ПХБ, метаболический потенциал которых может быть использован в биотехнологиях очистки окружающей среды от высокотоксичных поллютантов.

Одной из наиболее актуальных проблем современности является загрязнение окружающей среды токсичными, устойчивыми соединениями, образующимися в результате промышленной деятельности человека. В 2001 г. международным сообществом принята Стокгольмская конвенция, где определен состав стойких органических загрязнителей (СОЗ), особо опасных для человека, запрещенных к производству и использованию [1].

Согласно конвенции, полихлорированные бифенилы (ПХБ) включены в состав СОЗ. По химической структуре ПХБ представляют два С–С-связанных ароматических кольца, в которых присутствуют в качестве заместителей от 1 до 10 атомов хлора. Коммерческие смеси полихлорбифенилов включают в свой состав 40–60 гомологов и изомеров ПХБ из 209 возможных. Уровень содержания данных веществ в окружающей среде очень высок [2]. Несмотря на прекращение их промышленного производства, ПХБ продолжают поступать в окружающую среду при сгорании промышленных отходов, нарушении целостности электрооборудования, вывозе и размещении на складах, свалках и полях аэрации. Липофильность ПХБ способствует их биоаккумуляции в тканях животных и человека, что ведет к развитию ряда тяжелых заболеваний, а химическая инертность предопределяет устойчивость к воздействию абиотических факторов [3].

К настоящему времени известно, что одним из наиболее перспективных способов снижения содержания ПХБ в окружающей среде является их переработка с использованием метаболического потенциала природной микрофлоры. Способность к трансформации отдельных хлорбифенилов описана для широкого круга природных бактерий [2, 4].

Установлено, что бактерии трансформируют ПХБ как в анаэробных, так и в аэробных условиях. Наиболее опасные для животных и человека высокохлорированные бифенилы подвергаются восстановительному дегалогенированию (анаэробные условия), в результате чего степень хлорирования молекулы понижается, но полного разложения не происходит. Наибольший интерес вызывает процесс аэробного разложения, так как только в этом случае бактериями осуществляется полная минерализация ПХБ [4, 5]. Однако большинство из исследованных аэробных бактерий-деструкторов высокоактивны по отношению к моно- и дихлорбифенилам и лишь единичные штаммы проявляют деградирующую активность к средне- и высокохлорированным бифенилам. Скорость биодеструкции ПХБ также зависит от способности микроорганизмов разлагать промежуточные продукты трансформации хлорбифенилов. Известно лишь несколько природных и генетически модифицированных штаммов аэробных бактерий, осуществляющих полную минерализацию моно- и дихлорбифенилов [2, 5–7]. В остальных случаях в среде в процессе микробиологического разложения ПХБ накапливаются токсичные, устойчивые к воздействию химических и физических факторов продукты разложения хлорбифенилов.

Известно, что бактерии рода *Rhodococcus* проявляют деградирующую активность к широкому кругу ароматических соединений природного и антропогенного происхождения [8]. Среди организмов этого рода описано несколько штаммов-деструкторов ПХБ [4, 5, 7, 9–11]. Наиболее изученными из них являются *Rhodococcus jostii* RHA1 и *R. globerulus* P6, которые осуществляют разложение полихлорбифенилов как индивидуально, так и в составе смесей [12–

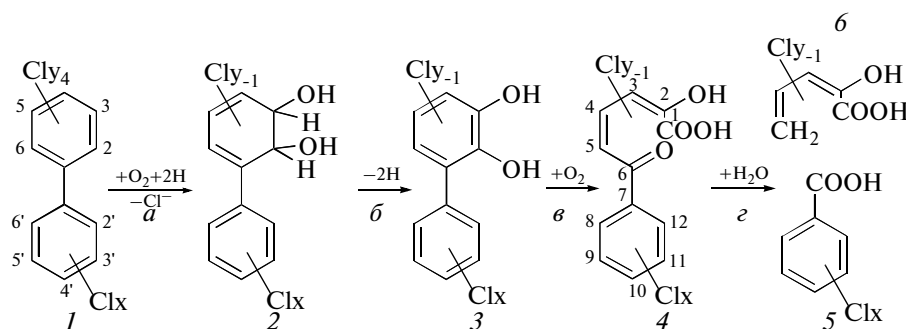


Рис. 1. Схема микробной деструкции полихлорбифенилов: 1 – полихлорбифенил (ПХБ); 2 – (хлор)бифенилдигидродиол; 3 – (хлор)дигидроксибифенил (ДГБ); 4 – (хлор)2-гидрокси-6-оксо-6-фенилгекса-2,4-диеновая кислота (ГОФДК); 5 – хлорбензойная кислота (ХБК); 6 – (хлор)2-гидрокси-пента-2,4-диеновая кислота. Ферменты, катализирующие деструкцию ПХБ: *a* – бифенил 2,3-диоксигеназа (БДО); *b* – бифенил-2,3-дигидродиол 2,3-дегидрогеназа (Б2,3Д); *в* – бифенил-2,3-диол 1,2-диоксигеназа (2,3ДГБ ДО); *г* – ГОФДК гидролаза [5, 15, 16].

14]. Данные родококки активны по отношению к низкохлорированным бифенилам, осуществляя трансформацию этих соединений по пути окислительного расщепления с образованием конечного продукта разложения – хлорбензойной кислоты (ХБК) (рис. 1) [5, 15, 16].

Цель работы – изучение деструкции экспериментальной смеси, содержащей хлорбифенилы со средней степенью хлорирования (от трех до шести заместителей в молекуле бифенила), штаммами рода *Rhodococcus*, выделенными нами из техногенно-загрязненных почв.

МЕТОДИКА

Реагенты. В работе использованы минеральные соли производства ЗАО “НПО Экрос” (Россия); бифенил, додецилсульфат натрия (“Sigma”, Германия); H_2SO_4 , гексан, ацетонитрил (НПК “Криохром”, Россия); экспериментальная смесь хлорбифенилов (**смесь А**) (Институт органического синтеза УрО РАН, Россия).

Бактериальные штаммы. Штаммы *Rhodococcus* sp. В7а, *Rhodococcus* sp. G12а и *R. ruber* P25 (=ИЭГМ 896) выделены из техногенных почв, загрязненных отходами химических и соледобывающих предприятий (г. Березники, Пермский край). Исследуемые штаммы обладают высоким биодеградирующим потенциалом по отношению к различным (хлор)ароматическим соединениям, в том числе бифенилу и моно-, ди-, трихлорбифенилам [7, 9, 17, 18].

Получение биомассы бактериальных культур. Использовали минеральную среду К1 (г/л): K_2HPO_4 – 4.0, NaH_2PO_4 – 0.4, $(NH_4)_2SO_4$ – 0.5, $Ca(NO_3)_2$ – 0.01, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.15, pH среды 7.3 [19]. В качестве источника углерода добавляли бифенил (1 г/л). Культивирование осуществляли в колбах объемом 250 мл с 50 мл среды К1 на термостатируемой качалке (120 об/мин) при 28°C.

Деструкция смеси хлорбифенилов. Деструкцию проводили с “отмытыми” клетками, как описано [6]. Смесь А вносили в виде ацетонового раствора до конечной концентрации 32 мг/л. В контрольных образцах использовали бактериальную биомассу, инактивированную автоклавированием (1 атм., 30 мин). Количественное и качественное определение хлорбифенилов (ХБ) в смеси А до и после бактериальной трансформации осуществляли согласно [9]. Количественное содержание ХБ вычисляли на основании сравнения высоты и площади пиков на хроматограмме в экспериментальных и контрольных образцах с высотой и площадью пиков ХБ в исходной смеси А. Величину деструкции (Д) рассчитывали по формуле:

$$D(\%) = \frac{C_{\text{контр}} - C_{\text{эксп}}}{C_{\text{контр}}} \times 100,$$

где $C_{\text{контр}}$ – концентрация ХБ в контроле, мг/л; $C_{\text{эксп}}$ – концентрация ХБ в экспериментальном образце, мг/л.

Дегградация ХБ. Продукты дегградации определяли на спектрофотометре BioSpec-mini (“Shimadzu”, Япония) и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (хроматограф LC-10ADvp и детектор RF-10Axl “Shimadzu”, Япония, колонка Lichrosorb RP-18 10U 250 × 4.6 мм “Alltech”, США) в культуральной жидкости, предварительно очищенной от бактериальных клеток центрифугированием при 9660 g в течение 3 мин (центрифуга miniSpin, “Eppendorf”, Германия).

Образование продуктов мета-расщепления ароматического кольца хлорбифенилов – (хлор)2-гидрокси-6-оксо-фенилгекса-2,4-диеновые кислоты (ГОФДК) определяли спектрофотометрически при длине волны от 390 до 440 нм [15, 16].

Наличие в надосадочной жидкости ХБК и 4-гидроксибензойной кислоты (4-ГБК) определяли методом ВЭЖХ. Вносили 20 мкл очищенной от клеток культуральной жидкости в установку ВЭЖХ.

Подвижная фаза — смесь ацетонитрил–0.1%-ный H_3PO_4 (70 : 30), скорость протока — 0.70 мл/мин. Продукты деградации ХБ определяли в УФ при длине волны 205 нм. Идентификацию проводили с помощью сравнения времени удерживания на колонке исследуемых и стандартных соединений. Количество образовавшихся продуктов оценивали по величине площади и высоты пиков на хроматограмме относительно данных величин стандартных соединений.

Наличие свободных ионов хлора контролировали измерением оптической плотности хлорида серебра при длине волны 460 нм, образующегося после реакции ионов хлора с азотнокислым серебром [20].

Образование (хлор)дигидроксибифенила (ДГБ) и (хлор)бифенилдигидродиола определяли в обезвоженных гексановых экстрактах культуральной жидкости [9]. Анализ проводили на газовом хроматографе GC6890N (“Agilent Technology”, США) с масс-селективным детектором MSD5973N (“Agilent Technology”, США) и кварцевой капиллярной колонкой HP-5MS SN US15189741-1 (30 м × 0.25 мм) (“Agilent Technology”, США) в режиме, аналогичном определению хлорбифенилов [9]. Метаболиты идентифицировали с помощью программ MSD Productivity ChemStation Software Rev.C.00.01 (“Agilent Technology”, США) и Mass Spectral Libraries NIST 98 (“Scientific Instrument Services”, США).

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных пакетов компьютерных программ Microsoft Excel и STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ смеси полихлорированных бифенилов. Для изучения процесса разложения ПХБ штаммами рода *Rhodococcus* была использована смесь А с преимущественным содержанием тетрахлорированных бифенилов, которые составляли 88.3% от остальных ХБ смеси (табл. 1, 2). Элементный анализ смеси А показал, что по содержанию хлора данная смесь наиболее близка к известному коммерческому продукту Ароклор 1248 (табл. 1) [21]. В смеси А так же, как и в Ароклор 1242 и 1248, преобладают тетрахлорированные бифенилы и, в отличие от данных для Ароклор, незначительно представлены три-, пента- и гексазамещенные ХБ (2.5, 8.5, 0.7% соответственно). Полностью спектр ПХБ смеси А встречается в составе Ароклор 1242 (табл. 2) [21].

Биодеградация хлорбифенилов смеси А. Штаммы *R. ruber* P25, *Rhodococcus* sp. B7a и *Rhodococcus* sp. G12a активно разлагали хлорбифенилы смеси А (рис. 2). Анализ динамики убыли ХБ позволил констатировать, что наибольшую деструктивную активность проявлял штамм G12a, значительно снижая

Таблица 1. Состав экспериментальной (смесь А) и коммерческих (Ароклор) [21] смесей полихлорированных бифенилов (%)

Группа ХБ	Смесь А	Ароклор		
		1242	1248	1254
Моно-	—	3	—	—
Ди-	—	13	2	—
Три-	2.5	28	18	—
Тетра-	88.3	30	40	11
Пента-	8.5	22	36	49
Гекса-	0.7	4	4	34
Гепта-	—	—	—	6
Окта-	—	—	—	—
Нана-	—	—	—	—
[Cl], мас. %	≈48.1	41.3	48.6	54.4

Примечание: знак (—) — в смеси отсутствуют.

содержание хлорбифенилов (71%) в течение первых 2 сут эксперимента. Суммарная концентрация хлорбифенилов при использовании штамма B7a уменьшалась на 40% в течение первых 2 сут и на 3 сут — на 55%. Напротив, динамика убыли хлорбифенилов при разложении штаммом *R. ruber* P25 была близка к линейной и составляла около 26% за 1 сут. За весь период эксперимента (3 сут) уровень деструкции хлорбифенилов смеси А исследуемыми штаммами составил 78–95% (рис. 2).

В литературе описаны бактериальные штаммы, осуществляющие деструкцию коммерческих смесей ПХБ—Ароклор 1242 и 1248, близких к смеси А по изомерному и гомологичному составу ПХБ и содержанию хлора (табл. 1, 2). Так, штамм *Alcaligenes eutrophus* H850 разлагал около 81% ХБ данных смесей в течение 2 сут, *Pseudomonas aeruginosa* TMU56 — 57.5–73.3% хлорбифенилов (Ароклор 1242) — за 4 сут, а штаммы родов *Enterobacter*, *Ralstonia* и *Pseudomonas* осуществляли деструкцию на 37–91% ХБ (Ароклор 1242) — за 12 сут [22–24]. А.В. Kolar с сотр. были выделены и описаны штаммы рода *Rhodococcus*, способные разлагать 50–61% ХБ (Ароклор 1248) в течение 14 сут [10]. *R. erythropolis* Z6 трансформировал 56–60% ХБ в коммерческих смесях Ароклор 1248 и ПХБ 50 за 14 сут [11]. Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют, что уровень деструкции хлорбифенилов смеси А штаммами *Rhodococcus* sp. B7a, *Rhodococcus* sp. G12a и *R. ruber* P25 сопоставим с уровнем разложения смесей ПХБ грамотрицательными бактериями и значительно

Таблица 2. Содержание (%) индивидуальных ПХБ в смеси А (настоящее исследование) и в коммерческих смесях торговой марки Ароклор [21]

№ ПХБ*	Положение хлора в молекуле бифенила	Смесь А, %	Ароклор, %		
			1242	1248	1254
17	2,4,2'-	2.04	3.22	1.27	0.03
28	2,4,4'-	0.44	6.08	3.36	0.06
41	2,3,4,2'-	0.52	0.59	0.89	0.74
44	2,3,2',5'-	1.61	3.32	5.95	0.61
47	2,4,2',4'-	12.49	0.96	1.4	0.07
49	2,4,2',5'-	7.41	2.91	4.24	0.30
52	2,5,2',5'-	22.61	3.22	6.22	0.78
56	2,3,3',4'-	2.09	1.28	2.83	1.19
60	2,3,4,4'-	2.24	0.91	1.90	0.68
64	2,3,6,4'-	5.28	1.68	3.35	0.31
68	2,3,3',5'-	0.94	0.01	—	—
71	2,6,3',4'-	1.22	0.85	1.21	0.09
72	2,5,3',5'-	10.12	0.02	—	—
75	2,4,6,4'-	7.20	0.90	0.05	—
77	3,4,3',4'-	14.54	0.23	0.36	0.11
85	2,3,4,2',4'-	1.65	0.28	0.96	2.28
105	2,3,4,3',4'-	0.66	0.41	1.32	6.06
110	2,3,6,3',4'-	4.68	0.77	2.67	7.42
118	2,4,5,3',4'-	1.50	0.69	2.18	12.27
153	2,4,5,2',4',5'-	0.77	0.08	0.34	3.07

* Классификация ИЮПАК, (—) — в смеси отсутствует.

превышает аналогичный показатель, выявленный для известных штаммов рода *Rhodococcus*.

Аэробное разложение полихлорированных бифенилов бактериями происходит преимущественно по пути окислительного разложения (хлор)бифенила (рис. 1) [5, 15, 16]. В результате действия ферментов осуществляется окисление одного из колец молекулы, в случае хлорбифенилов, как правило, наименее замещенного, с последовательным образованием гидроксипроизводных (хлор)бифенила до расщепления молекулы на (хлор)пентадиеновую и (хлор)бензойную кислоты. Рядом авторов отмечено, что образующиеся при этом хлорированные дигидродиолбифенилы, дигидроксибифенилы и бензоаты могут быть более токсичны, чем исходные хлорбифенилы [2, 4, 5].

В экспериментах показано, что при культивировании исследуемых штаммов со смесью А в среде наблюдалось наличие продуктов метаболизма ХБ: (хлор)дигидроксибифенилы, (хлор)гидроксиоксо-фенилгексадиеновые кислоты, хлор- и гидрокси-замещенные бензойные кислоты (табл. 3). Несмотря на то что в среде не было зафиксировано присутствие хлорбифенилдигидродиолов, можно утверждать, что разложение хлорбифенилов смеси

осуществляется штаммами по классическому пути окислительного расщепления бифенила (рис. 1). Отсутствие первого метаболита пути разложения (хлор)бифенилов может быть обусловлено двумя факторами: 1) высокой активностью бифенил-2,3-дигидродиол 2,3-дегидрогеназы (КФ 1.3.1.56) (**Б2,3Д**) исследуемых штаммов к образующимся (хлор)бифенилдигидродиолам; 2) способностью бифенил 2,3-диоксигеназы (КФ 1.14.12.18) (**БДО**) при атаке пары углеродных атомов молекулы хлорбифенила, один из которых несет ион хлора, образовывать (хлор)ДГБ, минуя стадию образования (хлор)бифенилдигидродиолов. Подобная схема окисления (ди-пента)хлорбифенилов описана для бифенил 2,3-диоксигеназы штаммов *Rhodococcus globerulus* P6 и *Burkholderia xenovorans* LB400 [13, 16].

Установлено, что при деструкции ХБ смеси А штаммами *Rhodococcus* sp. B7a и *Rhodococcus* sp. G12a не происходило накопления в среде в значительном количестве (хлор)дигидроксибифенилов, но регистрировалось образование различных ГОФДК с $\lambda_{\text{макс}} = 397, 398, 440$ нм (табл. 3). Полученные данные свидетельствуют о высокой активности бифенил-2,3-диол 1,2-диоксигеназы (КФ 1.13.11.39) (**2,3ДГБ ДО**) данных штаммов.

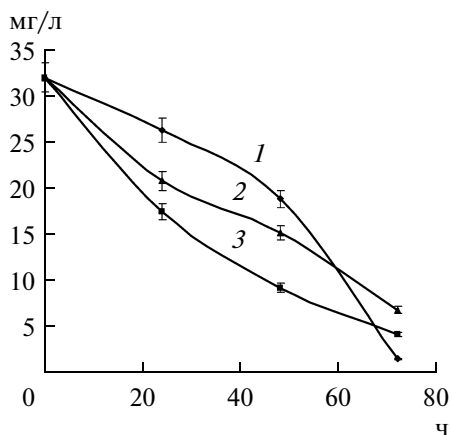


Рис. 2. Разложение (мг/л) смеси А штаммами рода *Rhodococcus*: 1 – *Rhodococcus* sp. В7а, 2 – *R. ruber* P25, 3 – *Rhodococcus* sp. G12а.

Напротив, при разложении ХБ штаммом *R. ruber* P25 не отмечено образование ГОФДК, но зафиксировано накопление ДГБ (табл. 3). Известно, что хлорированные ДГБ осуществляют обратимое субстратное ингибирование бифенил-2,3-диол 1,2-диоксигеназы [25]. Можно предположить, что 2,3ДГБ ДО_{P25} менее устойчива к ингибирующему действию (хлор)дигидроксибифенилов, чем 2,3ДГБ ДО_{В7а} и 2,3ДГБ ДО_{G12а}.

Ограничивать утилизацию ПХБ может также неспособность ГОФДК гидролазы (КФ 3.7.1.8) трансформировать ряд изомеров хлорированных ГОФДК. Так, ГОФДК, несущие ионы хлора в диеноатной части, слабо трансформируются гидролазами штаммов *R. globerulus* P6 и *B. xenovorans* LB400, тогда как ГОФДК с заместителями в фенольной части молекулы являются более доступным субстратом для ГОФДК гидролаз данных штаммов [14]. Анализ состава смеси А (табл. 2) и возможных мета-

болических схем разложения ХБ смеси (данные не представлены) показал, что основная доля образующихся ГОФДК содержит ионы хлора в обеих частях молекулы. ГОФДК гидролазы штаммов *Rhodococcus* sp. В7а, *Rhodococcus* sp. G12а и *R. ruber* P25 проявляют активность к хлорированным ГОФДК, о чем свидетельствует накопление невысоких концентраций ГОФДК в культуральной среде и присутствие хлорбензойных кислот.

По нашим данным, штаммы *R. ruber* P25, *Rhodococcus* sp. В7а и *Rhodococcus* sp. G12а утилизируют 2-хлорбензойную (2-ХБК) и (или) 4-хлорбензойную (4-ХБК) кислоты [7, 9, 17, 18]. Как видно из табл. 3, при разложении смеси А образуются хлор- и гидроксibenзойные кислоты. Следует отметить, что 4-гидроксibenзойная кислота является основным метаболитом гидролитического дехлорирования 4-ХБК [19]. Анализ динамики изменения концентрации 2-ХБК и 4-ГБК у штамма *Rhodococcus* sp. В7а и 4-ХБК у штаммов *R. ruber* P25 и *Rhodococcus* sp. G12а показал, что хлорбензойные кислоты не являются конечным продуктом в случае конверсии смеси А данными штаммами. Аналогичная способность к разложению пара-, но не орто-, замещенных моно- и дихлорбензойных кислот, образующихся при деструкции тетраХБ, описана для штамма *Alcaligenes* sp. JВ1 [26].

Для штамма *Rhodococcus* sp. В7а определено содержание свободных ионов хлора в среде через 72 ч деструкции смеси А. Установлено, что концентрация ионов хлора составляла 83.8% от максимальной возможной при полном дехлорировании исходной смеси хлорбифенилов. Полученные данные могут свидетельствовать, что при утилизации смеси А штаммом *Rhodococcus* sp. В7а не происходит накопления значительных количеств токсичных хлорированных метаболитов.

Деструкция индивидуальных ПХБ. Снижение концентрации ПХБ в смесях под действием аэроб-

Таблица 3. Продукты разложения смеси А штаммами рода *Rhodococcus*

Штамм	Время, ч	(хлор)ДГБ, % от общего состава смеси	(хлор)ГОФДК		Производные бензойной кислоты, мг/л			
			$\lambda_{\text{макс}}$, нм	ОП, ед.	2-ХБК	4-ХБК	2,4-ХБК	4-ГБК
В7а	24	1.51 ± 0.02	440	0.156	н.д.	н.д.	н.д.	1.883 ± 0.004
	48	2.62 ± 0.03		0.181	0.079 ± 0.001	н.д.	н.д.	0.646 ± 0.002
	72	2.32 ± 0.02		0.206	0.057 ± 0.003	н.д.	н.д.	0.333 ± 0.002
G12а	24	3.88 ± 0.04	440	1.289	1.008 ± 0.002	3.180 ± 0.004	н.д.	0.382 ± 0.003
	48	5.45 ± 0.01	398	1.334	1.509 ± 0.001	1.789 ± 0.001	0.031 ± 0.005	0.935 ± 0.002
	72	5.16 ± 0.03	397	1.408	3.573 ± 0.004	1.607 ± 0.003	0.384 ± 0.004	4.191 ± 0.003
P25	24	6.71 ± 0.07	н.д.	н.д.	н.д.	0.004 ± 0.001	н.д.	н.д.
	48	19.42 ± 0.05			н.д.	0.103 ± 0.002	н.д.	н.д.
	72	21.85 ± 0.02			н.д.	0.073 ± 0.002	н.д.	0.031 ± 0.001

Примечание: (н.д.) – не детектировалось.

Таблица 4. Деструкция (%) индивидуальных хлорбифенилов смеси А штаммами рода *Rhodococcus*

ПХБ, положение хлора в молекуле	<i>Rhodococcus</i> sp. В7а			<i>Rhodococcus ruber</i> P25			<i>Rhodococcus</i> sp. G12а		
	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч
2,4,2'-	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2,3,4,2'-	100	100	100	100	100	100	42.3 ± 0.2	69.1 ± 0.5	95.7 ± 0.1
2,4,4'-	100	100	100	100	100	100	48.6 ± 0.1	82.9 ± 0.4	94.0 ± 0.2
2,3,4,4'-	100	100	100	18.7 ± 0.2	100	100	20.1 ± 0.2	44.4 ± 0.4	95.1 ± 0.2
2,3,6,4'-	100	100	100	88.5 ± 0.4	100	100	93.1 ± 0.4	97.7 ± 0.2	98.7 ± 0.3
2,4,6,4'-	44.5 ± 0.2	61.1 ± 0.6	100	13.0 ± 0.3	19.7 ± 0.2	100	45.8 ± 0.2	88.6 ± 0.3	97.1 ± 0.1
2,4,2',4'-	78.0 ± 0.3	100	100	79.1 ± 0.4	100	100	32.5 ± 0.1	49.2 ± 0.3	74.7 ± 0.2
2,3,4,2',4'-	9.3 ± 0.1	100	100	46.7 ± 0.4	100	100	29.5 ± 0.3	51.4 ± 0.2	78.6 ± 0.3
2,4,2',5'-	8.2 ± 0.1	50.4 ± 0.4	100	14.9 ± 0.1	23.6 ± 0.1	100	23.4 ± 0.1	46.6 ± 0.1	76.7 ± 0.3
2,3,2',5'-	8.7 ± 0.4	19.1 ± 0.4	100	51.2 ± 0.6	100	100	17.4 ± 0.2	39.9 ± 0.1	77.0 ± 0.3
2,5,2',5'-	0	35.9 ± 0.2	89.2 ± 0.2	2.9 ± 0.1	7.1 ± 0.2	29.2 ± 0.2	40.1 ± 0.5	97.1 ± 0.2	97.9 ± 0.1
2,3,3',4'-	9.0 ± 0.2	28.2 ± 0.3	100	77.8 ± 0.3	100	100	19.0 ± 0.5	41.1 ± 0.5	81.6 ± 0.4
2,6,3',4'-	0.6 ± 0.1	100	100	50.1 ± 0.5	100	100	48.1 ± 0.3	51.1 ± 0.5	97.8 ± 0.2
3,4,3',4'-	1.6 ± 0.2	52.1 ± 0.1	100	32.4 ± 0.2	36.7 ± 0.2	78.7 ± 0.2	60.1 ± 0.4	66.5 ± 0.4	81.4 ± 0.1
2,3,6,3',4'-	0	31.3 ± 0.1	100	35.7 ± 0.1	36.5 ± 0.1	48.7 ± 0.1	23.0 ± 0.2	47.6 ± 0.1	77.0 ± 0.1
2,4,5,3',4'-	0	100	100	59.5 ± 0.3	100	100	29.4 ± 0.6	48.9 ± 0.1	78.1 ± 0.2
2,3,4,3',4'-	100	100	100	100	100	100	24.4 ± 0.2	54.4 ± 0.2	79.8 ± 0.3
2,5,3',5'-	72.3 ± 0.5	100	100	17.5 ± 0.2	79.9 ± 0.1	100	58.6 ± 0.1	77.4 ± 0.2	98.2 ± 0.4
2,3,3',5'-	100	100	100	100	100	100	40.3 ± 0.3	43.5 ± 0.1	44.2 ± 0.2
2,4,5,2',4',5'-	100	100	100	100	100	100	39.5 ± 0.1	49.3 ± 0.1	85.8 ± 0.1

ных бактериальных культур обусловлено деструкцией отдельных гомологов или изомеров, чаще всего — моно-, ди- и трихлорированных. При этом средне- и высокохлорированные бифенилы, наиболее устойчивые к микробной атаке и высокотоксичные для живых организмов, остаются не трансформированными [4, 11, 12, 26]. В результате наших исследований установлено, что штаммы *Rhodococcus* sp. В7а, *Rhodococcus* sp. G12а и *R. ruber* P25 проявляют деструктивную активность по отношению ко всем ПХБ, присутствующим в смеси А (табл. 2, 4). Штаммы активно разлагали три- и тетрахлорированные бифенилы, содержащие монохлорированное кольцо с заместителями в орто- или пара-положении (2,4,2'-, 2,4,4'-, 2,3,4,2'-, 2,3,4,4'-, 2,3,6,4'-, 2,4,6,4'-ХБ). Аналогичный уровень деструкции данных хлорбифенилов описан для штаммов *A. eutrophus*

H850, *Rhodococcus jostii* RHA1 и *B. xenovorans* LB400 [12, 16, 22].

Анализ деструкции отдельных ПХБ смеси А показал, что бифенил 2,3-диоксигеназа штаммов *Rhodococcus* sp. В7а, *Rhodococcus* sp. G12а и *R. ruber* P25 проявляет активность к моно-, ди- и тризамещенным кольцам молекулы ПХБ (табл. 4). Ранее нами установлена способность БДО_{P25} окислять ди-хлорированное кольцо 2,4,2'-ХБ (данные не показаны). Известно, что на активность бифенил 2,3-диоксигеназы оказывает влияние не только количество заместителей, но и их положение в молекуле ПХБ [13, 16, 27]. Активность БДО_{LB400} уменьшается в ряду — незамещенное кольцо, орто-, мета-, пара-замещенное, а БДО_{P6} — мета-, пара-, ди-орто-хлорированное кольцо молекулы ПХБ [13, 16]. Получен-

ные нами результаты не позволяют выявить закономерность в активности бифенил 2,3-диоксигеназы исследуемых штаммов по отношению к дизамещенным кольцам хлорированным в орто-, мета- или пара-положении, однако можно утверждать, что БДО_{P25}, БДО_{B7a} и БДО_{G12a} окисляют орто-пара-, орто-мета, мета-пара- и мета-мета-дихлорированные кольца в молекуле ПХБ (табл. 4).

К концу 3 сут биодеструкции исследуемая смесь ПХБ была представлена: 1) при разложении штаммом B7a – 2,5,2',5'-ХБ; 2) при разложении штаммом P25 – 2,5,2',5'-ХБ, 3,4,3',4'-ХБ и 2,3,6,3',4'-ХБ; 3) при разложении штаммом G12a отмечено наличие в незначительном количестве большинства соединений исходной смеси (табл. 4). Согласно ряду работ, наиболее устойчивыми к микробному окислению являются симметрично замещенные ПХБ, у которых в обоих кольцах молекулы присутствуют ионы хлора в орто-мета-, орто-пара- или мета-пара-положениях [4, 5, 22]. Помимо симметричного расположения заместителей, важную роль играет концентрация данных ХБ [27]. Штаммы *Rhodococcus* sp. B7a и *Rhodococcus* sp. G12a осуществляли трансформацию 2,5,2',5'-ХБ эффективнее, чем известные ПХБ-деструкторы родов *Rhodococcus*, *Arthrobacter* и *Ralstonia* [11, 12, 22, 24, 28].

Нами было установлено, что родококки разлагают 78–100% 3,4,3',4'-ХБ в концентрации 15.75 мкМ (начальная концентрация в смеси А) за 3 сут. Ли Ксу с сотр. [27] показали, что штамм *Enterobacteria* sp. LY402 трансформирует 50% 3,4,3',4'-ХБ от исходной концентрации 0.05 мкМ за 8 сут, повышение концентрации хлорбифенила до 0.5 мкМ приводило к полному ингибированию деструкции. Уровень деструкции данного соединения в коммерческих смесях ПХБ штаммами *R. jostii* RHA1 и *A. eutrophus* H850 составлял 20–26% [12].

Исследуемые штаммы осуществляли разложение гексахлорированного бифенила, несущего по 3 заместителя в каждом кольце молекулы. Уровень деструкции 2,4,5,2',4',5'-ХБ составил 85–100% (начальная концентрация в смеси А – 6.8 мкМ). Из литературы известно, что данный хлорбифенил является устойчивым к микробной атаке. Способность к его разложению отмечена для *R. jostii* RHA1 (34%), *A. eutrophus* H850 (20%) и *Enterobacteria* sp. LY402 (7–50% при начальной концентрации 5 мкМ) [12, 22, 27]. Полученные результаты свидетельствуют о высокой деградирующей активности штаммов рода *Rhodococcus* по отношению к труднодоступным полихлорированным бифенилам.

Следует отметить, что динамика разложения ПХБ, оставшихся в культуральной жидкости к концу инкубации (табл. 4), позволяет предположить, что возможно достижение их полной деструкции исследуемыми штаммами.

Таким образом, штаммы *Rhodococcus* sp. B7a, *Rhodococcus* sp. G12a и *R. ruber* P25 эффективно утилизируют смесь полихлорированных бифенилов,

основную долю которой составляют тетрахлорированные изомеры (88.3%), и могут быть рекомендованы для использования в технологиях утилизации ПХБ и восстановления загрязненных территорий.

Авторы выражают благодарность Гусеву В.А и Шишкину М.А. (ИЭГМ УрО РАН) за помощь в исследовании образцов смеси А, подвергнутых бактериальной деструкции, методом газохроматографического масс-спектрометрического анализа.

Работа поддержана Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” (ГР № 01200963682); ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (№ 2009-1.1-201-018-001).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Final act of the Conference of Plenipotentiaries on the Stockholm convention on persistent organic pollutants, Stockholm, 22–23 May // UNEP/POPS/CONF/4. United Nations Environment Programme, Geneva. 2001.
2. Васильева Г.К., Стрижакова Е.П. // Микробиология. 2007. Т. 76. № 6. С. 725–741.
3. Seo J.-S., Keum Y.-S., Li Q.X. // Int. J. Environ. Res. Public. Health. 2009. V. 6. № 1. P. 278–309.
4. Furukawa K., Fujihara H. // J. Biosci. Bioengin. 2008. V. 105. № 5. P. 433–449.
5. Pieper D.H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 67. № 2. P. 170–191.
6. Рыбкина Д.О., Плотникова Е.Г., Дорофеева Л.В., Мироненко Ю.Л., Демаков В.А. // Микробиология. 2003. Т. 72. № 6. С. 759–765.
7. Плотникова Е.Г., Рыбкина Д.О., Демаков В.А. Патент РФ № 2262531 // Б.И. 2005. № 29.
8. Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Biology of Rhodococcus. Microbiology Monographs / Ed. H.M. Alvares. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. V. 16. P. 231–262.
9. Егорова Д.О., Шумкова Е.С., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 644–650.
10. Kolar A.B., Hrsak D., Fingler S., Cetkovič H., Petrič I., Količ N.U. // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2007. V. 60. № 1. P. 16–24.
11. Petrič I., Hrsak D., Fingler S., Voncina E., Cetkovič H., Kolar A.B., Količ N.U. // Food Technol. Biotechnol. 2007. V. 45. № 1. P. 11–20.
12. Seto M., Kimbara K., Shimura M., Hatta T., Fukuda M., Yano K. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 9. P. 3353–3358.
13. McKay D.B., Seeger M., Zielinski M., Hofeer B., Timmis K.N. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 6. P. 1924–1930.
14. Seah S.Y.K., Labbe G., Kaschebek S.R., Reifennath F., Reineke W., Eltis L.D. // J. Bacteriol. 2001. V. 183. № 5. P. 1511–1516.
15. Seeger M., Timmis K.N., Hofer B. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 7. P. 2654–2658.

16. Seeger M., Zielinski M., Timmis K.N., Hofer B. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 8. P. 3614–3621.
17. Плотникова Е.Г., Рыбкина Д.О., Ананьина Л.Н., Ястребова О.В., Демаков В.А. // Экология. 2006. № 4. С. 261–268.
18. Егорова Д.О., Шумкова Е.С., Плотникова Е.Г. // Актуальные аспекты современной микробиологии: Матер. V молодежной школы-конференции с международным участием. Москва. 2009. С. 104–105.
19. Плотникова Е.Г., Цой Т.В., Грищенко В.Г., Зайцев Г.М., Нагаева М.В., Боронин А.М. // Генетика. 1991. Т. 27. № 4. С. 589–597.
20. Tsoi T.V., Zaitsev G.M., Plotnikova E.G., Kosheleva I.A., Boronin A.M. // FEMS Microbiol. Lett. 1991. V. 81. № 2. P. 165–169.
21. Frame G.M. // Fresenius J. Anal. Chem. 1997. V. 357. № 6. P. 714–722.
22. Bedard D.L., Wagner R.E., Brennan M.J., Haberl M.L., Brown J.F. // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53. № 5. P. 1094–1102.
23. Hatamian-Zarmi A., Shojaosadati S.A., Vasheghani-Farahani E., Hosseinkhani S., Emamzadeh A. // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2009. V. 63. № 6. P. 788–794.
24. Adebusoye S.A., Ilori M.O., Picardal F.W., Amund O.O. // Chemosphere. 2008. V. 73. № 1. P. 126–132.
25. Vaillancourt F.H., Haro M.-A., Drouin N.M., Karim Z., Maaroufi H., Eltis L.D. // J. Bacteriol. 2003. № 4. V. 185. P. 1253–1260.
26. Commandeur L.C.M., May R.J., Mokross Y., Bedard D.L., Reineke W., Govers H.A.J., Parsons J.R. // Biodegradation. 1996. V. 7. № 6. P. 435–443.
27. Xu L., Xu J.-J., Jia L.-Y., Liu W.-B., Jian X. // Curr. Microbiol. 2011. V. 62. № 3. P. 784–789.
28. Michaud L., Di Marco G., Bruni V., Lo Giudice A. // Mar. Pollut. Bull. 2007. V. 54. № 11. P. 1754–1761.

Destruction of Mixture of Tri-Hexa-Chlorinated Biphenyls by *Rhodococcus* Genus Strains

D. O. Egorova, V. A. Demakov, and E. G. Plotnikova

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Division, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia
e-mail: daryao@rambler.ru

Received April 7, 2011

Abstract—Destruction of polychlorinated biphenyls (PCBs) by strain-destructors *Rhodococcus* sp. B7a and *Rhodococcus* sp. G12a has been studied. It was shown that these strains destruct 78–95% of PCB mixture containing tri-hexa-chlorinated biphenyls. *Rhodococcus* destruct all components of the mixture of tri-, tetra-, penta-, and hexa-chlorinated biphenyls without accumulation of toxic chlorinated metabolites. The studied bacteria destruct PCB that are the most stable for oxidation, such as 2,5,2',5'-CB; 3,4,3',4'-CB; and 2,4,5,2',4',5'-CB. The most perspective strains are *R. rubber* P25, *Rhodococcus* sp. B7a and *Rhodococcus* sp. G12a whose metabolic potential can be used for biotechnological refinement of the environment from highly toxic pollutants.

УДК 66.061.34+579.66

БИОГИДРОМЕТАЛЛУРГИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ МЕДИ ИЗ СЛОЖНОГО МЕДНОГО КОНЦЕНТРАТА

© 2011 г. М. И. Муравьев, Н. В. Фомченко, Т. Ф. Кондратьева

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

e-mail: maxmuravyov@gmail.com

Поступила в редакцию 02.02.2011 г.

Исследовано выщелачивание сульфидно-окисленного медного концентрата руды Удоканского месторождения с содержанием меди 37.4%. В процессе обработки в растворе серной кислоты при pH 1.2 скорость выщелачивания меди составила 6.9 г/кг ч в течение 22 ч, что позволило извлечь 40.6% меди. При последующем химическом выщелачивании при 80°C в течение 7 ч раствором сернокислого трехвалентного железа, полученным после биоокисления ассоциацией микроорганизмов, скорость извлечения меди составила 52.7 г/кг ч. Общее извлечение меди достигало 94.5% (за 29 ч). Регенерация ионов Fe³⁺ осуществлялась ассоциацией умеренно термофильных микроорганизмов, включающей бактерии рода *Sulfobacillus* и архей *Ferroplasma acidiphilum*, со скоростью 1.0 г/л ч при 40°C в присутствии 3% твердой фазы, полученной при химическом выщелачивании медного концентрата. Предложена технологическая схема переработки сложного медного концентрата с применением бактериально-химического выщелачивания.

Переработка медных сульфидных руд может осуществляться двумя способами — пирометаллургическими. Пирометаллургические способы извлечения меди основаны на сочетании процессов обогащения руд, плавки полученных концентратов на штейн, конвертирования штейна и электролитического рафинирования с последующей плавкой медных катодов. Процессы плавки требуют высоких температур, сопровождаются выбросами в атмосферу пыли и диоксида серы. Кроме того, имеется еще ряд серьезных недостатков: большие капитальные затраты при строительстве заводов, невозможность перерабатывать концентраты с высоким содержанием токсичных элементов (мышьяк и др.), потеря благородных металлов с отходами обогащения руд, нерентабельность переработки низкосортных руд, потери меди со шлаками. При этом химический состав концентратов вторичных сульфидов меди, характеризующийся низким отношением S/Cu, не позволяет плавить их автогенно, что приводит к дополнительным расходам [1].

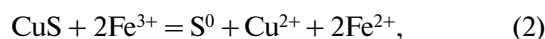
Гидрометаллургические способы включают выщелачивание при повышенном давлении (автоклавные процессы) [2], бактериальное выщелачивание в реакторах или кучах [3], а также выщелачивание в хлоридных растворах [4] или с применением различных окислителей (озон, пероксид водорода и др.) [5]. Способы автоклавного выщелачивания цветных металлов из сульфидного сырья характеризуются высокой энергоемкостью, большими капитальными затратами, использованием специального оборудования, работающего под давлением и, вследствие этого, значительной опасностью производства. Использование “экзотических” окислителей, таких,

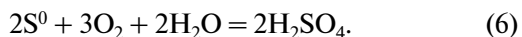
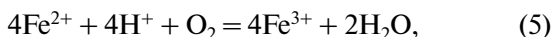
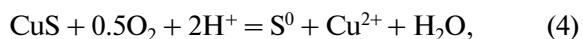
как озон и пероксид водорода, характеризуется высокой токсичностью и высокой стоимостью. Употребление хлоридных сред для процессов выщелачивания требует применения специальных коррозионностойких конструкционных материалов, а также систем специальной очистки отходов.

Наибольшее распространение получило кучное бактериальное выщелачивание, которое применяется для переработки низкосортных и труднообогащаемых руд вторичных сульфидов меди. Данный способ показал свою эффективность на двух десятках месторождений, работающих более 30 лет [3]. Основные недостатки способа — большая длительность процесса, варьирующаяся от нескольких месяцев до 2 лет, загрязнение окружающей среды ионами тяжелых токсичных металлов, а также зависимость от климатических условий.

Биогидрометаллургические процессы, основанные на выщелачивании цветных металлов из руд и концентратов в реакторах с системами перемешивания, экологически безопасны, просты в эксплуатации, характеризуются сравнительно низкими капитальными и эксплуатационными расходами [6]. Однако их промышленное внедрение сдерживается недостаточной высокой скоростью и, вследствие этого, большой продолжительностью [7].

Химические реакции, протекающие при биовыщелачивании меди из вторичных сульфидов (в частности, халькозина и ковеллина), могут быть выражены в виде следующих уравнений [3]:





При этом реакции (1) и (2) являются чисто химическими, а реакции (3)–(6) в основном катализируются микроорганизмами.

Известно, что на гетерофазные реакции, протекающие в кинетической области, наибольшее влияние оказывает температура. На этом принципе основан, в частности, процесс BioCOP, в котором биоокисление сульфидного концентрата осуществляется при температуре 78°C ассоциацией экстремально термофильных ацидофильных архей [8]. Однако при такой температуре резко снижаются парциальное давление кислорода и диоксида углерода в аэрирующем воздухе, необходимые для дыхания и конструктивного метаболизма микроорганизмов. Поэтому на коммерческом заводе в Чили, использовавшем процесс BioCOP с 2003 г., в аэрирующий воздух перед подачей в биореакторы добавляли необходимые количества кислорода и диоксида углерода. Кроме того, ассоциация используемых экстремально термофильных архей позволяла работать при содержании твердой фазы в суспензии не больше 12.5%. Комплекс указанных причин привел к прекращению эксплуатации завода через несколько лет после открытия [9].

Более перспективным представляется двухстадийный бактериально-химический процесс, в котором химическая и биологическая стадии проводятся последовательно в разных аппаратах. При этом создаются условия, интенсифицирующие протекание химических процессов окисления на первой стадии, и благоприятные для микробиологического окисления – на второй. Двухстадийная технология показала свою эффективность при выщелачивании медно-цинкового промпродукта [10] и медной руды [11]. На этом принципе основана технология BRISA для выщелачивания меди из сульфидных минералов [12, 13]. Недостатком процесса является проведение химического выщелачивания при низком содержании твердой фазы в суспензии (до 2%), а также использование в качестве катализатора соли серебра, что существенно удорожает этот способ.

Ранее нами была показана перспективность использования на второй стадии двухстадийного бактериально-химического процесса выщелачивания сульфидного медного концентрата ассоциации умеренно термофильных микроорганизмов [14]. Однако в процессе испытаний в течение 20 ч общее извлечение меди в раствор составило около 90%, что связано, по-видимому, с недостаточным окислением халькопирита при значении окислительно-восстановительного потенциала (Eh) выше 700 мВ относительно стандартного водородного электрода

(данный минерал быстрее разрушается в диапазоне значений от 450 до 650 мВ) [15, 16].

Цель работы – исследование двухстадийного процесса бактериально-химического выщелачивания сложного медного концентрата и разработка эффективной технологии получения из него меди.

МЕТОДИКА

Характеристика медного концентрата. В качестве объекта исследований был использован образец флотационного сульфидно-окисленного медного концентрата руды Удоканского месторождения меди (Россия). Основной химический состав концентрата следующий – медь (37.40%), железо общее (4.34%), железо(II) оксид (2.30%), сера общая (10.40%), сера сульфидная (9.92%), кальций (0.75%), магний (0.53%), углерод (0.76%). Минералогический состав определен фазовым рентгенографическим методом с использованием рентгеновского дифрактометра Philips “X-pert Pro” (Нидерланды). Результаты представлены в табл. 1. Анализ представленных данных показал, что около 80% меди в концентрате присутствовало в составе сульфидов и около 20% в составе окисленных минералов.

Микроорганизмы и условия их культивирования. Для проведения стадии биоокисления была экспериментально создана умеренно термофильная ассоциация микроорганизмов. При этом использовали музейные штаммы бактерий *Sulfobacillus thermotolerans* Kr1^T, *S. sibiricus* N1^T, штаммы бактерий рода *Sulfobacillus* Sh1, Sh8, культуральную жидкость из реакторов Олимпиадинской золотоизвлекательной фабрики, а также ассоциацию, полученную при выщелачивании медно-цинкового концентрата Учалинского горно-обогажительного комбината. Культуральные жидкости каждого штамма или ассоциаций микроорганизмов смешивали в равном количестве. Полученный посевной материал вносили в питательную среду из расчета 10% от объема. Культивирование ассоциации микроорганизмов осуществляли на модифицированной среде 9К Сильвермана и Лундгрена при 40°C [17].

Адаптацию ассоциации микроорганизмов к ионам меди проводили культивированием на указанной выше среде с внесением необходимого количества соли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Опыты проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 100 мл среды на ротационной качалке при 170 мин⁻¹ и 40°C до полного окисления ионов железа в каждом пассаже. При этом была получена умеренно термофильная ассоциация микроорганизмов, адаптированная к концентрации ионов меди в среде 4 г/л.

Кислотная обработка концентрата. В реактор объемом 2.5 л загружали навеску концентрата, добавляли необходимое количество дистиллированной воды. Механическое перемешивание осуществ-

Таблица 1. Минералогический состав медного концентрата

Минерал	Формула	Содержание, %	Содержание меди в концентрате, %
Дигенит	Cu_9S_5	24.0	18.8
Борнит	Cu_5FeS_4	14.0	8.3
Делафоссит	$CuFeO_2$	3.0	1.3
Халькопирит	$CuFeS_2$	2.5	0.9
Халькозин	Cu_2S	1.0–2.0	0.8–1.6
Малахит	$Cu_2(OH)_2CO_3$	~5.0	~2.9
Азурит	$Cu_3(OH)_2(CO_3)_2$	~5.0	~2.8
Тенорит	CuO	<1.0	<0.8
Кварц	SiO_2	15.0	–
Плагиоклаз	$(Na, Ca)(AlSi)_2Si_2O_8$	11.0	–
Калиевый полевой шпат	$KAlSi_3O_8$	7.0	–
Иллит	$(K, H_2O)Al_2Si_3AlO_{10}(OH)_2$	5.0	–
Хлорит	$(Mg, Fe)_6(Si, Al)_4O_{10}$	3.5	–
Кальцит	$CaCO_3$	1.0	–
Магнетит	Fe_3O_4	1.0–2.0	–

ляли при частоте оборотов турбинной мешалки 430 мин⁻¹. Термостатирование осуществляли с помощью U-образного теплообменника, соединенного с термостатом Elmi TW2.02 (Латвия). Доводили значение pH до необходимой величины добавлением 98.5%-ной серной кислоты.

Химическое выщелачивание концентрата. Раствор, содержащий трехвалентное железо, для химического выщелачивания в периодическом режиме получали путем окисления соли $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ в среде 9К [18] ассоциацией микроорганизмов. Химическое выщелачивание концентрата проводили в том же реакторе, что и кислотную обработку. В реактор вносили обработанный кислотой концентрат, добавляли предварительно нагретый до необходимой температуры раствор с концентрацией ионов трехвалентного железа 30.7 г/л, полученный после окисления микроорганизмами, и проводили цикл химического выщелачивания. Значения pH на нужном уровне поддерживали периодическим добавлением 98.5%-ной серной кислоты. После прекращения цикла выщелачивания пульпу осаждали на центрифуге Sigma 6K 15 (Германия) при 7000 г в течение 1 мин. Осадок возвращали в реактор для проведения следующего цикла.

Биоокисление концентрата. При исследовании процессов биоокисления концентрата в качестве жидкой фазы использовали раствор минеральных солей среды 9К. Количество вносимой соли $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ соответствовало концентрации ионов Fe^{2+} 17.1 г/л. В среду также дополнительно вносили 0.02% дрожжевого экстракта. Содержание твердой фазы составляло 3%. Инокулят –

10% от объема полученной суспензии. Биоокисление проводили в биореакторах объемом 2.5 л с объемом суспензии в них 1 л при частоте вращения вала турбинной мешалки 430 мин⁻¹, аэрации 4 мин⁻¹ и температуре 40°C, поддерживаемой с помощью U-образного теплообменника.

Аналитические методы. Концентрацию клеток микроорганизмов определяли прямым счетом в световом микроскопе с фазово-контрастным устройством Olympus CX41 (Япония). Величины pH и Eh измеряли с помощью pH-метра-милливольтметра pH-150МА (Беларусь); редокс-потенциал измеряли платиновым электродом относительно хлорсеребряного электрода, значения выражали относительно нормального водородного электрода. Концентрацию ионов Fe^{3+} и Fe^{2+} в жидкой фазе определяли с роданидом калия [19] на фотометре КФК-3 (Россия) при длине волны 475 нм.

Концентрацию ионов меди определяли на атомно-абсорбционном спектрометре с пламенной атомизацией Perkin Elmer 3100 (США).

Для анализа твердой фазы суспензию осаждали в центрифуге Sigma 6K 15 (Германия) при 7000 г в течение 1 мин. Осадок ресуспендировали в водопроводной воде и снова осаждали. Процедуру проводили до тех пор, пока промывной раствор не приобретал нейтральную реакцию. Полученный осадок высушивали до постоянного веса при 55°C и определяли его выход от исходного количества выщелачиваемого концентрата.

Содержание меди в твердой фазе определяли растворением последней в смеси концентрированных соляной и азотной кислот (3 : 1 об./об.) при кипяче-

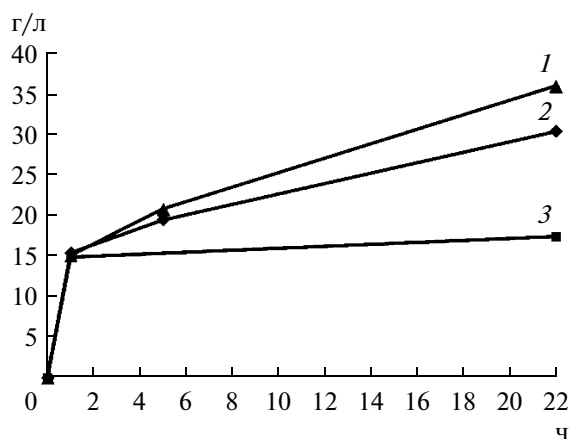
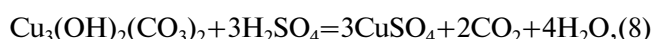
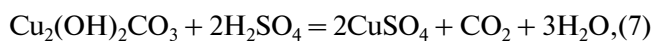


Рис. 1. Динамика изменения концентраций меди в растворе в процессе кислотной обработки медного концентрата при значениях pH 0.6 (1), 1.2 (2) и 1.6 (3).

нии в течение 0.5 ч (до полного растворения всех медных минералов) с последующим определением концентрации меди в растворе атомно-абсорбционным методом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование режимов кислотной обработки. В состав исследуемого концентрата руды месторождения Удокан входили окисленные минералы меди — малахит, азурит, а также делафоссит и тенорит. Кроме того, в концентрате присутствовали минерал кальцит. Данные минералы достаточно активно реагируют с серной кислотой:



Это приводит к значительному повышению значений pH суспензии в технологических процессах, образованию пены в реакторах и, как следствие, негативно сказывается на эффективности процессов химического выщелачивания

Таблица 2. Основные результаты кислотной обработки медного концентрата

pH	Выход осадка, %	Содержание Cu в осадке, %	Извлечение Cu, %	Расход H ₂ SO ₄ , г/кг	Средняя скорость выщелачивания Cu, г/л ч
0.6	68.3	28.4	48.1	405	1.64
1.2	73.4	30.2	40.6	313	1.38
1.6	80.0	35.9	23.3	202	0.79

концентрата раствором, содержащим ионы трехвалентного железа.

Одним из способов удаления указанных минералов перед процессом химического окисления может являться растворение их в растворе серной кислоты. Кроме того, полученный таким образом раствор сульфата меди содержит меньшее количество примесей (главным образом железа), что позволит более эффективно извлекать из него медь последующей жидкостной экстракцией и электролизом (SX/EW).

Кислотную обработку проводили при содержании твердой фазы около 17% в течение 22 ч при 50°C. Данная температура была выбрана с учетом возможного разогрева суспензии в промышленных реакторах при перемешивании, что экспериментально установлено на действующих предприятиях.

Изучено влияние значения pH пульпы на интенсивность и эффективность извлечения меди в раствор. Для опытов были выбраны значения pH 0.6, 1.2 и 1.6. Наибольшая скорость выщелачивания меди наблюдалась в первый час процесса (рис. 1) и была приблизительно одинаковой во всех случаях — около 15 г/л ч. Средние скорости выщелачивания меди составили 1.64, 1.38 и 0.79 г/л ч при кислотной обработке при значении pH 0.6, 1.2 и 1.6 соответственно. Конечные концентрации меди в растворе после окончания кислотной обработки концентрата при значениях pH 0.6, 1.2 и 1.6 составили 36.0, 30.4 и 17.4 г/л соответственно. Конечные концентрации железа в растворе были низкими и составили для тех же значений pH 5.0, 4.2 и 3.0 г/л соответственно, причем основное количество железа переходило в раствор в первый час обработки, вероятно, за счет растворения делафоссита (CuFeO₂):



Основные результаты исследований процесса кислотной обработки представлены в табл. 2. Сравнение полученных результатов указывает на то, что наиболее перспективным значением pH для кислотной обработки является 1.2, т.к. при поддержании pH на уровне 0.6 требуется слишком большой расход кислоты (405 кг/т) без значительного улучшения технологических показателей по сравнению с pH 1.2. Извлечение меди в раствор при pH 1.2 составило 40.6% после 22 ч кислотной обработки, что свидетельствует о растворении не только окисленных минералов меди, в которых содержится около 20% меди, но и, вероятно, сульфидов. При кислотной обработке при pH 1.6 извлечение меди в раствор было существенно ниже — 23.3%, однако на последующей стадии химического выщелачивания возможно значительное увеличение этого показателя.

Для определения влияния предварительной кислотной обработки на последующее химическое выщелачивание (окисление) медного концентрата бы-

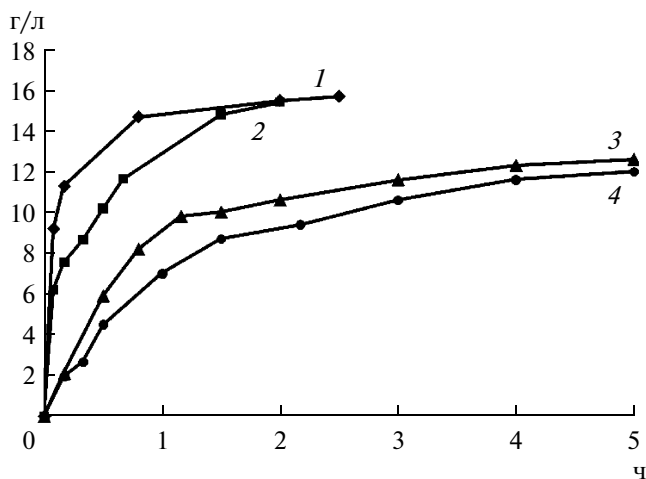
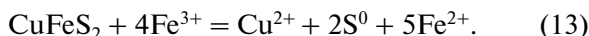
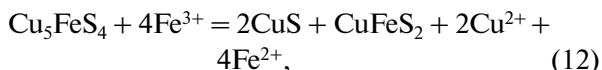
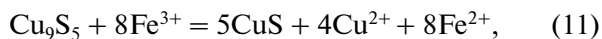


Рис. 2. Динамика изменения концентраций ионов Cu^{2+} в жидкой фазе при химическом выщелачивании медного концентрата, предварительно обработанного в растворе серной кислоты при pH 1.6 (1, 3) и 1.2 (2, 4) в первом (1, 2) и втором (3, 4) циклах.

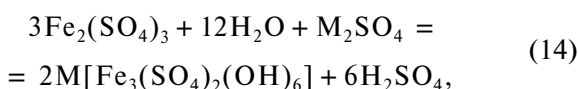
ли выбраны образцы концентрата после его кислотной обработки при pH 1.2 и 1.6.

Исследование режимов химического выщелачивания. Химическое выщелачивание исследуемого медного концентрата основано на окислении сульфидных минералов меди, главным образом дигенита, борнита и халькопирита, ионами Fe^{3+} в соответствии с уравнениями реакций [3]:



Представленные уравнения показывают, что процесс химического выщелачивания может характеризоваться накоплением ионов меди (Cu^{2+}) в растворе и снижением концентрации ионов Fe^{3+} , и соответственно, повышением концентрации ионов Fe^{2+} .

Кроме того, в системах с сернокислым раствором трехвалентного железа может протекать реакция с образованием ярозита по уравнению (14), причем с повышением температуры интенсивность ее увеличивается.



где $\text{M} = \text{K}^+, \text{Na}^+, \text{NH}_4^+, \text{H}_3\text{O}^+$.

В работах [20, 21] показано, что поддержание значений pH в необходимом диапазоне (1.2–1.5, в зависимости от температуры) позволяет существенно снизить интенсивность этого негативного процесса, приводящего к снижению концентрации основного окислителя сульфидных минералов.

Химическое выщелачивание концентрата проводили в периодических условиях при 80°C , содержании твердой фазы в суспензии 9% и концентрации ионов Fe^{3+} в исходном растворе 30.7 г/л при pH 1.2–1.3.

Изменения концентрации меди и ионов трехвалентного железа в жидкой фазе в процессе химического выщелачивания представлены на рис. 2 и 3 соответственно. Как следует из представленных данных, при химическом выщелачивании концентрата, предварительно обработанного при pH 1.6, процесс

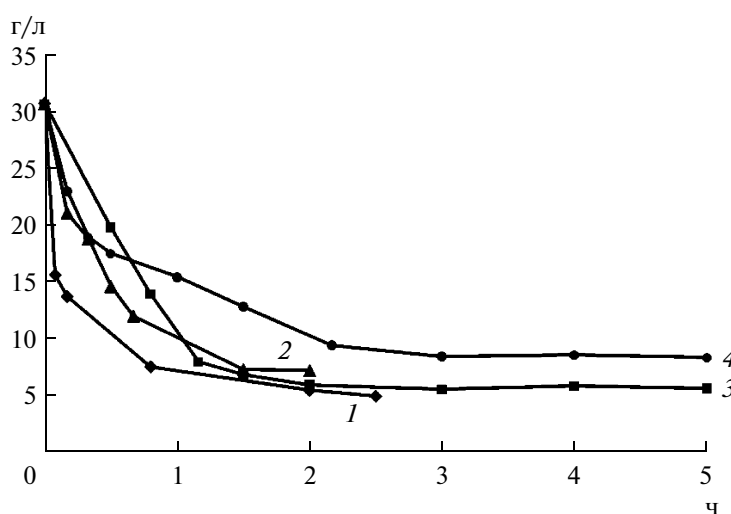


Рис. 3. Динамика изменения концентрации ионов Fe^{3+} в жидкой фазе при химическом выщелачивании медного концентрата, предварительно обработанного в растворе серной кислоты при pH 1.6 (1, 3) и 1.2 (2, 4) в первом (1, 2) и втором (3, 4) циклах.

Таблица 3. Основные результаты химического выщелачивания медного концентрата после его кислотной обработки

рН на стадии кислотной обработки	№ цикла выщелачивания	Продолжительность, ч	Выход осадка за 2 цикла, %	Содержание Cu в осадке, %	Общее извлечение Cu, %	Расход H ₂ SO ₄ , г/кг
1.6	1	2.5	Н.д.*	22.3	56.8	103
	2	5	105.0	8.4	81.2	0
1.2	1	2	Н.д.	Н.д.	70.6	54
	2	5	94.0	3.0	94.5	38

* Н.д. – нет данных.

интенсивно протекал в первом цикле в первые 40 мин, а во втором – в течение 1 ч. При этом динамика накопления Cu²⁺ в растворе (рис. 2) согласуется с динамикой убыли Fe³⁺ в выщелачивающем растворе (рис. 3). В конце первого цикла концентрация меди при выщелачивании образца, предварительно обработанного при рН 1.2, составила 15.4 г/л, а средняя скорость накопления меди в растворе за цикл составила 7.7 г/л ч, в конце второго цикла – 12.0 г/л при средней скорости накопления меди за цикл – 1.4 г/л ч. При выщелачивании образца, полученного при рН 1.6, показатели по скорости выщелачивания меди были 6.3 г/л ч в первом цикле и 2.5 г/л ч во втором при конечной концентрации меди 15.7 г/л и 12.6 г/л соответственно. В конце циклов выщелачивания даже при наличии в среде остаточной концентрации трехвалентного железа в среде 5–7 г/л, интенсивность выщелачивания меди была относительно низкой. Средняя скорость восстановления ионов Fe³⁺ по снижению их концентрации в растворе составила при рН 1.6 в первом цикле – 10.3 г/л ч, а во втором – 5.0 г/л ч, при рН 1.2 – 11.8 и 4.5 г/л ч соответственно. Значения окислительно-восстановительного потенциала на протяжении большего времени находились в диапазоне 600–650 мВ, что благоприятно для окисления халькопирита. Основные результаты первого и второго циклов химического выщелачивания медного концентрата в зависимости от рН кислотной обработки представлены в табл. 3.

Сравнение процессов химического выщелачивания концентрата, предварительно обработанного серной кислотой при рН 1.6 и 1.2, показывает, что в последнем случае процесс протекал значительно эффективнее. Так, суммарное извлечение меди в раствор в первом случае составило только 81.2%, в то время как во втором – 94.5%. Кроме того, при химическом выщелачивании концентрата, обработанного кислотой при рН 1.2, отмечен более низкий выход осадка (94%), чем при рН 1.6 (105%), что свидетельствовало о меньшем образовании ярозита.

Таким образом, более благоприятным продуктом для химического выщелачивания раствором трехвалентного железа, полученным после окисления микроорганизмами, является концентрат, обработанный при рН 1.2. Проведение процесса в таком режиме позволяло достичь извлечения меди в раствор около 95% в течение общего времени выщелачивания (кислотного и химического ионами Fe³⁺) 29 ч при содержании меди в осадке после выщелачивания 3.0%.

Исследование биоокисления медного концентрата и регенерации трехвалентного железа. Биоокисление медного концентрата после химического выщелачивания применяется для более полного извлечения из него меди и получения раствора, содержащего ионы Fe³⁺, т.е. для биорегенерации раствора после химического выщелачивания для его повторного использования.

В качестве инокулята была использована умеренно термофильная ассоциация микроорганизмов. Исследования проводились при содержании твердой фазы в суспензии 3%, исходной концентрации ионов Fe²⁺ – 17.1 г/л, Fe³⁺ – 0.3 г/л. Проведены модельные опыты по окислению двухвалентного железа при 40°C в присутствии твердой фазы, полученной после двух циклов химического выщелачивания медного концентрата, предварительно обработанного в растворе серной кислоты при рН 1.2. Полученный образец твердой фазы содержал 3.0% меди, а суммарное извлечение меди в раствор на предыдущих стадиях составило 94.5%.

Физико-химические параметры жидкой фазы в процессе биоокисления концентрата представлены в табл. 4. Как следует из данных таблицы, полное окисление ионов Fe²⁺ протекало в течение 2 сут со средней скоростью 8.6 г/л сут, скорость выщелачивания меди при этом составляла 0.2 г/л сут, а удельная скорость выщелачивания – 0.15 г/кг ч. В последующие 5 сут наблюдалось выпадение ионов Fe³⁺ в осадок, о чем свидетельствовало снижение концентрации их в растворе, и снижение скорости выщела-

Таблица 4. Физико-химические параметры жидкой фазы процесса биоокисления медного концентрата

Продолжительность, сут	Концентрация, г/л				pH	Eh, мВ	Концентрация, кл. · 10 ⁷ /мл*
	Fe ³⁺	Fe ²⁺	ΣFe	Cu ²⁺			
0	0.3	17.1	17.4	0.20	1.61	529	S – 0.6
1	6.9	10.7	17.6	0.29	2.00	624	S – 4.0
2	15.5	0	15.5	0.40	1.55	768	S – 2.0, A – 3.0
3	14.9	0	14.9	0.49	1.48	763	S – 1.0, A – 10.0
4	14.6	0	14.6	0.52	1.46	733	S – 0.3, A – 10.0
7	14.5	0	14.5	0.68	1.40	744	S – 0.1, A – 70.0

* S – сульфобациллы, A – археи.

чивания меди до 0.056 г/л сут. Поэтому эффективное время выщелачивания совместно с окислением ионов железа составило 2 сут.

Подавляющее количество микроорганизмов в активной стадии процесса биоокисления было представлено сульфобациллами. С третьих суток процесса отмечалось снижение концентрации сульфобацилл в среде и преобладание умеренно термофильных архей, а также замедление выщелачивания меди. Это, возможно, связано с высокими значениями окислительно-восстановительного потенциала (768–744 мВ), при которых медь плохо выщелачивается из минерала халькопирита, являющегося наиболее трудноокисляемым из всех присутствующих в концентрате медных минералов.

Извлечение меди в раствор и содержание ее в твердой фазе в процессе биоокисления медного концентрата представлено в табл. 5. Показано, что биорегенерация окислителя умеренно термофильной ассоциацией микроорганизмов в присутствии 3% твердой фазы в течение 2 сут привела к увеличению общего извлечения меди до 97%, т.е. на 2.5% больше по сравнению с химическим выщелачиванием и снижению ее содержания в осадке в 2 раза (до 1.49%). Последующее биоокисление в течение 5 сут не давало существенного увеличения извлечения меди в раствор, суммарное значение которого составило 98%.

Рассчитаны удельные скорости выщелачивания меди на стадии кислотной обработки при pH 1.2, на стадии химического выщелачивания, а также на стадии последующего биоокисления. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее интенсивной была стадия химического выщелачивания (окисления) концентрата раствором

трехвалентного железа при 80°C. Удельная скорость выщелачивания меди при кислотной обработке при pH 1.2 составила 6.9 г/кг ч, на стадии последующего химического выщелачивания – 52.7 г/кг ч, а при дальнейшем биоокислении – только 0.15 г/кг ч.

Таким образом, показано, что медь из сложного концентрата руды месторождения Удокан наиболее интенсивно извлекалась в раствор на стадии высокотемпературного химического выщелачивания в течение 7 ч, где выщелачивалось 94.5% меди. При этом на стадии биоокисления в течение 2 сут обеспечивалась регенерация раствора для химического выщелачивания с дополнительным повышением суммарного извлечения меди из концентрата до 97%.

Предложения по переработке медного концентрата. На основании проведенных исследований предложена технологическая схема переработки сложного медного концентрата, представленная на рис. 4. В соответствии с ней концентрат обрабатывают в растворе серной кислоты, затем полученная суспензия разделяется на твердую и жидкую фазы отстаиванием и фильтрацией, а полученный осадок подвергается высокотемпературному химическому выщелачиванию. Выщелачивание проводится раствором сернокислого трехвалентного

Таблица 5. Результаты биоокисления медного концентрата

Продолжительность, сут	Содержание Cu в осадке, %	Общее извлечение Cu, %
2	1.49	97.0
7	0.96	98.0



Рис. 4. Схема переработки сложного медного концентрата руды Удоканского месторождения.

железа, поступающего со стадии биоокисления. Далее суспензия поступает на отстаивание, осадок подается на биоокисление, а раствор — на экстракцию меди. Раствор, содержащий сульфат двухвалентного железа, после экстракции меди направляется также на биоокисление для его регенерации. Из экстракта медь вымывается серной кислотой в виде сульфата меди, который поступает на электролиз вместе с сульфатом меди, полученным после кислотной обработки медного концентрата. В процессе электролиза получается катодная медь и отработанный электролит, который утилизируется на стадии биоокисления.

В процессе биоокисления образуется раствор сульфата трехвалентного железа для стадии химического выщелачивания, а также осадок, содержащий около 1.5% меди, который может быть отправлен на стадию обогащения для доизвлечения из него меди и получения отвального по содержанию меди продукта (0.2–0.3%).

Таким образом, в результате изучения режимов кислотной обработки концентрата, его последующего выщелачивания ионами Fe^{3+} и регенерации окислителя в процессе биоокисления предложена технологическая схема переработки сложного медного концентрата, которая характеризуется высоким извлечением меди и замкнутыми водными потоками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы № 23 Фундаментальных исследований Президиума РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автогенные процессы в цветной металлургии / Ред. В.В. Мечев, В.П. Быстров, А.В. Тарасов. М.: Металлургия, 1991. 413 с.
2. Dreisinger D. // Hydrometallurgy. 2006. V. 83. № 1–4. P. 10–20.
3. Watling H.R. // Hydrometallurgy. 2006. V. 84. № 1–2. P. 81–108.
4. Peacey J., Guo X.J., Robles E. // Trans. Nonferrous Met. Soc. China. 2005. V. 14. № 3. P. 560–568.
5. Крылова Л.Н., Панин В.В., Медведев А.С. // Обогащение руд. 2007. № 4. С. 21–24.
6. van Answegen P. // BIOMINE, '93. Mater. Conf. Adelaide. Adelaide: Australian Mineral Foundation, 1993. Chapter 15.
7. Panin V.V., Adamov E.V., Krylova L.N., Pivovarova T.A., Voronin D.Yu., Karavaiko G.I. // Biohydrometallurgy. Proc. Int. Symp. (IBS 2003). Athens: National Technical University of Athens, 2003. P. 85–90.
8. Batty J.D., Rorke G.V. // Hydrometallurgy. 2006. V. 83. № 1–4. P. 83–89.
9. Brierley C.L. // Adv. Mater. Res. 2009. V. 71–73. P. 3–10.
10. Фомченко Н.В., Бирюков В.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 1. С. 64–69.
11. Smalley N., Davis G. // Miner. Eng. 2000. V. 13. № 6. P. 599–608.
12. Palencia I., Romero R., Mazuelos A., Carranza F. // Hydrometallurgy. 2002. V. 66. № 1–3. P. 85–93.
13. Carranza F., Iglesias N., Mazuelos A., Palencia I., Romero R. // Hydrometallurgy. 2004. V. 71. № 3–4. P. 413–420.
14. Фомченко Н.В., Бирюков В.В., Муравьев М.И. // Биотехнология. 2007. № 6. С. 65–71.
15. Hiroyoshi N., Miki H., Hirajima T., Tsunekawa M. // Hydrometallurgy. 2001. V. 60. № 3. P. 185–197.
16. Cordoba E.M., Munoz J.A., Blazquez M.L., Gonzalez F., Ballester A. // Hydrometallurgy. 2008. V. 93. № 3–4. P. 88–96.
17. Меламуд В.С., Пивоварова Т.А. // Микробиология. 1998. Т. 34. № 3. С. 309–315.
18. Silverman M.P., Lundgren D.C. // J. Bacteriol. 1959. V. 77. № 5. P. 642–647.
19. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М.: Недра, 1970. 140 с.
20. Kinnunen P.H.-M., Salo V.L.A., Pehkonen S.O., Puhakka J.A. // Biohydrometallurgy. Proc. Int. Symp. (IBS 2003). Athens: National Technical University of Athens, 2003. P. 193–201.
21. Daoud J., Karamanev D. // Miner. Eng. 2006. V. 19. № 9. P. 960–967.

Biohydrometallurgical Technology of a Complex Copper Concentrate Process

M. I. Murav'ev, N. V. Fomchenko, and T. F. Kondrat'eva

Winogradsky Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312

e-mail: maxmuravyov@gmail.com

Received February 2, 2011

Abstract—Leaching of sulfide-oxidized copper concentrate of the Udokan deposit ore with a copper content of 37.4% was studied. In the course of treatment in a sulfuric acid solution with pH 1.2, a copper leaching rate was 6.9 g/kg h for 22 h, which allowed extraction of 40.6% of copper. As a result of subsequent chemical leaching at 80°C during 7 h with a solution of sulphate ferric iron obtained after bio-oxidation by an association of microorganisms, the rate of copper recovery was 52.7 g/kg h. The total copper recovery was 94.5% (over 29 h). Regeneration of the Fe³⁺ ions was carried out by an association of moderately thermophilic microorganisms, including bacteria of genus *Sulfobacillus* and archaea of genus *Ferroplasma acidiphilum*, at 1.0 g/l h at 40°C in the presence of 3% solids obtained by chemical leaching of copper concentrate. A technological scheme of a complex copper concentrate process with the use of bacterial-chemical leaching is proposed.

УДК 620.193.8

КОРРОЗИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ЕСТЕСТВЕННЫХ МИКРОБНЫХ АССОЦИАЦИЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2011 г. В. Б. Родин, С. К. Жиглецова, Н. А. Жиркова, Н. В. Александрова,
В. А. Чугунов, В. П. Холоденко

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Московская обл., 142279
e-mail: info@obolensk.org

Поступила в редакцию 31.01.2011 г.

Воздействие микробных ассоциаций, выделенных из различных экологических ниш, на коррозию мягкой стали изменялось в зависимости от состава питательной среды и режима аэрации. При этом наблюдалось как уменьшение, так и увеличение коррозионных потерь, что свидетельствует об условности существующего разделения микроорганизмов на деструкторов и пассиваторов коррозии.

До сих пор с микробиологически индуцируемой коррозией (МИК) борются в основном с помощью биоцидов, представляющих определенную экологическую опасность. Кроме того, их воздействие иногда кратковременно или недостаточно эффективно, поэтому необходим поиск альтернативных методов борьбы с МИК.

Одним из перспективных способов борьбы с МИК является использование защитных биопленок некоторых микроорганизмов. Так, в частности, было показано, что *Pseudomonas S9* и *Serratia marcescens* в 8 раз уменьшали весовые потери металла [1], а биопленки *Escherichia coli* и *Pseudomonas fragi* уменьшали коррозионные потери от 4 до 40 раз [2]. Исследование 42 штаммов хемоорганотрофных бактерий, выделенных из биопленок и воды промышленных охлаждающих систем, показало, что коррозия металлов уменьшалась в присутствии большинства этих микроорганизмов [3]. Таким образом, в литературе сложилось деление микроорганизмов на индуцирующих коррозию и на защищающих от нее, то есть на деструкторов и пассиваторов коррозии. Обратимость воздействия микроорганизмов на коррозию металлов связывалась с секрецией экзополисахаридов [4], поглощением клетками кислорода [5] и образованием специфических антимикробных веществ [6], которые предотвращают развитие коррозионно агрессивных бактерий.

Однако при изучении биокоррозии, как правило, эксперименты проводят или в средах, специально подобранных для изучаемых микробов (например, среды Постгейта для сульфатвосстанавливающих бактерий (СВБ)) [7], или в средах, близких к производственным [3] или природным [4, 8] условиям. Неоднократно делались попытки определить условия окружающей среды, ограничивающие возможность протекания МИК [9–11]. Однако до сих пор влиянию состава среды на процессы биокоррозии,

протекающих с участием микроорганизмов, уделялось недостаточно внимания.

Ранее нами была проверена коррозионная активность 10 аэробных бактерий, принадлежащих к различным таксономическим группам, на глюкозо-минеральной среде с пептоном (ГМП) и питательном бульоне (ПБ) [12]. Оказалось, что величина биокоррозионного повреждения полностью определялась составом питательной среды. Так, на среде ГМП в присутствии чистых культур этих микроорганизмов скорость коррозии относительно контроля возрастала с 2 до 13 раз. В то же время в среде ПБ те же бактерии уменьшали коррозионные потери относительно контроля с 2 до 8 раз.

На примере *Klebsiella rhinoscleromatis* также было показано, что интенсивность и величина как повреждающего действия, так и защищающего эффекта определялись концентрацией соответствующего источника углерода [13].

При анализе полученных результатов возникло предположение, что величина и направление микробиологического воздействия на коррозию зависит от того, насколько источник углерода способствует образованию кислых или щелочных продуктов метаболизма. Для проверки этого предположения было исследовано влияние на биокоррозию замены глюкозы в среде ГМП на различные углеводы, утилизация которых в микроаэрофильных условиях сопровождается разной степенью закисления среды. Исследовали те же десять микроорганизмов, а в качестве источника углерода вместо глюкозы — рамнозу, дульцит и сорбит. В результате была получена статистически достоверная корреляционная зависимость между величиной коррозионных потерь и значением pH культуральной жидкости в конце инкубации. Очевидно, что в среде ГМП, состав которой не вызывал коррозии, микроорганизмы потребляли способствующие пассивации ионы фосфатов и

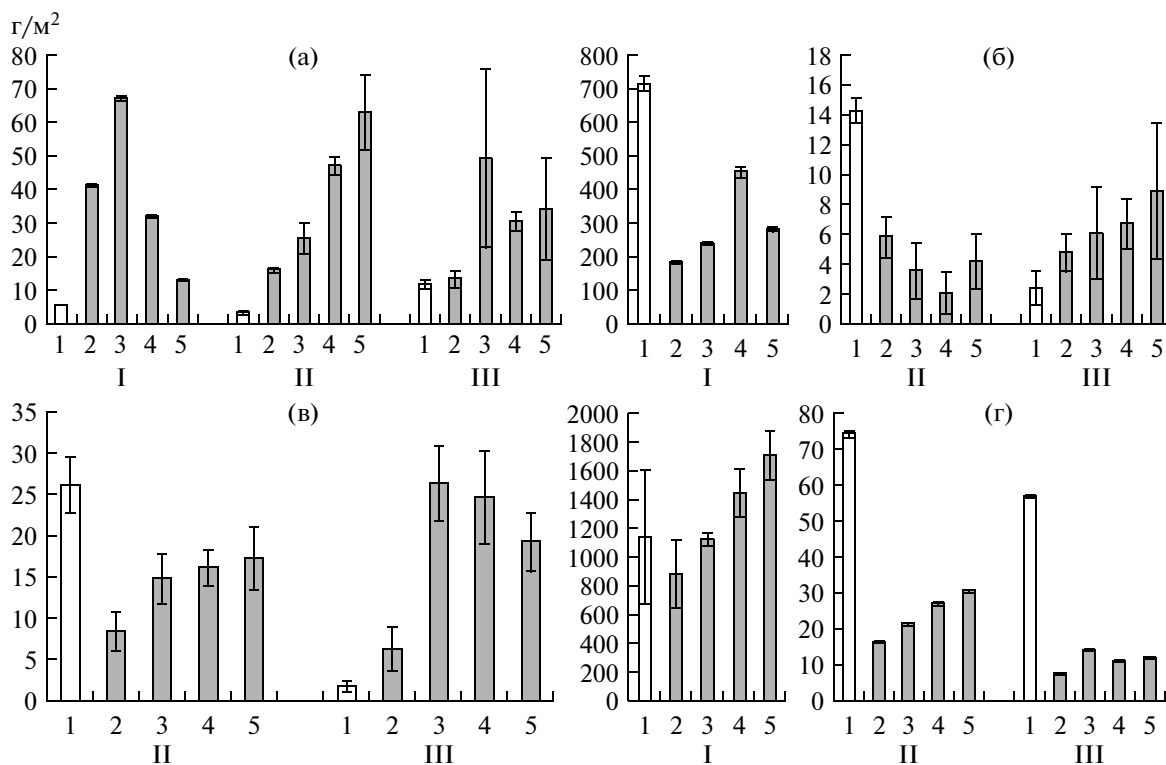


Рис. 1. Коррозионные потери мягкой стали в присутствии естественных ассоциаций при аэробных (I), микроаэрофильных (II) и анаэробных (III) условиях культивирования в разных средах: (а) – среда ГМП; (б) – среда LB; (в) – среда DSM; (г) – среда МСК: 1 – стерильная среда (контроль), 2 – “Стоки”, 3 – “Почва”, 4 – “Ил”, 5 – “Река”.

использовали глюкозу с образованием ионов H^+ , что приводило к увеличению коррозионных потерь. В среде ПБ те же клетки, используя пептон в качестве источника углерода и энергии, защелачивали прилегающую к поверхности металла среду, защищая ее тем самым от коррозии [12].

Таким образом, изложенные выше результаты наших исследований позволили сделать вывод о том, что воздействие чистых аэробных культур на коррозионные процессы определяется прежде всего видом и концентрацией питательного субстрата. Однако, как известно, в реальных процессах биоповреждений участвуют не чистые культуры микроорганизмов, а их природные ассоциации, поведение которых является значительно более сложным [14, 15], поэтому остается не ясно, применимы ли к естественным микробным ассоциациям закономерности проявления коррозионной активности, обнаруженные для чистых культур.

Цель работы – изучение влияния состава питательной среды и режима аэрации на коррозионную активность природных микробных ассоциаций.

МЕТОДИКА

Выделение ассоциаций и их культивирование. В работе использовали следующие природные ассоци-

ции микроорганизмов: ассоциация “Стоки”, выделенная из нефтепромысловых вод Альметьевского месторождения (Татарстан); ассоциация “Почва”, выделенная из суглинистой почвы (г. Серпухов, Московская обл.); ассоциация “Ил”, выделенная из прудового ила; ассоциация “Река”, выделенная из воды реки Нара. В отдельном эксперименте (рис. 2) были использованы микробные ассоциации, выделенные их различных географических регионов и экологических ниш.

В работе использовали следующие питательные среды (г/л): LB – среда Лурия–Бертани: NaCl – 10.0; дрожжевой экстракт, “Sigma” (США) – 5.0; пептон (“Sigma”) – 10.0. ГМП – глюкозо-минеральная среда с пептоном: $(NH_4)_2SO_4$ – 1.0; K_2HPO_4 – 6.0; KH_2PO_4 – 3.0; пептон (“Sigma”) – 0.5; глюкоза – 10.0. DSM – среда для выращивания СВБ [16]: KH_2PO_4 – 0.5; NH_4Cl – 1.0; Na_2SO_4 – 1.0; $CaCl_2$ – 0.1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 2.0; дрожжевой экстракт (“Sigma”) – 1.0; 60%-ный раствор лактата натрия – 3.0 мл; $NaHCO_3$ – 1.0; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.04; $Na_2S \cdot 9H_2O$ – 0.08. Среда МСК содержала минеральные соли и керосин, как единственный источник углерода и энергии: K_2HPO_4 – 0.1; KH_2PO_4 – 0.05; NH_4Cl – 1.0; Na_2SO_4 – 1.0; керосин – 5.0 мл. ГПМ агар – сухой питательный агар для культивирования микроор-

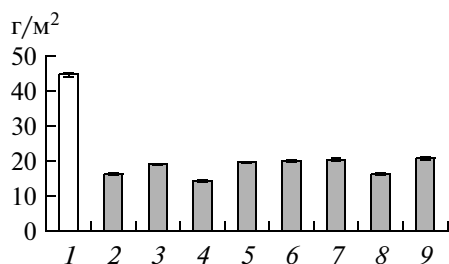


Рис. 2. Коррозионные потери стали на среде МСК в присутствии естественных микробных ассоциаций, выделенных из различных географических регионов и экологических ниш: 1 – стерильная среда (контроль); 2 – река Белка, Башкирия, Россия; 3 – река Днепр (Смоленск, Россия); 4 – река Дунай (Будапешт, Венгрия); 5 – пресноводный аквариум; 6 – песчаный карьер (г. Орел, Россия); 7 – пруд (г. Орел, Россия); 8 – городской канал (Манчестер, Великобритания); 9 – грунт из околотрубного пространства магистрального газопровода (Ухта, республика Коми, Россия).

ганизмов (ГНЦ ПМБ, Оболенск): панкреатический гидролизат рыбной муки – 24.0; NaCl – 5.0; агар – 12.0.

Для обеспечения разных режимов аэрации на средах ГМП, LB и DSM использовали следующие варианты культивирования микробных ассоциаций:

- анаэробный, в пробирках, до верха заполненных средой и плотно закрытых резиновыми пробками, в стационарном режиме;
- микроаэрофильный, в пробирках с 10 мл среды, закрытых ватными пробками, в стационарном режиме;
- аэробный, в конических колбах объемом 700 мл, с 200 мл среды на качалке (200 об/мин).

На среде МСК культивирование проводили в конических колбах объемом 700 мл, закрытых ватными пробками. В этом случае различные режимы аэрации создавались за счет различной степени поглощения кислорода воздуха биопленкой нефтеокисляющих микроорганизмов, образующейся на поверхности среды. Анаэробное культивирование ассоциаций осуществляли в колбах с 700 мл среды в стационарном режиме. При этом среда на несколько сантиметров не достигала края горлышка колбы, из-за чего площадь ее контакта с кислородом воздуха была минимальной. Можно предположить, что весь или почти весь кислород поглощался биопленкой аэробных нефтеокисляющих микроорганизмов, вырастающей под слоем керосина. Микроаэрофильный режим культивирования ассоциаций создавали в 200 мл среды в стационарном режиме. В данном случае отношение площади контакта среды с воздухом к объему среды гораздо больше по сравнению с предыду-

щим вариантом, поэтому биопленка аэробных нефтеокисляющих микроорганизмов не полностью поглощала кислород, поступающий в питательную среду. Обозначения этих режимов в данном случае в значительной степени условно и отражало лишь различную степень аэрации.

Ассоциации выделяли, внося 10% образца почвы или воды в указанные выше среды. Накопительные культуры на средах ГМП и LB получали в микроаэрофильных условиях, а на средах DSM и МСК – в анаэробных. Все варианты культивирования проводили при 28°C. Инкубацию на средах ГМП, LB и МСК проводили в течение 3 нед, а на среде DSM – в течение 5 нед.

Инокуляция и определение коррозионных потерь. Стальные диски из мягкой стали диаметром 1 см и толщиной 0.4 мм зачищали наждачной бумагой и обезжиривали этиловым спиртом, высушивали в эксикаторе, взвешивали и помещали в предварительно простерилизованные пробирки или колбы.

В стерильные среды вносили 1% инокулята из накопительных культур, разливали в пробирки и колбы с дисками, закрывали пробками и ставили на инкубацию при 28°C. После завершения опытов в культуральной жидкости определяли pH, концентрацию сероводорода [17], а также делали высев для определения количества аэробных гетеротрофных бактерий и СВБ. Титр аэробных гетеротрофных бактерий определяли путем посева на чашки с ГПМ агаром из серии десятикратных разведений культуральной жидкости. Количество СВБ определяли путем титрования культуральной жидкости методом десятикратных серийных разведений в среде DSM [10].

Стальные диски промывали водой, 5%-ной соляной кислотой в течение 10–30 с, затем снова водой. Такая обработка позволяла быстро удалять продукты коррозии без изменения массы металла. После промывания диски предварительно обезжировали фильтровальной бумагой и окончательно высушивали в эксикаторе до постоянной массы. О коррозионной активности ассоциаций судили по уменьшению массы диска на единицу площади поверхности за время инкубации. Каждый опыт проводили в 5 повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех вариантах культивирования зафиксирован высокий (10^8 – 10^9 кл./мл) итоговый титр клеток как гетеротрофных, так и СВБ. Это означает, что во всех проведенных экспериментах существовали достаточно благоприятные условия для развития как аэробных, так и анаэробных микроорганизмов. Повидимому, при культивировании в аэробных условиях СВБ развивались внутри клеточных конгломератов, взвесь из которых появлялась в среде через несколько суток инкубации.

Результаты химического анализа культуральной жидкости после окончания опыта

Режим аэрации	Ассоциация	Среда ГМП		Среда LB		Среда DSM		Среда МСК	
		pH	H ₂ S, мг/л	pH	H ₂ S, мг/л	pH	H ₂ S, мг/л	pH	H ₂ S, мг/л
Аэробный	Контроль	7.3	—*	6.8	—	—	—	7.9	—
	“Стоки”	7.1	—	8.7	—	—	—	6.0	—
	“Почва”	7.1	—	9.7	—	—	—	5.9	—
	“Ил”	7.2	—	9.7	—	—	—	6.4	—
	“Река”	7.2	—	9.7	—	—	—	6.7	—
Микроаэрофильный	Контроль	7.2	—	7.5	—	7.2	—	7.7	—
	“Стоки”	4.3	4.8	7.9	10.1	8.2	2.3	5.9	1.0
	“Почва”	6.6	9.0	9.1	0.8	9.3	0.7	6.5	0.4
	“Ил”	6.5	5.2	9.1	1.5	9.3	0.2	6.1	0.8
	“Река”	6.1	2.7	9.1	0.5	9.1	0.3	7.7	1.8
Анаэробный	Контроль	7.1	—	7.1	—	7.3	—	8.2	—
	“Стоки”	4.2	2.3	6.6	10.2	8.4	58.3	6.5	4.9
	“Почва”	6.6	1.5	6.6	4.2	8.8	7.7	7.2	1.1
	“Ил”	5.5	1.3	6.2	2.7	8.8	8.8	7.2	2.4
	“Река”	5.2	0.7	6.8	1.1	8.8	39.9	7.5	2.2

* — не определяли.

На среде ГМП при всех режимах аэрации все испытанные ассоциации (“Стоки”, “Почва”, “Ил”, “Река”) вызывали значительное (в несколько раз) усиление коррозии по сравнению с контролем (рис. 1а). Исключение составила только ассоциация “Стоки”, которая в анаэробных условиях показала незначительное (около 20%) усиление коррозии на этой среде.

Культивирование ассоциаций на среде ГМП в анаэробных и микроаэрофильных условиях сопровождалось закислением среды и накоплением сероводорода (таблица): почернение среды, очевидно, было результатом накопления сульфида железа. В аэробных условиях культивирования изменения pH и цвета среды в процессе инкубации не наблюдали.

В отличие от среды ГМП на остальных средах воздействие ассоциаций на коррозию изменялось в зависимости от режима аэрации. Так, на среде LB все ассоциации в аэробных и микроаэрофильных условиях ингибировали коррозию, а в анаэробных — усиливали ее (рис. 1б). При инкубации на качалке в аэробных условиях были зафиксированы очень большие коррозионные потери как в контрольных, так и в опытных образцах, что, очевидно, связано с воздействием кислорода. Однако в опытных вариантах в результате жизнедеятельности микроорганизмов зафиксировано также и резкое увеличение pH (таблица), что, по-видимому, значительно затор-

мозило коррозию. В микроаэрофильных стационарных условиях доступ кислорода к поверхности металла был ограничен, что уменьшало коррозионные потери примерно в 50 раз в контроле по сравнению с аэробным вариантом культивирования. Здесь также отмечено сильное защелачивание, ингибирующее действие которого привело к уменьшению коррозии по сравнению с контролем в несколько раз. В анаэробных условиях из-за отсутствия кислорода коррозионные потери в контроле уменьшились в несколько раз по сравнению с микроаэрофильными условиями. Однако в опытных вариантах они возросли, по-видимому, из-за повышения концентрации сероводорода и закисления среды.

В результате роста всех ассоциаций на среде DSM в микроаэрофильных условиях наблюдалось ингибирование коррозии, а в анаэробных все ассоциации коррозию ускоряли (рис. 1в). При этом во всех вариантах культивирования происходило защелачивание среды (таблица). В микроаэрофильных условиях цвет среды не изменялся, сероводород накапливался в незначительных количествах. В анаэробных условиях рост ассоциаций сопровождался почернением среды и значительным увеличением концентрации сероводорода.

На среде МСК в аэробных условиях как в контроле, так и в присутствии ассоциаций зафиксированы приблизительно одинаковые высокие коррозион-

ные потери с большим разбросом экспериментальных данных (рис. 1г). В анаэробных и микроаэрофильных условиях коррозионные потери в присутствии ассоциаций относительно контроля уменьшились в несколько раз.

На среде МСК во всех вариантах культивирования визуально наблюдалась интенсивная утилизация керосина. В анаэробных условиях, начиная со второй недели инкубации, наблюдалось почернение среды. В остальных вариантах опыта цвет среды не изменялся. Концентрации сероводорода в микроаэрофильном и анаэробном вариантах различались незначительно. В конце опыта в контрольных вариантах наблюдалось защелачивание среды, в то время как в опытных колбах в аэробных условиях зафиксировано закисление, а в микроаэрофильных и анаэробных условиях как закисление, так и защелачивание среды (таблица).

Таким образом, полученные результаты показывают, что все ассоциации в целом одинаково влияли на коррозию мягкой стали, протекающую в различных средах и при разных условиях аэрации. При определенном наборе питательных веществ в среде и режиме аэрации все ассоциации или усиливали коррозию, или ингибировали ее, или их воздействие достаточно слабо проявлялось на фоне химических коррозионных процессов.

Полученные результаты в целом подтвердили высказанное нами ранее предположение об определяющем влиянии состава среды на характер воздействия микроорганизмов на коррозионные процессы [12]. Подавляющее большинство природных ассоциаций должно различаться не по видовому составу, а по соотношению входящих в них видов микроорганизмов, поэтому при росте инокулятов из разных ассоциаций в одних и тех же условиях в них происходит отбор микроорганизмов, метаболизм которых в наибольшей степени подходит для утилизации данного питательного субстрата при данном режиме аэрации. Даже если в ассоциации присутствуют единичные клетки нескольких видов, которые в наибольшей степени способны адаптироваться к данным условиям окружающей среды или для которых эти условия являются благоприятными для роста, то через определенное время при поддержании данных условий эти виды могут стать доминирующими. Таким образом, независимо от природного источника инокулята в одних и тех же условиях роста происходит отбор наиболее адекватных данным условиям процессов метаболизма. Исходное различие в количественном составе образующих ассоциацию таксономических групп должно влиять только на время, приводящее к конечному результату, но не на сам результат. Одинаковый метаболизм предполагает и одинаковые продукты метаболизма, а значит и одинаковое воздействие на коррозионные процессы.

Очевидно, что во всех 4 испытанных ассоциациях содержались гетеротрофные микроорганизмы, способные утилизировать пептоны, входящие в большом количестве в состав среды LB. В присутствии кислорода воздуха происходило их полное окисление до углекислого газа, воды и аммиака. Последнее способствовало защелачиванию среды, что приводило к ингибированию коррозии мягкой стали на среде LB в аэробном и микроаэрофильном режимах. В анаэробных условиях сахара и пептоны окислялись не полностью. Сахара сбраживались в органические кислоты, а пептоны разлагались до органических кислот и низкомолекулярных азотсодержащих соединений. Судя по слабнокислой реакции культуральной жидкости (таблица), кислых продуктов образовывалось больше, чем щелочных, что и вызывало ускорение коррозии. Не исключено, что в этом случае свой вклад в ускорение коррозии вносили и СВБ, входящие в состав ассоциаций. Они начинали развиваться, используя продукты метаболизма других микроорганизмов во второй период инкубации, что приводило к почернению питательной среды.

В отсутствие микроорганизмов коррозионные потери на среде LB, очевидно, определяются содержанием кислорода в среде непосредственно у поверхности металла. Максимальные потери наблюдались на этой среде в аэробных условиях, а минимальные — в анаэробных.

В отличие от этого на среде ГМП в контрольных вариантах даже в условиях интенсивной аэрации коррозионные потери были сравнительно небольшими. По всей видимости, это объясняется пассивирующим действием содержащихся в этой среде высоких концентраций фосфатов. В этой среде единственным источником углерода и энергии была глюкоза. В аэробных условиях она полностью окислялась до углекислого газа и воды без образования кислых продуктов метаболизма, поэтому зафиксированное в аэробных условиях ускорение коррозии можно связать с разрушением микроорганизмами защитной фосфатной пленки. Помимо этого ускорению коррозии в микроаэрофильных и анаэробных условиях, очевидно, способствовало закисление среды, вызванное неполным окислением глюкозы.

Защелачивание среды DSM в результате процесса сульфатредукции оказывало ингибирующий эффект только в микроаэрофильных условиях. Образующийся сероводород, очевидно, окислялся ограниченным количеством кислорода воздуха, что приводило к снижению концентрации этих двух коррозионно активных веществ. Несмотря на низкое содержание кислорода в анаэробных условиях, коррозионные потери возросли, по-видимому, из-за накопления сероводорода, концентрация которого

по сравнению с микроаэрофильным вариантом увеличилась более чем на порядок.

Особый интерес представляют результаты, полученные на среде МСК, содержащей минеральные соли и керосин в качестве единственного источника углерода и энергии, поскольку этот случай наиболее близок к реальным условиям в нефтедобывающей промышленности. Здесь в процессе культивирования можно выделить два взаимосвязанных и противоположных по воздействию на значение рН процесса – биодegradацию керосина и сульфатредукцию. Как известно, биодegradация углеводов сопровождается закислением [18], а сульфатредукция – защелачиванием [7] среды.

В начале инкубации доминировали процессы деструкции углеводов, а процессы сульфатредукции ускорялись по мере снижения в культуральной жидкости концентрации кислорода и накопления в ней продуктов биодegradации керосина, служащих для СВБ питательным субстратом. За время инкубации по мере потребления запасов керосина кислотообразующий процесс его биодegradации постепенно замедлялся и доминирующим становилось защелачивание среды в результате сульфатредукции. Момент смены и характер протекания этих противоположно направленных процессов должен быть индивидуален для каждой ассоциации и, видимо, этим объяснялось наличие у разных ассоциаций как кислой, так и щелочной реакции при микроаэрофильном и анаэробном вариантах инкубации (таблица).

Таким образом, в процессе культивирования на среде МСК величина рН должна колебаться вблизи нейтрального значения, что означало незначительное влияние этого показателя на коррозионные процессы. Поскольку фосфатов на этой среде на два порядка меньше, чем на среде ГМС, то их пассивирующий эффект тоже должен быть незначительным. Из этого следует, что коррозионные потери на среде МСК должны определяться, главным образом, концентрацией кислорода и сероводорода. Полученные результаты полностью подтвердили это (рис. 1г).

Так, в аэробных условиях коррозионные потери из-за агрессивного воздействия кислорода в опытных и контрольных вариантах были одинаково высоки, поскольку определялись только воздействием кислорода. В микроаэрофильных условиях из-за меньшего доступа кислорода коррозионные потери в опытных вариантах были в 2–3 раза меньше, чем в контроле. В анаэробных условиях в результате большего поглощения доступного кислорода нефтеокисляющими микроорганизмами защитный биологический эффект оказался еще сильнее.

Учитывая практическую значимость полученного результата, нами был поставлен аналогичный дополнительный опыт с использованием других есте-

ственных ассоциаций, полученных из восьми удаленных друг от друга географически регионов. Как видно из результатов, представленных на рис. 2, все восемь различных природных микробных ассоциаций также тормозили коррозию в анаэробных условиях на среде МСК. Это позволило утверждать, что независимо от места расположения нефтепромысла характер микробиологического воздействия на коррозию нефтепромыслового оборудования будет определяться не составом аборигенной микрофлоры, а концентрацией кислорода в нефтепромысловой воде и ее химическим составом.

Наблюдавшееся в конце инкубации почернение среды и накопление сероводорода в анаэробных условиях на среде МСК указывало на определенную активность СВБ, что, однако, не оказало какого-либо существенного влияния на коррозию. По-видимому, как и в случае со средой LB, это было связано с относительно коротким сроком инкубации.

Таким образом, полученные результаты полностью подтвердили правильность сделанного нами ранее вывода об условности разделения микроорганизмов на деструкторов и пассиваторов. Так же, как и чистые культуры, различающиеся по видовому составу ассоциации, при изменении условий культивирования одинаковым образом изменяют свое воздействие на коррозионные процессы.

Обсуждение полученных результатов не может претендовать на исчерпывающее объяснение всех происходивших в эксперименте процессов. Тем не менее, они позволяют предположить, что закономерности микробиологического воздействия на коррозию можно прогнозировать, исходя из известных законов протекания электрохимической коррозии, учитывающих воздействие кислорода, сероводорода, а также кислых или щелочных продуктов метаболизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pedersen A., Hermansson M.* // Biofouling. 1981. V. 1. P. 313–322.
2. *Jayaraman A., Eartman J.C., Wood T.K.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997(a). V. 47. P. 62–68.
3. *Potekhina J.S., Sherisheva N.G., Potekhina L.P., Pospelov A.P., Rakitina T.A., Warnecke F., Gottschalk G.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 52. P. 639–646.
4. *Nivens D.E., Nichols P.D., Henson J.M., Geesey G.G., White D.C.* // Corrosion NACE. 1986. V. 42. № 4. P. 204–210.
5. *Jayaraman A., Cheng E.T., Eartman J.C., Wood T.K.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 48. P. 11–17.
6. *Ornek D., Jayaraman A., Syrett B., Hsu C-H., Wood, T.K.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 58. P. 651–657.
7. *Postgate J.R.* The Sulphate-Reducing Bacteria. 2nd ed., Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1984. 165 p.
8. *Lee J.S., Ray R.I., Lemieux E., Falster A., Little B.J.* // Biofouling. 2004. V. 20. P. 237–247.

9. *Ford T.E., Mitchell R.* // *Advances in Microbial. Ecology*. N. Y.: Plenum Press., 1990. V. 11. P. 230–262.
10. *Videla H.A.* *Manual of Biocorrosion*. N. Y.: CRC Press Inc., 1996. 273 p.
11. *Borenshtein S.W.* *Microbiologically Influenced Corrosion Handbook*. N. Y.: Industrial Press Inc., 1994. 208 p.
12. *Родин В.Б., Жиглецова С.К., Кобелев В.С., Акимова Н.А., Александрова Н.В., Расулова Г.Е., Холоденко В.П.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2000. Т. 36. № 6. С. 679–684.
13. *Жиглецова С.К., Родин В.Б., Кобелев В.С., Александрова Н.В., Расулова Г.Е., Холоденко В.П.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2000. Т. 36. № 6. С. 637–641.
14. *Николаев Ю.А., Плакунов В.К.* // *Микробиология*. 2007. Т. 76. № 2. С. 149–163.
15. *Costerton J.W., Lewandovski Z., Caldwell D.E., Corber D.R., Lappin-Scott H.M.* // *Annu. Rev. Microbiol.* 1995. V. 49. P. 711–745.
16. *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Catalogue of strains. 4th Ed.* Braunschweig: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH., 1989.
17. *Лайтинен Г.А., Харрис В.Е.* *Химический анализ*. М.: Химия, 1979. 624 с.
18. *Ленгелер П., Древе Г., Шлегель Г.* *Современная микробиология прокариотов*. М.: Мир, 2005. 656 с.

Corrosive Activity of Natural Microbial Associations at Various Conditions of Cultivation

**V. B. Rodin, S. K. Zhigletsova, N. A. Zhirkova, N. V. Aleksandrova,
V. A. Chugunov, and V. P. Kholodenko**

*State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow oblast, 142279 Russia
e-mail: info@obolensk.org*

Received January 31, 2011

Abstract—Influence of microbial associations isolated from different ecological niches on corrosion of mild steel was changed depending on composition of medium and aeration regime. Both decrease and increase in corrosion losses were observed, which indicated that the subdivision of microorganisms into destructors and passivators of corrosion is merely conventional.

УДК 581.19+631.811.98:[577.152.3+577.112.3 +576.315.45]:633.111.1

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ (*Triticum aestivum* L.) ПРИ ДЕЙСТВИИ БИОРЕГУЛЯТОРА СТИФУНА

© 2011 г. О. И. Яхин*, А. А. Лубянов***, И. А. Яхин*, В. А. Вахитов*, Р. И. Ибрагимов***,
М. С. Юмагужин****, З. Ф. Калимуллина*

*Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Уфа, 450054

e-mail: yakhin@anrb.ru

**Уфимский филиал Оренбургского государственного университета, Уфа, 450054

***Башкирский государственный университет, Уфа, 450007

Поступила в редакцию 1.02.2011 г.

При действии ростстимулирующих концентраций биорегулятора стифуна на растениях пшеницы выявлено увеличение функциональной активности ядрышек меристематических клеток, увеличение содержания лектина (агглютинина зародыша пшеницы), повышение активности протеиназ, ингибиторов трипсина и АТФазы. При применении биорегулятора возрастал пул свободных аминокислот, увеличивалось содержание цистеина, лизина, лейцина, тирозина и значительно – метионина и фенилаланина. Полученные результаты позволяют предполагать активацию стифуном биосинтеза белка в растениях пшеницы.

С целью повышения устойчивости растений к абиотическим стрессовым факторам и болезням, стимуляции роста, продуктивности и качества урожая в последние годы широкое распространение получили биорегуляторы на основе продуктов метаболизма микроорганизмов и/или растений, содержащие органические (аминокислоты, витамины, фитогормоны) и минеральные вещества. Они характеризуются полифункциональным действием на сельскохозяйственные культуры, отсутствием негативного влияния на окружающую среду, высокой экономической эффективностью [1]. К таким препаратам относятся никфан, симбионта, эми-стим, агропон (продукты метаболизма грибов эндофитов облепихи, женьшеня, *Acremonium lichenicola*, микромицета *Cylindrocarpon magnusianum* соответственно) [2], силк, новосил, растстим, срезар, лариксин (растительные метаболиты хвойных) [3, 4], ПТМБ (продукты термофильного метанового брожения) [5] и др.

Перспективным биорегулятором, стимулирующим рост и увеличивающим продуктивность растений пшеницы, ячменя, озимой ржи, гороха [6–10], риса [11], картофеля [12], повышающим их устойчивость к стрессам и болезням, является стифун – лиофилизат экстракта озимой ржи [6]. Стифун не оказывает общетоксического действия на организм млекопитающих, не обладает сенсibiliзирующими свойствами при естественном пути поступления в организм, не влияет на формирование клеточного и гуморального иммунитета [13]. На растениях пшеницы установлено, что стифун повышал энергию прорастания и всхожесть семян, способствовал интенсивному корнеобразованию и росту надзем-

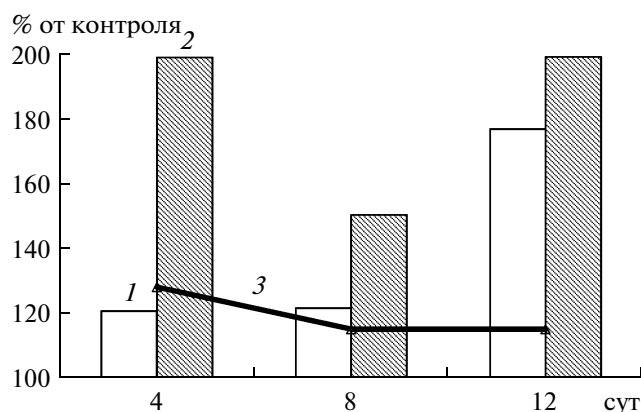
ной части, увеличению общей и продуктивной ку-стистости, озерненности колоса и массы 1000 семян [7, 8]. Наряду с увеличением урожайности зерна на 18–27% при его применении отмечалось увеличение содержания белка и клейковины.

Цель работы – оценка влияния препарата стифун на метаболические процессы у растений яровой пшеницы.

МЕТОДИКА

Опыты проводились на мягкой яровой пшенице (*Triticum aestivum* L.) сорта Жница. Препаративную форму стифуна (водорастворимый порошок) получали по ранее описанной методике [6]. В экспериментах использовали водные растворы стифуна в концентрациях 3.3, 33 и 330 мг/л. Семена растений перед посевом стерилизовали в 70%-ном этаноле. В работе использовались различные способы применения стифуна: обработка семян или проростков в течение 20 и 60 мин соответственно и проведение биохимических анализов через 4, 8, 12 сут или 3, 24, 48 ч; проращивание семян в чашках Петри на фильтровальной бумаге, увлажненной раствором биорегулятора в течение 48 ч при 24°C; выращивание растений в стеклянных стаканах с раствором биорегулятора в течение 14 сут на плотиках из пробкового материала с отверстиями (диаметр 4 мм), на которые размещали предварительно пророщенные в течение 24 ч в термостате при 24°C семена, а также из семян, обработанных биорегулятором, на перлите в течение 9 сут.

Морфометрические параметры ядрышек в ядрах интерфазных меристематических клеток оценива-



Влияние стифуна (33 мг/л) на биомассу растений пшеницы и содержание лектина (АЗП): 1 – АЗП в побегах, 2 – АЗП в корнях, 3 – масса 1 растения.

ли с использованием микроскопа Amplival (“Carl Zeiss”, Германия) после окрашивания азотнокислым серебром [14]. Хроматографическое разделение и количественное определение аминокислот проводили на аминокислотном анализаторе “Hitachi 835” (Япония). Локализацию и активность Mg^{2+} -активируемой АТФазы (КФ 3.6.1.3) в растительных клетках оценивали по методу Вахштейна и Майзеля [15]. Содержание агглютинина зародыша пшеницы (АЗП) определяли методом непрямого конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) [16].

Растворимые белки экстрагировали 0.05 М трис-НСI-буфером, рН 8.2, с 0.02 М $CaCl_2$. Экстракты центрифугировали при 3500 г, 10 мин (MPV-310, “МЕХАНИКА”, Польша).

Активность протеиназ и ингибиторов трипсина определяли по гидролизу синтетического субстрата N, α -бензоил-DL-аргинин-4-нитроанили-

да (БАПНА) [17]. Активность ферментов выражали в относительных единицах (Е), активность ингибиторов – в ингибиторных единицах (ИЕ). За единицу активности фермента принимали такую активность, при которой в стандартных условиях за 1 мин образовывалось 1 мМ п-нитроанилида. ИЕ в стандартных условиях ингибирует 1 единицу (Е) активности трипсина при гидролизе БАПНА или желатины.

Опыты проводились в 3–4 повторностях и воспроизводились не менее 3 раз. В одной биологической повторности использовали не менее 10 растений. При проведении биохимических анализов использовали 4–7 повторностей. Цитохимические эксперименты включали оценку не менее 3000 клеток на каждый вариант опыта. Статистическую значимость между вариантами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента при доверительной вероятности 0.95.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что стифун стимулировал рост растений пшеницы. Увеличение сухой массы корней и побегов предполагает возможность активации стифуном биосинтетических процессов. В ядрах меристематических клеток этих органов увеличивались количество и объем ядрышек, что может свидетельствовать о повышении их функциональной активности. Ранее обсуждалась связь между суммарным объемом ядрышек и метаболической активностью клеток и было показано, что регуляторы роста растений фузикоцин, эмистим, гексахлорат, кинетин могли увеличивать синтез рРНК в клетках меристем [18, 19]. Известно, что размер ядрышка отражает интенсивность метаболических процессов в клетке [20], чем крупнее ядрышко, тем интенсивнее в нем происходит синтез рРНК и, соответственно, выше интенсивность синтеза белка [21].

Таблица 1. Влияние стифуна на линейные размеры, массу, ядрышковые параметры меристематических клеток корней (в знаменателе) и побегов (в числителе) у 48 ч проростков пшеницы

Концентрация стифуна, мг/л	Длина, мм	Сухая масса, мг	Число ядрышек	Объем ядрышек, мкм ³
0 (контроль)	5.70 ± 0.17	0.41 ± 0.01	1.46 ± 0.07	2.10 ± 0.11
	13.60 ± 0.41	1.20 ± 0.04	2.40 ± 0.16	3.70 ± 0.25
3.3	$7.40 \pm 0.33^*$	$0.58 \pm 0.03^*$	$2.10 \pm 0.08^*$	$2.90 \pm 0.14^*$
	$15.70 \pm 0.71^*$	$1.40 \pm 0.06^*$	$2.76 \pm 0.20^*$	$4.60 \pm 0.32^*$
33	$6.30 \pm 0.28^*$	$0.56 \pm 0.28^*$	$2.30 \pm 0.10^*$	$3.00 \pm 0.18^*$
	$15.30 \pm 0.69^*$	1.30 ± 0.06	2.50 ± 0.18	$4.50 \pm 0.30^*$
330	6.20 ± 0.25	0.55 ± 0.02	$2.55 \pm 0.14^*$	$3.20 \pm 0.19^*$
	14.70 ± 0.59	1.30 ± 0.05	2.50 ± 0.19	$4.50 \pm 0.31^*$

* Различия по сравнению с контролем значимы при $p < 0.05$.

Таблица 2. Влияние стифуна (3.3 мг/л) на концентрацию свободных аминокислот в корнях и надземной части 14-суточных растений пшеницы

Аминокислота	Концентрация, мг/100 мг сухого вещества			
	корни		надземная часть	
	контроль	стифун	контроль	стифун
Асп	0.208 ± 0.019	0.080 ± 0.007	0.545 ± 0.044	0.974 ± 0.088
Тре	0.051 ± 0.004	0.021 ± 0.002	0.176 ± 0.016	0.127 ± 0.013
Сер	0.031 ± 0.002	0.019 ± 0.003	0.066 ± 0.007	0.077 ± 0.009
Глу	0.112 ± 0.013	0.092 ± 0.011	0.101 ± 0.012	0.106 ± 0.010
Про	0.044 ± 0.004	0.020 ± 0.002	0.077 ± 0.007	0.127 ± 0.011
Гли	0.030 ± 0.003	0.016 ± 0.001	0.027 ± 0.004	0.040 ± 0.004
Ала	0.082 ± 0.009	0.037 ± 0.003	0.096 ± 0.012	0.241 ± 0.022
Цис	0.026 ± 0.004	0.043 ± 0.006	0.037 ± 0.003	0.087 ± 0.010
Вал	0.122 ± 0.015	0.054 ± 0.008	0.195 ± 0.020	0.284 ± 0.028
Мет	0.003 ± 0.001	0.021 ± 0.002	0.018 ± 0.002	0.047 ± 0.004
Иле	0.087 ± 0.010	0.029 ± 0.003	0.108 ± 0.013	0.167 ± 0.017
Лей	0.069 ± 0.011	0.041 ± 0.004	0.056 ± 0.007	0.188 ± 0.017
Тир	0.066 ± 0.009	0.101 ± 0.012	0.123 ± 0.010	0.246 ± 0.025
Фен	0.050 ± 0.005	0.097 ± 0.008	0.114 ± 0.008	0.609 ± 0.055
Лиз	0.062 ± 0.008	0.138 ± 0.012	0.110 ± 0.010	0.268 ± 0.032
Гис	0.028 ± 0.003	0.018 ± 0.002	0.069 ± 0.008	0.081 ± 0.009
Арг	0.030 ± 0.003	0.020 ± 0.002	0.065 ± 0.007	0.043 ± 0.005
Сумма	1.10 ± 0.09	0.85 ± 0.09	1.98 ± 0.22	3.71 ± 0.45

Структурными единицами вновь синтезируемых белков и регуляторами многих биохимических процессов в растениях являются свободные аминокислоты, которые также участвуют в биосинтезе разнообразных вторичных соединений. Применение стифуна увеличивало пул свободных протеиногенных аминокислот у растений пшеницы на 48% по сравнению с контролем (табл. 2). Суммарное содержание аминокислот увеличивалось в надземной части растений на 87%, а в корнях — уменьшалось на 23%. Из 17 исследованных аминокислот для 5 (лизин, метионин, тирозин, фенилаланин, цистеин) показано возрастание их уровня и в корнях, и в надземной части, для 9 (аланин, аспарагиновая кислота, валин, гистидин, глицин, изолейцин, лейцин, пролин, серин) — увеличение в надземной части и уменьшение в корнях, для аргинина и треонина — снижение и в корнях, и в листьях, а для глутаминовой кислоты — уменьшение в корнях.

В контрольных растениях доминировала аспарагиновая кислота. В корнях в значительном количестве присутствовали валин и глутаминовая кислота. При действии стифуна в надземной части растений наиболее представленными аминокислотами были аспарагиновая кислота, лизин и незаряженные гидрофобные аминокислоты (фенил-

аланин, тирозин, валин, аланин), а в корнях — тирозин и лизин (табл. 2). Следует отметить, что глутамат и аспартат играют важную роль в реакциях переаминирования с образованием различных аминокислот, в том числе лизина, фенилаланина, метионина. В наших экспериментах уровень метионина в контроле был наименьшим из всех исследованных аминокислот и значительно возрастал при действии стифуна. Известно, что в процессе синтеза белка метионин, помимо участия в построении полипептида, выполняет и особую роль в инициации трансляции мРНК [22]. В растениях через его производное — S-аденозилметионин осуществляется контроль уровня таких метаболитов, как этилен, полиамины, биотин и регуляция процессов клеточного деления, синтеза клеточной стенки, хлорофилла и др. [22].

Следует отметить, что в данном опыте при действии стифуна линейные размеры растений увеличивались с 30.3 в контроле до 33.2 см в варианте с биорегулятором, биомасса — с 17.1 до 20.0 мг соответственно. Увеличение уровня метионина при действии стифуна, по-видимому, свидетельствует об активации метаболических процессов. Ранее исследователями уже была выявлена положительная корреляция между количеством в растениях метионина и лизина, а повышенный уровень лизина способ-

Таблица 3. Активность протеиназ (мЕ/г сырой массы) и ингибиторов трипсина (мИЕ/г сырой массы) у проростков пшеницы при действии стифуна (33 мг/л)

Вариант	3 ч		24 ч		48 ч	
	корни	побеги	корни	побеги	корни	побеги
Протеиназы, мЕ/г сырой массы						
Контроль	87.6 ± 5.0	150.7 ± 9.2	91.0 ± 6.2	167.7 ± 8.2	134.4 ± 7.6	134.8 ± 7.4
Стифун	120.9 ± 7.2*	281.1 ± 12.6*	180.0 ± 5.7*	232.4 ± 15.7*	186.9 ± 14.3*	158.0 ± 10.7
Ингибиторы трипсина, мИЕ/г сырой массы						
Контроль	291.4 ± 16.2	306.4 ± 9.0	235.7 ± 18.7	270.1 ± 16.9	308.7 ± 15.0	242.9 ± 18.7
Стифун	354.6 ± 16.4*	382.2 ± 17.7*	331.3 ± 15.1*	379.0 ± 31.2*	487.5 ± 24.8*	392.1 ± 35.4

* Различия по сравнению с контролем значимы при $p < 0.05$.

ствовал увеличению синтеза метионина или уменьшал его катаболизм [22].

Фенилаланин является предшественником многих фенольных соединений, которые могут обладать антиоксидантными свойствами и участвуют в процессе лигнификации растительных клеток. Возрастание в растениях после применения стифуна (табл. 2) содержания тирозина и фенилаланина — аминокислот, являющихся у пшеницы предшественниками ксилана, могло быть связано с усилением процессов элонгации стебля в фазе кушения, как это было показано в опытах с применением молибдена [23]. Так, в полевых экспериментах применение стифуна приводило к увеличению длины, диаметра и толщины стенок междоузлий растений пшеницы [7].

Повышение уровня свободных аминокислот, активация их синтеза при применении физиологически активных веществ обсуждаются в литературе в связи с устойчивостью растений к стрессовым факторам. Так, повышение эпибрассинолидом засухоустойчивости растений было обусловлено увеличением уровня свободных аминокислот, участвующих в осморегуляции [24]. Активация синтеза аминокислот у озимой пшеницы при использовании молибдена могла способствовать повышению устойчивости растений к холоду [23]. Результаты, полученные при изучении влияния стифуна на содержание свободных аминокислот, позволяют предположить возможность активации данным биорегулятором неспецифических защитных реакций растений, которые могут рассматриваться в качестве факторов преадаптации к неблагоприятным воздействиям различной природы.

В процессах формирования устойчивости и роста растений важная роль, обусловленная как регуляторными, так и защитными функциями, принадлежит также протеолитическим ферментам и их ингибиторам [25, 26]. Так, при действии салициловой кислоты наблюдалось повышение активности протеиназ и ингибиторов трипсина [27]. Применение стифуна приводило к увеличению через 3, 24, 48 ч после обработки активности трипсиноподоб-

ных протеиназ и их ингибиторов как в побегах, так и в корнях пшеницы (табл. 3). Применение стифуна у 48 ч растений вызывало также увеличение линейных размеров и сухой массы (табл. 1).

Другой ответной реакцией растений на действие биотических и абиотических стрессовых факторов может являться увеличение содержания лектина [28, 29]. Обработка семян стифуном приводила к практически 2-кратному возрастанию уровня лектина—агглютинина зародыша пшеницы (АЗП) в корнях 4-суточных растений, при этом увеличивалась и биомасса проростков (рисунок). В побегах значительное повышение его содержания наблюдалось лишь к концу опыта (12 сут). Вероятно, различия в скорости ответа корней и побегов на воздействие биорегулятора связаны с тем, что корни являются местом преимущественного синтеза и локализации АЗП [30]. По мнению исследователей, увеличение содержания АЗП в растениях пшеницы под влиянием фитогормонов и элиситоров природного происхождения свидетельствует о вовлечении этого белка в формирование защитных реакций растительных клеток [29, 31–33]. Как нами было показано ранее, применение стифуна приводило к снижению распространенности и степени развития ряда возбудителей болезней пшеницы [8]. Также стифун предотвращал негативное действие засоления, гипертермии, водного дефицита на рост и продуктивность растений.

Характер изменений содержания свободных аминокислот при применении стифуна (табл. 2) может свидетельствовать о том, что данный биорегулятор воздействует на уровень и перераспределение отдельных метаболитов в растениях. Согласно литературным данным стифун влиял на распределение ассимилятов в растениях, повышая аттрагирующую способность оплодотворенных завязей, увеличивая при оптимальных условиях минерального питания отложение запасных веществ в классе выполненных семян [11].

Важная роль в транспорте органических веществ принадлежит мембранным АТФазам. Обсуждается транспортная функция Mg^{2+} -АТФазы,

Таблица 4. Распределение АТФазной активности на поперечных срезах корней 9-суточных растений пшеницы при действии стифуна (33 мг/л)

Структура корня	Интенсивность окрашивания, усл. ед.*	
	контроль	стифун
Первичная кора	++++	+++++
Перицикл	++	++++
Межклетники в коре	+++	+++++
Межклетники перицикла	+	+++++

* Интенсивность реакции выражена в условных единицах “+” (у. е.), отражающих степень активности АТФазы.

которая может быть вовлечена в регулирование активности зародыша посредством воздействия на транспорт растворов от корней и (или) листьев [34]. По данным исследователей АТФазная активность обнаруживалась на плазматической мембране, интенсивная реакция происходила в транспортных клетках ксилемы с обеих сторон кольца ксилемы и элементов флоэмы [34]. Как показали наши результаты (табл. 4), в корнях пшеницы АТФаза (КФ 3.6.1.3) выявлялась в первичной коре, перицикле, межклетниках. При действии стифуна наблюдалось значительное увеличение активности АТФазы во всех рассмотренных структурах корня. Механизм ростстимулирующего действия таких регуляторов роста растений как фузикококцина, ауксина, гуминовые кислоты может быть сопряжен с АТФазной активностью как в результате ее активации, так и с синтезом ее *de novo* [35]. Совокупность имеющихся данных позволяет предполагать активацию также стифуном поглотительной и транспортной способности корня.

Таким образом, результаты исследований могут указывать на стимуляцию стифуном метаболических процессов у растений пшеницы. Совокупность экспериментальных данных позволяет предположить активацию белкового биосинтеза при действии стифуна, о чем может свидетельствовать увеличение функциональной активности ядрышек и отдельных белков, сопряженность активации протеиназно-ингибиторной системы и увеличения пула свободных аминокислот с интенсификацией ростовых процессов. Выявленное возрастание активности АТФазы, обладающей транспортной функцией, может указывать на активацию транспорта ассимилятов при действии стифуна. Из полученных нами данных также следует, что стифун влиял на биохимические процессы растений, специфичность изменения которых при действии различных индукторов устойчивости, как показано в ряде исследований, свидетельствовала об их участии в регуляции устойчивости к абиотическим и биотическим стрессовым факторам. В связи с этим можно предположить, что стифун является регулятором неспецифической устойчивости растений. Наши следующие исследования будут посвящены

изучению механизмов антистрессового действия стифуна при неблагоприятных воздействиях различной природы.

Выражаем благодарность Ф.М. Шакировой и М.В. Безруковой за методическую помощь при проведении иммуноферментного анализа.

Исследования поддержаны грантами “Программы поддержки ведущих научных школ Российской Федерации” (НШ-2217.2003.4), Российского фонда фундаментальных исследований (02-04-97917), целевым грантом Министерства промышленности, науки и технологий РФ (2003), “Фонда содействия отечественной науки”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Прусакова Л.Д., Малеванная Н.Н., Белопухов С.Л., Вакуленко В.В. // *Агрохимия*. 2005. № 11. С. 76–86.
2. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. М. 2010. 801 с.
3. Ралдугин В.А. // *Рос. хим. журн. общества им. Д.И. Менделеева*. 2004. Т. 48. № 3. С. 84–88.
4. Евтушенко Е.В., Сапрыкин В.А., Галицын М.Ю., Чекуров В.М. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2008. Т. 44. № 1. С. 123–128.
5. Драгозов И.В., Коць С.Я., Чехун Т.И., Яворская В.К., Волкогон Н.В. // *Физиология растений*. 2002. Т. 49. № 6. С. 925–930.
6. Яхин И.А., Вахитов В.А., Исаев Р.Ф., Яхин О.И. Патент РФ. 1997. № 2076603.
7. Яхин И.А., Яхин О.И., Исаев Р.Ф. // *Докл. РАСХН*. 1999. № 6. С. 8–10.
8. Яхин И.А., Яхин О.И., Вакуленко В.В. // *Защита и карантин растений*. 2000. № 4. С. 19.
9. Яхин И.А., Яхин О.И., Вакуленко В.В. // *Защита и карантин растений*. 2001. № 1. С. 47.
10. Яхин И.А., Яхин О.И. // *Защита и карантин растений*. 2002. № 12. С. 31.
11. Карпов Е.А., Гладун И.В., Белозерова О.Л., Баркалова О.И. // *Агрохимия*. 1997. № 11. С. 61–64.
12. Яхин И.А., Яхин О.И. // *Земледелие*. 2001. № 5. С. 41.
13. Онацкий Н.М., Яхин И.А., Рыбалкин С.П., Михина Л.В., Яхин О.И., Ибатуллина Р.Б. // *Токсикологический вестник*. 2001. № 5. С. 20–24.

14. Bloom S.E., Goodpasture C. // Human. Genet. 1976. V. 34. P. 199–206.
15. Wachstein M, Meisel E. // J. Amer. Clin. Pathol. 1957. V. 27. № 1. P. 13–23.
16. Хайруллин Р.М., Шакирова Ф.М., Безрукова М.В., Ямалеев А.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 1992. Т. 28. № 3. С. 468–474.
17. Erlanger B.P., Kokowski S., Cohen M. // Arch. Biochem. Biophys. 1961. V. 95. № 2. P. 271–278.
18. Арапатьян Л.А. Цитогенетические эффекты фитогормонов. Ереван: Изд-во АН АрмССР, 1989. 138 с.
19. Клицов С.В., Артемьева Г.М., Лазарева Е.М., Муромцев Г.С. // Генетика. 2000. Т. 36. № 8. С. 1071–1080.
20. Liu D., Jiang W., Gao X. // Biologia Plantarum. 2003/4. V. 41. № 1. P. 79–83.
21. Соболев М.А. // Цитология и генетика. 2001. № 3. С. 72–84.
22. Amir R. // Amino acids. 2010. V. 39. № 4. P. 917–931.
23. Hu C., Wang Y., Wei W. // J. Plant Nutr. 2002. V. 25. № 7. P. 1487–1499.
24. Пустовойтова Т.Н., Жданова Н.Е., Жолкевич В.Н. // Докл. РАН. 2001. Т. 376. № 5. С. 697–700.
25. Мосолов В.В., Григорьева Л.И., Валуева Т.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 2. С. 131–140.
26. Schaller A. // Planta. 2004. V. 220. P. 183–197.
27. Адамовская В.Г., Клечковская Е.А., Молодченкова О.О., Вовчук С.В. // Физиология растений. 2000. Т. 47. № 2. С. 210–215.
28. Peumans W.J., Van Damme E.J.M. // Plant Physiol. 1995. V. 109. № 2. P. 347–352.
29. Бабоша А.В. // Биохимия. 2008. Т. 73. № 7. С. 1007–1022.
30. Raikhel N.V., Mishkind M.L., Palevitz B.A. // Planta. 1984. V. 162. № 1. P. 55–61.
31. Cammue B.P.A., Broekaert W.F., Kellens J.T.C., Raikhel N.V., Peumans W.J. // Plant Physiol. 1989. V. 91. № 4. P. 1432–1435.
32. Shakirova F.M., Avalbaev A.M., Bezrukova M.V., Gimalov F.R. // Plant Growth Regulation. 2001. V. 33. P. 111–115.
33. Безрукова М.В., Авальбаев А.М., Кильдибекова А.Р., Фатхутдинова Р.А., Шакирова Ф.М. // Докл. РАН. 2002. Т. 387. № 2. С. 276–278.
34. Sossountzov L., Habricot Y. // Protoplasma. 1985. V. 127. P. 180–191.
35. Canellas L.P., Olivares F.L., Okorokova-Façanha A.L., Façanha A.R. // Plant Physiol. 2002. V. 130. P. 1–7.

Metabolic Changes in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Plants under Action of Bioregulator Stifun

O. I. Yakhin^a, A. A. Lubyantsev^{a, b}, I. A. Yakhin^a, V. A. Vakhitov^a, R. I. Ibragimov^c,
M. S. Yumaguzhin^{a, c}, and Z. F. Kalimullina^a

^a Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Center, Russian Academy of Sciences, Ufa 450054
e-mail: yakhin@anrb.ru

^b Ufa Branch of Orenburg State University, Ufa, 450054

^c Bashkir State University, Ufa, 450007

Received February 1, 2011

Abstract—Under action of growth-stimulating concentrations of bioregulator stifun on wheat plants, an increase of functional activity of nucleoli of meristematic cells; contents of lectin (wheat germ agglutinin); and activity of proteinases, trypsin inhibitors, and ATPase activity was established. The pool of free amino acids was increased under bioregulator use. Levels of methionine, phenylalanine, cysteine, lysine, and tyrosine were increased. It is likely that stifun could activate protein biosynthesis in wheat plants.

УДК 31.23.25:62.41.99:65.63.01

ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ЭКСПРЕССНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМПИЦИЛЛИНА В МОЛОКЕ И КИСЛО-МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

© 2011 г. Н. А. Бызова, Е. А. Зверева, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев

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

e-mail: nbyzova@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 16.05.2011 г.

Разработан иммунохроматографический метод определения β -лактамного антибиотика ампициллина. Метод основан на конкурентном взаимодействии молекул антибиотика, содержащихся в пробе, и иммобилизованного на мембране конъюгата пенициллин-белок со специфическими антителами, меченными коллоидным золотом, которое происходит при движении вдоль мембраны реагентов и тестируемой пробы. Комплектация тест-системы обеспечивает контроль превышения предельно допустимого содержания антибиотика в молоке и молочных продуктах – 10 нг/мл. Показана возможность тестирования молока-сырья, молочных и кисло-молочных продуктов в течение 10 мин при комнатной температуре без пробоподготовки.

В настоящее время антибиотики широко используются как для борьбы с заболеваниями человека, так и для профилактики и лечения болезней животных. Существенным фактором риска становятся контаминация антибиотиками пищевых цепей и их нетерапевтическое поступление в организм человека с продуктами питания, которое может вызывать развитие устойчивых форм микроорганизмов, дисбактериозы, аллергические реакции, подавление активности некоторых ферментов и т.д. [1–5]. В связи с этим содержание антибиотиков является важным параметром при оценке безопасности продуктов питания. Для контроля антибиотиков наиболее интенсивно используются микробиологические и химические методы [4].

Микробиологическое тестирование основано на подавлении антибиотиками, содержащимися в пробе, роста тестового микроорганизма (обычно это стрептококки, микрококки или спорообразующие аэробы) или синтеза этим микроорганизмом определенного фермента. Добавление тестового микроорганизма к образцам молока может вызвать сдвиг pH, контролируемый растворами лакмуса, бромкрезолового пурпурного и др., и окислительно-восстановительные реакции, ход которых тестируют с помощью метиленового синего или трифенилтетразолия [6–9]. Хотя микробиологические методы дают адекватную информацию о содержании в пробе физиологически активных молекул антибиотиков, их реализация требует длительного времени и накладывает ограничения на помещение, в котором ведется работа с микроорганизмами.

Альтернативой микробиологическим являются химические методы тестирования. Для детекции антибиотиков различных классов разработаны раз-

нообразные методы, основанные, как правило, на хроматографии с масс-спектрометрией или капиллярном электрофорезе [10–13]. Несмотря на низкие пределы обнаружения (до 0.1 нг/мл), эти методы обладают существенными недостатками. Для их реализации необходимо сложное дорогостоящее оборудование и квалифицированный персонал. К тому же хроматографический анализ довольно трудоемок, т.к. предполагает многоэтапную пробоподготовку – экстракцию, концентрирование и др. Эти факторы определяют высокую себестоимость тестирования и невозможность применения данных методов для широкого мониторинга.

С учетом вышеизложенного основные требования, предъявляемые к разрабатываемым новым методам определения антибиотиков, заключаются в минимальной трудоемкости и соответствии рабочих диапазонов предельно допустимым концентрациям контаминантов в продуктах питания. Эти условия выполняются при переходе к иммуноаналитическим методам. Применение антител обеспечивает высокую селективность анализа, а их мечение – усиление сигнала и возможность выявления низких концентраций антибиотиков-антигенов. В настоящее время иммуноаналитические методы успешно применяются для решения разнообразных практических задач, прежде всего в медицинской и ветеринарной диагностике [14–16], что свидетельствует об их перспективности и для целей контроля пищевых продуктов.

Традиционный микропланшетный иммуноферментный анализ (ИФА), наиболее интенсивно используемый иммуноаналитический метод [17–20], в силу диффузионных ограничений длится около 2 ч. Возможность использования иммунохимиче-

ских подходов существенно увеличило в последние годы число альтернативных форматов с временем анализа 10–20 мин [14, 21, 22]. Из различных форматов иммуноанализа наибольший интерес для экспрессного мониторинга представляет иммунохроматография, в которой все специфические реакции и формирование детектируемого сигнала инициируются контактом тест-полоски с пробой и не требуют вспомогательных реагентов, приборов, дополнительных манипуляций и т.п. [23, 24]. Однако для реальных проб анализ часто требует некоторого методического усложнения, т.к. нативная проба может плохо перемещаться по тест-полоске или препятствовать иммунохимическим взаимодействиям. Так, при тестировании проб молока обычно рекомендуется помещение тест-полосок в термостат с температурой от 45 до 56°C [www.charm.com].

Ранее нами был реализован иммунохроматографический анализ (ИХА) хлорамфеникола [25] и стрептомицина [26] без предобработок и инкубации, что достигалось за счет сочетания параметров антител, коллоидных частиц и мембран.

Цель исследования – разработка и характеристика экспрессного ИХА для ампициллина – представителя широко распространенного класса антибиотиков – β -лактамов.

МЕТОДИКА

При разработке тест-системы были применены моноклональные антитела против β -лактамовных антибиотиков и конъюгат пенициллин – бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы “DCN” (США). Также использовали антитела козы (GAMIss), кролика (RAMIss) и овцы (SAMIss) против IgG мыши и антитела овцы (SARIss) против IgG кролика (“Имтек”, Россия), антитела козы (GAMI) против IgG мыши (“Arista Biologicals”, США), конъюгат антител быка против IgG мыши с пероксидазой (“Медгамал”, Россия), ампициллин, пенициллины G и V, амоксициллин, клоксациллин, хлорамфеникол, стрептомицин, гентамицин, канамицин, тетрациклин, рифампицин, сульфаниламид, трис, Тритон X-100, дигидрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, азид натрия (“Sigma”, США), неомицин, цефалексин, ципрофлоксацин, сульфаквиноксамин, сульфаметоксипиридазин, золотохлористоводородная кислота (“Fluka”, Германия), Твин-20, БСА, цитрат натрия, диметилсульфоксид (ДМСО, “MP Biomedicals”, Великобритания), глицерин, NaCl, K₂CO₃ (“Диаэм”, Россия), Na₂CO₃, NaHCO₃, KH₂PO₄, KOH (“Химмед”, Россия). Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щелочи, органические растворители) были аналитической или химической чистоты.

Растворы для получения коллоидного золота (КЗ) и его конъюгатов готовили на воде, деионизи-

рованной с помощью установки Milli-Q (“Millipore”, США).

Исходные растворы антибиотиков (1–5 мг/мл в 50 мМ цитратном буфере, pH 6.4) готовили в день эксперимента, кроме хлорамфеникола, рифампицина, сульфаниламида и сульфаквиноксамина. Исходные растворы хлорамфеникола в этаноле, рифампицина в ДМСО, сульфаниламида и сульфаквиноксамина в метаноле использовали как свежеприготовленные, так и хранившиеся при 4°C до 1 мес.

ИФА проводили в 96-луночных прозрачных полистироловых микропланшетах Costar 9018 (“Corning Costar”, США). Для изготовления иммунохроматографических тест-полосок использовали мембраны из набора mdi Easypack (“Advanced Microdevices”, Индия), включавшего рабочую мембрану, закрепленную на твердой основе, подложку для коллоидного конъюгата, мембрану для нанесения пробы, конечную адсорбирующую мембрану и защитную ламинирующую пленку.

Конкурентный ИФА ампициллина. Конъюгат пенициллин–БСА в концентрации 2 мкг/мл в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 7.4, с 0.1 М NaCl (ФБС) иммобилизовали из объема 100 мкл в лунках микропланшета в течение ночи при 4°C. Затем четырехкратно отмывали микропланшет ФБС с 0.05% Тритона X-100 (ФБСТ). Далее в лунки микропланшета вносили по 50 мкл раствора ампициллина (интервал концентраций от 1 мкг/мл до 10 пг/мл) в ФБСТ и добавляли по 50 мкл специфических антител в концентрации 0.02 мкг/мл в ФБСТ. Микропланшет инкубировали 1 ч при 37°C, затем четырехкратно отмывали ФБСТ, добавляли в лунки по 100 мкл иммунопероксидазного конъюгата (разведение 1 : 6000 в ФБСТ) и снова инкубировали 1 ч при 37°C. После отмывки (трижды ФБСТ и один раз – дистиллированной водой) определяли пероксидазную активность связавшейся с носителем ферментной метки. Для этого в лунки микропланшета вносили по 100 мкл 0.4 мМ раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в 40 мМ Na-цитратном буфере, pH 4.0, с 3 мМ H₂O₂, инкубировали 15 мин при комнатной температуре, останавливали реакцию добавлением 50 мкл 1 М H₂SO₄ и измеряли D_{450} .

В иммуноферментных экспериментах по характеристике специфичности антител вместо ампициллина использовали пенициллины G и V, амоксициллин и клоксациллин в концентрациях от 10 мкг/мл до 1 нг/мл.

Зависимости оптической плотности (y) от концентрации антигена в пробе (x) аппроксимировали 4-параметрической сигмоидной функцией $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$ с помощью программного обеспечения Origin 7.5 (“OriginLab”, США). Значение параметра C соответствует концентрации антигена, ингибирующей связывание антител на 50%

(IC₅₀). Концентрацию антигена, вызывающую 10%-ное ингибирование (IC₁₀), рассчитывали с использованием той же функции и рассматривали, как предел обнаружения анализа.

Получение КЗ цитратным методом [25, 27]. К 97.5 мл деионизированной воды добавляли 1.0 мл 1%-ного раствора H₂AuCl₄, доводили до кипения и при перемешивании добавляли 1.5 мл 1%-ного раствора цитрата натрия. Смесь кипятили еще 25 мин, затем охлаждали и хранили при 4–6°C.

Просвечивающая электронная микроскопия. Препараты КЗ наносили на сеточки (300 меш., “Pelco International”, США), покрытые пленкой-подложкой из поливинилформала, растворенного в хлороформе. Снимки получали на электронном микроскопе CX-100 (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении 3300000. Фотографии в цифровой форме анализировали в программе Image Tool.

Получение конъюгатов КЗ с антителами. Предварительную характеристику связывания антител с КЗ проводили по рекомендациям [28]. С этой целью к 0.1 мл растворов антител в воде (концентрацию варьировали от 5 до 250 мкг/мл) добавляли по 1.0 мл раствора КЗ ($D_{520} = 1.0$), перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем в каждую пробу добавляли по 0.1 мл 10%-ного NaCl, перемешивали и через 10 мин измеряли D_{580} .

Перед конъюгацией с КЗ антитела диализовали против 1000-кратного объема 10 мМ трис-НСl-буфера, рН 8.5, в течение 2 ч при 4°C. К раствору КЗ ($D_{520} = 1.0$) добавляли 0.2 М K₂CO₃ до достижения рН 8.5 и вносили в раствор антител выбранной концентрации. Смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре и перемешивании, после чего вносили БСА до конечной концентрации 0.25%. Частицы КЗ с иммобилизованными на них антителами отделяли от непрореагировавших антител центрифугированием при 8000 g в течение 30 мин. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в ФБС, содержащем 0.25% БСА. При необходимости длительного хранения к полученному продукту добавляли NaN₃ до конечной концентрации 0.02%.

Изготовление иммунохроматографических тест-систем [25]. Нанесение реагентов на мембраны, входящие в состав тест-системы, проводили с помощью автоматического диспенсера IsoFlow (“Image Technology”, США). Конъюгат КЗ с антителами наносили на подложку в разведении, соответствующем $D_{520} = 2.0$ (32 мкл на 1 см ширины подложки). Для формирования аналитической зоны использовали конъюгат пенициллин–БСА (0.2 мг/мл в 0.2 М карбонатном буфере, рН 9.6), контрольной зоны – антитела козы против IgG мыши (GAM1, 0.25 мг/мл в ФБС). Оба раствора стабилизировали и наносили по 2.0 мкл на 1 см ширины

рабочей мембраны. Полученные подложки и рабочие мембраны сушили на воздухе при 20–22°C не менее 20 ч. Собирали мультимембранный композит, из которого с помощью автоматического гильотинного нарезчика Index Cutter-1 (“A-Point Technologies”, США) получали полоски шириной 3.5 мм. Эти тест-полоски с силикагелем в качестве осушителя герметично упаковывали в пакеты из ламинированной алюминиевой фольги с помощью запаивателя с миниконвейером FR-900 (“Wenzhou dingli packing machinery”, Китай). Нарезку и упаковку проводили при 20–22°C в специальном помещении с относительной влажностью воздуха не более 30%.

Приготовление проб молока-сырья, молочных и кисло-молочных продуктов. Коровье молоко жирностью от 0.5 до 6.0%, кефир жирностью 1.0%, простоквашу жирностью 3.2% и питьевой фругурт жирностью 1.5% покупали в розничной торговой сети; цельное коровье молоко-сырье было предоставлено Е.А. Юровой (ВНИИ молочной промышленности РАСХН). В пробы добавляли разные количества антибиотиков и перемешивали. Пробы готовой молочной и кисло-молочной продукции анализировали иммунохроматографическим методом без пробоподготовки, а цельное молоко-сырье перед тестированием разбавляли дистиллированной водой в соотношении 3 : 1 (об./об.).

ИХА и регистрация его результатов. Анализ проводили при комнатной температуре. Вскрывали пакет, извлекали тест-полоску и в вертикальном положении ее нижний конец погружали на 1 мин в аликвоту пробы (50 мкл), после чего помещали тест-полоску на горизонтальную поверхность. Через 10 мин после начала анализа контролировали результат, получая цифровое изображение тест-полоски на сканере Bear Paw 4800TA pro (“Mustek”, Тайвань) и рассчитывая интегральную интенсивность окрашивания аналитической и контрольной зон, как описано в работе [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика иммунореагентов, используемых в ИХА. Аналитические возможности коммерческих иммунореагентов были предварительно охарактеризованы методом ИФА. Как следует из полученной в оптимизированных условиях градуировочной кривой ИФА (рис. 1), моноклональные антитела в сочетании с конъюгатом гаптен–белок позволяют определять ампициллин в концентрациях вплоть до 0.05 нг/мл. Отметим, однако, что при визуальном контроле результатов конкурентного иммунохроматографического анализа регистрируемое исчезновение окрашивания в аналитической зоне соответствует выходу градуировочной кривой на нижнее, а не на верхнее плато. Применительно к микропланшетному ИФА данный эффект достигался при концентрации ампициллина, равной 10 нг/мл. Эта величина соответ-

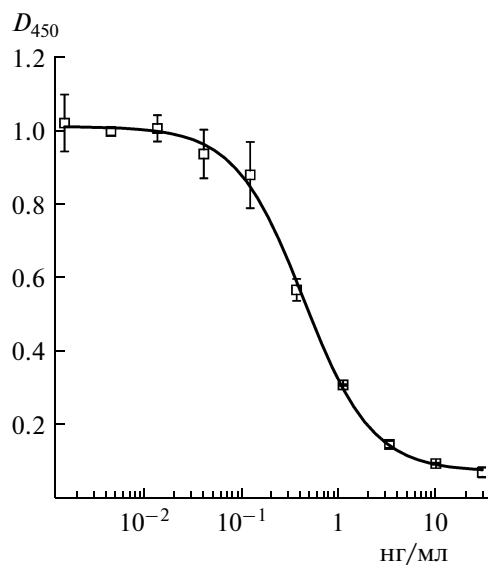


Рис. 1. Определение ампициллина в буфере методом конкурентного ИФА. Параметры аппроксимирующей кривой: $A = 1.00996$; $D = 0.07089$; $C = 0.43601$; $B = 1.23197$.

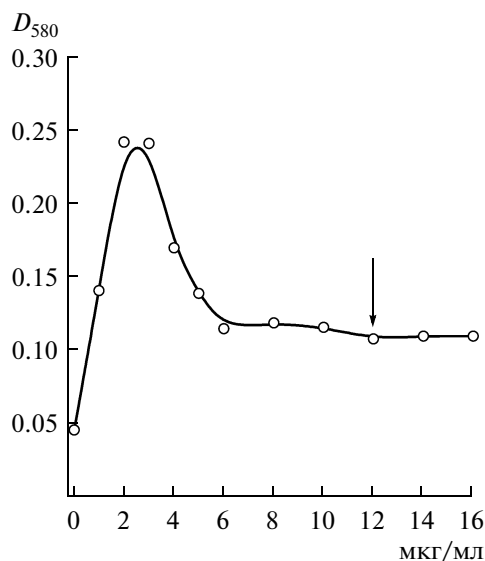


Рис. 2. Определение концентрации (мкг/мл) специфических антител, используемой для конъюгации с КЗ. Нулевой уровень D_{580} соответствует раствору КЗ без антител и без добавления 10%-ного NaCl. Выбранная концентрация антител (12 мкг/мл) отмечена стрелкой.

стует предельно допустимому содержанию ампициллина в молоке и молочных продуктах [СанПиН 2.3.2.1078–01] и позволяет рекомендовать реагенты для разработки экспрессных аналитических систем. Действительно, в наших предыдущих экспериментах порог распознавания положительных и отрицательных образцов в иммунохроматографии и выход градуировочной кривой ИФА на нижнее плато соответствовали практически равным концентрациям определяемого соединения [30].

Антитела характеризовались специфичностью к ампициллину (100%) и цефалексину (150%) и низкой перекрестной реактивностью по отношению к другим бета-лактамам: пенициллин G – 0.05%, пенициллин V – 0.04%, амоксициллин – 0.07%, клоксациллин – 0.03%.

КЗ получали по методу Френса [27]. Электронная микроскопия показала высокую степень однородности частиц по размерным характеристикам [25]. Среднее значение максимальной оси составило 37 ± 8 нм, минимальной оси – 30 ± 5 нм. Таким образом, частицы характеризовались средним диаметром 34 нм, что соответствует общепринятым рекомендациям по оптимальному размеру КЗ для иммунохроматографии – 30–40 нм [31]. Для полученных частиц адсорбционная иммобилизация позволила сформировать монослой, содержащий до 180 молекул антител на одну частицу коллоидного золота (предположительно средняя площадь контакта равна 20 нм^2).

Выбор условий конъюгирования антител с КЗ проводили на основании фотометрических данных,

отражающих агрегацию продукта данной реакции при высокой ионной силе раствора. Полученная концентрационная зависимость (рис. 2) характеризуется ростом оптической плотности до 2.5 мкг/мл, резким спадом до 6 мкг/мл и последующим медленным спадом с выходом на плато до 12 мкг/мл. Отметим, что при концентрации антител, равной 6 мкг/мл, мольное соотношение антитела–КЗ составляет 190 : 1, т.е. практически совпадает с теоретическим пределом насыщения поверхности частиц при монослойной иммобилизации антител. Для конъюгирования выбирали, как рекомендовано в [28], концентрацию антител, на 10–15% превосходящую точку выхода D_{580} на плато, что позволяло стабилизировать поверхность коллоидной частицы антителами и предотвратить формирование агрегатов. Таким образом, при синтезе использовали антитела в концентрации 12 мкг/мл. Избыток непрореагировавших антител удаляли на стадии осаждения конъюгата.

Разработка конкурентного ИХА ампициллина. Прежде всего нами была проверена способность синтезированного конъюгата КЗ–антитела к взаимодействию в контрольной и аналитической зонах тест-полоски и выбраны оптимальные реагенты для нанесения в эти зоны.

Серия препаратов антител против IgG мыши была сопоставлена по связыванию конъюгата КЗ–антитела в ходе иммунохроматографии. При насыщающих концентрациях интенсивность окраски контрольной линии составляла для козьих антител 115 отн. ед. (GAMIss) и 133 отн. ед. (GAMI), для кроличьих антител (RAMIss) – 80 отн. ед. и для ове-

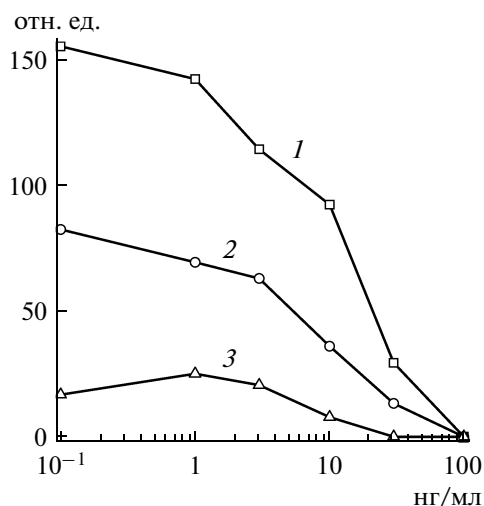


Рис. 3. Зависимость градуировочной кривой ИХА ампициллина от вида буфера, используемого при иммобилизации конъюгата пенициллин–БСА в аналитической зоне тест-полоски: 1 – 0.2 М карбонатный буфер, pH 9.6; 2 – 50 мМ фосфатный буфер, pH 7.4, с 0.1 М NaCl; 3 – 0.1 М цитратный буфер, pH 6.4.

чьих антител (SAMIss) – 95 отн. ед. Хотя отличия не очень велики, для дальнейшего использования в анализе были выбраны козы антитела GAM1 фирмы “Arista Biologicals”, обеспечивающие максимальное связывание коллоидного маркера. Оптимальная концентрация антивидовых антител при иммобилизации в контрольной зоне составила 0.25 мг/мл, соответствуя выходу на плато концентрационной зависимости связывания коллоидного конъюгата.

Для формирования аналитической зоны тест-полоски был использован конъюгат пенициллин–БСА. На первом этапе выбирали буфер, в котором конъюгат наносили в аналитическую зону. Как видно из рис. 3, интенсивности окрашивания аналитической зоны в отсутствие аналита в пробе и при насыщающей (0.5 мг/мл) концентрации конъюгата пенициллин–БСА значительно отличались: 155 отн. ед. при иммобилизации из карбонатного буфера, pH 9.6, 83 отн. ед. – из ФБС, pH 7.4 и 17 отн. ед. – из цитратного буфера, pH 6.4. Очевидно преимущество карбонатного буфера, который и был использован в дальнейшем при изготовлении тест-полосок.

Исходя из данных наших предшествующих работ [25, 26, 30], конъюгат КЗ–антитела наносили из раствора, концентрация которого соответствовала $D_{520} = 2.0$, что обеспечивало формирование интенсивно окрашенных зон в ходе анализа в сочетании с полной вымывания реагента из стартовой зоны и отсутствием неспецифического окрашивания рабочей мембраны.

Для производительного иммунохроматографического тестирования важно, чтобы изменение ка-

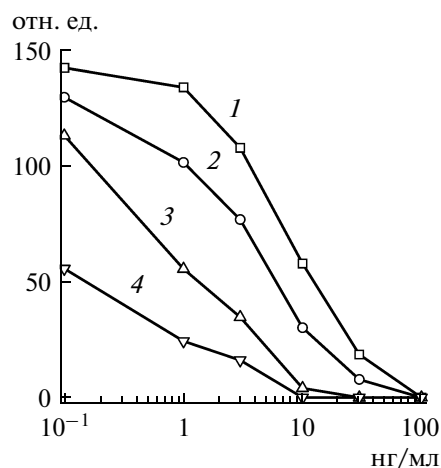


Рис. 4. Зависимость градуировочной кривой ИХА ампициллина от концентрации конъюгата пенициллин–БСА, используемой при его нанесении в аналитическую зону тест-полоски: 1–4 – концентрации раствора конъюгата пенициллин–БСА, 0.4, 0.3, 0.2 и 0.1 мг/мл соответственно.

чественного результата анализа (исчезновение окрашивания в аналитической зоне) строго соответствовало установленному контролируемому уровню содержания соединения (его предельно допустимой концентрации) и не требовало, таким образом, дополнительного разведения пробы перед тестированием в определенное число раз или ее концентрирования. Трудоемкое решение этой задачи состоит в скрининге большого числа антител, отличающихся по аффинности, что не всегда возможно. Для регулирования порога различения положительных и отрицательных проб было использовано изменение концентрации конъюгата гаптен–белок (пенициллин–БСА) при иммобилизации.

На рис. 4 представлены полученные зависимости интенсивности окраски аналитической зоны от содержания ампициллина в пробе при разных концентрациях конъюгата пенициллин–БСА. Как видим, уменьшение концентрации конъюгата при иммобилизации от 0.4 до 0.2 мг/мл позволило в 10 раз снизить предел обнаружения ампициллина (от 100 до 10 нг/мл). Дальнейшее уменьшение концентрации конъюгата пенициллин–БСА до 0.1 мг/мл приводило к существенному (в 2.5 раза) снижению амплитуды градуировочной кривой ИХА. Поэтому для иммобилизации была выбрана концентрация конъюгата пенициллин–БСА, равная 0.2 мг/мл, что обеспечивало необходимый порог детекции (10 нг/мл в соответствии с [СанПиН 2.3.2.1078–01]) при достаточной интенсивности окрашивания аналитической зоны и низком расходе реагента.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности при оптимизации иммунохроматогра-

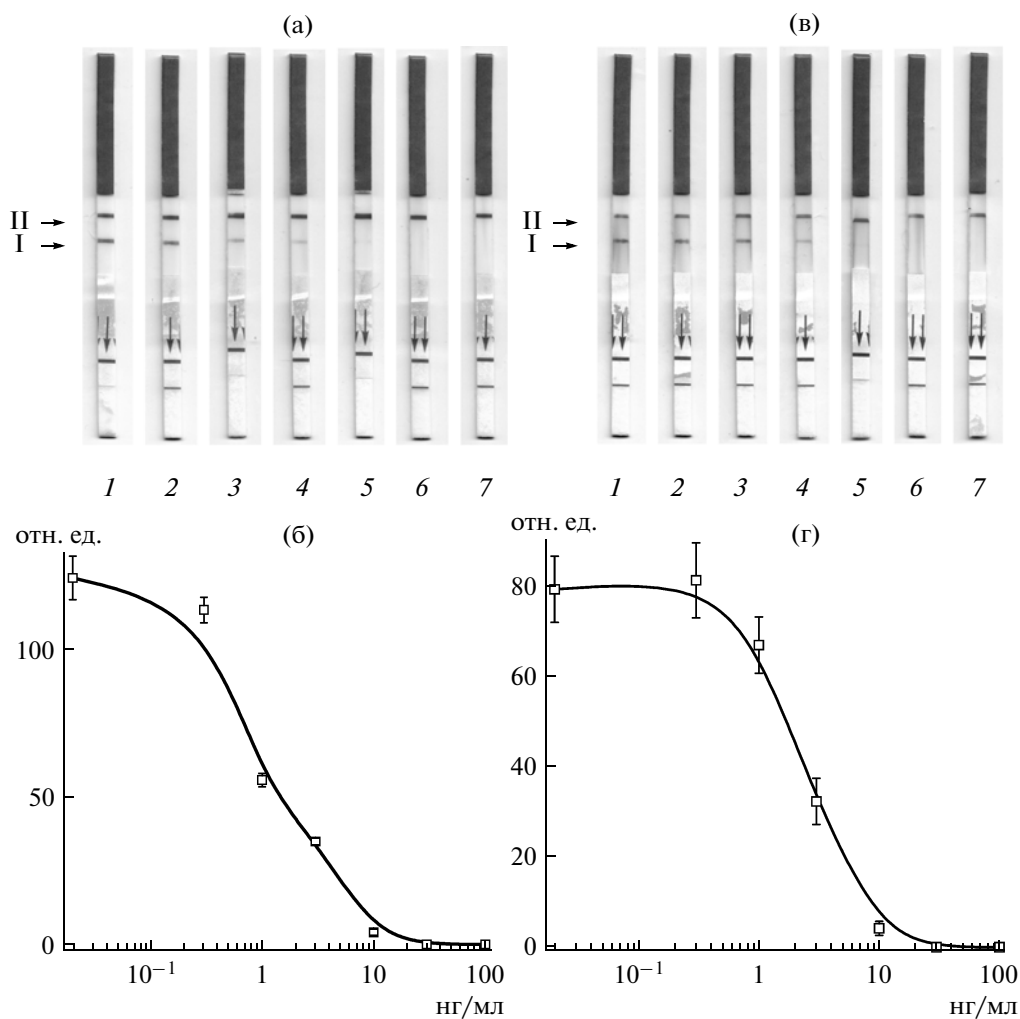


Рис. 5. Иммунохроматографическое определение ампициллина в буфере (а, б) и молоке жирностью 3.5% (в, г): а, в — внешний вид тест-полосок после проведения анализа (I — аналитическая зона, II — контрольная зона); 1–7 — концентрации ампициллина 0, 0.3, 1, 3, 10, 30 и 100 нг/мл соответственно; б, г — зависимость интенсивности окраски в аналитической зоне (отн. ед.) от концентрации ампициллина (нг/мл).

фической тест-системы на порядок сдвинуть порог различения положительных и отрицательных проб с минимальными потерями в амплитуде сигнала (и соответственно — в точности и достоверности измерений).

Характеристика разработанной иммунохроматографической тест-системы. На основе результатов оптимизации были изготовлены тест-полоски и проведены эксперименты по иммунохроматографическому контролю наличия ампициллина в стандартных растворах, молочных и кисло-молочных продуктах.

На рис. 5 представлены результаты анализа проб (ФБС и молоко жирностью 3.5%) с разной концентрацией ампициллина. При проведении ИХА исчезновение окраски в аналитической зоне соответствовало превышению предельно допустимого содержания ампициллина (10 нг/мл) в тестируемой пробе. Точность определения составляла 10%.

Через 5 мин после начала движения фронта жидкости (молока) интенсивность окрашивания аналитической зоны составляла 50% от максимума, через 7 мин — 70%, а через 10 мин — 85% (рис. 6). С учетом этого рекомендуемая продолжительность анализа равняется 10 мин.

В иммунохроматографической системе не наблюдалось перекрестных реакций с антибиотиками других групп (хлорамфеникол, стрептомицин, тетрациклин, гентамицин, неомицин, канамицин, ципрофлоксацин, рифампицин) и бактериостатиками (сульфаметоксипиридазин, сульфаниламид, сульфаквиноксамин) в концентрациях до 10 мкг/мл.

Разработанная тест-система была применена для анализа цельного молока-сырья, молочных (жирностью от 0.5 до 6.0%) и кисло-молочных продуктов (кефира жирностью 1%, простокваши жирностью 3.2% и питьевого фругурта жирностью 1.5%). Полученные результаты представлены на

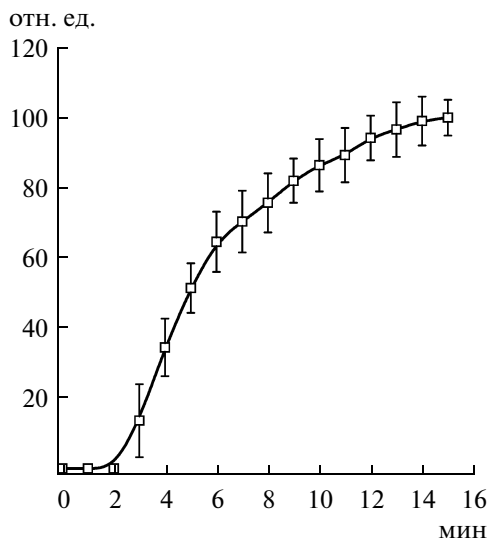


Рис. 6. Динамика окрашивания аналитической зоны в иммунохроматографической системе определения ампициллина в молоке жирностью 1.5% в отсутствие аналита.

рис. 7. Для всех испытанных проб показана возможность надежного обнаружения ампициллина с той же минимальной выявляемой концентрацией, как и в буфере — 10 нг/мл.

Отметим, что при иммунохроматографическом тестировании цельного молока-сырья уровень жидкости не поднимался вдоль тест-полоски до конца рабочей мембраны, что не позволило провести достоверную оценку результатов анализа. Предварительное разведение пробы дистиллированной водой в соотношении 3 : 1 (об./об.) исключало эти

проблемы (рис. 8), незначительно влияя на сложность и трудоемкость анализа в целом. При этом окрашивание в аналитической зоне наблюдалось для концентраций ампициллина в разбавленной пробе менее 10 нг/мл (в исходной пробе — менее 13.3 нг/мл).

Важным достоинством предложенного метода является возможность его реализации при комнатной температуре. Доступные в настоящее время мембранные тесты для определения ампициллина требуют предварительной инкубации при повышенной температуре либо образцов молока со специальными рецепторами (Twinsensor BT, “Twinsensor”, Бельгия; Beta star, “USB-Bioproductions”, США; SNAP, “IDEXX”, США), либо тест-полосок с наносенсорной пробой молока (Charm SL Beta-lactam Test, “Charm”, США). Ряд иммунохроматографических тестов для определения β -лактамных антибиотиков, таких, как PENs-204R4 (“NKVIO”, Китай), Penicillin G Rapid Test (“Quicking Biotech”, Китай), предусматривают предварительную многоступенчатую подготовку проб молока. В отличие от вышеперечисленных тестов анализ молока с помощью разработанной тест-системы может проводиться при комнатной температуре и без пробоподготовки. Важным преимуществом тест-систем является также их пригодность для контроля безопасности кисломолочных продуктов, так как для них предусмотрены те же пороговые уровни контаминации, а пригодность для этих целей коммерчески доступных тест-систем не охарактеризована.

Результаты анализа можно контролировать визуально или с использованием портативного фотометрического детектора с программным обеспечением [32]. Скорость определения и методическая

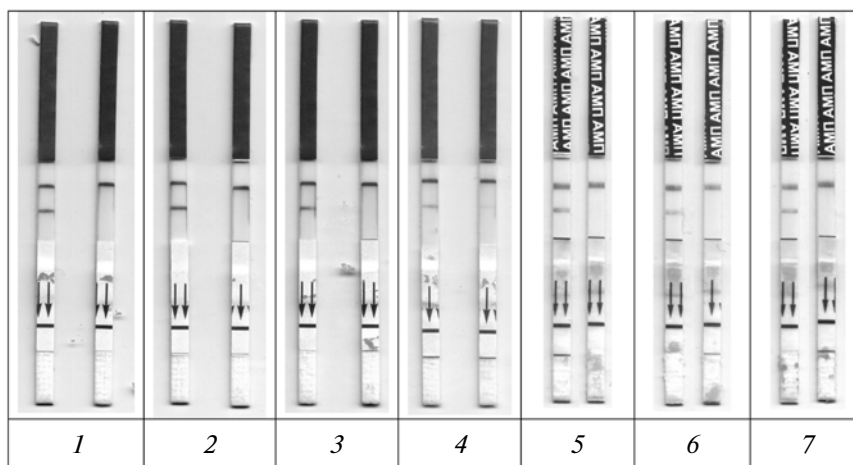


Рис. 7. Иммунохроматографическое определение ампициллина в молоке-сырье, молочных и кисломолочных продуктах: 1 — молоко-продукт жирностью 0.5%; 2 — молоко-продукт жирностью 3.2%; 3 — молоко-продукт жирностью 6.0%; 4 — цельное молоко-сырье, разбавленное перед тестированием дистиллированной водой в соотношении (об./об.) 3 : 1; 5 — кефир жирностью 1.0%; 6 — простокваша жирностью 3.2%; 7 — питьевой фругурт жирностью 1.5%. Левая тест-полоска для каждого матрикса соответствует отсутствию ампициллина в пробе, правая — присутствию ампициллина в концентрации 10 нг/мл.

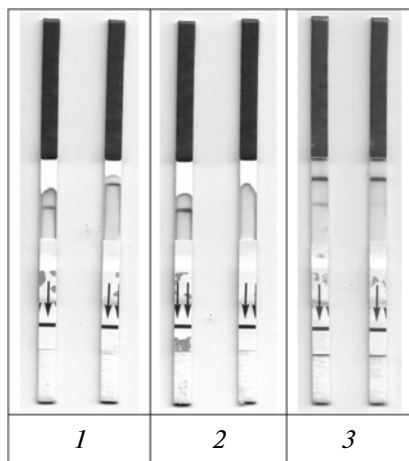


Рис. 8. Иммунохроматографическое определение ампициллина в цельном молоке-сырье (пробы 1 и 2) и молоке-сырье (проба 3), разбавленном перед тестированием дистиллированной водой в соотношении 3 : 1 (об./об.). Левая тест-полоска для каждой пробы соответствует отсутствию ампициллина, правая – присутствию ампициллина в концентрации 10 нг/мл.

простота позволяют рассматривать разработанную тест-систему как эффективное средство для массового скрининга молока-сырья, молочной и кисломолочной продукции на содержание ампициллина.

Авторы выражают признательность И.В. Сафенковой (Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН) за проведение электронно-микроскопических исследований препарата КЗ.

Работа выполнена при поддержке государственными контрактами № 02.740.11.0868 от 28.06.2010, № 14.740.11.0615 от 05.10.2010 и № 16.512.11.2125 от 25.02.2011, грантами РФФИ 09-08-01209, 11-04-91189 и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 8 “Создание и совершенствование методов химического анализа и исследования структуры веществ и материалов”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bennish M.L. // Adv. Pediatr. Infect. Dis. 1999. V. 14. P. 269–290.
- Schwarz S., Kehrenberg C., Walsh T.R. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2001. V. 17. № 6. P. 431–437.
- Hardy B. // Animal Biotechnol. 2002. V. 13. № 1. P. 129–147.
- Chafer-Pericas C., Maquieira A., Puchades R. // Trends Anal. Chem. 2010. V. 29. № 9. P. 1038–1049.
- Kantiani L., Farre M., Barcelo D. // Trends Anal. Chem. 2009. V. 28. № 6. P. 729–744.
- Sierra D., Sanchez A., Contreras A., Luengo C., Corrales J.C., Morales C.T., de la Fe C., Guirao I., Gonzalo C. // J. Dairy Sci. 2009. V. 92. № 8. P. 3585–3591.
- Petrović J., Katić V., Bugarski D. // Food Anal. Methods. 2008. V. 1. № 2. P. 119–125.
- Comunian R., Paba A., Dupre I., Daga E.S., Scintu M.F. // J. Dairy Sci. 2010. V. 93. № 12. P. 5644–5650.
- Althaus R., Berruga M.I., Montero A., Roca M., Molina M.P. // Anal. Chem. Acta. 2009. V. 632. № 1. P. 156–162.
- Garcia-Campana A.M., Gamiz-Gracia L., Lara F.J., del Olmo Iruela M., Cruces-Blanco C. // Anal. Bioanal. Chem. 2009. V. 395. № 4. P. 967–986.
- Bailon-Perez M.I., Garcia-Campana A.M., del Olmo Iruela M., Gamiz-Gracia L., Cruces-Blanco C. // J. Chromatogr. A. 2009. V. 1216. № 47. P. 8355–8361.
- Fagerquist C.K., Lightfield A.R., Lehotay S.J. // Anal. Chem. 2005. V. 77. № 5. P. 1473–1482.
- Holstege D.M., Puschner B., Whitehead G., Galey F.D. // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. № 2. P. 406–411.
- Дзантиев Б.Б., Жердев А.В. // Биохимические методы анализа. М.: Наука, 2010. С. 303–332.
- Marquette C.A., Blum L.J. // Biosens. Bioelectron. 2006. V. 21. № 8. P. 1424–1433.
- Wu A.H. // Clin. Chim. Acta. 2006. V. 369. № 2. P. 119–124.
- Martlbauer E., Usleber E., Schneider E., Dietrich R. // Analyst. 1994. V. 119. № 12. P. 2543–2548.
- Kress C., Schneider E., Usleber E. // Small Ruminant Research. 2011. V. 96. № 2–3. P. 160–164.
- Самсонова Ж.В., Щелокова О.С., Иванова Н.Л., Рубцова М.Ю., Егоров А.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 6. С. 668–675.
- Fitzgerald S.P., O’Loan N., McConnell R.I., Benchikh el O., Kane N.E. // J. AOAC Int. 2007. V. 90. № 1. P. 334–342.
- Ricci F., Volpe G., Micheli L., Palleschi G. // Anal. Chim. Acta. 2007. V. 605. № 2. P. 111–129.
- Chan C.P., Cheung Y.C., Renneberg R., Seydack M. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2008. V. 109. P. 123–154.
- Posthuma-Trumpie G.A., Korf J., van Amerongen A. // Anal. Bioanal. Chem. 2009. V. 393. № 2. P. 569–582.
- Wong R.C., Tse H.Y. Lateral Flow Immunoassay. N.Y.: Humana Press, 2009. 224 p.
- Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B. // Talanta. 2010. V. 81. № 3. P. 843–848.
- Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Sveshnikov P.G., Dzantiev B.B. // Anal. Chem. Acta. 2011. doi:10.1016/j.aca.2011.06.001.
- Frens G. // Nat. Phys. Sci. 1973. V. 241. P. 20–22.
- Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques // Amsterdam: Acad. Press, Elsevier, 2008. 900 p.
- Бызова Н.А., Сафенкова И.В., Чирков С.Н., Авдиенко В.Г., Гусева А.Н., Митрофанова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б., Атабеков И.Г. // Биохимия. 2010. Т. 75. № 11. С. 1583–1595.
- Byzova N.A., Zherdev A.V., Zvereva E.A., Dzantiev B.B. // J. AOAC Int. 2010. V. 93. № 1. P. 36–43.
- Chandler J., Gurmin T., Robinson N. // IVD Technology. 2000. V. 6. № 2. P. 37–49.
- Дзантиев Б.Б., Жердев А.В., Попов В.О., Венгеров Ю.Ю., Старовойтова Т.А., Тогузов П.Т. // Клин. лаб. диагностика. 2002. Т. 8. С. 25–31.

Immunochromatographic Technique for Express Determination of Ampicillin in Milk and Dairy Products

N. A. Byzova, E. A. Zvereva, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev

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

e-mail: nbyzova@inbi.ras.ru

Received May 16, 2011

Abstract—An immunochromatographic method for determination of β -lactam antibiotic ampicillin has been developed. The method is based on the competitive interaction between antibiotic molecules contained in the sample and protein conjugate of penicillin immobilized on a membrane for binding with specific antibodies labeled with colloidal gold, which occurs during movement of the sample to be tested and reagents along the membrane. The completion of the test system ensures control of exceeding the maximum permissible content of the antibiotic in milk and dairy products (10 ng/ml). The possibility of testing milk, raw milk, and dairy products for 10 minutes at room temperature without sample preparation has been demonstrated.

УДК 541.135.541.64

МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННЫЕ ГИДРОФИЛЬНЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ СОРБЦИИ ЭРИТРОМИЦИНА

© 2011 г. Н. М. Ежова, И. С. Гаркушина, О. А. Писарев

Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, 199004

e-mail: pisarev@imc.macro.ru

Поступила в редакцию 23.03.2011 г.

Методом молекулярного импринтинга синтезированы новые гидрофильные полимерные сорбенты, несущие сайты, комплементарные молекуле антибактериального антибиотика эритромицина. Для сравнительного изучения сорбционных свойств синтезирована серия аналогичных по структуре сорбентов, не несущих импринт-сайтов. На обоих типах синтезированных полимерных сорбентов изучена сорбция эритромицина в широком диапазоне значений pH и ионной силы. Показано, что избирательность сорбции эритромицина на молекулярно импринтированных сетчатых полимерах обусловлена вкладом специфичного взаимодействия целевой молекулы с матрицей сорбента. Данный тип сорбента перспективен для разработки очистки антибиотика непосредственно из культуральной среды *Saccharopolyspora erythreus*.

В последнее десятилетие широко распространенным подходом к одному из важнейших направлений биотехнологии — выделению и очистке сложных по химическому строению и обладающих высокой структурной лабильностью биологически активных веществ, является использование высокоспецифичных полимерных сорбентов, предназначенных для селективной сорбции целевого объекта из многокомпонентных биологических жидкостей [1]. Современным подходом к получению селективных сорбентов является метод молекулярного импринтинга. Метод молекулярного импринтинга заключается в синтезе полимерной матрицы в присутствии целевой молекулы, которая играет роль молекулы-шаблона. После удаления такой молекулы из сетчатого полимера в структуре матрицы образуются сайты, комплементарные целевой молекуле по расположению сорбционных центров [2–4].

Ранее были синтезированы “настроенные” на молекулу эритромицина карбоксильные катиониты, имеющие в своей структуре как участки, комплементарные по отношению к молекуле антибиотика, так и свободные карбоксильные группы [5, 6]. К недостаткам такого синтеза можно отнести как наличие импринт-сайтов, так и ионогенных групп, способных к взаимодействию с другими веществами культуральной среды, что снижало селективность данного типа сорбентов.

Цель работы — получение и изучение свойств молекулярно-импринтированных полимерных сорбентов, которые содержат только сорбционные центры, настроенные на молекулу эритромицина, а также могут быть использованы в динамическом колонном режиме для создания процесса выделе-

ния и очистки антибиотика непосредственно из культуральной среды *Saccharopolyspora erythreus*. Такие сетчатые сорбенты представляют полимерную модель биологического рецептора эритромицина.

МЕТОДИКА

В качестве неионогенного сомономера для синтеза сетчатых полимеров в работе использовали 2-гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА, “Acros Organics”, США). Сшивающим агентом служил диметакрилат этиленгликоля (ДМЭГ) той же фирмы.

Контрольные полимеры (КП), так же, как и молекулярно-импринтированные полимеры (МИП), синтезировали путем трехмерной осадительной сополимеризации с той лишь разницей, что синтез неимпринтированных КП проводили в отсутствие молекулы метакрилата эритромицина (МЭ). Вместо нее в полимеризационную смесь вводили метакриловую кислоту (МАК) в той же пропорции по отношению к остальным мономерам, что и МЭ. В результате после удаления эритромицина из импринтированного полимера сохранялся одинаковый химический состав КП и МИП. МЭ был получен из эритромицина—основания (ОАО “Биосинтез”, г. Курган, Россия) [5].

Таким образом, МИП представляли собой сополимеры ГЭМА, МЭ и ДМЭГ, из которых после окончания синтеза удаляли эритромицин. КП являлись сополимерами ГЭМА, МАК и ДМЭГ.

При синтезе полимерных сорбентов в качестве растворителя использовали 45%-ный водный раствор изопропилового спирта. Инициатором радикальной сополимеризации служила окислительно-восстановительная система персульфат аммония—

Таблица 1. Оптимизация условий синтеза импринтированных сополимеров (содержание МЭ в полимеризационной смеси – 6 мол. %)

№ п/п	ГЭМА, мол. %	ДМЭГ, мол. %	Выход, %	Насыпная плотность, г/мл	$K_{\text{наб.}}$ в воде	$K_{\text{наб.}}$ в 50%-ном ИП
1	74	20	65	0.73	2.8	8.9
2	69	25	70	0.72	4.0	6.2
3	64	30	75	0.68	6.0	10.5
4	54	40	20	0.19	2.0	2.5

аскорбиновая кислота (1.0% от массы мономеров). Синтезированные сополимеры прогревали на кипящей водяной бане в течение 1 ч, отмывали от непрореагировавших сомономеров, сушили, измельчали в фарфоровой ступке и фракционировали с помощью набора сит. В экспериментах использовали фракцию размером 100–200 мкм.

Физико-химические характеристики сорбентов определяли по методикам, которые описаны в [6–8]. Особое внимание было уделено полноте удаления эритромицина из импринтированных сополимеров. Полное удаление антибиотика было достигнуто путем экстракции сополимеров этанолом в аппарате Сокслета. Процесс продолжался до полного отсутствия антибиотика в пробе. О наличии эритромицина–основания в спиртовой пробе судили по окраске индикатора метилрота, при отсутствии в пробе основания она не изменялась.

Эксперименты по изучению равновесной сорбции проводили в среде Na-ацетатного буфера в широком диапазоне значений pH и ионной силы. Концентрацию антибиотика в водном растворе определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм по предварительно построенным калибровочным кривым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез гетеросетчатых биосорбентов наиболее эффективен при применении растворителей, хорошо сольватирующих образующиеся микрозаготовки сетчатого полимера [1, 9]. Поэтому при разработке условий синтеза таких сорбентов особенно важен выбор исходных мономеров и кросс-агента, а также растворителя. Для эритромицина наибольший интерес представляет ГЭМА. Сополимеризация ГЭМА с ДМЭГ позволяет получить гидрофильную и в то же время не содержащую ионогенных функциональных групп матрицу сорбента. Наиболее подходящим растворителем для этой пары мономер–кросс-агент являются водно-спиртовые смеси на основе изопропилового или n-пропилового спиртов.

Изучена радикальная сополимеризация ГЭМА с ДМЭГ, а также ГЭМА, ДМЭГ и МЭ в различных растворителях при разных мольных соотношениях и различной концентрации мономеров в раствори-

теле. Установлено, что наиболее подходящим растворителем, позволяющим варьировать мольные соотношения компонентов мономерной смеси в широком диапазоне, являлся 50%-ный водный раствор изопропанола (ИП). При концентрации мономеров в этом растворителе, равной 20 мол. %, удалось ввести в мономерную смесь максимальное количество эритромицина–шаблона (вплоть до 15 мол. %).

Изучение влияния содержания сшивающего агента на свойства образующихся сетчатых сополимеров было проведено при вышеуказанных условиях при содержании МЭ – 6 мол. %. Как видно из полученных данных (табл. 1), увеличение содержания в полимеризационной смеси кросс-агента ДМЭГ до 40 мол. % приводило к образованию сетчатого полимера с низкой насыпной плотностью. Это исключало его применение в колоночном процессе. В диапазоне 20–30 мол. % ДМЭГ наиболее структурно устойчивым, то есть обладающим наименьшим различием при набухании в воде и 50%-ном водном ИП, являлся сорбент, содержащий 25 мол. % ДМЭГ.

Таким образом, были найдены оптимальные условия синтеза новых гидрофильных сетчатых полиэлектролитов импринтированных молекулами эритромицина (20%-ная концентрация мономеров в 50%-ном водном растворе ИП и 25 мол. % ДМЭГ в качестве кросс-агента).

В этих условиях были получены две серии сорбентов: КП – в отсутствие эритромицина в полимеризационной смеси и МИП, которые были синтезированы в присутствии шаблона-антибиотика и “настроены” на селективную сорбцию антибиотика.

Из анализа данных, приведенных в табл. 2, видно, что синтез КП, то есть сополимеризация МАК, ГЭМА и ДМЭГ в найденных нами условиях, протекала с практически количественным выходом. Соответствие полной обменной емкости, найденной путем потенциометрического титрования карбоксильных групп, теоретически вычисленным значениям также указывало на полноту вхождения мономеров.

При синтезе МИП (табл. 3) наблюдали уменьшение выхода сополимеров с увеличением количества эритромицина–шаблона, а также различие найденных и вычисленных значений полной обменной ем-

Таблица 2. Сополимеризация МАК с ГЭМА и 25 мол. % ДМЭГ (КП)

№ п/п	МАК, мол. %	ГЭМА, мол. %	Выход, %	ρ , г/см ³	ПОЕ, мг-экв/г	
					вычислено	найдено
1	3	72	99	0.75	0.21	0.21
2	6	69	99	0.76	0.42	0.41
3	9	66	99	0.76	0.63	0.61
4	12	63	98	0.74	0.85	0.84
5	15	60	98	0.74	1.07	1.04

Таблица 3. Сополимеризация МЭ с ГЭМА и 25 мол. % ДМЭГ (МИП)

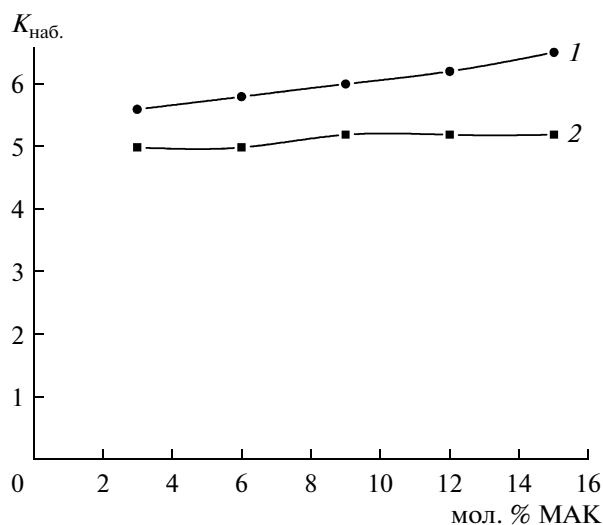
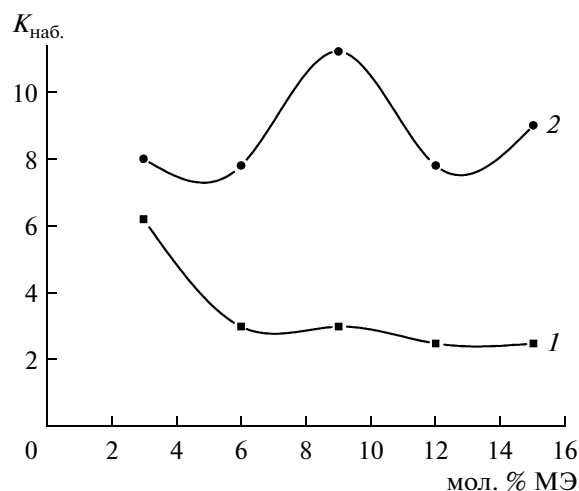
№ п/п	МЭ, мол. %	ГЭМА, мол. %	Выход, %	ρ , г/см ³	ПОЕ, мг-экв/г	
					вычислено	найдено
1	3	72	93	0.75	0.21	0.28
2	6	69	70	0.77	0.42	0.50
3	9	66	53	0.75	0.63	0.62
4	12	63	53	0.76	0.85	0.78
5	15	60	42	0.76	1.07	0.87

кости. Вместе с тем обе реакционные серии привели к синтезу сорбентов, обладающих примерно одинаковой насыпной плотностью, что существенно при использовании их в колоночном процессе.

Как видно из рис. 1 и 2, наибольшие различия в структуре КП и МИП были обнаружены при изучении набухания полимерных сорбентов в воде и 50%-ном водном ИП. КП обладали гидрофильной природой наряду с высокой структурной устойчивостью. Величины коэффициентов набухания находились в диапазоне 5.0–6.5, что согласовывалось

с исходной концентрацией мономеров в растворителе (рис. 1). Коэффициенты набухания КП практически не зависели от процентного содержания МАК, что позволило предположить незначительные различия в пористости для всех пяти образцов данной серии. Это дало возможность использовать только один из них (КП-9) для исследования основных сорбционных свойств всей реакционной серии и сравнения КП с МИП.

При переходе к МИП наблюдали значительные изменения в величинах коэффициентов набухания

**Рис. 1.** Зависимость набухания КП от концентрации МАК (мол. %) в воде (1) и 50%-ном водном ИП (2).**Рис. 2.** Зависимость набухания МИП от концентрации МЭ (мол. %) в воде (1) и 50%-ном водном ИП (2).

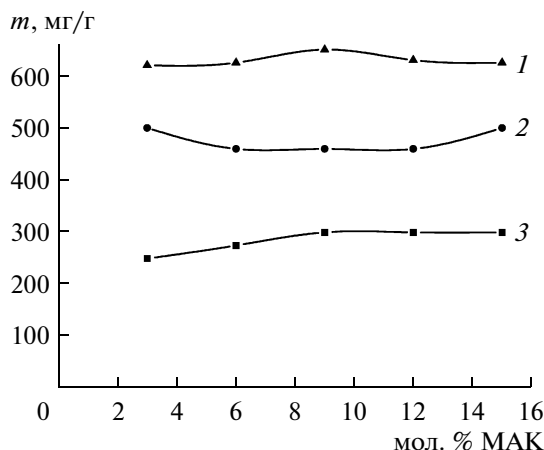


Рис. 3. Зависимость емкости сорбции эритромицина на КП от концентрации МАК (мол. %). $C_{исх} = 2$ мг/мл; pH 4.0. Измерения проводили при различной ионной силе сорбционного раствора: 0.05 (1), 0.1 (2), 0.2 (3).

по мере увеличения количества МЭ в полимеризационной смеси (рис. 2). Снижение величин коэффициентов набухания МИП в воде по мере увеличения количества МЭ можно объяснить окклюзией все большего количества гидроксильных групп ГЭМА вокруг гидрофобной части молекулы-шаблона. Значительное увеличение набухания в исходном растворителе (50%-ный водный ИП), то есть в том, в котором данная сетка была сформирована, однозначно свидетельствует об образовании значительных пустот, оставшихся после удаления молекулы-шаблона.

Изучение равновесной сорбции эритромицина на КП и МИП проводили в Na-ацетатном буфере при различной ионной силе (рис. 3 и 4). Ранее было установлено, что зависимость емкости сорбции данного антибиотика от pH внешнего раствора носит экстремальный характер, причем максимальная сорбция наблюдалась в диапазоне значений 4.0–5.0 [6].

Зависимость сорбционной емкости эритромицина от содержания МАК на КП исследовали при pH 4.0. Как видно из рис. 3, этот параметр незначительно зависел от содержания МАК, но заметно зависел от ионной силы внешнего раствора. При увеличении ионной силы от 0.05 до 0.2 н. значения сорбционной емкости антибиотика уменьшались в 2.5 раза.

В аналогичных условиях изучали зависимость сорбционной емкости эритромицина от содержания МЭ на МИП (рис. 4). При анализе данных видно, что ионная сила внешнего раствора мало влияла на величину сорбционной емкости МИП. Ранее аналогичный характер этих зависимостей выявлен для МИП, импринтированных молекулами лизина [9]. Это явление связано с возникновением специ-

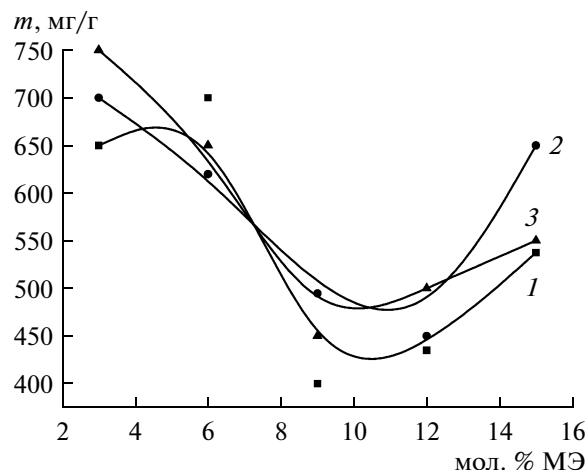


Рис. 4. Зависимость емкости сорбции эритромицина на МИП от концентрации МЭ (мол. %). $C_{исх} = 2$ мг/мл; pH 4.0. Измерения проводили при различной ионной силе сорбционного раствора: 0.05 (1), 0.1 (2), 0.2 (3).

фичных гидрофобных взаимодействий молекулы шаблона с МИП, когда молекуле термодинамически “выгодно” занять комплементарные пустоты вне зависимости от степени диссоциации сорбента и целевого объекта.

На величину сорбционной емкости заметно влияло лишь количество целевых молекул в полимеризационной смеси — максимальные величины наблюдались при 3 и 15 мол. % МЭ. При содержании 3 мол. % МЭ наблюдалось максимальное набухание сорбентов в воде (рис. 2), затем набухание по мере увеличения содержания МЭ снижалось, а количество импринт-сайтов увеличивалось. Эти два фактора, по всей видимости, формировали вид зависимости (рис. 4) с минимальными значениями сорбционных емкостей для сорбентов МИП-9 и МИП-12 (сорбентов, синтезированных в присутствии 9 и 12 мол. % МЭ соответственно).

Таким образом, разработаны методы синтеза и изучены свойства новых гидрофильных полимерных сорбентов, содержащих импринт-сайты антибиотика — макролида эритромицина. Сравнительное изучение сорбции антибиотика на ненастроенных и молекулярно импринтированных сорбентах показало различный характер межмолекулярного взаимодействия целевой молекулы с сорбционными центрами МИП и КП. По сравнению с ненастроенными сорбентами МИП сорбируют эритромицин с большей емкостью и избирательностью сорбции, причем межмолекулярное взаимодействие антибиотика с МИП практически не зависело от ионной силы внешнего раствора. Так как содержание минеральных солей в культуральной среде *Saccharopolyspora erythraeus* зависит от условий культивирования и изменяется в широких пределах, то это обстоятельство является чрезвычайно полез-

ным для реализации одноактного высокоселективного сорбционного процесса выделения и очистки эритромицина непосредственно из культуральной среды.

Работа осуществлялась при поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы” (контракт № 14.740.11.0382).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Писарев О.А., Ежова Н.М. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. Т. 8. № 4. С. 535–552.
2. Leonard M. // J. Chromatogr. B. 1997. V. 699. № 1. P. 3–27.
3. Allende C.J. // Adv. Drug Del. Rev. 2005. V. 57. № 5. P. 1731–1732.
4. Brügemann O., Haupt K., Lei Ye, Yilmaz E., Mosbach K. // J. Chromatogr. A. 2000. V. 889. № 4. P. 15–24.
5. Гаркушина И.С., Ежова Н.М., Писарев О.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 4. С. 409–412.
6. Писарев О.А., Ежова Н.М., Гаркушина И.С. // Журн. физ. химии. 2009. Т. 83. № 1. С. 142–147.
7. Ежова Н.М., Чернова И.А., Погодина Т.Е., Самсонов Г.В. // Ионный обмен и хроматография / Ред. Г.В. Самсонов. Л.: Наука, 1984. С. 37–41.
8. Вольский В.С., Ежова Н.М., Самсонов Г.В. // Журн. прикл. химии. 1985. № 9. С. 2133–2136.
9. Ежова Н.М., Полякова И.В., Писарев О.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 2. С. 243–247.

Molecularly Imprinted Hydrophilic Polymer Sorbents for Selective Sorption of Erythromycin

N. M. Ezhova, I. S. Garkushina, and O. A. Pisarev

Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 199004 Russia

e-mail: pisarev@imc.macro.ru

Received March 23, 2011

Abstract—New hydrophilic polymer sorbents comprising reactionary sites which are complementary to a molecule of antibiotic erythromycin were synthesized by the method of molecular imprinting. A series of similar sorbents without reactionary sites was used for comparison of sorption characteristics. Sorption of erythromycin on both types of polymer sorbents synthesized was studied in a wide range of pH and ionic strength. Selectivity of erythromycin sorption on molecularly imprinted cross-linked polymers was shown to depend on the specific interaction of target molecule with polymer matrix. This type of sorbent is perspective for the development of antibiotic purification directly from a culture medium *Saccharopolyspora erythreus*.

УДК 577.112.7+547.458

ВЛИЯНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА

© 2011 г. Н. М. Местечкина*, О. А. Безбородова**, А. В. Ильина***, А. Н. Левов***,
С. Ю. Клейменов****, Е. Р. Немцова**, Р. И. Якубовская**, В. Д. Щербухин*, В. П. Варламов***

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

**Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена МЗиСР РФ, Москва 125284

***Центр “Биоинженерия” РАН, Москва 117312

****Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва 119334

e-mail: mestnm@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 14.02.2011 г.

Исследовано влияние нейтральных и ионогенных полисахаридов на антиоксидантную (АОА) и детоксицирующую активности лактоферрина (ЛФ), длительность его циркуляции в организме. Помимо природных полимеров, были синтезированы производные хитозана с различными функциональными группами. На основании теста АОА из них отобрано 5 полисахаридов. При изучении детоксицирующего действия ЛФ на двух моделях индуцированного токсикоза выявлены полисахариды, которые сохраняли или усиливали эту активность ЛФ. Установлено, что образование комплекса лактоферрина с двумя галактоманнанами и сукциноилхитозаном приводило к положительным изменениям свойств ЛФ: детоксицирующая активность белка оставалась неизменной или увеличивалась на фоне замедления его выведения из организма.

Полисахариды, обладающие биологической активностью, такие, как инулин, декстраны, альгинаты, глюко- и галактоманнаны, хитозаны, широко используются в пищевой, косметической, фармацевтической и других отраслях промышленности и медицине. Известно, что, помимо собственной биологической активности, некоторые полисахариды изменяют активность других химических соединений. Так, полисахариды способны обеспечивать адресную доставку лекарственных средств в организме [1, 2], а также пролонгировать их действие [3]. Например, конъюгат галактоманнана с антибиотиком адриамицином используется для доставки последнего к рецепторам гепатоцитов, специфичным к α -галактозе [4].

Сульфатированный по N и 6-O хитозан значительно увеличивал активность *in vitro* и *in vivo* фактора роста костной ткани [5]. Выявлено, что хитозаны в составе вакцин способны усиливать иммунный ответ животных [6, 7].

Известны нанопрепараты пролонгированного действия на основе полисахаридов [8, 9]. Наноструктуры комплекса хитозан–альгинат с нифедипином [8] обеспечивают снижение артериального давления в течение длительного времени. Хитозан-гиалуроновые наночастицы, содержащие гепарин, используются при антиастматической терапии [9]. Подобные результаты вызывают интерес к изучению влияния нетоксичных и широко распространенных полисахаридов на функциональную активность белков.

В качестве модельного белка был выбран используемый в практической медицине лактоферрин (ЛФ) человека – полифункциональный железосодержащий гликопротеин из семейства трансферринов. Макромолекула белка состоит из одной полипептидной цепи (~700 аминокислотных остатков), которая образует 2 глобулярные N- и C-доли, каждая из которых содержит железосвязывающий домен. Лактоферрин способен связывать ионы железа и других металлов переменной валентности, что придает ему свойства активного антиоксиданта. Белок в высокой степени гликозилирован, его молекулярная масса (ММ) составляет около 80 кДа [10]. Он содержится в секреторных жидкостях, нейтрофилах и плазме крови.

ЛФ обладает антиоксидантной (АОА), антимикробной и иммуномодулирующей активностью, благодаря чему осуществляет детоксицирующее и противовоспалительное действие при патологических состояниях организма различного генеза [11–14]. Распространенность ЛФ косвенно свидетельствует о его защитной роли в организме, а недостаточный уровень ЛФ коррелирует с продолжительным и тяжелым течением воспалительных заболеваний. На основе природного ЛФ, выделенного из женского молока, разработан и зарегистрирован препарат “Лапрот” (№ ЛС-002374 от 15.12.2006 г.). Результаты испытаний препарата показали его высокую терапевтическую эффективность при лечении токсических состояний, обусловленных различными забо-

леванями, в частности гнойно-воспалительными, септическими и др. [14–16].

Однако при введении экзогенного ЛФ в кровоток он быстро элиминируется из организма и для поддержания эффективной концентрации требуется его систематическое введение. Увеличение продолжительности нахождения ЛФ в кровотоке гипотетически возможно с помощью создания высокомолекулярных комплексов ЛФ с полисахаридами. Такие препараты отсутствуют в настоящее время как в России, так и за рубежом. Имеется лишь сообщение о начале разработки препарата длительного действия на основе микрочастиц хитозана, содержащих ЛФ [17].

Для выбора полисахаридов, способных образовывать комплексы с ЛФ и пролонгировать его действие, было необходимо провести скрининг полисахаридов. Для этой цели нами был выбран ряд малотоксичных, растворимых в воде полисахаридов различного состава, структуры и происхождения — растительные глюко- и галактоманнаны, арабиногалактан; хитозан ракообразных и его синтетические производные, декстран. Наличие реакционноспособных функциональных групп в молекулах отобранных полисахаридов имеет принципиальное значение для дальнейших химических модификаций, которые могли бы обеспечить либо усиление присущих этим полисахаридам свойств, либо появление новых.

Важными характеристиками функциональной активности ЛФ являются антиоксидантная активность, детоксицирующая способность и скорость выведения из организма.

Цель работы — изучение влияния полисахаридов на функциональную активность ЛФ человека и выявление гликополимеров, обладающих способностью пролонгировать его действие.

МЕТОДИКА

Полисахариды. Использовали хитозан, галактоманнан, глюкоманнан, арабиногалактан и декстран.

Галактоманнан (ГМ) семян *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub сем. бобовых выделен и очищен из коммерческого источника (Gum Guar, “Sigma”, США) по методике, описанной ранее [18]. Частичной кислотной деполимеризацией получены 4 фракции полисахарида с различными ММ 89, 110, 147 и 226 кДа, которые определяли вискозиметрическим методом [18].

Глюкоманнан (ГЛМ) получен и очищен из корней растения *Eremurus comosus* O. Fedtsch. сем. лилейных по методике, описанной в [19].

Арабиногалактан (АРГ) получен в НПФ “Флавит” (Пушино, Россия).

Декстран с ММ 60 кДа выпускается ОАО “Биохимик” (Саранск, Россия).

Исходный хитозан с ММ 700 кДа и степенью дезацетилирования (СД) $85 \pm 3\%$ получен в ЗАО “Биопрогресс” (Щелково, Россия).

Для синтеза производных хитозана использовали реагенты: янтарный и малеиновый ангидриды, 2-гидрокси-3-метоксибензальдегид, йодистый метил и пиросульфит натрия (“Fluka”, Швейцария).

Степень замещения (СЗ) и СД производных определяли аналитическими и спектральными методами [20, 21].

Молекулярную массу низкомолекулярных хитозанов и арабиногалактана определяли методом высокоэффективной гельпроникающей хроматографии [22]. Средневязкостную ММ исходного и гидролизованного хитозана (700 и 387 кДа) измеряли в вискозиметре Уббелодде при 25°C в Na-ацетатном буфере [23]. Для глюко- и галактоманнанов использовали вискозиметр Оствальда.

Моносахаридный состав арабиногалактана, глюко- и галактоманнанов устанавливали в их гидролизатах в виде ацетатов полиолов на хроматографе “Shimadzu GC 2010” (Япония).

Лактоферрин. В работе использовали лактоферрин человека, выделенный из женского молока (“МНИОИ им. П.А. Герцена”, Россия) [24], поликлональные антитела кролика к ЛФ человека (“ICN Biomedicals”, США), конъюгат антител к ЛФ человека с пероксидазой хрена (“МНИОИ им. П.А. Герцена”, Россия), цисплатин (“Эбеве”, Австрия).

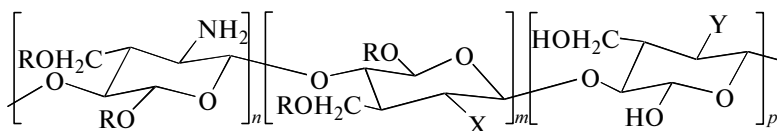
Молекулярную массу ЛФ человека определяли методом электрофореза в ПААГ [25], используя набор белков-маркеров (“Sigma”, США).

Аналитический электрофорез по методу Лемли [26] проводили в 7.5%-ном ПААГ в денатурирующих и неденатурирующих условиях. Гели окрашивали по стандартной методике раствором Кумасси R-250 бриллиантового голубого в уксусной кислоте.

Антигенную аутентичность белковых комплексов подтверждали с помощью Вестерн-блоттинга анализа. В качестве хромогена использовали 3,3-диаминобензидинтетрахлорид (“Sigma”, США) с 0.03% H₂O₂.

Антиоксидантная активность. АОА ЛФ (индивидуального и в составе комплекса) определяли *in vitro* в гомогенате печени мышей (линия BDF1, самки). Метод основан на способности исследуемого вещества ингибировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) в гомогенате печени мышей [27]. Антиоксидантную активность рассчитывали, как обратную величину от концентрации исследуемого образца, необходимой для 50% ингибирования ПОЛ, и выражали в условных единицах (усл. ед.).

Детоксицирующее действие. Активность изучали на моделях токсикоза, индуцированного введением токсической дозы (LD₅₀) цитостатического препарата цисплатина — цис-дихлордиаминплатины —



- I – $n = 5$; $m = 15$; $p = 80$; $X = \text{NHCOCH}_3$; $Y = \text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$; $R = \text{H}$
 II – $n = 60$; $m = 2$; $p = 38$; $X = \text{NHCOCH}_3$; $Y = \text{NHCOCH}_2\text{CH}(\text{SO}_3\text{H})\text{COOH}$; $R = \text{H}$
 III – $n = 85$; $m = 15$; $p = 0$; $X = \text{NHCOCH}_3$; $Y = \text{NH}_2$; $R = \text{SO}_3\text{H}$
 IV – $n = 78$; $m = 2$; $p = 20$; $X = \text{NHCOCH}_3$; $Y = 2\text{-гидрокси-3-метоксибензиламин}$; $R = \text{H}$
 V – $n = 83$; $m = 2$; $p = 15$; $X = \text{NHCOCH}_3$; $Y = \text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{I}^-$; $R = \text{H}$

Рис. 1. Структура производных хитозана: I – сукциноилхитозан; II – сульфат сукциноилхитозана; III – сульфат хитозана; IV – N-3-метокси-2-гидроксибензилхитозан; V – метилированное производное хитозана.

ДДП или введением гепатотропного яда – четыреххлористого углерода (CCl_4).

Определение содержания ЛФ. Концентрацию ЛФ в биологических образцах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа в “сэндвич” варианте [28].

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Термодинамические характеристики связывания лактоферрина с галактоманнаном исследовали с помощью калориметра изотермического титрования iTSC₂₀₀ (“MicroCal”, США), как описано ранее [29]. Эксперименты проводили при 25°C в изотоническом растворе. Аликвоты лиганда (2,5 мкл) добавляли в калориметрическую ячейку объемом 200 мкл до получения полной изотермы связывания. Концентрацию белка в калориметрической ячейке варьировали в пределах 10–20 мкМ, а концентрацию галактоманнана в титрующем шприце – 100–400 мкМ. Теплоу разбавления определяли титрованием буфера раствором лиганда, после чего изотерму разбавления вычитали из изотермы связывания, а полученную кривую обрабатывали и анализировали с помощью программного пакета MicroCal Origin 7.0.

Измерение параметров денатурации белка производили при помощи микрокалориметра DASM-4M (СКБ Научного приборостроения РАН, Пушкино, Россия) с капиллярными ячейками объемом 467 мкл. Скорость нагрева 1°C/мин, давление 2.2 бар.

Системы. Растворы ЛФ–полисахарид готовили следующим образом: лиофильно высушенный образец полисахарида растворяли в 0.15 М хлориде натрия (3 мг/мл), затем добавляли раствор лактоферрина (2.5 мг/мл) до конечной концентрации по ЛФ и полисахариду 1 мг/мл. Раствор тщательно перемешивали в течение 20 мин, получая системы ЛФ–полисахарид с соотношением компонентов 1 : 1 по массе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали широкий спектр полисахаридов: полусинтетические производные хитозана, галакто-

маннаны с различной степенью полимеризации, глюкоманнан, арабиногалактан и декстран.

Для синтеза производных хитозана (рис. 1) использовали образцы низкомолекулярного полисахарида (ММ 387, 60 и 7 кДа), полученные в результате ферментативного и кислотного гидролиза [30, 31] высокомолекулярного препарата (ММ 700 кДа, СД 85%). В результате дальнейшей химической модификации хитозана в состав полисахарида были введены 3 вида заместителей: несущие кислотные и основные функции и группы, придающие соединениям антиоксидантные свойства.

Для синтеза первой группы производных хитозана были осуществлены реакции: сукцинирование полисахарида янтарным ангидридом методом, описанным в работе [32]; сульфосукцинирование с помощью малеинового ангидрида и метабисульфита натрия по [33]; сульфатирование сульфотриоксидом пиридина в диметилформамиде по [34]. Получены 3 вида производных: сукциноилхитозан с СЗ 0.80 (рис. 1, I, исходный хитозан ММ 387 кДа, СД 85%); сульфат сукциноилхитозана с СЗ 0.40 (рис. 1, II, исходный хитозан ММ 7 кДа, СД 98%); и сульфат хитозана с СЗ 1.5 (рис. 1, III, исходный хитозан ММ 60 кДа, СД 85%).

Для получения второй группы производных использовали хитозан с ММ 7 кДа, СД 98%. Метилированное производное – квартенизированный хитозан (рис. 1, V) был синтезирован действием йодистого метила на полисахарид в щелочной среде N-метилпирролидона [35].

Третья группа производных представлена соединением – N-3-метокси-2-гидроксибензилхитозаном (рис. 1, IV), полученным взаимодействием полисахарида (ММ 7кДа, СД 98%) с 3-метокси-2-гидроксибензальдегидом и последующим восстановлением имина боргидридом натрия [36].

Галактоманнаны представляют собой линейный 1-4-β-D-маннан, часть моносахаридных остатков которых замещена по С-6 единичными остатками α-галактозы. Частичной кислотной деполимеризацией были получены фракции полисахарида с ММ

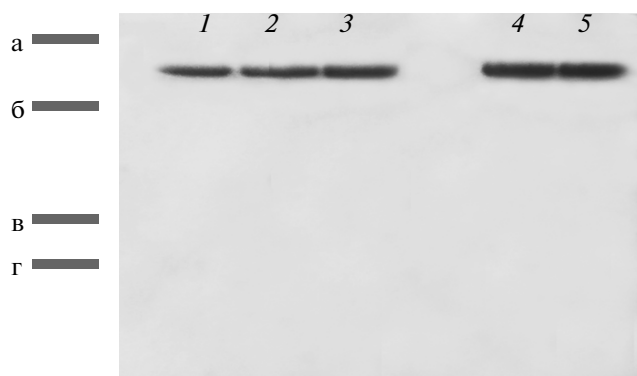


Рис. 2. Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях: 1 – ЛФ человека; 2 – ЛФ–ГМ (ММ 89); 3 – ЛФ–ГМ (ММ 110); 4 – ЛФ–АРГ; 5 – ЛФ–сукциноилхитозан. Белки метчики (кДа): а – фосфоорилаза (94), б – бычий сывороточный альбумин (67), в – яичный альбумин (43), г – карбоангидраза (30).

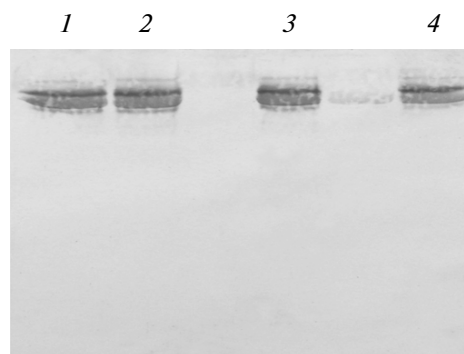


Рис. 3. Иммуноблоттинг ЛФ человека, входящего в состав комплексов с полисахаридами, с использованием поликлональных антител кролика к ЛФ человека: 1 – ЛФ; 2 – ЛФ–ГМ (ММ 89); 3 – ЛФ–АРГ; 4 – ЛФ–сукциноилхитозан.

89, 110, 147 и 226 кДа. Соотношение Ман : Гал во всех фракциях составило 1.66 ± 0.03 .

Глюкоманнаны – полисахариды, линейная цепь которых содержит 1,4-β-манно- и глюкопиранозные остатки и 2.4% ацетильных групп, локализованных при С-2 и/или С-3 остатках маннозы. Соотношение Ман : Глю полисахарида составило 1.60 ± 0.04 , ММ – 87.8 кДа.

Арабиногалактан – полисахарид, главная цепь которого состоит из 1,3-β-галактопираноз; к части звеньев по С-6 присоединены ответвления из арабинозы в фуранозной и пиранозной форме, β-галактопиранозы. Остатки в боковых цепях связаны между собой 1,3- и 1,6-гликозидными связями. Соотношение Гал : Ара = 8.6 ± 0.2 , ММ – 16.5 кДа.

Растворы систем ЛФ–полисахарид готовили, как описано в разделе “Методика”.

Для подтверждения идентичности индивидуального ЛФ и в комплексе с полисахаридами был использован следующий подход. Комплексы ЛФ с полисахаридами анализировали методом электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях. Образцы индивидуального ЛФ и в комплексе с полисахаридами образуют узкую, хорошо очерченную полосу (рис. 2), которая соответствует компоненту с молекулярной массой 75.5 ± 0.5 кДа, что хорошо совпадает со значением для коммерческого ЛФ человека.

Антигенную аутентичность подтверждали с помощью Вестерн-блоттинг-анализа. Для этого после окончания электрофореза в неденатурирующих условиях гель переносили на нитроцеллюлозную мембрану. В результате было показано специфическое взаимодействие ЛФ, входящего в состав комплексов с полисахаридами и контрольного образца ЛФ человека, с поликлональными антителами к ЛФ человека (рис. 3).

Для установления влияния присутствия полисахаридов на антиоксидантную активность ЛФ, образ-

цы анализировали в биологической тест-системе *in vitro*, основанной на способности исследуемого вещества ингибировать ПОЛ в гомогенате печени контрольных животных. Данные по изучению АОА представлены в таблице. В качестве контроля использовали ЛФ человека. При его концентрации в пробе 118 ± 8 мкг/мл достигалось 50%-ное ингибирование ПОЛ. Ни один из исследованных полисахаридов не обладал собственной АОА, однако они значительно различались по своему влиянию на антиоксидантную активность лактоферрина.

Производные хитозана, имеющие в структуре кислые группировки (рис. 1, I, II, III; таблица, комплексы 1, 2 и 3), приводят к уменьшению АОА ЛФ, что, по-видимому, связано с ионными взаимодействиями между разноименно заряженными группами полисахарида и белка, влияющими на активный центр лактоферрина.

В случае производного IV (рис. 1), увеличение АОА ЛФ на 10% (таблица, 4) до 934 усл. ед. (контроль ЛФ – 847 усл. ед.), по-видимому, связано с наличием в полисахариде метоксигидроксibenзильной группировки, способной к окислению, а также и к координации с ионами железа.

Квартенизированное производное хитозана (рис. 1, V) увеличивало общий положительный заряд, что, вероятно, и приводило к увеличению активности ЛФ (таблица, 5) на 8% (917 усл. ед.). Таким образом, производные хитозана с заместителями, способными к окислению, или с группами, несущими положительный заряд, могут рассматриваться, как перспективные полисахариды для повышения АОА ЛФ при образовании комплексов с гликопротеином.

Как видно из таблицы, системы 6 и 7 высокомолекулярных галактоманнанов и система 10 глюкоманнана понижают АОА лактоферрина. Большая молекулярная масса двух фракций галактоманнана

Антиоксидантная активность лактоферрина в присутствии полисахарида

№	Система	Ингибирование (50%), мкг/мл	Активность, ед.
Производные хитозана			
1	ЛФ–сукциноилхитозан	140	714
2	ЛФ–сульфосукциноилхитозан	160	625
3	ЛФ–сульфат хитозана	152	657
4	ЛФ–N-3-метокси-2-гидроксибензилхитозан	107	934
5	ЛФ–метилированное производное хитозана	109	917
Галактоманнаны (ГМ)			
6	ЛФ–ГМ, ММ 226 кДа	239	418
7	ЛФ–ГМ, ММ 147 кДа	181	552
8	ЛФ–ГМ, ММ 110 кДа	119	840
9	ЛФ–ГМ, ММ 89 кДа	121	826
10	ЛФ–ГЛМ	157	637
11	ЛФ–декстран	180	556
12	ЛФ–декстран + ГМ (ММ 110 кДа)	161	621
13	ЛФ–арабиногалактан	125	800
	Контроль ЛФ	118 ± 8	847
	Контроль (полисахариды): сукциноилхитозан, сульфосукциноилхитозан, сульфат хитозана, N-3-метокси-2-гидроксибензилхитозан, метилированное производное хитозана; ГМ – ММ 226 кДа, 147 кДа, 110 кДа, 89 кДа; ГЛМ; декстран; арабиногалактан	не ингибируют	

(ММ 226 и 147 кДа), по-видимому, создает стерические затруднения для ЛФ, что и приводит к уменьшению его АОА. Вероятно, аналогичный эффект наблюдается и для линейной, более жесткой структуры макромолекулы глюкоманнана.

Комплекс ЛФ с декстраном и тройная система (таблица, 11, 12) ЛФ–декстран–ГМ (ММ 110 кДа) также обладали меньшей активностью (556 и 621 усл. ед.) – 65 и 73% от активности нативного ЛФ – 847 усл. ед. Подобный результат может объясняться глобулярной структурой декстрана.

Анализ полученных данных в группе галактоманнанов (ГМ) показал, что в условиях используемой нами тест-системы, комплексы 8 (ГМ с ММ 110 кДа) и 9 (ГМ с ММ 89 кДа) практически не изменяли величину АОА ЛФ – 840 и 826 усл. ед. соответственно. Незначительно изменял активность ЛФ также и арабиногалактан (система 13) – 800 усл. ед. (на 5.5%).

Таким образом, в результате исследования влияния нейтральных и ионогенных полисахаридов на антиоксидантную активность лактоферрина выявлено 5 физиологически активных полисахаридов, а именно: производные хитозана – N-3-метокси-2-гидроксибензилхитозан и метилированный хитозан, а также галактозосодержащие полисахариды – ГМ (110 кДа), ГМ (89 кДа) и АРГ.

Влияние гликополимеров на детоксицирующее действие ЛФ оценивали на двух моделях токсикоза у животных: индуцированного противоопухолевым препаратом – цисплатином, широко используемым в схемах полихимиотерапии и гепатотропным ядом – четыреххлористым углеродом.

Цисплатин вызывает целый комплекс токсических реакций. Применение этого препарата в высоких дозах вызывает гибель животных от острой токсичности. Из результатов, представленных на рис. 4, следует, что однократное введение ДДП в дозе 16 мг/кг приводило к 60 ± 10%-ной гибели животных от острого токсикоза.

В контрольной группе животных, получавших ЛФ человека (Лапрот), гибель от токсического действия ДДП составила 20 ± 10%. Для индивидуальных полисахаридов аналогичная величина составила 60 ± 10%, т.е. полисахариды не проявляли детоксицирующей активности. В группах животных, которым вводили системы из группы производных хитозана – ЛФ–N-3-метокси-2-гидроксибензилхитозан, ЛФ–метилированное производное, ЛФ–сукциноилхитозан и ЛФ–АРГ наблюдалось снижение гибели животных до 30 ± 10%, а в группах животных, которые получали комплексы из группы галактоманнанов – ЛФ–ГМ (ММ 89 кДа) и ЛФ–ГМ (ММ 110 кДа) летальность составила только 20 ± 10% (рис. 4).

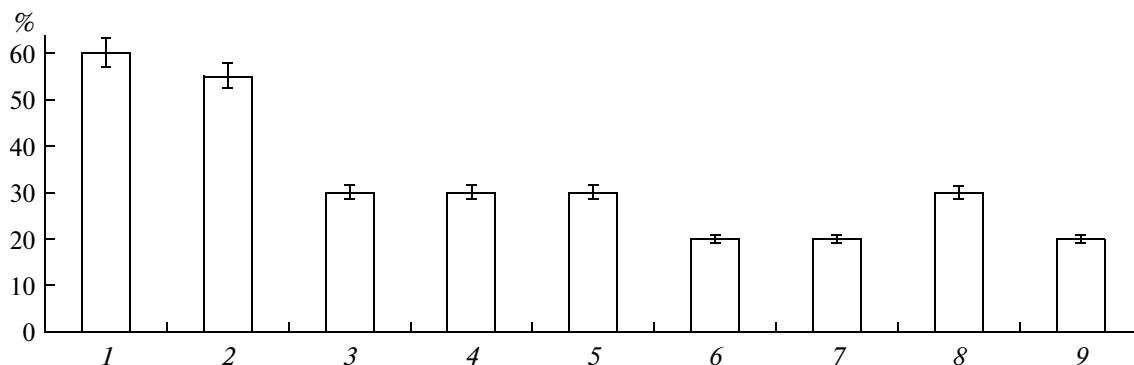


Рис. 4. Влияние систем ЛФ—полисахарид на токсическое действие ДДП: 1 — контроль ДДП, 2 — контроль полисахарида, 3 — ЛФ—N-3-метокси-2-гидроксibenзилхитозан, 4 — ЛФ—метилированное производное хитозана, 5 — ЛФ—сукциноилхитозан, 6 — ЛФ—ГМ (ММ 89), 7 — ЛФ—ГМ (ММ 110), 8 — ЛФ—АРГ, 9 — контроль ЛФ. Образцы вводили в разовой дозе 10 мг/кг в течение 3 сут (курсовая доза 30 мг/кг).

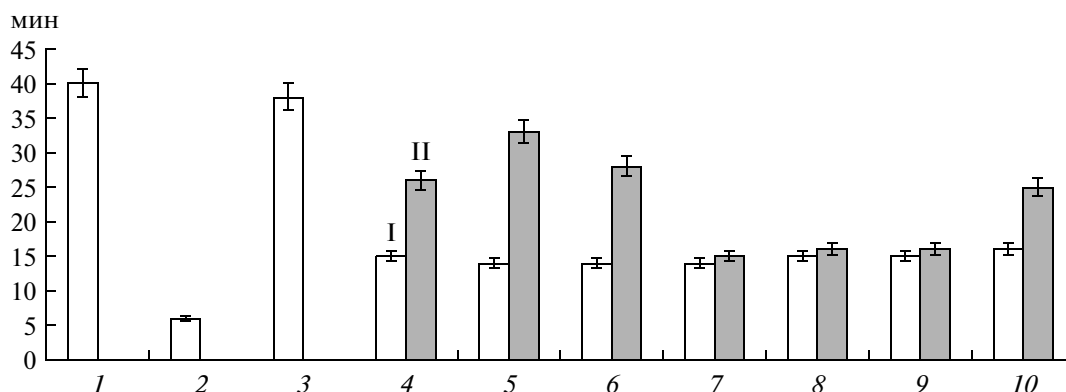


Рис. 5. Продолжительность тиопенталового сна животных, получавших CCl_4 : 1 — контроль CCl_4 , 2 — контроль изотонический раствор, 3 — контроль полисахарида, 4 — контроль ЛФ, 5 — ЛФ—N-3-метокси-2-гидроксibenзилхитозан, 6 — ЛФ—метилированное производное хитозана, 7 — ЛФ—сукциноилхитозан, 8 — ЛФ—ГМ (ММ 89), 9 — ЛФ—ГМ (ММ 110), 10 — ЛФ—АРГ. Образцы вводили в разовой дозе 10 мг/кг в течение 3 сут (курсовая доза 30 мг/кг).

I — тест за 1 ч, II — тест за 24 ч до введения CCl_4 .

Таким образом, в эксперименте в этой модели индуцированного токсикоза установлено, что полисахариды, не обладая собственным детоксицирующим эффектом, практически не влияют на соответствующую активность лактоферрина.

Токсикоз, вызываемый введением CCl_4 , проявляется в нарушении функций печени, что может быть оценено, например, по продолжительности наркотического (тиопенталового) сна. Влияние полисахаридов на детоксицирующую активность ЛФ в составе комплексов оценивали по уменьшению продолжительности этого сна, при этом исследуемые системы вводили за 1 и за 24 ч до тиопентала.

Из результатов, представленных на рис. 5, следует, что введение CCl_4 вызывало значительное увеличение продолжительности сна животных. Применение ЛФ человека и его комплексов с полисахаридами за 1 ч до инъекции CCl_4 приводило к биологически значимому уменьшению продолжительности сна животных.

При модификации теста, т.е. при введении ЛФ за 24 ч до инъекции CCl_4 , картина изменялась. Время сна в контроле (чистый ЛФ) увеличивалось на 86% по сравнению с предыдущим тестом. Для трех систем (рис. 5) продолжительность сна также увеличивалась. В то же время у трех систем — ЛФ—сукциноилхитозана и ЛФ—галактомананов с ММ 89 и 110 кДа, продолжительность наркотического сна совпала с таковой при введении за 1 ч до CCl_4 . Таким образом, показано, что эти системы увеличивали или пролонгировали детоксицирующую активность ЛФ.

Приведенные выше результаты побудили нас исследовать влияние полисахаридов на время функционирования ЛФ в печени и в кровяном русле модельных животных — мышей. Через 3 ч после введения ЛФ в организм его содержание в печени животных контрольной группы составляло всего 5%. В то же время в системах ЛФ—ГМ (89 кДа) и ЛФ—сукцино-

илхитозан (через 3 ч) и ЛФ—АРГ (через 2 ч) наблюдался высокий уровень ЛФ, который составил $90 \pm 3\%$, $74 \pm 9\%$ и $89 \pm 4\%$ от введенной дозы. Даже через 1 сут после инъекций содержание ЛФ не падало ниже 20% от введенной дозы.

Исследование сыворотки крови показало следующее. Через 3 ч после инъекции содержание ЛФ составляло 4%. Введение его в составе системы ЛФ—сукциноилхитозан повышало уровень белка до $55 \pm 13\%$ от введенной дозы, который постепенно снижался, достигая через 7 ч $25 \pm 7\%$. При введении систем с галактоманнаном и арабиногалактаном наблюдали аналогичный эффект: уровень ЛФ через 3 ч также был выше ($35 \pm 5\%$ и $25 \pm 6\%$ соответственно) и через 7 ч составлял $7 \pm 1\%$ и $3 \pm 0.8\%$. Следует отметить, что белок в составе всех комплексов, введенных животным, мог быть выявлен через 24 ч, в то время как у животных контрольной группы ЛФ человека через такой же срок наблюдения полностью отсутствовал.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что присутствие полисахаридов в исследованных системах способствует увеличению времени циркуляции ЛФ в кровотоке и повышению его концентрации в печени. Следовательно, полисахариды препятствовали элиминации ЛФ из организма.

Полученные результаты побудили нас проверить предположение о взаимодействии белка и полисахарида (на примере галактоманнана с ММ 89 кДа) с помощью ДСК. Было использовано два подхода: изотермическая калориметрия титрования и тепловая денатурация белка.

Исходя из формы калориметрической кривой и расчетов термодинамических параметров, можно предположить, что лактоферрин имеет два типа центров связывания с галактоманнаном: один с константой 5–10 нМ, второй с константой около 0.5 мМ, исходя из средней молекулярной массы полисахарида 89 кДа. Причем с каждым типом сайтов белка связывается не более 2 молекул полисахарида.

Для оценки возможных изменений стабильности структуры молекулы ЛФ в результате взаимодействия с полисахаридом также была исследована тепловая денатурация белка методом сканирующей калориметрии.

ДСК лактоферрина в изотоническом растворе, 150 мМ NaCl, не обнаружила явных различий термодинамических параметров необратимой тепловой денатурации индивидуального ЛФ и в присутствии галактоманнана. Небольшие различия в энтальпии и температуре максимума скорости денатурации оказались меньше предела разрешения метода для соответствующих величин, что не исключает возможности взаимодействия белка с галактоманнаном (данные изотермической калориметрии титрования), оказывающего стабилизирующее влияние на структуру молекулы ЛФ.

Таким образом, проведенные исследования показали взаимодействие лактоферрина с галактоманнаном *in vitro* в изотоническом растворе при 37°C, которое, однако, не влияет на стабильность вторичной и третичной структуры собственно макромолекулы белка. Увеличение времени нахождения лактоферрина в организме в присутствии галактоманнана позволяет предположить, что молекулы полисахарида экранируют белок от действия протеаз или затрудняют его участие в других биохимических процессах, замедляя его выведение.

* * *

Приведенные результаты демонстрируют воздействие нейтральных и ионогенных полисахаридов на антиоксидантную и детоксицирующую активности лактоферрина, а также на длительность циркуляции его в организме. Использование теста АОА позволило отобрать группу из 5 полисахаридов, активность которых в составе системы с ЛФ, была выше или на уровне активности индивидуального белка.

На двух моделях индуцированного токсикоза *in vivo* показано, что ЛФ в составе отобранных систем оказывал детоксицирующее действие в отношении острых токсических реакций, вызванных введением цитостатика — ДДП и гепатотропного яда — СС₁₄, что позволило говорить о сохранении биологической активности белка в комплексе с полисахаридами.

Определение ЛФ в составе комплексов в крови и печени показало, что белок детектируется вплоть до 24 ч после введения, в то время как индивидуальный ЛФ к этому сроку не детектируется вовсе.

При совокупной оценке полученных результатов выявлено, что образование комплексов лактоферрина с галактоманнанами (ММ 89 и 110 кДа) и сукциноилхитозаном приводит к наиболее выраженным положительным изменениям физиологических свойств ЛФ: детоксицирующая активность белка остается неизменной или увеличивается на фоне замедления его выведения из организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ: грант 09-04-13714-офи-ц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang L., Chu J.S., Fix J.A. // Int. J. Pharm. 2002. V. 235. № 1–2. P. 1–15.
2. Kim H.J., Choi S.J., Shin W.S., Moon T.W. // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 4. P. 1049–1056.
3. Misra A.N., Baweja J.M. // Indian Drugs. 1997. V. 34. № 4. P. 216–223.
4. Ouchi T., Matsumoto M., Ihara K., Ohya Y. // J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem. 1997. V. 34(A). № 6. P. 975–989.
5. Zhou H., Qian J., Wang J., Yao W., Liu Ch., Chen J., Cao X. // Biomaterials. 2009. V. 30. № 9. P. 1715–1724.

6. Ghendon Y., Markushin S., Vasiliev Y., Akopova I., Koptiaeva I., Krivtsov G., Borisova O., Ahmatova N., Kurbatova E., Mazurina S., Gervazieva V. // *J. Med. Virol.* 2009. V. 81. № 3. P. 494–506.
7. Jiang H., Park I., Shim N. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004. V. 58. № 3. P. 471–476.
8. Li P., Dai Y.N., Zhang J.P., Wang A.Q., Wei Q. // *Int. J. Biomed. Sci.* 2008. V. 4. № 3. P. 221–228.
9. Oyarzun-Ampuero F.A., Brea J., Loza M.I., Torres D., Alonso M.J. // *Int. J. Pharm.* 2009. V. 381. P. 122–129.
10. Борзенкова Н.В., Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И. // *Биофарм. журнал.* 2010. Т. 2. № 3. С. 3–19.
11. Эделева Н.В., Осипова Н.А., Якубовская Р.И., Немцова Е.Р., Сергеева Т.В. // *Анестезиология и реаниматология.* 1997. № 3. С. 36–41.
12. Ward P.P., Uribe-Luna S., Conneely O. // *Biochem. Cell Biol.* 2002. V. 80. № 1. P. 95–102.
13. Valenti P., Antonini G. // *Cell Mol. Life Sci.* 2005. V. 62. № 22. P. 2576–2587.
14. Немцова Е.Р., Эделева Н.В., Осипова Н.А., Якубовская Р.И., Бойко А.В., Демидова Л.В., Чиссов В.И. // *Рос. онкол. журн.* 2006. № 4. С. 29–33.
15. Эделева Н.В., Сергеева Т.В., Немцова Е.Р., Щербицкая И.Я., Якубовская Р.И., Осипова Н.А. // *Анестезиология и реаниматология.* 2001. № 5. С. 61–64.
16. Немцова Е.Р., Сергеева Т.В., Безбородова О.А., Якубовская Р.И. // *Рос. онкол. журн.* 2003. № 5. С. 48–53.
17. Onishi H., Machida Y., Kovata K. // *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 2007. V. 33. № 6. P. 641–647.
18. Егоров А.В., Местечкина Н.М., Щербухин В.Д. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2003. Т. 39. № 4. С. 452–456.
19. Смирнова Н.И., Местечкина Н.М., Щербухин В.Д. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2002. Т. 38. № 5. С. 548–551.
20. Hirai A., Odani H., Nakajima A. // *Polym. Bull.* 1991. V. 26. № 1. P. 87–94.
21. Ильина А.В., Варламов В.П. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2003. Т. 39. № 3. С. 273–277.
22. Лопатин С.А., Дербенева М.С., Куликов С.Н., Варламов В.П., Шпицун О.А. // *Журн. аналит. химии.* 2009. Т. 64. № 6. С. 666–670.
23. Gamzazade A.I., Slimak V.M., Skljjar A.M., Stikova E., Pavlova S., Rogozhin S. // *Acta Polym.* 1985. V. 36. № 8. P. 421–424.
24. Якубовская Р.И., Немцова Е.Р., Коханова И.Д., Дума В.Н., Александер С.К. // *Вопросы мед. химии.* 1986. № 6. С. 75–79.
25. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
26. Гааль Э., Медьешу Г., Верецкеи Л. *Электрофорез в разделении биологических макромолекул.* М.: Мир, 1982. 446 с.
27. Tutykhina I.L., Bezborodova O.A., Shmarov M.M. // *Protein Expression and Purification.* 2009. V. 65. № 1. P. 100–107.
28. Немцова Е.Р., Иванова Л.М., Якубовская Р.И. // *Вопросы. мед. химии.* 1995. № 3. С. 58–61.
29. Mitkevich V.A., Kononenko A.V., Petrushanko I.Y., Yanvarev D.V., Makarov A.A., Kisselev L.L. // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. № 14. P. 3947–3954.
30. Ильина А.В., Ткачева Ю.В., Варламов В.П. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2002. Т. 38. № 2. С. 132–135.
31. Tikhonov V.E., Stepnova E.A., Babak V.G., Yamskov I.A., Palma-Guerrero J., Jansson H.B., Lopez-Llorca L.V., Salinas J., Gerasimenko D.V., Avdienko I.D., Varlamov V.P. // *Carbohydrate Polym.* 2006. V. 64. P. 66–72.
32. Yamaguchi R., Arai Y., Itoh T. // *Carbohydrate Res.* 1981. V. 88. № 2. P. 172–175.
33. Budanova N., Shapovalova E., Lopatin S., Varlamov V., Shpigun O. // *Chromatographia.* 2004. V. 59. № 11/12. P. 709–713.
34. Местечкина Н.М., Егоров А.В., Щербухин В.Д. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2006. Т. 42. № 3. С. 368–373.
35. Guo Z., Xing R., Liu S., Zhong Z., Ji X., Wang L., Li P. // *Carbohydrate Polym.* 2008. V. 71. P. 694–697.
36. Lin Y., Chen Q., Luo H. // *Carbohydrate Res.* 2007. V. 342. № 1. P. 87–95.

Effect of Polysaccharides on Biological Activity of Human Lactoferrin

N. M. Mestechkina^a, O. A. Bezborodova^b, A. V. Il'ina^c, A. N. Levov^c, S. Yu. Kleimenov^d,
E. R. Nemtsova^b, R. I. Yakubovskaya^b, V. D. Shcherbukhin^a, and V. P. Varlamov^c

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

e-mail: mestnm@inbi.ras.ru

^b *Herzen Cancer Research Institute, Vtoroi Botkinskii proezd, Moscow, 125284 Russia*

^c *Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, pr. 60-letiya Oktyabrya 7/1, Moscow, 117312 Russia*

^d *Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

Received February 14, 2011

Abstract—The influence of neutral and ionic polysaccharides on the antioxidant (AOA) and detoxifying activities of lactoferrin (LF) and the duration of its circulation in the body was studied. In addition to natural polymers, we studied artificial chitosan derivatives with different functional groups. On the basis of AOA test, five polysaccharides were selected. The study of the detoxifying effect of LF in two models of induced toxicity revealed polysaccharides that maintained or increased the detoxifying activity of LF. We established that the formation of a complex of lactoferrin with two galactomannans and succinyl chitosan caused positive changes in LF properties: the detoxifying activity of the protein remained unchanged or increased, whereas its elimination from the body was decelerated.