

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	АНТИМИКРОБНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ: РАЗНООБРАЗИЕ И СВОЙСТВА (ОБЗОР) Стоянова Л.Г., Устюгова Е.А., Нетрусов А.И.	259	4
<input type="checkbox"/>	THE INVOLVEMENT OF PSEUDOMONAS BACTERIA IN INDUCED SYSTEMIC RESISTANCE IN PLANTS (REVIEW) Jankiewicz U., Koltonowicz M.	276	0
<input type="checkbox"/>	АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ОКСИПРОИЗВОДНЫХ КУМАРИНА Потапович М.В., Метелица Д.И., Шадыро О.И.	282	0
<input type="checkbox"/>	E. COLI PROPIONYL-COA SYNTHETASE IS REGULATED IN VITRO BY AN INTRAMOLECULAR DISULFIDE BOND Guo Y., Oliver D.J.	289	0
<input type="checkbox"/>	РОЛЬ ЭКЗОПОЛИМЕРНОГО КОМПЛЕКСА В ФОРМИРОВАНИИ БИОПЛЕНКИ НА ПОВЕРХНОСТИ СТАЛИ КОРРОЗИОННО-АГРЕССИВНЫМИ БАКТЕРИЯМИ Пуриш Л.М., Асауленко Л.Г., Абдулина Д.Р., Васильев В.Н., Иутинская Г.А.	294	3
<input type="checkbox"/>	РОЛЬ СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА В БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОРРОЗИИ МЕТАЛЛОВ Белов Д.В., Калинина А.А., Соколова Т.Н., Смирнов В.Ф., Челнокова М.В., Карташов В.Р.	302	5
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ ЛЕТУЧИХ МЕТАБОЛИТОВ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН НА РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ LISTERIA MONOCYTOGENES И YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS Сидоренко М.Л., Бузолева Л.С.	308	2
<input type="checkbox"/>	СИНТЕЗ АУКСИНА ВЫШИМ ГРИБОМ LENTINUS EDODES (BERK.) SING В ПРИСУТСТВИИ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ СОЕДИНЕНИЙ ГРУППЫ ИНДОЛА Цивилева О.М., Лощинина Е.А., Макаров О.Е., Никитина В.Е.	313	0
<input type="checkbox"/>	INDUCTION, PURIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SULFHYDRYL OXIDASE FROM AN EGYPTIAN ISOLATES OF ASPERGILLUS NIGER Moubasher H., Fahmi A.A., Abdur-Rahman M.	323	0
<input type="checkbox"/>	α-L-RHAMNOSIDASE FROM ASPERGILLUS CLAVATO-NANICUS MTCC-9611 ACTIVE AT ALKALINE PH Vinlta Yadav, Saroj Yadav, Sarlta Yadav, Yadav K.D.S.	328	0
<input type="checkbox"/>	БИОСИНТЕЗ ФУМИХИНАЗОЛИНОВ ГРИБОМ PENICILLIUM THYMICOLA Желифонова В.П., Антипова Т.В., Козловский А.Г.	334	1
<input type="checkbox"/>	ХИТИН-ГЛЮКАНОВЫЙ КОМПЛЕКС В КЛЕТОЧНЫХ СТЕНКАХ ЛИШАЙНИКАPELTIGERA APHTHOSA Мейчик Н.Р., Воробьев Д.В.	340	0
<input type="checkbox"/>	ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ПОЛИСАХАРИДОВ УЛЬТРАДИСПЕРСНЫХ ЧАСТИЦ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ РАЗМЕРА Шутова В.В., Юсипович А.И., Паршина Е.Ю., Захаркин Д.О., Ревин В.В.	346	4

УДК 579.678

АНТИМИКРОБНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ: РАЗНООБРАЗИЕ И СВОЙСТВА (ОБЗОР)

© 2012 г. Л. Г. Стоянова, Е. А. Устюгова, А. И. Нетрусов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

Биологический факультет, Москва 119992

e-mail: stoyanovamsu@mail.ru

Поступила в редакцию 16.06.2011 г.

В обзоре представлены данные литературы по антимикробным метаболитам, синтезируемым молочнокислыми бактериями (МКБ), которые издавна используются для приготовления молочнокислых продуктов. Обобщены сведения по низкомолекулярным антимикробным веществам, являющимся основными или побочными продуктами молочнокислого брожения. В отдельных главах рассмотрено многообразие фунгицидных веществ МКБ и бактериоцинов в связи с их потенциальным использованием в качестве консервантов пищевых продуктов. Более подробно дана характеристика и классификация бактериоцинов, их синтез и механизм действия рассмотрены на примере низина А, относящегося к I классу лантибиотиков, синтезируемого бактериями *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Механизм действия бактериоцинов II класса рассмотрен на примере лактицина. В заключении приведены основные перспективные направления использования антимикробных метаболитов МКБ в промышленности и медицине.

Молочнокислые бактерии (МКБ) уже более ста лет привлекают внимание исследователей. Интерес многих ученых к МКБ связан с их влиянием на здоровье человека и способностью к консервированию пищевых продуктов. На взаимосвязь между МКБ и здоровьем человека впервые указал И.И. Мечников, предположив, что причиной большого количества заболеваний является отрицательное действие на ткани человеческого организма разнообразных токсинов и метаболитов, образуемых микроорганизмами, попадающими в организм человека. В поисках способов борьбы с преждевременным старением он обнаружил свойство молочнокислых бактерий подавлять развитие вредных микробов, обитающих в желудочно-кишечном тракте [1]. Этому факту долгое время не придавали должного значения, и лишь в 90-е годы прошлого столетия после ряда успешных исследований ученые вновь вернулись к идее И.И. Мечникова о значительной роли МКБ в поддержании здоровья человека. Эти исследования явились стимулом к изучению их антимикробных и пробиотических свойств.

Увеличение сроков хранения пищевых продуктов интересовало человечество еще с древних времен. Наиболее часто в качестве консервантов использовали поваренную соль с добавлением в ряде случаев уксусной кислоты. В последнее время в пищевой промышленности активно используются химические консерванты и антибиотики, обладающие бактерицидными и фунгицидными свойствами. Однако такие консерванты вызывают опасения у потребителей вследствие их токсичности и возможности подавления естественной микробиоты организма.

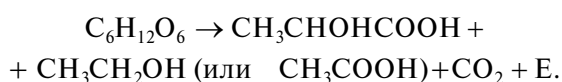
Использование МКБ и их метаболитов, обладающих антимикробными свойствами, является одним из активно разрабатываемых альтернативных подходов к консервированию продуктов питания. Как известно, МКБ тесно ассоциированы с пищевыми продуктами и имеют “GRAS” (Generally Recognized As Safe) статус, что определяет их как абсолютно безопасные для здоровья человека и животных. Основными антимикробными веществами МКБ являются органические кислоты, образуемые в процессе сбраживания сахаров, что приводит к быстрому закислению среды обитания и предотвращению развития других групп микроорганизмов [2]. За последние десятилетия появилось много данных о продукции МКБ антимикробных веществ, относящихся к разным классам органических соединений и обладающих способностью подавлять развитие других микроорганизмов. Некоторые из таких метаболитов, в частности бактериоцин и низин, с успехом используют в промышленности для увеличения сроков хранения продуктов питания. Но потребность пищевой промышленности в новых антимикробных веществах постоянно растет, поэтому выделение и описание веществ с антимикробными свойствами, образуемых МКБ, является перспективным и практически важным направлением развития фундаментальных исследований. Свойства отдельных антимикробных метаболитов МКБ, механизм их действия, а также перспективы использования в качестве консервантов будут рассмотрены в данном обзоре.

Свойства молочнокислых бактерий. МКБ – это грамположительные, не образующие спор (за исключением представителей рода *Sporolactobacillus*), каталазоотрицательные бактерии, лишенные цитохромов, аэро- и кислототолерантные, образующие молочную кислоту в качестве конечного метаболита. В природе молочнокислые бактерии приурочены к местообитаниям, богатым питательными веществами: молоко, мясо, овощи, некоторые виды обитают на растениях, другие составляют нормальную микрофлору пищеварительного тракта человека и животных [3]. Исторически бактерии, относящиеся к родам *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* и *Lactobacillus*, формируют ядро этой группы [4].

Источником энергии для молочнокислых бактерий служит молочнокислое брожение. Известны два основных пути превращения сахаров, используемых МКБ: гликолиз (путь Эмбдена–Мейергофа–Парнаса) и 6-фосфоглюконат-фосфокетотазный путь (путь Варбурга–Хорекера) [5].

В результате гликолиза образуется до 98% молочной кислоты: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHONCOOH + E$. Бактерии, входящие в эту группу, называются гомоферментативными. К представителям, вызывающим гомоферментативное молочнокислое брожение, относятся следующие МКБ: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* bv. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. plantarum*.

Бактерии, использующие 6-фосфоглюконат-фосфокетотазный путь, в процессе молочнокислого брожения кроме молочной кислоты образуются еще и значительные количества уксусной кислоты, этилового спирта, углекислого газа и иных побочных нейтральных продуктов (диацетила, ацетоина), на что идет до 50% сбраживаемых гексоз. Этот тип брожения называется гетероферментативным:



Процесс гетероферментативного молочнокислого брожения более сложный по сравнению с гомоферментативным типом. Представителями гетероферментативных молочнокислых бактерий являются некоторые палочковидные лактобациллы (*L. brevis*, *L. fermentum*), подрод *Streptobacterium*, из кокковых – *Streptococcus acetoinicus*, все виды рода *Leuconostoc* [5].

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ МКБ

Подробное исследование МКБ в течение последних десятилетий выявило их способность образовывать антимикробные вещества различной

природы [3]. Многие штаммы МКБ образуют кроме молочной кислоты значительное количество неспецифических низкомолекулярных соединений, таких, как: органические кислоты, пероксид водорода, диацетил, реутерин и др., которые и определяют спектр их антимикробного действия.

Органические кислоты. Как указано выше, основными конечными метаболитами, образуемыми МКБ в процессе брожения, являются молочная и уксусная кислоты. Уксусная кислота обладает более широким спектром антимикробного действия по сравнению с молочной. В то же время для обеих кислот известно синергидное действие: смесь уксусной и молочной кислот задерживает рост патогенных грамотрицательных энтеробактерий *Salmonella typhimurium* [5]. Отмечается, что L-лактат обладает большей ингибиторной способностью по сравнению с D-изомером [6]. Различные микроорганизмы по-разному реагируют на кислотность среды обитания, например при рН ниже 5.0 молочная кислота ингибирует рост спорообразующих бактерий, но не влияет на развитие микроскопических грибов и дрожжей.

Пероксид водорода. В присутствии кислорода МКБ также способны образовывать H_2O_2 при действии НАДН-оксидазы и супероксиддисмутазы. В отсутствие гема в среде МКБ не образуют каталазу, что приводит к накоплению пероксида, эффект которого может усиливаться в присутствии лактопероксидазы и тиоцианата, имеющихся в природных местообитаниях МКБ, например в молоке [7]. Антимикробное действие пероксида связано с сильным окислительным эффектом. Вследствие накопления бактериями *Lactococcus* и *Lactobacillus* перекисей наблюдали также ингибирование развития золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* и грамотрицательных *Pseudomonas* spp., вызывающих порчу пищевых продуктов [6].

Пирролидон-5-карбоксильная кислота. Эта кислота образуется лишь некоторыми видами МКБ, такими, как *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, *L. casei* ssp. *pseudoplantarum*, и обладает бактерицидной активностью в отношении *Bacillus subtilis* и *Enterobacter cloacae* [6].

Диацетил. Диацетил – ароматобразующий компонент сливочного масла образуется в процессе превращения цитрата через пируват. Максимальное образование диацетила наблюдается при слабокислом рН. Он активен, в основном, против грамотрицательных бактерий, принадлежащих к родам *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia* и *Aeromonas*, а также грамположительных, относящихся к роду *Bacillus* [8].

Реутерин (β-ОН-пропионовый альдегид). Это вещество образуется в анаэробных условиях из глицерина бактериями *Lactobacillus reuteri*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. collinoides* и *L. corniformis* [9]. Реуте-

Таблица 1. Дикетопиперазины, синтезируемые молочнокислыми бактериями [11]

Дикетопиперазины	Продуцент	Структурная формула
Цикло (L-Фен-L-Про)	<i>Lactobacillus plantarum</i> MiLAB 393, <i>L. coryniformis</i> Si3	
Цикло (L-Фен-транс-4-ОН-L-Про)	<i>L. plantarum</i> MiLAB 393, <i>L. coryniformis</i> Si3	
Цикло(L-Фен-цис-4-ОН-D-Про)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> MiLAB 170, <i>L. plantarum</i> MiLAB 14	

рин проявляет антагонистическую активность по отношению ко многим патогенным микроорганизмам, таким, как энтеробактерии (*Salmonella*, *Shigella*), бактерии родов *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, дрожжи рода *Candida* и простейшим рода *Trypanosoma*. Широкий спектр действия обусловлен тем, что реутерин связывается с SH-группами ферментов, в том числе и с рибонуклеотид-редуктазой [7].

ФУНГИЦИДНЫЕ ВЕЩЕСТВА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Проявление фунгицидной активности является нехарактерным физиологическим свойством для МКБ. Многие штаммы микромицетов чувствительны к молочной и уксусным кислотам, выделяемым МКБ. Однако в последнее время появилось ряд сообщений об образовании некоторыми штаммами МКБ специфических фунгицидных веществ. Наибольшее количество таких штаммов было выделено с растений, хранившихся в анаэробных условиях [9]. Известны следующие типы фунгицидных веществ, образуемых МКБ: дикетопиперазины или циклические дипептиды (цикло-Гли-L-Лей), цикло-(L-Фен-L-Про) и цикло-(L-Фен-транс-4-ОН-L-Про), гидроксипроизводные жирных кислот (п-гидроксифениллактат), бензойная кислота, метилгидантоин, мевалонлактон, пентоцин TV35b, реутерин. Первые три типа веществ в литературе охарактеризованы более полно [10].

Дикетопиперазины. Эти вещества долгое время считали продуктами деградации белков. Механизм их образования до сих пор полностью не выяснен, однако установлено, что синтез происходит нерибосомальным путем с участием мультифункционального фермента. Дикетопиперазины могут также образовываться из пептидов в условиях щелочной или кислой среды. Дикетопиперазины, образуемые некоторыми штаммами МКБ [11] приведены в табл. 1. Недавно из *Lactobacillus plantarum* AF1 было выделено новое соединение с фунгицидным действием, идентифицированное как 3,6-бис-(2-метилпропил)-2,5-пиперазиндион. Это единственное сообщение о фунгицидной активности МКБ, обусловленной циклическим соединением (Leu-Leu), которое принадлежит к классу 2,5-дикетопиперазинов [12].

Гидроксипроизводные жирных кислот. Некоторые МКБ образуют 2-гидрокси-гексановую и 3-гидрокси-гептадекановую кислоты, принадлежащие к этому классу веществ. Штамм *L. plantarum* MiLAB14 образует несколько гидроксированных жирных кислот с сильным фунгицидным эффектом: 3-гидроксидекановую кислоту, 3-гидроксидодекановую кислоту, 3-гидрокситетрадекановую и 3-гидрокси-5-цис-додекановую кислоты. МКБ образуют гидроксипроизводные жирных кислот из их ненасыщенных аналогов. Все описанные ненасыщенные жирные кислоты проявляют антибиотическую активность в отношении широкого круга дрожжей и плесневых грибов [9]. Из-за плохой растворимости в водных растворах гидроксированные жирные кислоты имеют об-

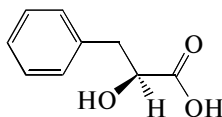


Рис. 1. Структура 3-фениллактата [14].

ший ингибиторный эффект в диапазоне от 10 до 100 мг/мл.

3-фениллактат. Вещество является одним из метаболитов обмена фенилаланина и может образовываться в клетках МКБ из п-гидроксифенилпирувата. Этот конечный метаболит проявляет антибиотическую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также действует на широкий круг микроскопических грибов [13]. Согласно литературным данным, *L. plantarum* обладает способностью образовывать несколько сходных веществ: фениллактат, 4-гидрокси-фениллактат, а также 3-гидрокси-фениллактат, в то время как *L. coryniformis*, *L. sakei* и *Pediococcus pentosaceus* образуют только фениллактат [14]. Фениллактат, кроме лактобацилл, образуют и пропионовокислые бактерии. На рис. 1 представлена его структурная формула.

В литературе имеются единичные сведения о мезофильных лактококках, обладающих фунгицидной активностью. В частности, из молочнокислых продуктов был выделен штамм *Lactococcus lactis* L14, ингибирующий рост *Candida albicans* DMST 5239. Активность этого штамма была стабильной в диапазоне pH 2.0–4.0 и сохранялась даже после автоклавирования [15]. Рой с соавт. [16] выделил из культуры *L. lactis* фунгицидный компонент пептидной природы. Помимо этого было описано ингибирование роста и продукция афлатоксина грибами *Aspergillus flavus* при совместном культивировании последних с лактококками. Активным компонентом в данном случае был низкомолекулярный фосфогликолипид с молекулярной массой меньше 500 Да, содержащий ароматическое кольцо [7]. За ингибирование продукции афлатоксина отвечало термостабильное низкомолекулярное вещество, теряющее активность при длительном хранении [17].

На кафедре микробиологии МГУ из молочнокислых продуктов были выделены штаммы лактококков, которые обладали широким спектром антибиотического действия, включая и фунгицидное. Эти штаммы ингибировали развитие плесеней, принадлежащих к родам *Aspergillus*, *Fusarium* и дрожжей родов *Candida*, *Rhodotorula*. Среди них были природные штаммы *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, выделенные из свежего коровьего молока и кисломолочных продуктов, а также полученные методом клеточной инженерии [18, 19]. Штаммы лактококков, идентифицирован-

ные как *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, синтезировали вещества, относящиеся к алкилароматическим кетонам, которые и определяли их фунгицидную активность [20], что указывает на перспективу применения этих лактококков для предотвращения порчи овощей и фруктов из-за обсемененности их плесневыми грибами и дрожжами [21–23].

БАКТЕРИОЦИНЫ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ, КЛАССИФИКАЦИЯ, СВОЙСТВА

Бактериоцины – это гетерогенные антибактериальные пептиды, разнообразные по уровню активности, спектру и механизму действия, молекулярной массе и физико-химическим свойствам. Известно, что многие микроорганизмы способны к синтезу бактериоцинов. Но бактериоцины МКБ представляют наибольший интерес с точки зрения применения их в качестве новых консервантов. Исследования в области изучения бактериоцинов у молочнокислых бактерий начались в 1930-х годах прошлого столетия с работы по низину, продуцентом которого были лактококки *L. lactis* subsp. *lactis* [24]. К настоящему времени изучено и полностью охарактеризовано большое количество бактериоцинов, синтезируемых как грамположительными, так и грамотрицательными бактериями. Продуцирующие бактериоцины МКБ включают представителей разных родов: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* и *Streptococcus*. Синтез бактериоцинов штаммоспецифичен. Наибольшее количество бактериоцинообразующих бактерий было выделено из молочных и мясных ферментированных продуктов, силоса, но ряд штаммов (*Enterococcus durans*, *Lactobacillus animalis*, *Leuconostoc* sp.) были выделены из почвенных образцов [25]. Имеются сведения, что штаммы *L. lactis* subsp. *lactis*, продуцирующие низин, были выделены из женского молока [26]. Бактериоцины отличаются от классических антибиотиков тремя основными свойствами: синтез бактериоцинов происходит на рибосомах, бактериоцины обладают специфическим спектром действия, каждый бактериоцин имеет свой собственный специализированный иммунный белок [27].

Бактериоцины МКБ по химическому строению разделяются на несколько классов.

Класс I – лантибиотики, представляющие собой пептиды с модифицированными аминокислотами (лантионин, β-метиллантионин). К этому классу принадлежат два типа лантибиотиков:

1. тип А – линейные, гибкие пептиды, формирующие поры в бактериальной мембране, например низины [28];

2. тип В – жесткие, глобулярные, не несущие заряд или заряженные отрицательно пептиды. К

Таблица 2. Физико-химические и биологические свойства компонентов бактериоциноподобного комплекса, образуемого гибридным штаммом *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-116 [20]

Свойства	Компонент				
	ЛГС-В	ЛГС-С	ЛГС-Н ^{1*}	ЛГС-Н*	Низин А
Мол. масса, (M + H) ⁺ , m/z, (MALDI-MS)	506.9	—	3161.6	3353	3353**
УФ-спектр, λ _{max} , нм, (растворитель)	260 (C ₂ H ₅ OH)	215; 274 (C ₂ H ₅ OH)	215 (H ₂ O)	215 (H ₂ O)	215 (H ₂ O)
ТСХ (SiO ₂), R _F в системе: метанол–H ₂ O (96 : 4)	0.75	0.43	0	0	0
Электрофорез на бумаге** в электролите: 1) E ₁ , pH = 2.4, 550 В, 2 ч, см	0	0	11	9.5	9.5
2) E ₂ , pH = 1.1, 250 В, 3 ч, см	0	0	4.3	3.3	3.3
Биологический спектр действия	Бактерии и грибы	Слабое действие на Грам+ бактерии	На Грам+ бактерии, включая термостойкую <i>B. coagulans</i>		

* Фракции ЛГС-Н получены методом препаративного электрофореза на бумаге в электролите E₁ (550 В, 2.5 ч). Проявляли реактивом Паули и биоавтографией с использованием тест-организмов *B. subtilis* и *B. coagulans*.

** Расстояние, пройденное веществом от стартовой линии к катоду, в см: “0 см” (на линии старта) – электронейтральное вещество; “3.3–11 см” (миграция к катоду) – вещество основного характера.

лантибиотикам типа В принадлежат мерсацидин, актагардин и цинамицин [29, 30].

Класс II – пептиды, не содержащие модифицированных аминокислот, которые в свою очередь подразделяются на три основные группы:

1. подкласс IIa – пептиды, имеющие специфическую консервативную N-концевую последовательность Тир-Гли-Асп-Гли-Вал-Хак-Цис, как правило, термостабильные, содержащие от 37 (у лейкоцина А и мезентерицина Y105) до 48 аминокислот, например у карнобактериоцина В2 и энтероцина SE-K4 [31], отличающиеся высокой активностью по отношению к патогенным бактериям рода *Listeria*, часто встречающимся в пищевом сырье;

2. подкласс IIb – дипептидные бактериоцины, имеющие в лидерном пептиде двойной глициновый мотив (лактококцин G, плантарицин E/F, лактацин F, термофилин 13);

3. подкласс IIc – циклические бактериоцины с ковалентно замкнутым C- и N-концами [32].

Класс III – крупные (с молекулярной массой более 30 кДа) нелантибиотиковые, термолабильные белки, такие, как гелветицин J и лактацин В [33].

Класс IV – сложные бактериоцины, содержащие как белковые, так и липидные или углеводные компоненты [34]. Сведения по этому классу бактериоцинов малочислены и разноречивы.

Один вид МКБ и даже штамм может образовывать бактериоцины разных классов. Например, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* является продуцентом таких лантибиотиков, как: низины А, В, С, L, Z, Q, F [35], лактицин 481 и дипептидный лантибиотик лактицин 3147 [36]. Из бактериоцинов второго класса лактококки образуют лактококцин 972 [37], лактицин QU 5 [38]. Недавно был

обнаружен бактериоцин, имеющий циклическую структуру – лактоцилин Q, образуемый *Lactococcus* sp. QU 12 [39].

Как показало сравнительное изучение штаммов, проведенное на кафедре микробиологии МГУ, синтез бактериоцинов штаммоспецифичен [20]. Среди изученных штаммов были природные штаммы 194 и 119х, классический низинообразующий штамм МГУ, полученный в результате адаптивной селекции по низину, рекомбинантный штамм F-116, полученный методом слияния протопластов двух родственных штаммов 729 и 1605. Штамм 729 – природный штамм, выделенный из молока, штамм 1605 – мутант, полученный в результате индуцированного мутагенеза.

Бактериоцины, синтезируемые штаммами 119х и МГУ, по физико-химическим свойствам не отличались от низина (рис. 1), в то время как из гибридного штамма F-116 был выделен антибиотический комплекс, представляющий собой сложную смесь биологически активных компонентов, состоящих из трех отдельных фракций с разными физико-химическими и биологическими свойствами (табл. 2). Основной фракцией антибиотического комплекса являлась пептидная фракция, активная в отношении только грамположительных бактерий, включая спорую кислотоустойчивую бактерию *B. coagulans*, доминирующую в консервах и пресервах. Эта фракция была полипептидом, распадающимся в кислой среде на две субъединицы с молекулярными массами 3353 и 3376 Да. По химической структуре и антибиотическому действию фракция близка к низину. Из другой фракции получен хроматографически чистый фунгицидный компонент с молекулярной массой 506.9 Да, который на основании ИК-спектра был отнесен к группе алкилароматических ке-

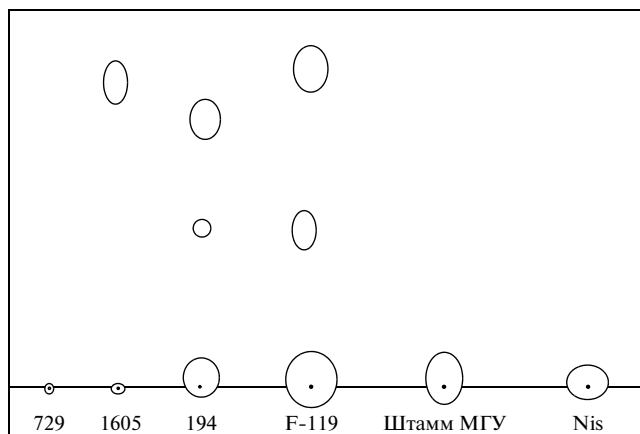


Рис. 2. Тонкослойная хроматография бактериоцин-подобных комплексов, продуцируемых гибридным штаммом *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-119 и его родителями в сравнении с низином, низинообразующим штаммом МГУ и природным штаммом 194 [20] в системе метанол–вода (96 : 4); биоавтография на пластинках “Silufol”, тест-организм – *B. coagulans*.

тонов, содержащих также гидроксильные группы (рис. 2, табл. 2). Третья фракция – минорная, биологическая активность ее была незначительной. Физико-химические и биологические свойства выделенных компонентов антибиотического комплекса, образуемого штаммом F-116, представлены в табл. 2. Анализ этих данных с помощью компьютерной базы данных биологически активных веществ программы BNPD [40] позволил заключить, что компоненты основной пептидной фракции (ЛГС-Н и ЛГС-Н¹) являются низинами, причем ЛГС-Н с молекулярной массой 3353 Да абсолютно идентична низину А, два других компонента, включая фунгицидный, в литературе не описаны и являются новыми природными биологически активными веществами [41].

Лантибиотики. Лантибиотики (лантионинсодержащие пептиды) – полициклические молекулы, образующиеся в результате посттрансляционных модификаций белков-предшественников

Таблица 3. Характеристика некоторых лантибиотиков, продуцируемых МКБ [43]

Лантибиотик	Молекулярная масса, Да	Число тиоэфиров	Продуцент
Низин А	3353	5	<i>Lactococcus lactis</i>
Низин Z	3330	5	<i>L. lactis</i>
Лактицин 481	2901	3	<i>L. lactis</i>
Лактоцин S	2764	3	<i>Lactobacillus sake</i>
Карноцин И149	4635	2–3	<i>L. piscicola</i>

и содержащие модифицированные аминокислоты [42]. В их молекулах имеются сульфгидрильные кольца, образованные серосодержащими аминокислотами. Лантибиотики, продуцируемые МКБ, различаются по числу тиоэфирных связей (от 2 до 5) и молекулярным массам (табл. 3) [43].

Низин – наиболее изученный лантибиотик. Он эффективен против многих штаммов грамположительных бактерий, включая стафилококки, стрептококки, бациллы, клостридии и в меньшей степени против микобактерий [44]. Низин при концентрации 0.3 мг/мл способен тормозить прорастание спор бактерий, относящихся к родам *Bacillus* и *Clostridium*, в той же степени, что и термическая обработка [8]. Установлено, что низин взаимодействует с сульфгидрильными группами в мембране споры, тем самым препятствуя ее прорастанию [45, 46].

Дипептидные лантибиотики не выделены в отдельный класс бактериоцинов. Из них наиболее изучены плантарицин W, синтезируемый *Lactobacillus plantarum*, и лактицин 3147, продуцируемый *Lactococcus lactis*. Двухкомпонентный лантибиотик лактицин 3147 обладает относительно широким спектром действия. Он активен против метициллиноустойчивых штаммов *Staphylococcus aureus*, устойчивых к ванкомицину штаммов *Enterococcus faecalis*, устойчивых к пенициллину *Pneumococcus*, а также *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus mutans* и пищевых патогенов: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus cereus* [36]. Лактицин 3147 при концентрации 20000 МЕ/мл полностью подавлял популяцию патогенов численностью более 10⁴ кл. за 2 ч [47]. Оба пептида лактицина 3147, как и плантарицина W обладают бактерицидной активностью, но наибольшая активность наблюдалась при совместном действии этих пептидов в отношении 1 : 1. Плантарицин W содержит немодифицированные остатки аминокислот цистеина и серина, что является единственным примером среди лантибиотиков. Некоторые авторы предлагают выделить эти два бактериоцина в отдельное семейство [48]. Способность синтезировать двухкомпонентные бактериоцины, например саливарицин Р, имеется у многих генетически различных штаммов *Lactobacillus salivarius*, выделенных из кишечника человека. Бактерии *L. salivarius* включаются в состав пробиотических средств, так как саливарицин Р способствует снижению количества бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, не оказывая эффекта на общую численность лактобацилл в кишечнике [49].

Биосинтез и формирование зрелых молекул лантибиотиков. Лантибиотики синтезируются на рибосомах в виде пептидов–предшественников и подвергаются интенсивной посттрансляционной модификации [50]. Синтез лантибиотиков можно разделить на несколько основных этапов [51]:

1) рибосомальный синтез; 2) дегидратация серина и треонина с образованием 2,3-дегидроаланина и (Z)-2,3-дегидробутирина соответственно; 3) стереоселективное присоединение цистеина к дегидроаланину и дегидробутирину с образованием тиоэфирных колец лантионина (Лан) и β-метиллантионина (МетЛан) соответственно; 4) экспорт полностью модифицированного предшественника с помощью АВС-транспортера; 5) протеолитическое отщепление лидерного пептида [52].

На рис. 3 представлена схема биосинтеза низина [53]. Фермент NisA связывает N-конец, который называют лидерным пептидом. NisB и NisC катализируют формирование лактама: NisB является дегидратазой, действующей на серин и треонин, NisC – циклаза, формирующая все тиоэфирные кольца [54, 55]. Лантиониновые мостики, формирующие кольцевые структуры, служат в качестве стабилизаторов конформации, важной для биологической активности и устойчивости антибиотиков к протеазам. Удаление лидерного пептида из препептида катализируется ферментом NisP и является последней стадией процессинга [56]. Лидерный пептид имеет консервативную последовательность из 24–30 аминокислотных остатков и необходим для специфической доставки молекулы-предшественника, а также предотвращения активации внутри клетки [42].

В процессе созревания лактицина 481 фермент LctM катализирует обе реакции модификации препептида: дегидратацию серина и треонина и образование трех тиоэфирных циклов. Лидерный пептид отщепляется N-концевым доменом LctT (АВС-транспортера), который и экскретирует зрелый продукт. Конверсия препептидов антибиотиков в зрелые молекулы требует энергии АТФ и Mg^{2+} [57].

Гены биосинтеза антибиотиков организованы в кластеры. Помимо структурных генов пептидов имеются дополнительные гены, важные для проявления активности бактериоцинов. Эти гены кодируют [51]:

- 1) ферменты, которые включены в ряд модификаций: LanC катализирует дегидратацию серина и треонина, а LanB ответственен за формирование тиоэфирных связей между дегидрированными аминокислотами и цистеином;
- 2) белки для выделения препептида из клетки – LanT;
- 3) иммунные белки, включенные в самозащиту – LanI;
- 4) сериновую протеазу LanP, которая удаляет лидирующую последовательность при выделении антибиотика;
- 5) другие регулирующие белки.

Синтез молекул антибиотиков обеспечивается структурным геном *lan*. Во многих случаях *lanA* является первым геном в опероне и кодирует молекулу-предшественник [42]. Гены, ответственные за модификацию (*lanB*, *lanC*, *lanM*, *lanD* и *lanJ*), процессинг (*lanP* и *lanT*), транспорт (*lanT*), иммунитет (*lanI*, *lanEFG* и *lanH*) и регуляцию (*lanR*, *lanK*, *lanQ* и *lanX*), локализованы рядом со структурным геном. Участвующие в синтезе и регуляции бактериоцинов кластеры могут располагаться как на хромосоме, так и на плаزمиде. Как правило, гены сенсорных и регуляторных белков транскрибируются совместно. В локусах, связанных с синтезом антибиотиков, как правило, ген сенсорного белка следует за регуляторными генами. На рис. 4 приведены генные кластеры низина и лактицина 481 [51].

Транскрипция структурного гена *nisA* непосредственно регулируется секретлируемой и полностью модифицированной молекулой низина посредством передачи сигнала двухкомпонентной регуляторной системой [58]. В данном случае низин является феромоном с антимикробными свойствами [59]. Инициация с промотера гена *nisA* связана с продуктами генов *nisR*, кодирующей ответный регулятор и ген *nisK* – гистидинкиназу [60]. Концентрация низина, требуемая для индукции, менее 14 нг/мл. На первом этапе гистидин-киназа NisK реагирует на присутствие молекул низина в среде и автофосфорилируется в цитозоле. Затем фосфатная группа переносится на NisR, который является белком-активатором транскрипции в синтезе низина. На третьем этапе предшественник модифицируется с помощью ферментов NisB и NisC, после чего транслируется через мембрану АВС-транспортером NisT. Лидерный пептид отщепляется протеазой NisP [53].

Продукция лактицина 481 некоторыми штаммами *L. lactis* регулируется внеклеточным рН. Подкисление среды молочной кислотой стимулирует экспрессию с обоих промотеров [42].

Механизм действия антибиотиков. Бактериоцины молочнокислых бактерий, являясь катионами, действуют на мембраны клеток-мишеней, приводя к образованию пор и рассеиванию трансмембранного градиента ионов [61]. Антибиотики не нуждаются в специфическом белковом рецепторе, так как они связываются в местах синтеза клеточной стенки с липидом II [ундекапринил-пирофосфорил-MurNAc-(пентапептид)-GlcNAc] – веществом, участвующем в синтезе пептидогликана. Липид II – высоко динамичная молекула, присутствующая у всех бактерий и осуществляющая транспорт субъединиц клеточной стенки через цитоплазматическую мембрану [62]. Он представляет собой бактопренолсвязанный предшественник клеточной стенки и состоит из пептидогликановой головки -N-ацетилмурамово-

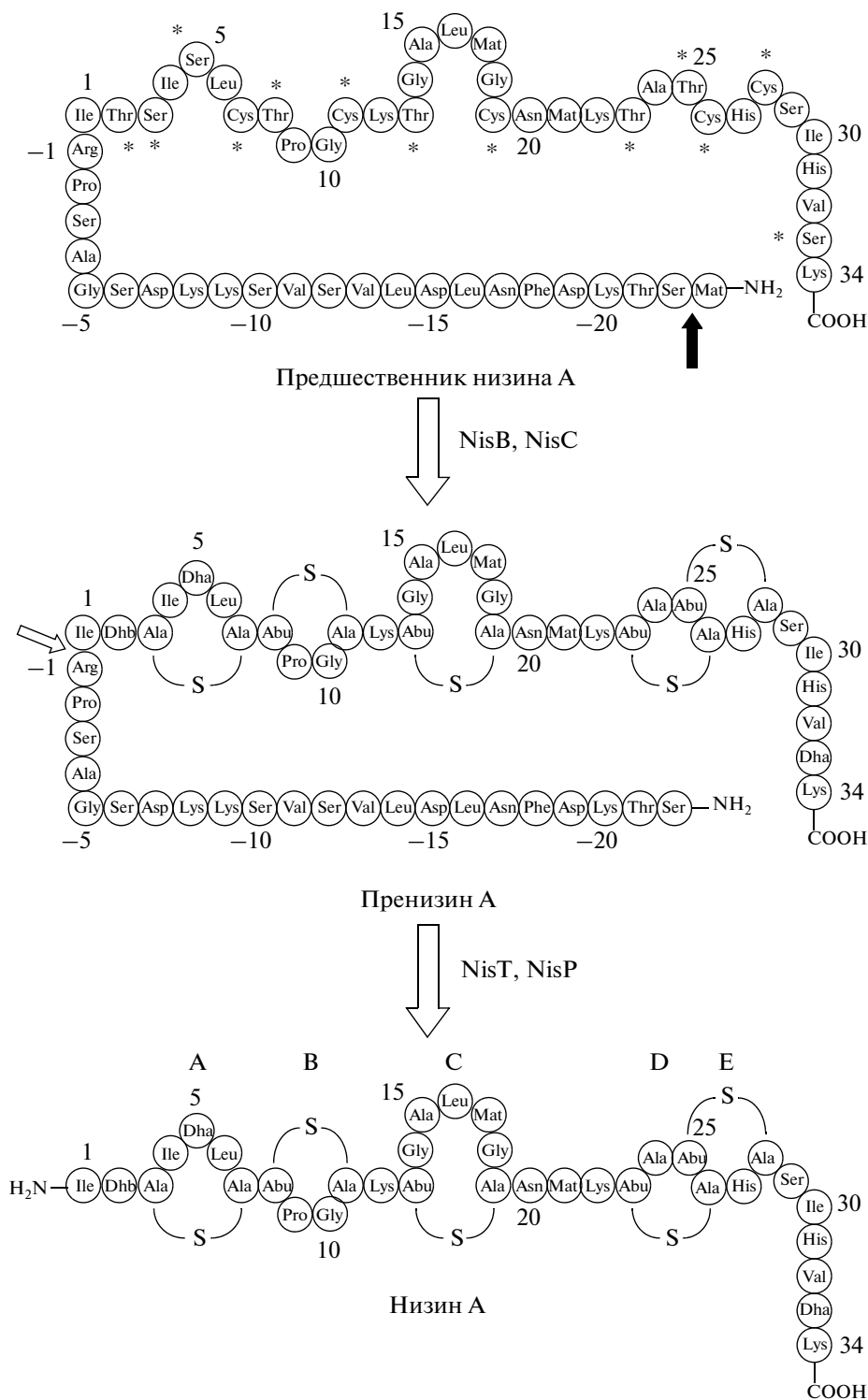


Рис. 3. Схематическое представление биосинтеза низина [53]. NisB – дегидратаза, действующая на серин и треонин; NisC – циклаза, формирующая тиозфирные кольца; LanT – фермент, осуществляющий экспорт полностью модифицированного предшественника; LanP – фермент, ответственный за удаление лидерного пептида от препептида.

го пентапептида (MurNAc), глютамин N-ацетил-глюкозамина (GlcNAc), основного строительного блока клеточной стенки, и пирофосфат(PP)-ун-

декапептильного хвоста, функционирующего как переносчик пептидогликана из цитоплазмы. Липид II составлен из 11 полиизопреновых остат-

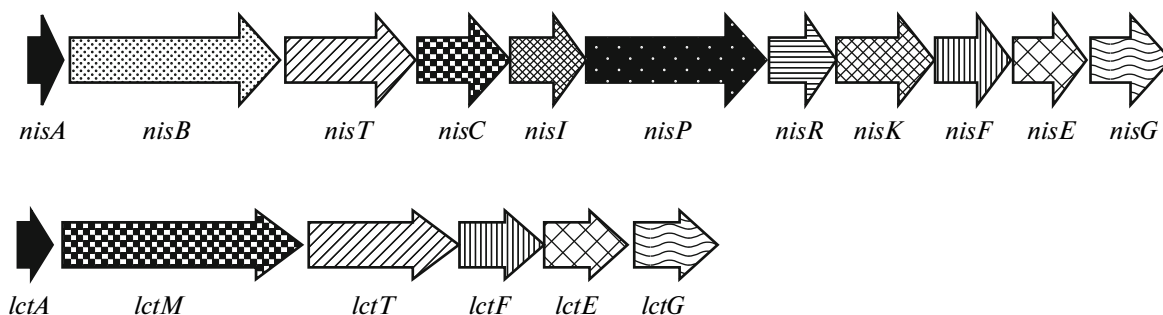


Рис. 4. Генные кластеры низина и лактицина [51] *nisA*, *lctA* – структурные гены низина и лактицина, соответственно; *nisB*, *nisC* – гены, ответственные за модификацию молекул низина; *nisP*, *nisT* – гены, ответственные за процессинг и транспорт низина; *nisI*, *nisEFG* – гены, ответственные за иммунитет к низину клеток-продуцентов; *nisR*, *nisK* – гены, участвующие в регуляции образования. Гены лактицина с идентичными функциями обозначены одинаково.

ков, в котором пирофосфат MurNAc-пентапептид связан с GlcN (глутамин N-ацетилглюкозамин), синтезируется внутри клетки на цитоплазматической мембране через липид I, который представляет собой комплекс УДФ-MurNAc-пентапептид-GlcNAc с ундекапринолфосфатом. Впоследствии липид II проходит к внешней стороне мембраны, а два аминокислота прикрепляются к клеточной стенке. Процесс может повторяться, ундекапринолпирофосфат может транспортироваться назад к внешней стороне мембраны через этап дифосфорилирования ундекапринолпирофосфата и цикл может начаться снова.

Наиболее полно механизм действия лантибиотиков изучен для низина. Имеется два фактора, играющих важную роль при взаимодействии низина с мембраной чувствительных клеток: это наличие отрицательно заряженных липидов в мембране и мембранный потенциал [63, 64], а также толщина клеточной стенки и доступность липида II [65].

На клетку-мишень низин оказывает двойное действие. При связывании с липидом II он блокирует синтез клеточной стенки, а в некоторых случаях может использовать липид II для закрепления в мембране и инициирования образования пор. При высокой концентрации низина поры могут формироваться в отсутствие липида II. В этом случае максимальная активность низина наблюдалась при 50–60%-ном содержании отрицательно заряженных липидов в мембране [66].

На рис. 5 представлена предполагаемая модель действия низина. На начальном этапе низин связывается с пирофосфатом липида II [66–68]. Затем С-конец молекулы переносится через мембрану и оказывается на ее внутренней стороне. На этом этапе наиболее важным является подвижность между кластерами А, В, С и D, Е в молекуле низина. Взаимодействие с липидом II стабилизирует трансмембранную ориентацию пептида, в результате чего формируются стабильные поры диа-

метром 2 нм [69]. В образовании одной поры участвуют 8 молекул низина и 4 молекулы липида II [69, 70].

Разная чувствительность бактерий к низину является следствием различной концентрации липида II в мембране. Известно, что у *E. coli* содержание этой молекулы существенно ниже (2×10^3 молекул на клетку), в то время как у *Micrococcus flavus* – 1×10^5 . В целом, бактериоцины I класса используют липид II в качестве связующего звена для специфического мембранного прикрепления [71].

Лантибиотики со схожей структурой А и В колец имеют липид II-зависимый механизм действия [62]. В частности, мерсацидин и актагардин (лантибиотики типа В) также формируют комплекс с липидом II, но связывание блокирует только включение липида II в пептидогликан, что приводит к медленному лизису клетки [72]. Предполагают, что мерсацидин блокирует синтез пептидогликана на уровне трансгликозилирования, но в этом случае поры в мембране не образуются [42].

Микроорганизмы–продуценты бактериоцинов имеют систему защиты от своих собственных продуктов с помощью экспрессии генов иммунных белков. Чувствительность продуцента варьирует и зависит от уровня продукции бактериоцина [73]. Иммунные белки проявляют значительную вариабельность: у практически одинаковых бактериоцинов могут быть абсолютно разные иммунные белки. Для низина известен NisI – белок с липопротеиновой сигнальной последовательностью, кодируемый геном *nisI* в опероне биосинтеза низина. Белок NisI прикрепляется к внешней поверхности мембраны клетки-продуцента, где связывает низин, уменьшая его локальную концентрацию [42].

Свойства и биосинтез бактериоцинов II класса. Ко второму классу бактериоцинов относятся немодифицированные пептиды, которые подразделяются на три подкласса. К подклассу IIa отно-

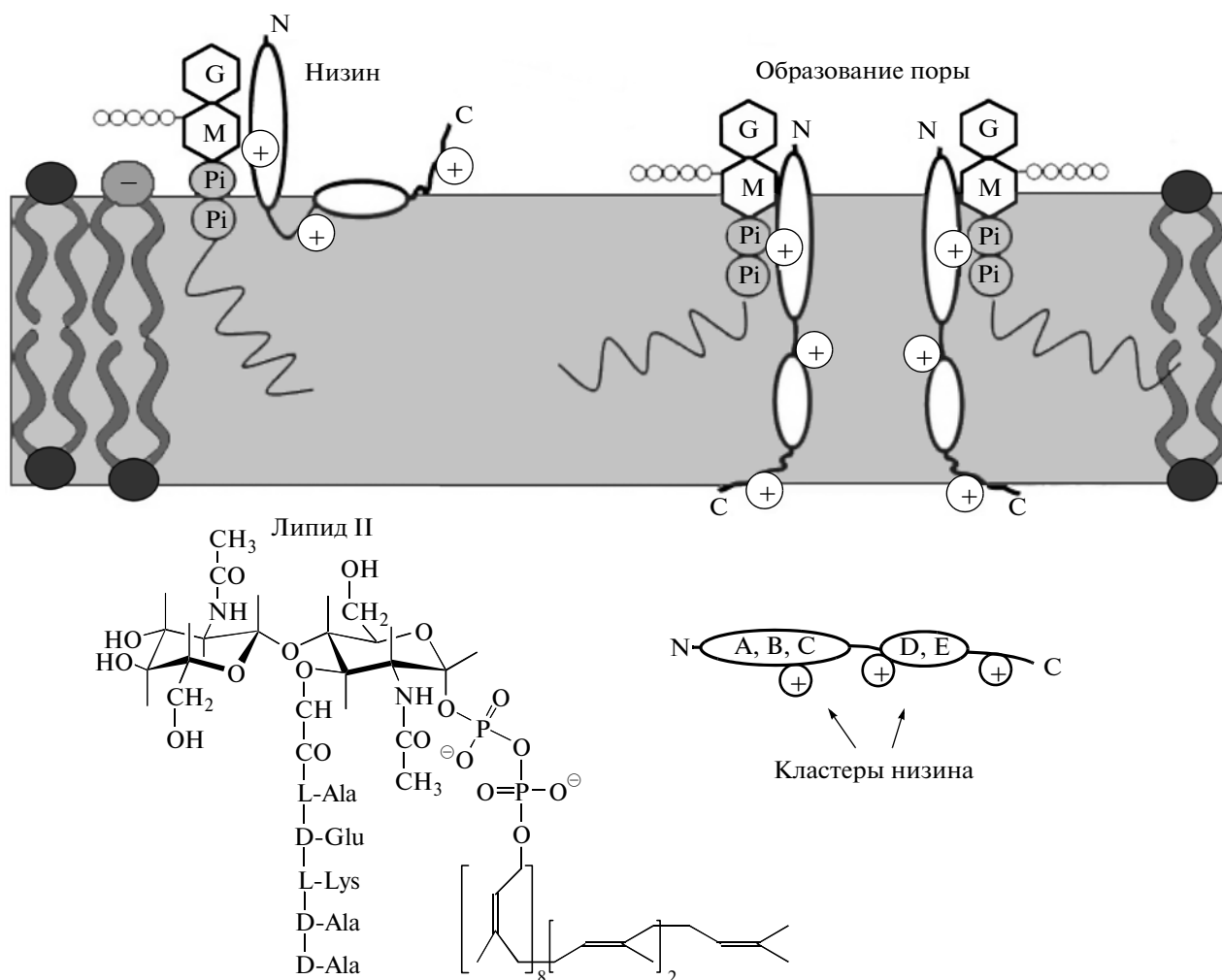


Рис. 5. Модель липид II-зависимого образования пор низином [66].

G – глутамин N-ацетилглюкозаамин; M – N-ацетилмурамовый пентапептид.

сятся педиоцинподобные бактериоцины, в Пб подкласс входят дипептидные бактериоцины, а подкласс Пс включает в себя бактериоцины, имеющие циклическое строение. В табл. 4 приведены основные бактериоцины Па и Пб подклассов и их продуценты. Эти бактериоцины различаются по молекулярным массам [74–99].

Многие из этих пептидов стабильны при низких значениях pH и ингибируют рост грамположительных бактерий, вызывающих порчу пищевых продуктов, таких, как: *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*. Так, например, лактицин Q, образуемый штаммом *L. lactis* subsp. *lactis* QU 5, по спектру антимикробного действия подобен низину А, но отличается стабильностью в щелочных условиях [38] и большей эффективностью в отношении многих грамположительных бактерий, в то время как лактококцины А, Q и лактококцин 972 ингибиру-

ют рост только некоторых штаммов лактококков [100].

Все бактериоцины Па подкласса являются катионными пептидами, состоящими из двух структурных единиц: высоко консервативного N-конца с характерной последовательностью Тир-Гли-Асп-Гли-Вал и менее консервативного С-концевого домена [101]. N-конец образует три антипараллельных β -слоя, поддерживаемых дисульфидными мостиками, С-конец формирует одну или две амфифильных α -спирали. Положительно заряженные аминокислоты, необходимые для взаимодействия с мембраной, у бактериоцинов второго класса локализованы, главным образом, на гидрофильном N-конце. С-конец бактериоцина участвует в определении его специфичности и внедрении в мембрану, а гидрофильные β -складки N-конца прикрепляются к поверхности мембраны [31].

Таблица 4. Бактериоцины II класса и их продуценты

Бактериоцины IIa подкласса			
Бактериоцин	Продуцент	Молекулярная масса, Da	Ссылка
Сакацин А	<i>Lactobacillus sakei</i> Lb 706	4300	[74]
Сакацин 674	<i>L. sake</i> Lb764	4437	[75]
Лактицин Q	<i>Lactococcus lactis</i> QU 5	5926	[38]
Лактококцин А	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG 2130	5778	[76]
Лактококцин 972	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> IPLA 972	7500	[77]
Лактококцин DR	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ADRIA 85L030	3400	[78]
Карнобактериоцин А	<i>Carnobacterium piscicola</i> LV17A	5052	[79]
Карнобактериоцин В2	<i>C. piscicola</i> LV17	4969	[80]
Курвацин А	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174	4309	[81]
Диверцин V41	<i>Carnobacterium divergens</i>	4509	[82]
Дивергицин M35	<i>C. divergens</i> M35	4518	[83]
Лактококцин MMFII	<i>L. lactis</i> MMFII	4144	[84]
Лейкоцин А	<i>Leuconostoc gelidum</i> UAL 187	3930	[85]
Мезентериоцин Y105	<i>L. mesenteroides</i> Y105	3446	[86]
Плантариоцин 423	<i>Lactobacillus plantarum</i> 423	3500	[87]
Педиоцин PA-1	<i>Pediococcus acidilactici</i> PAC 1.0	4629	[88]
Педиоцин AcH	<i>P. acidilactici</i> AcH	4628	[89]
Сакацин G	<i>Lactobacillus sake</i> 2512	3834	[90]
Бактериоцины IIb подкласса			
Лактококцин G	<i>L. lactis</i> LMGT2081	4346; 4110	[91]
Лактококцин MN	<i>L. lactis</i> 9B4	4325; 4377	[51]
Лактококцин Q	<i>L. lactis</i> QU 4	4260; 4018	[92]
Плантариоцин E/F	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11	2687; 2758	[93]
Плантариоцин J/K	<i>L. plantarum</i> C11	2921; 3508	[94]
Плантариоцин NC8	<i>L. plantarum</i> NC8	3587; 4000	[95]
Лактацин F	<i>Lactobacillus johnsonii</i> VPI11088	2500; –	[96]
Лактооцин 705	<i>Lactobacillus casei</i> CRL 705	3357; –	[97]
Термофилин 13	<i>Streptococcus thermophilus</i> Sfi13	5776; 3910	[98]
Лейкоцин H	<i>Leuconostoc</i> MF215B	–*	[99]

* Молекулярная масса не определена из-за непостоянства аминокислотного состава пептида.

Структурные гены многих бактериоцинов, не содержащих лантионина, расположены на плазмидах, за исключением диверцина V41 [102], сакацина P и карнобактериоцина B2 [103]. В некоторых случаях одна плазмида может нести гены синтеза нескольких бактериоцинов как, например, плазмида p9B4-6, кодирующая лактококцины А, В и М и соответствующие иммунные белки. В противоположность этому, разные отдельные плазмиды, находящиеся в разных штаммах, могут кодировать один бактериоцин. Например, для лактококцина А имеются три различные плазмиды у двух подвидов *L. lactis* subsp. *lactis*. Гены обычно организованы в один или несколько опе-

ронов. В педиоцине PA-1, плантариоцине 423 все 4 гена, необходимые для биосинтеза, локализованы в одном опероне. В других случаях гены распределены по нескольким оперонам, где один оперон несет структурные гены и гены иммунности, второй – гены секреции, третий – регуляции биосинтеза [31].

Бактериоцины IIa подкласса синтезируются в виде предшественников с сигнальной последовательностью. Молекулы препептидов идентичны у сакацина А и курвацина А, лантибиотика лактицина 481 и лактококцина DR, сакацина 674 и сакацина P. Предполагают, что препептид направляет полипептид в сес-зависимый путь экскреции, ко-

торый включает также стабилизацию препептида в процессе трансляции, сохранение молекулы в неактивном состоянии и участие в транслокации [51]. Бактериоцины I и II класса секретируются с помощью ABC-транспортера [34].

Сравнительно недавно были идентифицированы дипептидные бактериоцины IIb подкласса. Свойства генетически и биохимически охарактеризованных бактериоцинов этого подкласса представлены в табл. 4.

Бактериоцины IIb подкласса имеют много общих черт с бактериоцинами IIa подкласса. В частности, они тоже являются катионами и имеют гидрофобную или амфифильную область в молекуле. Как правило, оба пептида действуют синергидно. Однако отдельные пептиды лактацина F и плантарицина E/F и J/K могут проявлять антимикробную активность, но в гораздо меньшей степени [104]. Известно, что в лактоцине 705 за антибактериальную активность отвечает один пептид, в то время как второй пептид, молекулярная масса которого не определена из-за непостоянства его аминокислотного состава, участвует в распознавании рецептора на мембране клетки-мишени [105]. Гены, ответственные за синтез отдельных пептидов двухпептидных бактериоцинов, располагаются друг за другом в одном опероне, и к каждому бактериоцину имеется только один ген иммунного белка, что говорит о том, что оба пептида функционируют как единый комплекс [103]. Кроме того, установлено, что между кластерными пептидами лактококцина G, плантарицинов E/F и J/K при атаке на клетку происходят прямые физические взаимодействия [106].

Для регуляции продукции бактериоцинов второго класса используется система кворумсенсинга. Она состоит из трех компонентов и соответственно выражается в трехкомпонентной регуляторной системе: феромона пептидной природы, трансмембранного белка – гистидинкиназы (рецептора феромона) и ответного белка цитозоля. Показано, что синтез термофилина 13 бактериями *Streptococcus thermophilus* LMD-9 и плантарицинов, образуемых штаммами *L. plantarum* C11, E/F и J/K, зависит от фазы роста и концентрации индуцирующего фактора, феромона [107].

Механизм действия бактериоцинов II класса. Предполагаемой молекулой-рецептором для бактериоцинов IIa подкласса является переносчик маннозы $E\text{II}_{\text{I}}^{\text{Man}}$ [108]. Белок $E\text{II}_{\text{I}}^{\text{Man}}$ принадлежит к фосфотрансферазной системе (ФТС) и кодируется *prt* опероном. ФТС отвечает за транспорт и фосфорилирование сахара внутри клетки как у грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. ФТС-пермеаза маннозного семейства состоит из четырех доменов IIА, IIВ, IIС, и IID. Цитоплазматические домены IIА и IIВ участвуют в фосфорилировании, а мембранные IIС и IID –

в транспорте. Субъединицы IIС и IID, находящиеся в мембране, являются мишенями для бактериоцинов второго класса [31]. N-конец бактериоцина отвечает за связывание с мембраной клеток-мишени посредством электростатических взаимодействий, тогда как триптофансодержащий участок С-конца – за проникновение бактериоцина в мембрану [109]. Для лактококцина А, продуцируемого *L. lactis* subsp. *lactis*, доказано, что присутствие мембранных компонентов IIС и IID достаточно для проявления чувствительности [107]. Предполагаемая модель действия лактококцина А и механизм защиты от него показан на рис. 6.

Согласно этой схеме бактериоцин взаимодействует с IIС и IID компонентами ман-ФТС как с рецептором клеточной поверхности (рис. 6, А; положение 1 и 2). После связывания бактериоцин усиливает проницаемость мембраны (состояние 3), что и приводит к гибели клетки. Вероятно, пора в мембране образуется за счет олигомеризации молекул бактериоцина либо за счет разрушения маннозо-ФТС комплекса.

В иммунных клетках, не продуцирующих бактериоцин, иммунный белок не связан с маннозо-ФТС (рис. 6, Б; положение 1'). В клетках, продуцирующих бактериоцин, иммунные белки прочно связаны с рецепторными белками (IIС и IID) для защиты их от гибели [107]. Эта модель возможна также для лактококцина В и некоторых педиоцинподобных бактериоцинов.

Механизм действия лактококцина Q отличается от действия бактериоцинов IIa подкласса. Для проявления его действия не нужно присутствие молекулы рецептора на плазматической мембране. Предполагается, что лактококцин Q электростатически связывается с отрицательно заряженной мембраной бактериальной клетки, после чего встраивается в нее, образуя поры [110].

Дипептидные бактериоцины IIb класса усиливают проницаемость клеточной мембраны для ионов за счет образования пор, в которые включаются оба пептида [111, 112]. Причем каждый бактериоцин образует поры, проницаемые только для определенного типа ионов. Так, лактококцин G усиливает проницаемость для многих моновалентных катионов и холина за исключением H^+ , а плантарицины E/F и J/K делают мембрану проницаемой для всех моновалентных катионов, включая и H^+ [113].

В связи с тем, что бактериоцины МКБ, относящиеся ко II классу, обладают высокой антибиотической активностью в отношении патогенов *Listeria innocua* и *L. monocytogenes*, развивающихся в продуктах питания и пищевом сырье в процессе длительного хранения, они перспективны для применения в качестве биоконсервантов [114]. Среди таких бактериоцинов известны курвацин А [81], диверцин V41 [82], лактоцин MMFII [84],

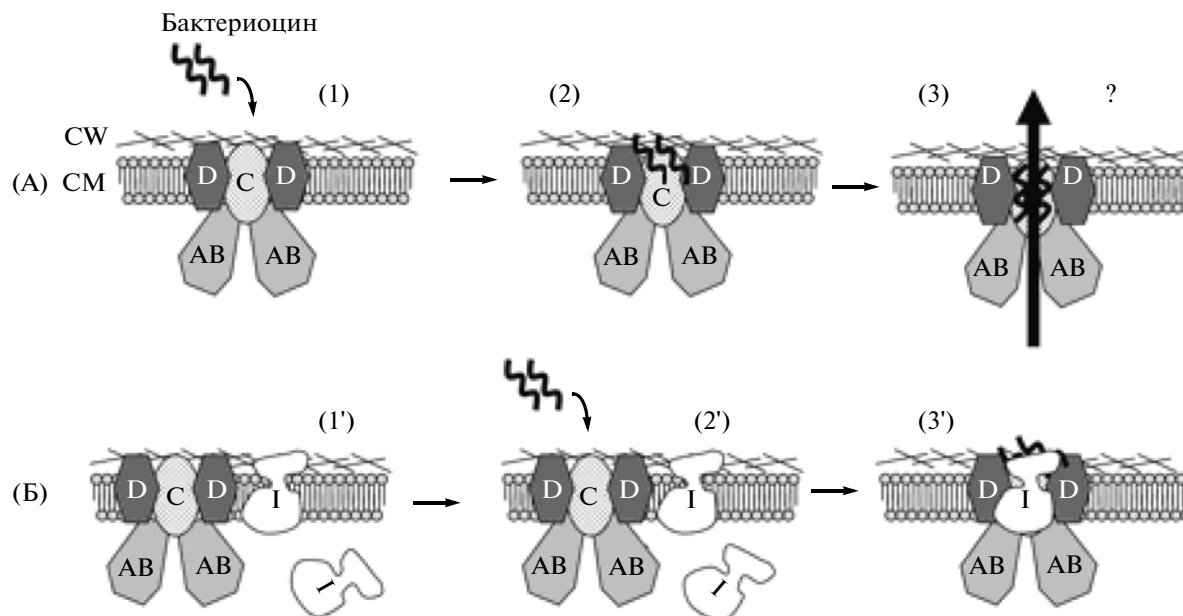


Рис. 6. Модель действия на клетку-мишень и иммунитет для лактококцина А [83]. А – бактериоцин взаимодействует с рецепторными белками клеточной поверхности (А-D) – компонентами ман-ФТС (положение 1 и 2). После связывания бактериоцин усиливает проницаемость мембраны (3), что и приводит к клеточной гибели. Пора образуется за счет олигомеризации молекул бактериоцина либо за счет разрушения манн-ФТС комплекса.

Б – в иммунных клетках, не продуцирующих бактериоцин, иммунный белок не связан с маннозо-ФТС (положение 1'); в клетках, продуцирующих бактериоцин, иммунные белки прочно связаны с рецепторными белками (А-D) для защиты от гибели.

Единицы ман-ФТС показаны в стехиометрическом соотношении 2 : 1 : 2 для АВ:С:D. CW – клеточная стенка; CM – цитоплазматическая мембрана.

лейкоцин А [85], плантарицин 423 [87], педиоцины РА-1 и АсН [114, 115, 116], сакацины Р и G [75, 90].

В настоящее время резко возрос интерес исследователей к МКБ, которые из-за своей безопасности, высокой ферментативной и антимикробной активности являются объектом фундаментальных исследований по созданию новых активных пробиотиков и разнообразных антимикробных препаратов с консервирующим эффектом.

МКБ являются продуцентами широкого круга антимикробных метаболитов, относящихся к разным классам химических веществ. Наиболее хорошо изучена группа бактериоцинов, так как бактериоцины вследствие их нетоксичности наиболее перспективны в качестве кандидатов для развития нового поколения антибиотических препаратов с пробиотическими свойствами [27, 117, 118]. В связи с тем, что МКБ имеют “GRAS” статус, их бактериоцины востребованы промышленностью как безопасные и специфичные био-консерванты [119, 120]. Многие бактериоцины этой группы бактерий успешно зарекомендовали

себя в качестве биоконсервантов для мясных продуктов, рыбы, кисломолочных продуктов, овощей и фруктов [121, 122]. Основные направления более эффективного использования бактериоцинов с целью увеличения сроков годности пищевых продуктов заключаются в использовании их смесей, включения бактериоцинов в упаковочные материалы, сочетание их с другими консервантами. Эффективность бактериоцинов определяется активностью их продуцентов. Для этого проводят скрининг природных высокопродуктивных штаммов из различных субстратов, используют различные генетические методы, включая методы клеточной инженерии [18, 20, 123–127].

С другой стороны, возможно применение бактериоцинов в медицине в качестве альтернативных антибиотиков [128, 129].

Между разными классами бактериоцинов имеются существенные отличия в строении молекулы, а, следовательно, и в их стабильности, механизме и спектре антимикробного действия. В частности, лантибиотики характеризуются сложным процессом посттрансляционных превращений, которые приводят к формированию лантибиотических мостиков в молекуле, что и обусловли-

вает стабильность пептида во внешней среде и более широкий спектр действия.

Особую научную и практическую ценность представляют синтезируемые МКБ соединения, которые обладают фунгицидным действием. Эта разнородная группа веществ на данный момент изучена недостаточно. Штаммы лактококков, идентифицированные как *L. lactis* subsp. *lactis*, синтезировали вещества, относящиеся к алкилароматическим кетонам, которые и определяют их фунгицидную активность. Многие авторы отмечают возможность использования штаммов МКБ для продления сроков хранения фруктов и овощей, наиболее подверженных порче микроскопическими грибами [12, 13, 23]. Учитывая, что потребность пищевой промышленности, медицины и сельского хозяйства в фунгицидных препаратах растет с каждым годом, а используемые в настоящее время фунгициды (химические препараты) обладают токсичностью для человека и животных, накапливаются в почве и воде, поиск новых фунгицидных веществ среди непатогенных форм микроорганизмов является актуальной проблемой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мечников И.И. Молочные микробы и их польза для здоровья. СПТ: Изд. Зворыкин, 1911. С. 30.
2. Leroy F., Verluyten J., Luc De Vuyst // Int. J. Food Microbiol. 2006. V. 106. P. 270–285.
3. Atanassova M., Choiset Y., Dalgalarondo M., Chobert J., Doussset X., Ivanova I., Haertle T. // Int. J. Food Microbiol. 2003. V. 87. P. 63–73.
4. Albano H., Todorov S., van Reenen C., Hogg T., Dicks L., Teixeira P. // Int. J. Food Microbiol. 2007. V. 116. P. 239–247.
5. Salminen S. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2 Ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1998. P. 14–22.
6. Yang Z., Suomalainen T., Mäyrä-Mäkinen A., Hutunen E. // J. Food Prot. 1997. V. 60. P. 786–790.
7. Lowe D., Arendt E. // J. Inst. Brew. 2004. V. 110. P. 163–180.
8. Jay M., Loessner M., Golden D. // Modern Food Microbiology. 7 Ed. New York: Springer Science Business Media. Inc. 2005. P. 336–339.
9. Sjögren J., Magnusson J., Broberg A., Schnürer A., Kenne L. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 7554–7557.
10. Broberg A., Jacobsson K., Ström K., Schnürer J. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 5547–5552.
11. Magnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J., Schnürer J. // FEMS Microbiol. Let. 2003. V. 219. P. 129–135.
12. Yang E., Chang H. // Int. J. Food Microbiol. 2010. V. 139. P. 56–63.
13. Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobetti M. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. P. 4084–4090.
14. Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 4322–4327.
15. Lertcanawanichakul M. // Walailak J. Sci. Tech. 2005. V. 2. P. 179–187.
16. Roy U., Batish V., Grover S., Neelakantan S. // Int. J. Food Microbiol. 1996. V. 32. P. 27–34.
17. Coallier-Ascan J., Idziac E. // Appl. Environ. Microbiol. 1985. V. 49. P. 163–167.
18. Stoyanova L.G., Ustyugova E.A., Sultimova T.D., Bilanenko E.N., Fedorova G.B., Khatrukha G.S., Netrusov A.I. // Am. J. Agricult. Biol. Sci. 2010. V. 5. P. 477–485.
19. Стоянова Л.Г., Сультимова Т.Д., Ботина С.Г., Нептрусов А.И. // Прикл. биохим. и микробиол. 2006. Т. 42. С. 560–568.
20. Стоянова Л.Г., Федорова Г.Б., Егоров Н.С., Нептрусов А.И., Камруха Г.С. // Прикл. биохим. и микробиол. 2007. Т. 43. № 6. С. 677–684.
21. Rouse S., Harnett D., Vaughan A., D. van Sinderen. // J. Appl. Microbiol. 2008. V. 104. P. 915–923.
22. Sathe S., Nawani N., Dhakephalkar P., Kapadnis B. // J. Appl. Microbiol. 2007. V. 103. P. 2622–2628.
23. Trias R., Bañeras L., Montesinos E., Badosa E. // Int. Microbiol. 2008. V. 11. P. 231–236.
24. Hurst A. // Adv. Appl. Microbiol. 1981. V. 27. P. 85–123.
25. Yanagida F., Chen Y., Shinohara T. // J. Gen. Appl. Microbiol. 2005. V. 52. P. 21–28.
26. Beasley S., Saris P. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 5051–5053.
27. Gillor O., Etzion A., Riley M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 81. P. 591–606.
28. Mulders J., Boerrigter I., Rollema H., Siezen R., de Vos W. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 201. P. 581–584.
29. Kogler H., Bauch M., Fehlhaber M., Griesinger C., Schubert W., Teetz V. Nisin and Novel Lantibiotics / Ed. G. Jung, H.-G. Sahl, Leiden: ESCOM, 1991. P. 113–122.
30. Schmitz S., Hoffmann A., Szekat S., Rudd B., Bierbaum G. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 7270–7277.
31. Drider D., Fimland G., Héchard Y., McMullen M., Prévost H. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2006. V. 70. P. 564–582.
32. Nissen-Meyer J., Oppegard C., Rogne P., Haugen H., Kristiansen P. // Probiotics Antimicrob. Prot. 2010. V. 2. P. 52–60.
33. Joerger R. // Poultry Sci. 2003. V. 82. P. 640.
34. Franz C., van Belcum M., Holzappel W., Abriouel H., Galvez A. // FEMS Microbiol. Rev. 2007. V. 31. P. 293–310.
35. Kwaadsteniet M., Doeschate K., Dicks L. // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. P. 547–549.

36. Morgan S., O'Connor P., Cotter P., Ross R., Hill C. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 49. P. 2606–2611.
37. Martínez B., Böttiger T., Schneider T., Rodríguez A., Sahl H., Wiedemann I. // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 74. P. 4666–4670.
38. Fujita K., Ichimasa S., Zendo T., Koga S., Yoneyama F., Nakayama J., Sonomoto K. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 2871–2877.
39. Sawa N., Zendo T., Kiyofuji J., Fujita K., Himeno K., Nakayama J., Sonomoto K. // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. P. 1552–1558.
40. Berdy J. BNPD, Data Base for Microbial Metabolite Research // Abstr. Int. Conf. Microbial Secondary Metabolism. Interlaken. Suisse. 1994. P. 2.
41. Стоянова Л.Г., Федорова Г.Б., Егоров Н.С., Камруха Г.С., Непрусов А.И. Патент РФ № 2374320. 2009.
42. Willey M., van der Donk W. // Ann. Rev. Microbiol. 2007. V. 61. P. 477–501.
43. Nes I., Diep D., Havarstein L., Holo H. // Antonie Van Leeuwenhoek. 1996. V. 70. P. 113–128.
44. Mota-Meira M., Lapointe G., Lacroix C., Lavoie M. // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. P. 24–29.
45. Pol I., van Arendonk W., Mastwijk H., Krommer J., Smid E.J., Moezelaar R. // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. P. 1693–1699.
46. Gut I., Prouty A., Ballard J., van der Donk W., Blanke S. // Antimicrob. Agents Chemother. 2008. V. 52. P. 4281–4288.
47. Ross R., Galvin M., McAuliffe O., Morgan S., Ryan M., Twomey D., Meaney W., Hill C. // Antonie Van Leeuwenhoek. 1999. V. 76. P. 337–346.
48. Holo H., Jeknic Z., Daeschel M., Stevanovic S., Nes I. // Microbiology. 2001. V. 147. P. 643–651.
49. Barrett E., Hayes M., O'Connor P., Gardiner G., Fitzgerald G., Stanton C., Ross P., Hill C. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 3719–3723.
50. McAuliffe O., Ross R., Hill C. // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 25. P. 285–308.
51. Jack R., Tagg J., Ray B. // Microbiol. Mol. Biol. Reviews. 1995. V. 59. P. 171–200.
52. Li B., Paul J., van der Donk W., Nair S. // Science. 2006. V. 311. P. 1464–1467.
53. Kuipers O., Beerthuyzen M., de Ruyter B., Luesink E., de Vos M. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 27299–27304.
54. Koponen O., Tolonen M., Qiao M., Wahlström G., Helin J., Saris P. // Microbiology. 2002. V. 148. P. 3561–3568.
55. Li B., van der Donk W. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 21169–21175.
56. Котельникова Е.А., Гельфанд М.С. // Генетика. 2002. Т. 38. С. 758–772.
57. Xie L., Miller, Chatterjee C., Averin O., Kelleher N., van der Donk W. // Science. 2004. V. 303. P. 679–681.
58. Kleerebezem M., Quadri L., Kuipers O., de Vos W. // Mol. Microbiol. 1997. V. 24. P. 895–904.
59. Turovskiy E., Kashtanov D., Paskhover B., Chikindas M.L. // Adv. Appl. Microbiol. 2007. V. 62. P. 191–234.
60. Pascalle G. de Ruyter., Kuipers O., de Vos M. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 3662–3667.
61. Nagao J., Assaduzzaman S., Asso Y., Okuda K., Nakayama J., Sonomoto K. // J. Biosci. Bioeng. 2006. V. 102. P. 139–149.
62. Hester E., Kramer N., Smith J., Hillman D., Zachariah C., Kuipper O. // Science. 2006. V. 313. P. 1636–1637.
63. Breukink E., van Craaij C., Demel R., Siezen R., Kuipers O., Kruijff B. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 6968–6976.
64. Montville T.J., Chen Y. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 50. P. 511–519.
65. Breukink E., Wiedemann I., van Kraaij C., Kuipers O., Sahe H. // Science. 1999. V. 286. P. 2361–2363.
66. Wiedemann I., Breukink E., van Craaij C., Kuipers O., Bierbaum G., de Kruijff B., Sahl H. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 1772–1779.
67. Bonev B., Breurir E., Swiezewska E., de Kruijff B., Watts A. // FASEB J. 2004. P. 1862–1869.
68. Hsu S., Breukink E., Tischenko E., Lutters M., de Kruijff B., Kaptein R., Bonvin A., van Nuland N. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2004. V. 11. P. 963–967.
69. Hasper H., Kruijff B., Breukink E. // Biochemistry. 2004. V. 43. P. 11567–11575.
70. Wiedemann I., Benz R., Sahl H. // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 3259–3261.
71. Bonelli R., Schneider T., Sahl G., Wiedemann I. // Antimicrob. Agents Chemother. 2006. V. 50. P. 1449–1457.
72. Wiedemann I., Böttiger T., Bonelli R., Schneide T., Sahl H., Martínez B. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 2809–2814.
73. Fimland G., Eijsink, Nissen-Meyer J. // Microbiology. 2002. V. 148. P. 3661–3670.
74. Holck A., Axelsson L., Birkeland S.E., Aukrust T., Blom H. 1992. // J. Gen. Microbiol. V. 138. P. 2715–2720.
75. Holck A., Axelsson L., Hühne K., Kröckel L. // F. Microbiol. Lett. 1994. V. 115. P. 143–149.
76. Holo H., Nilsen Q., Nes I.F. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 3879–3887.
77. Martinez B., Suarez J.E., Rodriguez A. // Microbiology. 1996. V. 142. P. 2393–2398.
78. Rince A., Le Pogam S., Thuault D., Bourgeois C.M., Le Pennec J.P. // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. P. 1652–1657.
79. Worobo R., Henkel T., Sailer M., Roy K., Vederas J., Stiles M. // Microbiology. 1994. V. 140. P. 517–526.
80. Quadri L., Sailer M., Ron K.L., Vederass J.C., Stiles M. 1994. // J. Biol. Chem. V. 269. P. 12204–12211.
81. Tiejaczek P.S., Vogel R.F., Hammes W.P. 1993. // Arch. Microbiol. V. 160. P. 279–283.

82. *Métivier A., Pilet M., Dousset X., Sorokine O., Anglade P., Zagorec M., Piard J., Marion D., Cenatiempo Y., Frémaux E.* // *Microbiology*. 1998. V. 144. P. 2837–2844.
83. *Tahiri I., Desbiens M., Benech R., Kheadr E., Lacroix C., Thibault S., Ouellet D., Fliss I.* // *Int. J. Food Microbiol.* 2004. V. 97. P. 123–136.
84. *Ferchichi M., Frère J., Mabrouk K., Manai M.* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2001. V. 205. P. 49–55.
85. *Hastings J., Sailer M., Johnson K., Roy K., Vederas J., Stiles M.* // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. P. 7491–7500.
86. *Hechard Y., Berjeaud J.M., Cenatiempo Y.* // *Curr. Microbiol.* 1999. V. 39. P. 265–269.
87. *Van Reenen C., Dicks L., Chikindas M.* // *J. Appl. Microbiol.* 1998. V. 84. P. 1131–1137.
88. *Henderson J., Chopko A., Dick van Wassenaar P.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1992. V. 295. P. 5–12.
89. *Motlagh A., Bhunia A., Szostek F., Hansen T.R., Johnson M.C., Ray B.* // *Lett. Appl. Microbiol.* 1992. V. 15. P. 45–48.
90. *Simon L., Fremaux C., Cenatiempo Y., Berjeaud J.M.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 6416–6420.
91. *Nissen-Meyer J., Holo H., Håvarstein L.S., Sletten K., Nes I.F.* // *J. Bacteriol.* 1992. V. 174. P. 5686–92.
92. *Zendo T., Yoneyama F., Sonomoto K.* // *Appl. Microbiol. Biotech.* 2010. V. 88. P. 1–9.
93. *Nissen-Meyer J., Larsen A.G., Sletten K., Daeschel M., Nes I.F.* // *J. Gen. Microbiol.* 1993. V. 139. P. 1973–1978.
94. *Diep D.B., Havarstein L.S., Nes I.F.* // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. P. 4472–4483.
95. *Maldonado A., Ruiz-Barba J., Jiménez-Díaz R.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 383–389.
96. *Muriana P.M., Klaenhammer T.R.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57. P. 114–121.
97. *Palacios J., Vignolo G., Farias M.E., de Ruis Holgado A.R., Oliver G., Sesma F.* // *Microbiol. Res.* 1999. V. 154. P. 199–204.
98. *Marciset O., Jeronimus-Stratingh M.C., Mollet B., Poolman B.* // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 14277–14284.
99. *Blom H., Katla T., Holck A., Sletten K., Axelsson L., Holo H.* // *Curr. Microbiol.* 1999. V. 39. P. 43–48.
100. *Zendo T., Koga S., Shigeri Y., Nakayama J., Sonomoto K.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72. P. 3383–3389.
101. *Papagianni M., Anastasiadou S.* // *Microb. Cell Fact.* 2009. V. 8. P. 3–9.
102. *Hühne K., Axelsson L., Holck A., Kröckel A.* // *Microbiology*. 1996. V. 142. P. 1437–1448.
103. *Oppegård C., Rogne P., Emanuelsen L., Kristiansen E., Fimland G., Nissen-Meyer J.* // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 13. P. 210–219.
104. *Anderssen E., Diep D., Nes I., Eijsink V., Nissen-Meyer J.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. P. 2269–2272.
105. *Cuozzo S., Castellano P., Sesma F., Vignolo G., Raya R.* // *Curr. Microbiol.* 2003. V. 46. P. 180–183.
106. *Hauge H., Mantzilas D., Eijsink V., Nissen-Meyer J.* // *J. Bacteriology*. 1998. V. 181. P. 740–747.
107. *Diep D., Skaugen M., Salehian Z., Holo H., Nes I.* // *Microbiology*. 2007. V. 104. P. 2384–2389.
108. *Dalet K., Cenatiempo Y., Cossart P., Héchard Y.* // *Microbiology*. 2001. V. 147. P. 3263–3269.
109. *Miller K., Schamber R., Osmanagaoglu O., Ray B.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. P. 1997–2005.
110. *Yoneyama F., Imura Y., Ichimasa S., Fujita K., Zendo T., Nakayama S., Matsuzaki K., Sonomoto K.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 538–541.
111. *Garneau S., Martin N., Vederas J.* // *Biochimie*. 2002. V. 84. P. 577–92.
112. *Héchard Y., Sahl H.* // *Biochimie*. 2002. V. 84. P. 545–57.
113. *Moll G., van den Akker E., Hauge H., Nissen-Meyer J., Nes I., Konings W., Driessen A.* // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 4848–52.
114. *Hugas M., Pages F., Garriga M., Monfor J.* // *Food Microbiol.* 1998. V. 15. P. 639–650.
115. *Chikindas M., Garcia-Garcera M., Driessen A., Ledebøer A., Nissen-Meyer J., Nes I., Abee T., Konings W., Venema G.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 59. P. 3577–3584.
116. *Biswas S., Ray P., Johnson M., Ray B.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57. P. 1265–1267.
117. *Cleveland J., Montville T., Nes I., Chikindas M.* // *Int. J. Food Microbiol.* 2001. V. 50. P. 131–149.
118. *Millette M., Cornut G., Dupont C., Shareck F., Archambault D., Lacroix M.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 1997–2003.
119. *Lauková A., Czikková S.* // *J. Appl. Microbiol.* 1999. V. 87. P. 182–186.
120. *De Vuyst L., Leroy F.* // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 13. P. 194–199.
121. *Cotter P., Hill C., Ross R.* // *Curr. Protein. Pept. Sci.* 2005. V. 6. P. 61–75.
122. *Galvez A., Lopez R., Abriouel H., Valdivia E., Omar N.* // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2008. V. 28. P. 125–52.
123. *Ming X., Weber G., Ayres J., Sandine W.* // *J. Food Sci.* 1997. V. 62. P. 413–415.
124. *Natrajan N., Sheldon B.* // *J. Food Prot.* 2000. V. 63. P. 1189–1196.
125. *Brumfitt W., Salton M., Hamilton-Miller J.* // *J. Antimicrob. Agents Chem.* 2002. V. 50. P. 731–734.
126. *Стоянова Л.Г., Егоров Н.С.* // *Микробиология*. 1998. Т. 67. С. 38–44.
127. *Стоянова Л.Г., Егоров Н.С.* // *Микробиология*. 1999. Т. 68. С. 235–240.
128. *Wu J., Hu S., Cao L.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. V. 51. P. 3131–3135.
129. *Lay C., Akerey B., Fliss I., Sibirade M., Rouabhia M.* // *J. Appl. Microbiol.* 2008. V. 105. P. 1630–1639.

Antibacterial Metabolites of Lactic Acid Bacteria: Their Diversity and Properties

L. G. Stoyanova, E. A. Ustyugova, and A. I. Netrusov

Biology Department, Moscow State University, Moscow, Russia

e-mail: stoyanovamsu@mail.ru

Received June 16, 2011

Abstract—The review is devoted to literature data on antimicrobial metabolites produced by lactic acid bacteria (LAB), which have long been used for the preparation of cultured dairy products. This paper summarizes data on low-molecular-weight antimicrobial substances, which are primary products or by-products of lactic fermentation. Individual sections are devoted to a variety of antifungal agents and bacteriocins produced by LAB; their potential use as food preservatives has been discussed. The characteristics and classification of bacteriocins are presented in a greater detail; their synthesis and mechanism of action are described using the example of nisin A, which belongs to class I lantibiotics synthesized by the bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. The mechanism of action of class II bacteriocins has been demonstrated with lacticin. Prospective directions for using LAB antimicrobial metabolites in industry and medicine are discussed in the Conclusion.

UDC 632.938

THE INVOLVEMENT OF *Pseudomonas* BACTERIA IN INDUCED SYSTEMIC RESISTANCE IN PLANTS (REVIEW)

© 2012 U. Jankiewicz, M. Kołtonowicz

Department of Biochemistry, Warsaw University of Life Sciences, 02-776 Warsaw, Poland
e-mail: urszula_jankiewicz@sggw.pl, marzenicakol@o2.pl

Received May 24, 2011

This article reviews the most recent results of studies on the mechanism of induced systemic resistance (ISR) elicited in plants by non-pathogenic bacteria of the genus *Pseudomonas*. Several examples of *Pseudomonas* strains eliciting resistance against fungal phytopathogens in different species of crop plants are presented. Literature data dealing with bacterial elicitors and the effect of their interaction with plant receptors are quoted. Special focus is focused on the controversial issue of the correlation between the synthesis of pathogenesis-related proteins (PRs) and ISR.

Brief characterization of plant resistance types.

Over a long period of time environmental pressure on plants induced the development of mechanisms enabling plants to combat the organisms negatively affecting them. One of these is resistance. Although plants do not have an immune system characteristic for mammals, this term applies to plants as well. In this case, resistance is defined as “the insusceptibility of a plant to infection”. Two types of resistance can be distinguished: constitutive (passive), and induced (acquired, active). Constitutive resistance is created by anatomical and physiological barriers. In turn, the state of enhanced plant defense, appearing as a consequence of the activity of a biotic or abiotic factor, is termed induced resistance. Usually enhanced resistance is not limited to the site at which a particular agent acts. A signal induced at one site spreads systemically to other organs, as a result of which the whole plant is prepared for an attack by a pathogen [1, 2]. Two kinds of induced resistance with systemic range can be distinguished: systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR). SAR is induced by pathogens eliciting necrotic changes in the plant tissues. Their presence within tissues results in increased synthesis of salicylic acid (SA), which in turn activates the expression of pathogenesis-related (PR) genes. The products of the expression of these genes participate in the destruction of the plant pathogen [3, 4]. On the other hand, ISR is mediated by non-pathogenic bacteria and fungi that stimulate plant growth. These are known as the plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF). They inhabit the root system, in which resistance is induced. The signaling pathway initiated in the underground plant organs, embraces the above ground parts as well. Jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) play an important role in this pathway [5, 6]. These plant hormones participate in the activation of genes, whose transcrip-

tion and translation lead to the formation of compounds that have negative effect on pathogens and plant pests. Activation occurs only after the plant organism is attacked by the phytopathogen [7, 8]. Genes respond more rapidly in the presence of JA and ET and their expression is both enhanced and faster. Resistance thus seems to have economic advantages for the overall plant defense response [9]. PGPR strains, after effective colonization and induction of resistance, maintain a plant in a state of elevated readiness to the occurrence of a pest in the general sense. Thus, there is no constitutive production of compounds by the plant which limits energy losses at the metabolic level [10]. The expression of induced systemic resistance (ISR) has been observed for different plant species, not only in dicotyledons (string bean, *Arabidopsis*, carrot, tobacco, radish and tomato), but also in monocotyledons (corn, rice) [11]. It appears that the mechanism of this plant resistance is effective in combating bacteria, fungi, viruses [12], nematodes [13] and insects [14].

ISR inducers. The participation of *Pseudomonas* bacteria, as well as of other bacteria classified to the PGPR in the induction of systemic resistance, is related to the production by these non-pathogenic bacteria of so-called elicitors (inducers, determinants), activating the defense responses of plant cells. In the case of an immune response to pathogens these compounds have been termed pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Frequently in multicellular organisms recognition of PAMPs by pathogenesis-related proteins (PRs) also enhances a SAR response [16]. A considerable diversity of the elicitors involved in ISR has been observed. They include the building blocks of bacterial cells as well as extracellular compounds synthesized by the microbes [17]. In the case of *Pseudomonas* they are: siderophores, flagellin, lipopolysaccharides (LPS) [18], an N-alkylated ben-

zoamine derivative [19], SA, 2,3-butanediol, [20] and antibiotics, including 2,4-diacetylphloroglucinol and pyocyanin [21, 22]. Two important aspects of ISR induction should be pointed out – the time needed for this type of resistance to develop and the number of bacterial cells required for its initiation. ISR can be elicited only when the number of bacterial cells reaches a minimal value equal to 10^5 CFU/g (colony forming unit/g) of plant root and time of root colonization by the bacteria is not shorter than a few days [23].

Interaction between inducers and plant receptors.

The mechanism of ISR induction is still unclear. It is thought that the induction of resistance in plants by rhizobacteria is analogous to the mechanism of resistance elicited by pathogens in eukaryotic cells. In both cases receptors are recognized by elicitors [24]. The induction of ISR is not a random process. A certain specificity in recognition and binding of PGPR elicitors to the corresponding root receptor of a given plant species is observed [25]. It appears that some bacterial strains, such as *P. fluorescens* WCS417r, demonstrate a high effectiveness of the binding in different plant species, whereas others, e.g. *P. fluorescens* WCS358, are characterized by narrow specificity. The former strain induces resistance via LPS in such plants as *Arabidopsis* [26] carnation [27], radish [28]. In turn, flagellin and LPS of *P. fluorescens* WCS358 are effective inducers of resistance in *Arabidopsis* but not in the pea and tomato [18]. Initially it was thought that a flagellin conservative motif of all PGPR could be recognized by the most plants. However, studies using two different *Pseudomonas* strains contradict this theory. *P. fluorescens* WCS358 and WCS374 strains both have a flagellum but only the former induces ISR in *Arabidopsis thaliana* [26]. As yet, the nature of the receptor binding a given elicitor is not known. It has been assumed that flagellin may be identified by the receptor LRR-NBS (leucine-rich repeat-nucleotide binding site). In *Arabidopsis* LRR-NBS binds to the most conserved domain of flagellin, triggering a mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway. Ultimately, several phosphorylations lead to the formation of a protein belonging to the WRKY family that is a group of proteins being transcription factors for genes encoding proteins involved in defense mechanisms of the plant cell [29].

ISR signaling pathway elicited by P. fluorescens WCS417r. The binding between a root receptor and the PGPR determinant results in activation of ISR signaling pathway. *A. thaliana*, ecotype Columbia (Col) is a model plant for which this process is studied in detail. This particular species is distinguished by the best studied genetic profile of the interactions between a microorganism and a plant [30]. To induce resistance, *Arabidopsis* roots were colonized by *P. fluorescens* WCS417r. A characteristic trait of the strain is its effectiveness in inhibiting the growth of pathogens of not only the model plant [6, 31].

Local response – ET and MYB72-dependent signaling pathway. ET is one of the first elements of a signaling pathway initiated by *P. fluorescens* WCS417r in the *Arabidopsis* root. This compound was found to be indispensable for the occurrence of resistance in the above ground plant organs [32]. Besides ET, gene *MYB72* also played an important role in the early signaling steps of ISR [33]. It appears that *P. fluorescens* WCS417r elicits the activation of the transcription of *MYB72* (as well as of 96 other genes) in the root. *MYB72* belongs to the *R2R3-MYB* family of genes in the *Arabidopsis* genome and encodes the transcription factor TF MYB 72. The expression of these genes results in the formation of proteins R2R3-MYB, whose presumable function is related to tolerance to stress, regulation of cell death and resistance to pathogens [34]. It has been reported that the presence of gene *MYB72* is required in the initial stages of ISR induction. This was confirmed in studies using plant mutants carrying the recessive form of the gene, in which bacteria did not elicit ISR [8]. It was also observed that overexpression of gene *MYB72* did not translate to increased level of resistance to such pathogens as *P. syringae* pv *tomato*, *Hyaloperonospora parasitica*, *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. This allows concluding that initiation of *MYB72* requires the participation of an additional factor for initiating ISR. In view of the fact that under *in vitro* conditions an interaction between MYB72 and ethylene-insensitive3-like 3 protein (EIL3) has been observed, the latter has been suggested to be the putative factor. EIL3 is a transcription factor of the EIN3 family. Close homologs of EIN3 are transcription factors EIL1 and EIL2 participating in regulation of the ethylene-dependent signaling pathway [35].

Systemic signaling response. The signaling pathway locally initiated by *P. fluorescens* strain WCS417r in the root spreads to the above ground plant organs. The major molecules involved in the expression of ISR in the stem and leaves are jasmonic acid (JA) and ET [36]. This is indicated by the results of studies using mutated plants with defects in genes participating in the cellular response to the above compounds. Mutations were introduced into such genes as *Etr1*, encoding ET receptor (a dominant mutation in this gene led to decreased susceptibility of tissues to the hormone) [35], and *Jar1* coding an enzyme involved in regulating JA activity in the signaling pathway [37]. Expression of ISR was not observed in any of the obtained mutants [36]. Of importance in the discussed phenomenon was that ISR did not cause increased synthesis of JA and ET, but only increased susceptibility of the plant to these hormones [38]. Studies have revealed that important components of the SAR pathway: SA and protein non-expressor of pathogenesis-related genes 1 (NPR1), are also implicated in the resistance induced by rhizobacteria. NPR 1 is considered a key regulatory protein in cross-talk between SAR and ISR [39]. It has been reported that even

though the ISR signaling pathway in *Arabidopsis* is independent of SA, NPR1 is one of its indispensable elements [36]. JA, ET and NPR1 form a specific signaling cascade in which the action of JA is followed by ET. In turn, these hormones interact with the final element of the pathway, protein NPR1. The occurrence of a signaling pathway involving ET and JA is observed only in plants carrying the dominant form of gene *ISR1*, located on chromosome III. It was shown that the product of the transcription and translation of this gene is a component of the ET-dependent signaling pathway [40]. Ecotypes of *Arabidopsis* carrying a recessive mutation in the *ISR1* gene locus (RLD and Wassilewskija) are susceptible to attack by the pathogen *P. syringae* pv. *tomato*, as opposed to ecotype Columbia (*ISR1/ISR1*). This is related to the fact that interruption of the signaling pathway at any point results in enhanced susceptibility of plants to the deleterious action of phytopathogens [40].

Other signaling pathways. Even though, similarly to *P. fluorescens* WCS417r, four other PGPR strains have been described to induce resistance in *A. thaliana* via the chemical messengers JA and ET [41], the course of the signaling pathway presented above is not a universal ISR scheme. JA and NPR1 are indispensable components of the signaling pathway initiated in the same plant by *P. fluorescens* CHAO in response to attack by *Peronospora parasitica* [21]. Another exception is the role of SA in the induction of ISR. This situation is observed in the tobacco plant, in which the mediation of the rhizobacterium *P. aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to infection by the tobacco mosaic virus [42]. The above examples serve as proof of interactions between plant signal transduction pathways, which allows adjusting the defence strategy of plants to the changed environmental conditions. A close cross-talk between the jasmonate and salicylate plant defense pathways is known to have a strong influence on the molecular and enzymatic profile of the plant and on some plant parasites [43].

Effects of ISR in plants. The final and also the most important elements of resistance induced in plants PGPR involve the synthesis of compounds protecting the plants cells from being harmed by a pathogen and/or destroying the cells of the pathogen destruction. The synthesis of these compounds in plant tissues is a result of activated transcription of the genes encoding them. However, as studies have shown, the process is not the immediate result of colonization of *Arabidopsis* roots by *P. fluorescens* WCS417r. The same phenomenon also occurs following challenge inoculation by the plant pathogen – 81 genes in the leaves show an augmented expression pattern, very likely as a result of the activity of signaling pathway molecules [9]. Following pathogen attack, JA-dependent genes characterized by over-expression of the motif 5'CA-CATG 3' in the promotor region of gene are activated in ISR-expressing plant cells. This sequence is a binding site for the transcription factor MYC2 which plays

a crucial role in regulating the transcription of these genes. MYC2 is probably involved in activating the transcription of genes, but only in response to an attack by a plant pathogen whose destruction is dependent on jasmonic acid-regulated genes. Otherwise, no up-regulation of MYC2 expression is observed [14]. It has been postulated that its activity is inhibited by the jasmonate-zim-domain (JAZ) suppressor protein. In situations other than described, the repressor is shunted into a pathway leading to its degradation in the proteasome [44]. The final outcomes of ISR are structural and biochemical changes in plant cells. Their aim is to impede penetration into the tissues and inhibit pathogen growth, and thus prevent the development of the disease caused by a specific plant pathogen [45].

Structural and biochemical modifications. Structural modifications occurring in the cell wall, being the response of a plant to attack by pathogen, consist in the physical and mechanical strengthening of the wall through the deposition of various compounds, making it impossible for pathogens to penetrate the plant tissues. These substances stiffen the cell wall, thus creating an impenetrable barrier. This involves the deposition of callose and infiltration of phenolic compounds at the site of infection by the plant pathogen [46]. Certain rhizobacteria, as a consequence of ISR induction, cause lignification of the cell wall, as observed in the case of bean [47].

Besides structural alterations in the cell wall, ISR also results in enhanced synthesis of various secondary metabolites participating in defense mechanisms (Table). These include the phytoalexins which are a chemically diverse group of low-molecular-weight compounds including sesquiterpenoids synthesized by the *Solanaceae*, and isoflavonoids in individual representatives of the *Papilionaceae*. The role that phytoalexins play in resistance is related to their toxic action against pathogens. Their presence inhibits the formation and germination of fungal spores and growth of hyphae, and restricts the growth of bacteria and viruses. In plant tissues, in which ISR was expressed, increased activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), participating in resistance responses, was found [48]. The enzyme is also involved in splitting off an ammonia molecule from (S)-phenylalanine, leading to the formation of E-cinnamonic acid which, in turn, is a lignin precursor. PAL thus plays an important role in the formation of a mechanical barrier. This enzyme is also involved in the synthesis of the phytoalexins mentioned above [49].

An important role in combating pathogens is carried out by pathogen-related proteins (PR). Some of them, thanks to their hydrolytic activity, participate in the degradation of the cell wall of fungi: proteins of the family PR-2 – (β -1,3-glucanase), PR-3, PR-4, PR-8, PR-11 (endochitinases) and PR-7 (endoproteinase). Others, such as protease inhibitors (PR-6), are capable of deactivating toxic polypeptides secreted by par-

Compounds participating in the destruction of plant pathogen cells in ISR

PGPR	Pathogen	Plant	Protective compound*	References
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 7NSK2 <i>Pseudomonas fluorescens</i> CHAO	<i>Botrytis cinerea</i>	Grape	Phytoalexins	[48]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> ,	Banana (<i>Musa</i> sp.)	PO, PAL, chitinase, β -1,3-glucanase, phenolic compounds	[56]
	<i>Alternaria palandui</i> ,	Onion (<i>Allium cepa</i> var <i>aggregatum</i>),	PO, PPO, chitinase, β -1,3-glucanase	[57]
	<i>Pyricularia grisea</i> ,	Finger millet (<i>Eleusine coracana</i>),	Chitinase, β -1,3-glucanase, PO, PPO	[23]
	<i>Pythium apha-nidermatum</i>	Tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i>), Paprika (<i>Capsicum annum</i>)	PAL, PO, PPO, phenolic compounds	[11]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Erysiphe pisi</i>	Pea (<i>Pisum sativum</i>)	Phenolic compounds	[59]
<i>Bacillus pumilus</i> IN937a and IN937b	<i>Sclerotium rolfii</i> , <i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Colletotrichum gleosporioides</i>	Tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i>), Paprika	SOD, PO	[58]

* PAL – phenylalanine ammonia lyase, PO – peroxidase, PPO – polyphenol oxidase, SOD – superoxide dismutase.

asites within the tissues [50]. The action of peroxidases (PR-9), in turn, results in increased production of lignin and its deposition in the cell wall, with subsequent formation of a mechanical barrier [51]. The correlation between the synthesis of PR proteins and ISR is controversial. In the case of *Arabidopsis*, *P. fluorescens* WCS417r cells did not induce the synthesis of these proteins similarly as in the case of radish [52, 53]. The results of these studies allow concluding that resistance in the case of *P. fluorescens* WCS417r is not related to the production of pathogen-related proteins. This conclusion is, however, contradicted by the results of numerous experiments with other strains of bacteria (Table). An example is *P. fluorescens* CHAO, whose presence induced the synthesis of proteins of the PR-1a, PR-1b and PR-1c families in tobacco [54]. *P. fluorescens* 63–28, in turn, caused increased β -1,3-glucanase and chitinase activity in the pea [46]. Marititto et al. [55], on the other hand, found an increased transcript level of lipoxygenase, an enzyme involved in the synthesis of jasmonic acid, in tomato plants inoculated with *P. putida* ВТР1. In these studies no stimulation of PAL activity was observed.

The phenomenon of induced systemic resistance (ISR) described above rouses the high hopes of many researchers representing different fields of science.

The mechanism of this resistance is still, however, insufficiently elucidated. There are many unknowns about this resistance, beginning with its induction, through the course of the signaling pathway, to a fungistatic-type substance. Answers to these questions may enable the practical application of the mechanism of this resistance in biological plant protection.

REFERENCES

1. Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Delaney, S.M., Soule, M.J., Phillips, G., and Thomasshow, L.S., *J. Bacteriol.*, 2001, vol. 183, no. 21, pp. 6454–6465.
2. Yu, G.Y., Sinclair, B., Hartman, G.L., and Bertagnolli, B.L., *Soil Biol. Biochem.*, 2002, vol. 34, no. 7, pp. 955–963.
3. Durrant, W.E. and Dong, X., *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2004, vol. 42, no. 1, pp. 185–209.
4. Sticher, L., Mauch-Mani, B., and Mettraux, J.P., *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1997, vol. 35, no. 1, pp. 235–270.
5. Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits H., Weisbeek, P.J., and

- Van Loon, C.L. *Plant Cell*, 1998, vol. 10, no. 3, pp. 1571–1580.
6. Kuc, J., *Crop Protection*, 2000, vol. 19, no. 8–10, pp. 859–861.
 7. Hase, S., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 2003, vol. 62, no. 4, pp. 291–226.
 8. Verhagen, B.W.M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.S., Van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J., *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2004, vol. 17, no. 8, pp. 895–908.
 9. Conrath, U., Beckers, G.M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., and Pozo, M.J., *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2006, vol. 19, no. 10, pp. 1062–1071.
 10. Pieterse, C.M.J. and Dicke, M., *Trends Plant Sci.*, 2007, vol. 12, no. 12, pp. 564–569.
 11. Ramamoorthy, V., Viswanathan, R., Raguchander, T., Prakasam, V., and Samiyappan R., *Crop Protection*, 2001, vol. 20, no. 1, pp. 1–11.
 12. Van Loon, L. C., Bakker, P.A.H., and Pieterse, C.M.J., *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1998, vol. 36, no. 9, pp. 453–483.
 13. Sikora, R.A. and Hoffmann-Hergarten, S., *Arab. J. Plant Prot.*, 1992, vol. 10, no. 4, pp. 53–58.
 14. Pozo, M.J., Van Der Ent, S., Van Loon, L.C., and Pieterse C.M.J., *New Phytol.*, 2008, vol. 180, no. 2, pp. 511–523.
 15. Mishina, T.E. and Zeier, J., *Plant J.*, 2007, vol. 50, no. 3, pp. 500–513.
 16. Gómez-Gómez L., 2004, *Mol. Immunol.*, vol. 41, no. 11, pp. 1055–1062.
 17. Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., and Van Loon, L.C., *Phytopathology*, 2007, vol. 97, no. 2, pp. 239–243.
 18. Meziane, H., Van der Sluis, L., Van Loon, L.C., Hofte, M., and Bakker, P.A.H.M., *Mol. Plant Pathol.*, 2005, vol. 6, no. 2, pp. 177–185.
 19. Ongena, M., Jourdan, E., Schafer M., Kech, C., Budzikiewicz, H., Luxen, A., and Thonart P., *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2005, vol. 18, no. 6, pp. 562–569.
 20. De Meyer, G. and Hofte, M., *Phytopathology*, 1997, vol. 87, no. 6, pp. 588–593.
 21. Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., and Métraux, J., *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2003, vol. 16, no. 4, pp. 851–858.
 22. Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., and Höfte, M., *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2002, vol. 15, no. 11, pp. 1147–1156.
 23. Raaijmakers, J.M., Leeman, M., Van Oorschot, M.P.M., Van der Sluis, I., Schippers B., and Bakker, P.A.H.M., *Phytopathology*, 1995, vol. 85, no. 10, pp. 1075–1081.
 24. Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M., In: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Z. A. Siddiqui (Ed.), Dordrecht, The Netherlands: Springer Science, 2005, chapter 2, pp. 39–66.
 25. Van Loon, L.C., *Eur. J. Plant Pathol.*, 2007, vol. 119, no. 3, pp. 243–254.
 26. Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., Trijssenaar, A., Van't, Westende Y.A.M., Hartog, F., and Van Loon, L.C., *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1997, vol. 10, no. 6, pp. 716–724.
 27. Van Peer, R., Schippers, B., *Neth. J. Plant Pathol.*, 1992, vol. 98, no. 2, pp. 129–139.
 28. Leeman, M., Van Pelt, J.A., Den Ouden, F.M., Heinsbroek, M., Bakker, P.A.H.M., and Schippers, B., *Phytopathology*, 1995, vol. 85, no. 9, pp. 1021–1027.
 29. Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T., *Nature*, 2004, vol. 428, no. 6984, pp. 764–767.
 30. Kunkel, B.N., *Trends Genet.*, 1996, vol. 12, no. 2, pp. 62–69.
 31. Bigirimana, J. and Hofte, M., *Phytoparasitica*, 2002, vol. 30, no. 2, pp. 159–168.
 32. Knoester, M., Pieterse, C.M.J., Bol, J.F., and Van Loon, L.C., *Mol. Plant. Microbe Interact.*, 1999, vol. 12, no. 8, pp. 720–727.
 33. Van der Ent, S., Verhagen, B.W.M., Van Doorn, R., Bakker, D., Verlaan, M.G., Pel, M. J.C., Joosten, R.G., Proveniers, M.C.G., Van Loon, L.C., Ton, J., and Pieterse, C.M.J., *Plant Physiol.*, 2008, vol. 146, no. 3, pp. 1293–1304.
 34. Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B., *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2001, vol. 4, no. 5, pp. 447–456.
 35. Guo, H. and Ecker, J.R., *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2004, vol. 7, no. 1, pp. 40–49.
 36. Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., and Van Loon, C.L., *Plant Cell*, 1998, vol. 10, no. 9, pp. 1571–1580.
 37. Staswick, P.E. and Tiryaki, I., *Plant Cell*, 2004, vol. 16, no. 8, pp. 2117–2127.
 38. Van der Ent, S., Verhagen, B.W.M., Van Doorn R., Bakker D., Verlaan, M.G., Pel, M.J.C., Joosten, R.G., Proveniers, M.C.G., Van Loon, L.C., Ton, J., and Pieterse, C.M.J., *Plant Physiol.*, 2008, vol. 146, no. 3, pp. 1293–1304.
 39. Spoel, S., Koornneef, A., Claessens, S.C., Korzelius, J., Van Pelt, J., Mueller, M., Buchala, A., Métraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong X., Corne P. et al., *The Plant Cell*, 2003, vol. 15, no. 3, pp. 760–770.
 40. Ton, J., Davison, S., Van Wees, S.C.M., Van Loon, L.C., and Pieterse, C.M.J., *Plant Physiol.*, 2001, vol. 125, no. 2, pp. 652–661.
 41. Ryu, C.M., Hu, C.H., Reddy, M.S., and Kloepper, J.W., *New Phytol.*, 2003, vol. 160, no. 2, pp. 413–420.
 42. De Meyer, G. and Hofte, M., *Eur. J. Plant Pathol.*, 1999, vol. 105, no. 5, pp. 513–517.
 43. Thaler, J.S., Karban, R., Ullman, D.E., Boege, K., and Bostock, R.M., *Oecologia*, 2002, vol. 131, no. 2, pp. 227–235.
 44. Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., and Ponce, M.R., *Nature*, 2007, vol. 448, no. 7154, pp. 666–671.
 45. Edreva, A., *Gen. Appl. Plant Physiology*, 2005, vol. 31, no. 1–2, pp. 105–124.
 46. Benhamou, N., Kloepper, J.W., Quqdt-Hallmann, A., and Tuzun, S., *Physiol. Plant Pathol.*, 1996, vol. 112, no. 3, pp. 919–929.
 47. Anderson, A.S. and Guerra, D., *Phytopathology*, 1985, vol. 75, no. 9, pp. 992–995.

48. Verhagen, B.W.M., Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Höfte M., and Aziz A., *J. Exp. Botany*, 2010, vol. 61, no. 1, pp. 249–260.
49. Daayf, F., Bel-Rhliid, R., and Belanger, R.R., *J. of Chem. Ecol.*, 1997, vol. 23, no. 6, pp. 1517–1526.
50. Van Loon, L.C. and Van Strein, E.A., *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1999, vol. 55, no. 2, pp. 85–97.
51. Lagrimini, L.M., Burkhart, W., Moyer, M., and Rothstein, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, no. 21, pp. 7542–7546.
52. Hoffland, E., Hakulinem, J., and Van Pelt, J.A., *Phytopathology*, 1996, vol. 86, no. 6, pp. 757–762.
53. Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Hoffland, E., Van Pelt, J.A., and Van Loon, L.C., *Plant Cell*, 1996, vol. 8, no. 8, pp. 1225–1237.
54. Schneider, S. and Ullrich, W.R., *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1994, vol. 45, no. 4, pp. 291–301.
55. Mariutto, M., Duby, F., Adam, A., Bureau, Ch., Fauconnier, M.-L., Ongena, M., Thonart, P., and Dommès, J., *BMC Plant Biology*, 2011, vol. 11, no. 4, pp. 29–41.
56. Thangavelu, R., Palaniswami, A., Doraiswamy, S., and Velazhahan, R., *Biologia Plantarum*, 2003, vol. 46, no. 1, pp. 107–112.
57. Karthikeyan, M., Jayakumar, V., Radhika, K., Bhaskaran, R., Velazhahan, R., and Alice, D., *Indian J. Bioch. Biophysic*, 2005, vol. 42, no. 6, pp. 371–377.
58. Jetiyanon, K., *Biological Control*, 2007, vol. 42, no. 2, pp. 178–185.
59. Singh, U.P., Sarma, B.K., Singh, D.P., and Bahadar, A., *Curr. Microbiol.*, 2001, vol. 44, no. 6, pp. 396–409.

УДК 577.152.1.01:7+541.516:57.042.2+663.241+543

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ОКСИПРОИЗВОДНЫХ КУМАРИНА

© 2012 г. М. В. Потапович, Д. И. Метелица, О. И. Шадыро

Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь, 220030, e-mail: pot-maxim@tut.by

Поступила в редакцию 19.09.2011 г.

Изучена эффективность ингибиторов (антиоксидантная активность) оксипроизводных кумарина — эскулетина, дикумарола и фраксетина в псевдопероксидазной системе метгемальбумин— H_2O_2 —тетраметилбензидин при $20^\circ C$ в забуференном физиологическом растворе, pH 7.4, содержащем 6% диметилсульфида и 0.25% диметилсульфоксида. Эффективность ингибиторов количественно охарактеризована константами ингибирования K_i , мкМ и величиной ингибирования в процентах. Величины K_i равны 9.5; 15 и 26 мкМ для эскулетина, дикумарола и фраксетина соответственно. Эскулетин и фраксетин ингибируют псевдопероксидазное окисление ТМБ по бесконкурентному типу, а дикумарол — по смешанному. Ингибирующая активность эскулетина при окислении ТМБ в пероксидазной системе характеризуется при pH 6.4 величиной K_i , равной 1.15 мкМ, а ингибирование носит конкурентный характер. Эскулетин — самый эффективный антиоксидант растительного происхождения из всех ранее исследованных в биохимических модельных системах.

Реакции свободнорадикального окисления являются важной составной частью нормального клеточного метаболизма и постоянно протекают в организме человека и животных. В биохимических процессах образуются и играют важную роль кислородсодержащие радикалы $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} (RO^{\cdot}), HO_2^{\cdot} (RO_2^{\cdot}) и пероксид водорода H_2O_2 [1–3]. В физиологических условиях клетки и ткани имеют вполне адекватную внутри- и внеклеточную защиту, противостоящую повышенному генерированию и разрушающему действию активных радикалов. Ухудшение экологической обстановки, химизация различных отраслей промышленности, сельского хозяйства и быта, пролонгированные стрессовые ситуации, злоупотребление алкоголем и курением приводят к тому, что в организме человека под влиянием этих факторов и радиоактивных загрязнений в несравненно большем количестве, чем в нормальных условиях, образуются активные радикалы и другие реакционноспособные вещества, существенно нарушающие нормальный ход обменных процессов [3–5].

По этим причинам актуальными проблемами современной биохимии и биотехнологии остаются следующие направления: оценка и измерение концентрации активных радикалов и скорости их

инициирования *in vivo* и в адекватных модельных системах *in vitro*; количественная характеристика антиоксидантного статуса организма человека и животных, в частности общей антиоксидантной активности (ОАА) биологических жидкостей (плазма и сыворотка крови, моча, слюна и др.); синтез новых высокоэффективных ингибиторов свободнорадикальных процессов, включающих не только функциональные группы, ответственные за антирадикальную активность, но и группы с направленным специфическим действием на мембраны, мезофазные переходы в них, на клеточные рецепторы, установление связи структуры синтетических и природных антиоксидантов (ингибиторов) с их активностью в широком интервале концентраций от 10^{-18} до 10^{-2} М, часто определяющих механизм действия ингибиторов. Решением перечисленных задач мы с коллегами занимаемся более 20 лет.

Прямое измерение концентрации свободных радикалов *in vitro* (и особенно *in vivo*), как правило, сильно затруднено. По этой причине до сих пор главным инструментом изучения инициирования свободнорадикальных жидкофазных процессов остается метод ингибиторов, основы которого созданы академиком Н.М. Эмануэлем и его учениками еще в 50–60-х годах XX века [6, 7]. Необходимость количественной характеристики инициирования радикалов в реальных условиях и потребность в быстром отборе потенциальных ингибиторов (антиоксиданты) в сравнительно простых условиях (20 – $36^\circ C$, водные растворы) обусловили интенсивное изучение многочисленных пар гемсодержащий биокатализатор — H_2O_2 ($ROOH$), где $ROOH$ — органические гидроперок-

Сокращения. БСА — бычий сывороточный альбумин, ДМСО — диметилсульфоксид, ДМФ — диметилформамид, ЗФР — забуференный физиологический раствор, pH 7.4, ОАА — общая антиоксидантная активность, ПХ — пероксидаза корней хрена, ТМБ — 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, ФДА — о-фенилендиамин, ФЦБ — фосфат-цитратный буфер, ИнН — ингибиторы свободнорадикальных процессов, f — стехиометрический коэффициент ингибирования, K_i — константа ингибирования, MetHa — метгемальбумины.

сиды, а в качестве биокатализаторов использованы пероксидаза хрена и так называемые псевдопероксидазы — гемин, метмиоглобин, метгемоглобин и метгемальбумины (MetHa) [2, 8–10]. В качестве акцепторов радикальных частиц использованы известные субстраты пероксидаз — АБТС (2,2'-азино-ди-(3-этил-2,3-дигидробензтиазолин-6-сульфоная кислота)), ФДА и ТМБ, при окислении которых образуются детально изученные продукты, что обеспечивает надежный и быстрый спектрофотометрический мониторинг свободнорадикального процесса. В качестве ингибиторов пероксидазного и псевдопероксидазного окисления АБТС, ФДА и ТМБ нами изучены синтетические соединения из ряда замещенных фенолов и пирокатехинов, производных замещенных о-аминофенолов, многоатомных фенолов, полифенолов и антиоксидантов нового поколения — полидисульфидов замещенных фенолов [8, 9].

Для количественной характеристики процессов сопряженного окисления ароматических аминов (ФДА и ТМБ) и многочисленных соединений фенольной природы использованы эффективные величины констант ингибирования K_i , мкМ, продолжительность периодов индукции в накоплении продуктов окисления ФДА или ТМБ, Δt , если они обнаруживаются, и коэффициенты ингибирования f , означающих число радикальных частиц, гибнущих на одной молекуле фенольного ингибитора. Многократно показано, что величины K_i адекватно отражают эффективность ингибиторов, меняются в широких пределах от нескольких до сотен мкМ и сильно зависят от типа субстрата и природы ингибитора [8–10].

Для практики очень важна не только активность ингибирующего действия антиоксиданта, но и другие характеристики, в частности его токсические свойства. В этой связи особый интерес приобретают антиоксиданты природного происхождения — токоферолы и их многочисленные аналоги [11], флавоноиды растительного происхождения — кверцетин, морин, силибин, кэмпферол, катехин и др. [8], производные лигнина гваяцилового и сирингилового ряда [10].

По нашему мнению, в качестве потенциальных нетоксичных антиоксидантов растительного происхождения большой интерес представляют оксипроизводные кумарина — эскулетин, фраксетин и дикумарол, антиоксидантные свойства которых до сих пор не охарактеризованы. В растительном мире широко распространены эскулетин и умбеллиферон, которые как и сам кумарин определяют запах цветов донника и поэтому применяются в парфюмерных композициях при изготовлении духов и одеколонов. Дикумарол давно известен и используется в медицине как антикоагулянт при терапии заболеваний, сопровождаю-

щихся образованием тромбов. Структурные формулы кумарина и его трех оксипроизводных представлены в таблице.

Цель работы — использование псевдопероксидазной системы метгемальбумин— H_2O_2 —ТМБ для количественной характеристики и сравнения антиоксидантной активности кумарина и его оксипроизводных, а также сопоставление сопряженного окисления эскулетина и ТМБ в псевдопероксидазной и пероксидазной системах для обоснованного выбора наиболее эффективного антиоксиданта кумаринового ряда.

МЕТОДИКА

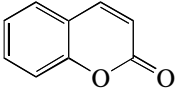
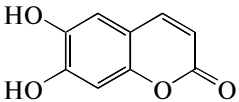
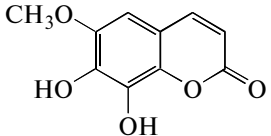
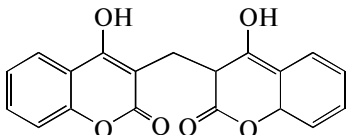
Объекты исследования. В работе использовали кумарин, 6,7-ди-окси-кумарин (эскулетин), 7,8-ди-окси-6-метокси-кумарин (фраксетин) и (3,3'-метилден-бис)4-окси-кумарин (дикумарол) фирмы "Sigma-Aldrich", США без дополнительной очистки.

Реагенты. Использовали пероксидазу корней хрена (КФ 1.11.1.7), изоэнзим С с оптическим показателем чистоты $RZ = 3.25$ производства "Bioenzyme Laboratories", Blaenavon, Gwent (Великобритания). Концентрацию ПХ определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярного поглощения в максимуме полосы Сорс (403 нм), равный $102000 M^{-1} cm^{-1}$ [12]. Применяли гемин фирмы "Serva" (Германия), раствор которого готовили в ДМСО и определяли концентрацию спектрофотометрически с использованием коэффициента молярного поглощения $174000 M^{-1} cm^{-1}$ при 405 нм [13]. Концентрацию БСА фирмы "Sigma" (США) без дополнительной очистки определяли с использованием коэффициента ϵ (280 нм) $35000 M^{-1} cm^{-1}$ [14]. Метгемальбумин получали по методике, описанной ранее [15], с соотношением компонентов 10 мкМ гемина/5 мкМ БСА.

В качестве субстрата-восстановителя применяли ТМБ ("Serva", Германия), а в качестве субстрата окислителя — разбавленный пероксид водорода, определяя концентрацию H_2O_2 с использованием ϵ (230 нм) $72.4 M^{-1} cm^{-1}$ [16]. Органические соразтворители ДМСО и ДМФ перед употреблением перегоняли. Для приготовления ЗФР, рН 7.4 и ФЦБ, рН 6.4 использовали соли и лимонную кислоту производства "Реахим" (Россия).

Окисление ТМБ в системе MetHa— H_2O_2 . Окисление без ингибиторов и в их присутствии проводили при 20°C в термостатируемых кюветах фотометра КФК-3 (Россия) в среде ЗФР, рН 7.4, содержащем 6% ДМФ и 0.25% ДМСО, что обеспечивало полную гомогенность реакционной смеси. Реакцию начинали добавлением раствора H_2O_2 и следили за образованием продукта окисления ТМБ по поглощению света в его миниму-

Ингибирование окисления ТМБ (0.09–0.25 мМ) в системе MetNa–H₂O₂ оксипроизводными соединениями кумарина, 20°C, 3ФР, рН 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО, гемин-БСА (10 мкМ, 5 мкМ), 0.5 мМ H₂O₂

InH	Структурная формула	[InH] _{макс} , мкМ	Ингибирование, %	K _i , мкМ	Тип ингибирования**
Кумарин		300	0	–	–
Эскулетин		6 3*	33 12*	9.5 1.15*	бк к*
Фраксетин		24	23	26	бк
Дикумарол		12	37	15	см

* Система ПХ–H₂O₂: 20°C, 15 мМ ЦФБ, рН 6.4, 6% ДМФ, 2 мМ H₂O₂, 0.3 нМ ПХ, 0.02–0.4 мМ ТМБ.

** Тип ингибирования: к – конкурентный, бк – бесконкурентный, см – смешанный.

ме A₆₅₅. При расчете скорости реакции использовали ε (655 нм) продукта окисления, равный 39000 М⁻¹ см⁻¹ [12]. При наличии периодов индукции в накоплении продукта окисления ТМБ совместно с ингибиторами для расчета скоростей реакции использовали строго линейные участки кинетических кривых роста A₆₅₅ после окончания лаг-периода.

Окисление ТМБ в системе ПХ–H₂O₂. Окисление без ингибиторов и в присутствии эскулетина проводили при 20°C в термостатируемой ячейке спектрофотометра “Spekol-211” (“Carl Zeiss”, Германия) в среде ФЦБ, рН 6.4, содержащего 6% ДМФ, 0.3 нМ ПХ, 2 мМ H₂O₂, 0.02–0.4 мМ ТМБ и разные концентрации эскулетина. Реакцию начинали добавлением H₂O₂ и следили за ней, как описано выше.

Ингибирование окисления ТМБ в псевдопероксидазной и пероксидазной системах. Для определения типа ингибирования строили кривые зависимости V₀ от начальной концентрации субстрата в двойных обратных координатах (метод Лайнуивера–Берка [17]). Эффективность ингибиторов характеризовали константами ингибирования K_i в мкМ [8–10]. Для определения K_i применяли метод Диксона, строя кривые зависимости V₀⁻¹ от [InH]₀, или метод Корниш–Боудена [18], строя кривые зависимости [S]₀/V₀ от растущей концен-

трации [InH]₀, где [S]₀ – начальная концентрация субстрата ТМБ. Для определения стехиометрического коэффициента ингибирования f использовали теорию метода ингибиторов свободнорадикальных реакций Н.М. Эмануэля и сотр. [6] и уравнения (1) и (2):

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

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

где Δτ – продолжительность периода индукции в накоплении продуктов окисления ТМБ, V_i – скорость инициирования радикалов, приблизительно равная скорости окисления ТМБ в отсутствие ингибитора. Эффективные константы ингибирования K_i определены графическим методом с ошибкой, не превышающей 7%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Совместное окисление ТМБ (0.09–0.25 мМ) в присутствии разных концентраций кумарина вплоть до 0.3 мМ в системе MetNa–H₂O₂ в стандартных условиях (20°C, 0.5 мМ H₂O₂, 3ФР, рН 7.4) показало, что кумарин не обнаружил ингибирующего влияния на превращения ТМБ: это объясняется отсутствием в его молекуле фенольных НО-групп.

На рис. 1а показаны кинетические кривые накопления продукта окисления ТМБ в терминах

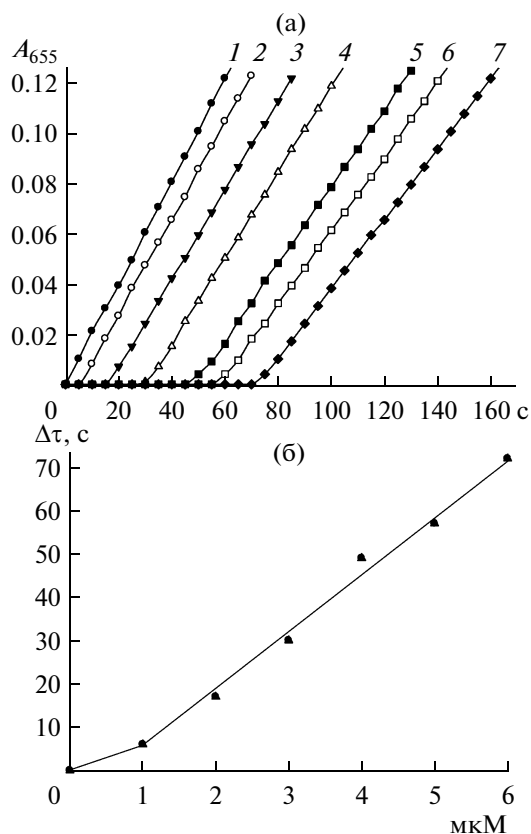


Рис. 1. Сопряженное окисление ТМБ и эскулетина в системе $\text{MetNa}-\text{H}_2\text{O}_2$. Кинетические кривые (а) роста оптической плотности (A_{655}) продукта окисления ТМБ (0.25 мМ) 1 – без ингибитора и в его присутствии (мкМ): 2 – 1, 3 – 2, 4 – 3, 5 – 4, 6 – 5, 7 – 6.

Зависимость продолжительности периода индукции (б) в накоплении продукта окисления ТМБ ($\Delta\tau$, с) от концентрации эскулетина (мкМ) в системе $\text{MetNa}-\text{H}_2\text{O}_2$: 3ФР, рН 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО, 0.5 мМ H_2O_2 .

оптической плотности A_{655} без ингибитора (1) и в присутствии эскулетина (2–7). Как видим, кинетика роста A_{655} характеризуется периодом индукции. Продолжительность периода индукции $\Delta\tau$ линейно зависит от возрастающей концентрации эскулетина (рис. 1б) в полном соответствии с теорией методов ингибирования свободнорадикальных процессов в жидкой фазе при их стационарном режиме [6]. С использованием уравнений (1) и (2) и с учетом того, что скорость иницирования $V_i \approx 2V_0$, так как на образование спектрально регистрируемого продукта реакции расходуется два катион-радикала ТМБ $^{+\cdot}$, по данным рис. 2б вычислен коэффициент f , равный до 1 мкМ эскулетина 1.3, а при концентрациях ингибитора 2–6 мкМ – 2.2. При малых концентрациях ингибитора на нем гибнет одна радикальная частица, а при больших в среднем – два катион-радикала ТМБ $^{+\cdot}$.

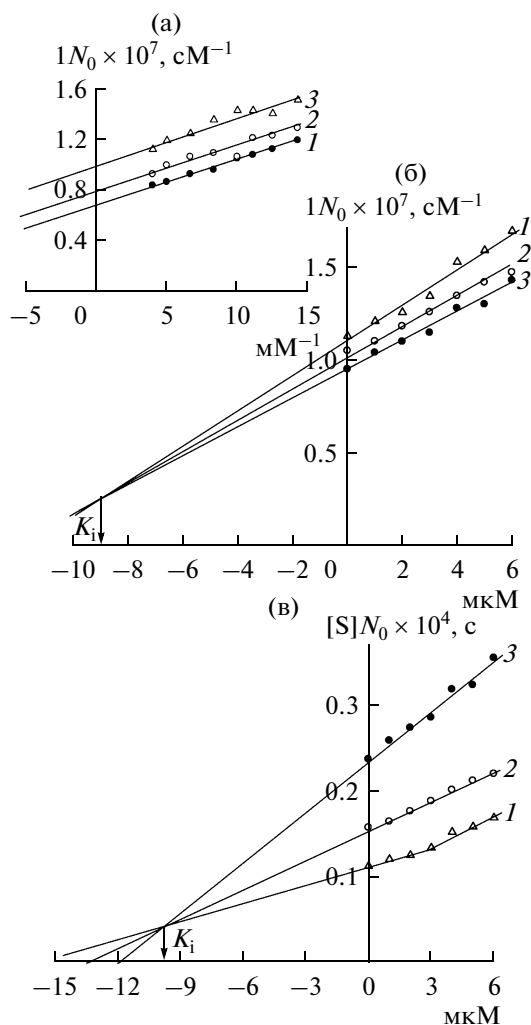


Рис. 2. Ингибирование окисления ТМБ эскулетинном в системе $\text{MetNa}-\text{H}_2\text{O}_2$.

Зависимость обратной начальной скорости окисления ТМБ от его обратной концентрации, мМ^{-1} (а), концентрации (мкМ) эскулетина (б), величины $[\text{ТМБ}]/V_0$ от концентрации (мкМ) эскулетина (в) в системе $\text{MetNa}-\text{H}_2\text{O}_2$: 3ФР, рН 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО, 0.5 мМ H_2O_2 .

(а) 1 – 0, 2 – 3, 3 – 6 мкМ эскулетина; (б) 1 – 0.1, 2 – 0.15, 3 – 0.25 мМ ТМБ; (в) 1 – 0.1, 2 – 0.15, 3 – 0.25 мМ ТМБ.

Зависимости в координатах Лайнуивера–Берка (рис. 2а) подтвердили бесконкурентный характер ингибирования при псевдопероксидазном окислении пары ТМБ–эскулетин. Из зависимостей в координатах Диксона (рис. 2б) и координатах Корниш–Бодена (рис. 2в) определены величины константы ингибирования K_i , равные 9 и 10 мкМ соответственно, т.е. средняя величина $K_i = 9.5 \pm 0.5$ мкМ. Это означает, что эскулетин является высокоэффективным ингибитором окисления ТМБ в псевдопероксидазной системе.

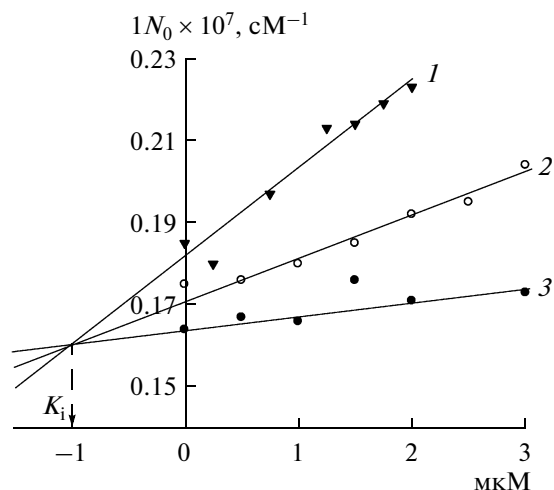


Рис. 3. Зависимость обратной начальной скорости окисления ТМБ от концентрации эскулетина (мкМ) в системе MetHa–H₂O₂: ФЦБ, рН 6.4, 6% ДМФ, 0.3 нМ ПХ, 2 мМ H₂O₂; 1–0.1, 2–0.2, 3–0.4 мМ ТМБ.

Представляет интерес сравнение ингибирующего действия эскулетина на окисление одного и того же субстрата ТМБ в псевдопероксидазной (MetHa–H₂O₂) и пероксидазной (ПХ–H₂O₂) системе, которые отличаются природой окисляющих агентов – радикалы HO· в первом случае и активированные комплексы I и II пероксидазы – во втором, а также структурой гидрофобных активных центров [8, 19]. Изучение совместного окисления пары ТМБ–эскулетин в системе ПХ (0.3 нМ) – H₂O₂ (2 мМ) проведено при 20°C в среде ФЦБ, рН 6.4, содержащей 6% ДМФ: выбор рН связан с резким падением активности ПХ с увеличением рН, а максимальная активность в окислении ТМБ обычно наблюдается при рН 5.5 [8, 12, 19]. Нами показано, что при пероксидазном окислении пары эскулетин–ТМБ в указанных выше условиях отсутствуют периоды индукции в накоплении продукта окисления ТМБ, а характер зависимости скорости окисления от концентрации ТМБ в двойных обратных координатах доказывает конкурентный тип ингибирования. На рис. 3 представлены кривые зависимости пероксидазного окисления пары ТМБ–эскулетин в координатах Диксона, которые подтверждают конкурентный тип ингибирования. По данным рис. 3 рассчитана константа ингибирования K_i , равная 1.0 мкМ. Величина K_i , найденная из зависимостей Лайнуивера–Берка, равна 1.3 мкМ, т.е. средняя величина в пероксидазном окислении пары ТМБ–эскулетин составляет $K_i = 1.15$ мкМ. Таким образом, ингибирующая активность эскулетина в окислении ТМБ в пероксидазной системе в 8.7 раза выше, чем в псевдопероксидазной. Эта разница увеличится при рН 7.4, так как ранее нами показано, что величины K_i сильно снижаются

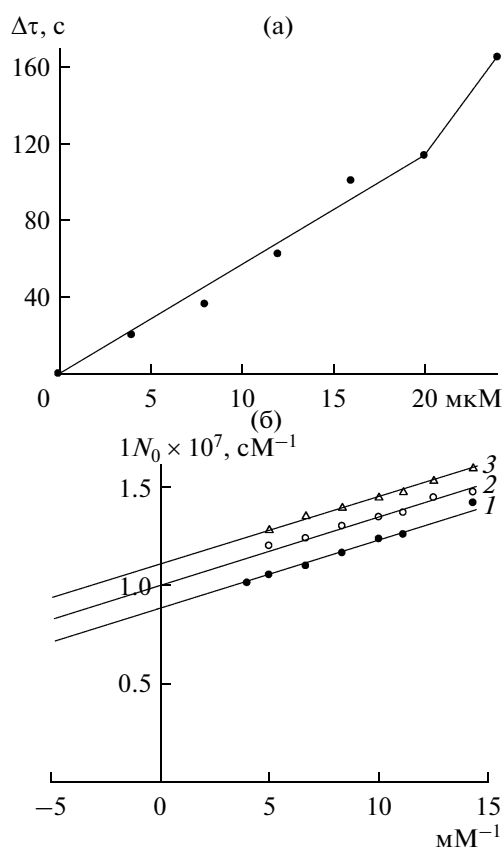


Рис. 4. Ингибирование окисления ТМБ фраксетинем в системе MetHa–H₂O₂. Зависимость продолжительности периода индукции, Δτ, с (а) в накоплении продукта окисления ТМБ (0.25 мМ) от концентрации фраксетина (мкМ) в системе MetHa–H₂O₂, зависимость обратной начальной скорости окисления ТМБ от его обратной концентрации (б) в системе MetHa–H₂O₂: ЗФР, рН 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО, 0.5 мМ H₂O₂; 1–0, 2–12, 3–24 мкМ фраксетина.

с ростом рН при пероксидазном окислении пары ТМБ–кверцетин [20].

Алгоритм изучения пары ТМБ–ингибитор в системе MetHa–H₂O₂, использованный ранее, применен для пары ТМБ–фраксетин, при окислении которой обнаружены периоды индукции на кинетических кривых накопления продукта окисления ТМБ. На рис. 4а показана зависимость продолжительности периода индукции от концентрации фраксетина: по данным этой зависимости вычислены коэффициенты f , равные 1.3 до 8 мкМ и 1.7 от 8 до 24 мкМ ингибитора, т.е. на одной молекуле фраксетина гибнет 1–2 катион-радикала ТМБ^{•+}.

На рис. 4б в двойных обратных координатах представлены кривые зависимости скорости окисления ТМБ от его начальной концентрации, доказывающие бесконкурентный тип ингибирования. По данным зависимостей в координатах Диксона

(не приводятся) определена константа ингибирования $K_i = 26$ мкМ.

При совместном окислении пары ТМБ-дикумарол в системе MetNa–H₂O₂ в стандартных условиях кинетические кривые накопления продукта окисления ТМБ не обнаружили периода индукции. На рис. 5а показаны зависимости начальной скорости окисления ТМБ от его начальной концентрации в двойных обратных координатах, доказывающие смешанный тип ингибирования. По данным рис. 5б в координатах Диксона определена величина K_i при окислении пары ТМБ-дикумарол, равная 15 мкМ, т.е. дикумарол – эффективный ингибитор окисления ТМБ в псевдопероксидазной системе.

В таблице сопоставлены количественные данные окисления кумарина и его трех оксипроизводных совместно с одним и тем же субстратом ТМБ в строго стандартных условиях. Из таблицы следует, что тип ингибирования зависит от природы биокатализатора и структуры ингибитора. Один и тот же ингибитор эскулетин характеризуется бесконкурентным характером ингибирования окисления ТМБ в системе MetNa–H₂O₂ и конкурентным типом ингибирования в системе ПХ–H₂O₂. Бесконкурентный тип ингибирования означает взаимодействие ингибитора только с фермент-субстратным комплексом MetNa–ТМБ, в то время как конкурентный тип ингибирования в пероксидазной системе означает взаимодействие ТМБ и эскулетина за связывание с активным центром ПХ и конкуренцию за активные формы ПХ – соединения I и II. При окислении пары ТМБ-кумарол в псевдопероксидазной системе смешанный тип ингибирования означает частичную конкуренцию ТМБ и дикумарола за связывание с MetNa и активные радикалы HO• – главные окисляющие агенты в системе MetNa–H₂O₂ [8].

При окислении пар ТМБ-эскулетин и ТМБ-фраксетин в псевдопероксидазной системе четко проявляются периоды индукции в накопления продукта окисления ТМБ-катион-радикала ТМБ^{•+}, что связано с неферментативной обменной реакцией (3), протекающей слева направо:



Это означает, что акцептирующие радикалы HO-группы эскулетина и фраксетина в условиях эксперимента достаточно реакционноспособны, чтобы восстанавливать катион-радикал ТМБ^{•+} до исходного состояния, в то время как в тех же условиях HO-группы дикумарола неспособны к реакции (3), что подтверждается отсутствием периодов индукции при окислении пары ТМБ-дикумарол в системе MetNa–H₂O₂. Снижение реакционной способности HO-групп дикумарола может быть связано с неароматической природой гетероциклического фрагмента дикумарола.

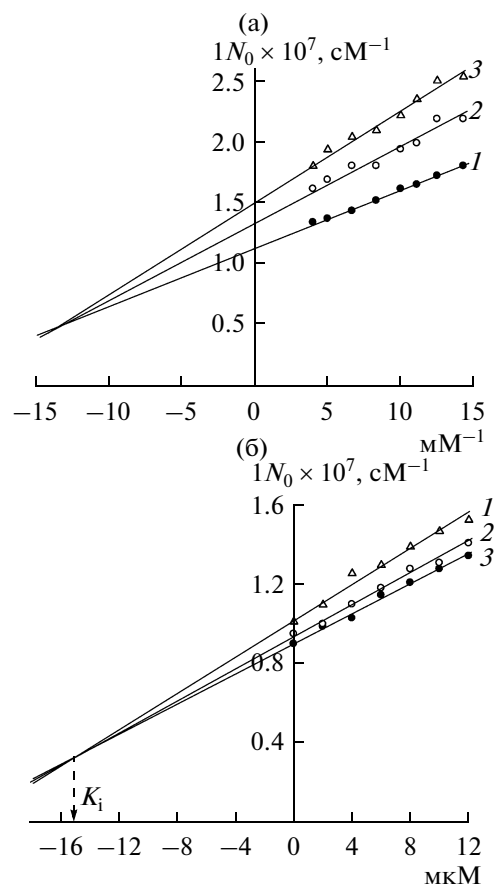


Рис. 5. Ингибирование окисления ТМБ дикумаролом в системе MetNa–H₂O₂. Зависимость обратной начальной скорости окисления ТМБ от его обратной концентрации, mM⁻¹ (а) и от концентрации (мкМ) дикумарола (б) в системе MetNa–H₂O₂: 3ФР, pH 7.4, 6% ДМФ, 0.25% ДМСО, 0.5 мМ H₂O₂; 1 – 0, 2 – 0.15, 3 – 0.25 мМ ТМБ.

Отсутствие периода индукции в образовании продукта окисления ТМБ в системе ПХ–H₂O₂–эскулетин объясняется значением pH 6.4, при котором окислялась пара ТМБ-эскулетин: в этих условиях акцепторы радикалов HO-группы эскулетина протонированы, что сильно снижает их реакционную способность в обменном процессе (3) [20].

Из таблицы следует, что в соответствии с величинами константы ингибирования K_i оксипроизводные кумарина могут быть расположены в ряд по убывающей ингибирующей активности в окислении ТМБ: эскулетин > дикумарол > фраксетин (величины K_i – 9.5; 15 и 26 мкМ соответственно). Отметим, что активность эскулетина в системе ПХ–H₂O₂ еще выше ($K_i = 1.15$ мкМ). Снижение ингибирующей активности у дикумарола может быть связано с “внеароматическим” расположением обеих HO-групп, а у фраксетина – с метилированием одной из активных HO-групп. Наи-

более оптимальной для взаимодействия с радикальными частицами оказалась структура эскулетина с 6,7-ди-окси-группами в сравнении с фраксетином с 7,8-ди-окси-группами, т.е. 8-НО-группа, вероятно, малоактивна в реакциях с радикалами в белок-содержащих биохимических системах.

В системе ПХ–H₂O₂ при pH 6.4 среди многочисленных изученных нами фенольных ингибиторов [8, 9] эскулетин обнаружил рекордную ингибирующую активность ($K_i = 1.15$ мкМ) и превосходит флавоноиды растительного происхождения, самые активные из которых в пероксидазной системе при pH 6.3 кверцетин и морин характеризуются величинами K_i , равными 11.5 и 22.5 мкМ [20]. Таким образом, поиск и характеристика эффективных антиоксидантов растительного происхождения являются необходимыми и должны быть продолжены.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Метелица Д.И.* Активация кислорода ферментными системами. М.: Наука, 1982. 255 с.
2. *Метелица Д.И.* Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. М.: Наука и техника, 1984. 293 с.
3. *Halliwel B., Gutteridge J.M.C.* Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press, 1999.
4. Free radicals: from Basic Science to Medicine / Eds. G. Poli, E. Albano, M.U. Dianzani. Basel-Boston-Berlin: Birkhauser Verlag, 1993. P. 365–523.
5. Oxygen Radicals and the Diseases Process / Eds. C.E. Thomas, B. Kalyanaraman. Wisconsin: Harwood Acad. Publ., 1998. 296 p.
6. *Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л.* Химическая физика старения и стабилизации полимеров. М.: Наука, 1982. С. 239–308.
7. *Денисов Е.Т.* Ингибирование цепных реакций. М.: Наука, 1997. 420 с.
8. *Метелица Д.И., Карасева Е.И.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 5. С. 537–564.
9. *Метелица Д.И., Пивень Н.В., Шадыро О.И., Григоренко Ю.А., Лухверчик Л.Н., Денисевич Н.П.* // Труды Белорус. гос. ун-та. 2008. Т. 3. Часть 1. С. 7–21.
10. *Потапович М.В., Курченко В.П., Метелица Д.И., Шадыро О.И.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 4. С. 386–396.
11. *Бурлакова Е.Б., Крашаков С.А., Храпова Н.Г.* // Биол. мембраны. 1998. Т. 15. № 2. С. 137–162.
12. *Метелица Д.И., Савенкова М.И., Курченко В.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1987. Т. 23. № 1. С. 116–124.
13. *Collier G.S., Praut J.M., De Wet C.R., Tschalala C.F.* // Biochem. J. 1979. V. 179. № 2. P. 281–289.
14. *Chmelič I., Kadleček I., Kalons N.* // J. Electroanal. Chem. 1979. V. 99. № 2. P. 245–250.
15. *Русь О.Б., Метелица Д.И.* // Вестні НАН Беларусі. Сер. хім. навук. 2001. № 4. С. 75–82.
16. Справочник химика / Ред. Б.П. Никольский. Л.: Химия, 1967. Т. 4. С. 919.
17. *Келети Т.* Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. С. 183–203.
18. *Диксон М., Уэбб Э.* Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 2. С. 507.
19. Биотехнология пероксидаз растений и грибов / Ред. А.М. Егоров. М.: ВИНТИ, Итоги науки и техники. Серия-Биотехнология. Том 36. 1992. 171 с.
20. *Григоренко Ю.А., Карасева Е.И., Метелица Д.И.* // Вестник Фонда фундаментальных исследований Республики Беларусь. 2007. № 4. С. 66–83.

Antioxidant Activity of Hydroxy Derivatives of Coumarin

M. V. Potapovich, D. I. Metelitsa, and O. I. Shadyro

Research Institute of Physicochemical Problems, Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

e-mail: pot-maxim@tut.by

Received September 19, 2011

Abstract—The inhibition efficiency (antioxidant activity) of hydroxy derivatives of coumarin, such as esculetin, dicumarol, and fraxetin, was studied in the methemalbumin–H₂O₂–tetramethylbenzidine (TMB) pseudoperoxidase system at 20°C in a buffered physiological solution (pH 7.4) containing 6% DMF and 0.25% DMSO. The inhibitor's efficiency was quantitatively characterized by the inhibition constants (K_i , μM) and the inhibition degree (%). The K_i values for esculetin, dicumarol, and fraxetin were 9.5, 15, and 26 μM, respectively. Esculetin and fraxetin inhibited pseudoperoxidase oxidation of TMB in a noncompetitive manner; dicumarol, in a mixed manner. The inhibiting activity of esculetin in peroxidase-catalyzed TMB oxidation at pH 6.4 is characterized by a K_i value equal to 1.15 μM, and the inhibition process is competitive. Esculetin was found to be the most effective antioxidant of plant origin among all derivatives previously studied in model biochemical systems.

UDC 577

***E. coli* PROPIONYL-CoA SYNTHETASE IS REGULATED *in vitro* BY AN INTRAMOLECULAR DISULFIDE BOND**

© 2012 Y. Guo, D. J. Oliver

Department of Genetics, Development, and Cell Biology, Center for Biorenewable Chemicals,
Iowa State University, Ames, IA 50010 USA

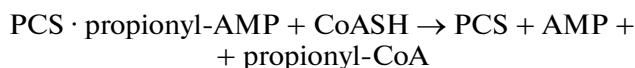
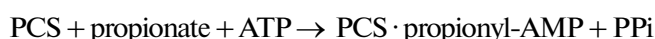
e-mail: doliver@iastate.edu; yimingguo@yahoo.com

Received October 25, 2011

The *E. coli* propionyl-CoA synthetase (PCS) was cloned, expressed, purified, and analyzed. Kinetic analyses suggested that the enzyme preferred propionate as substrate but would also use acetate. The purified, stored protein had relatively low activity but was activated up to about 10-fold by incubation with dithiothreitol (DTT). The enzyme activation by DTT was reversed by diamide. This suggests that the protein contains a regulatory disulfide bond and that the reduction to two sulfhydryl groups activates PCS while the oxidation to a disulfide leads to its inactivation. This idea was tested by sequential mutagenesis of the 9 Cys in the protein to Ala. It was revealed that the C128A and C315A mutants had wildtype enzyme activity but were no longer activated by DTT or inhibited by diamide. The data obtained indicate that two Cys residues could be involved in redox-regulated system through formation of an intramolecular disulfide bridge in PCS.

Propionate can serve as a carbon and energy source in a range of microbes. Propionate oxidation occurs in two steps. First it is activated to propionyl-CoA by the enzyme propionyl-coenzyme A synthetase (PCS, EC 6.2.1.17). Next, the propionyl-CoA is converted to pyruvate by the 2-methylcitric acid cycle [1]. In this variant of the tricarboxylic acid cycle, propionyl-CoA is condensed with oxaloacetate to form 2-methylcitrate. After conversion to 2-methylisocitrate this compound is cleaved to form succinate (which regenerates the oxaloacetate) and pyruvate.

Propionyl-CoA synthetase (PCS) is a member of the adenylate-forming enzyme superfamily all of which catalyze a two step reaction involving an enzyme-bound acyl-adenylate intermediate. In the case of PCS, the two half reactions are:



PCS activity in *Salmonella typhimurium* is regulated by a sophisticated mechanism discovered by the Escalante-Semerena laboratory [1–3] based on their earlier work with acetyl-CoA synthetase [4]. PCS is inactivated by propionylation of a Lys residue in active site [5] in a reaction where propionyl-CoA is the propionyl donor. This feedback loop allows high propionyl-CoA levels to down regulate the mechanism for its synthesis. It was found that the enzyme was reactivated by the *Salmonella* sirtuin CobB, which catalyzed the transfer of the propionyl group to NAD⁺ to form O-propionyl ADP-ribose thereby liberating the essential Lys residue [5, 6].

During the course of our recent studies on modulating acyl-CoA levels in *E. coli* in order to increase its capacity for producing modified fatty acid synthesis intermediates as a biological source of industrial chemicals we realized that there is a second potential regulatory system for *E. coli* PCS that involved a reversible oxidation and reduction of a disulfide bond within the enzyme. The purpose of this study was to confirm and characterize this potential redox regulation through biochemical studies on the isolated enzyme and to use site-directed mutagenesis to identify the specific amino acid residues involved. We showed that oxidation of the isolated enzyme results in its inactivation while reduction causes the enzyme to be activated. This mechanism is independent of the propionylation mechanism described above and may be involved in further control of enzyme activity.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, culture media and growth conditions. All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (USA) unless otherwise stated. *E. coli* DH5 α strain was obtained from New England Biolabs (USA); TOP10 strain and Arctic Express (DE3) were purchased from Invitrogen (USA) and from Stratagene (USA), respectively. *E. coli* strains were cultured at 37°C unless otherwise indicated in Luria-Bertani (LB) broth. Antibiotics ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$), gentamicin (20 $\mu\text{g/ml}$) or kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$) were used in rich medium.

DNA manipulations. Restriction endonucleases, DNA polymerase, and T4 DNA ligase were from Invitrogen Corporation (USA). DNA was sequenced using 3730x1 DNA analyzer (Applied Biosystems,

USA). Oligonucleotide primers were synthesized by Integrated DNA Technologies (USA). Unless otherwise stated, DNA manipulations were performed essentially as described by Maniatis et al. [7].

Gene cloning and plasmid constructions. The *E. coli* (k-12) genomic DNA was isolated using the GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma, USA). The coding sequence of the PCS enzyme was amplified by PCR with the *E. coli* genomic DNA as a template. The following two oligonucleotide primers were used: (i) a sense primer, 5'-AAGCTTATGTCTTTTAGCGAATTTTA-3' containing a *HindIII* recognition site (underlined) and 20 nucleotides of PCS starting with the ATG start codon; and (ii) an antisense primer, 5'-CTCGAGCTCTTCCATCGCCTGGCGGA-3' containing a *XhoI* recognition site (underlined) and 20 nucleotides that are complementary to the 3'-end sequence of PCS without the TAG stop codon. The amplified DNA was subcloned into pGEM T-Easy vector and sequenced. The DNA was digested with *HindIII* and *XhoI* and then inserted into the respective sites of pET-24b to make pET24b-PCS.

Site-directed mutagenesis. Site-directed mutations were made by recombinant PCR [8]. Plasmid pET24b-PCS was used as mutagenesis template. The PCR amplifications were carried out with Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, USA). The 50 µl PCR reaction used 50 ng of templates, 1 mM primer pair, 200 mM dNTPs, and 2U of DNA polymerase. The extension reaction was initiated by pre-heating the reaction mixture to 94°C for 3 min; 30 cycles of 94°C for 1 min, 52°C for 1 min and 72°C for 1.5 min; followed by incubation at 72°C for 10 min. The mutagenesis was made by two rounds of PCR. The first round used the sense primer for PCS gene with the antisense primer containing the site-directed mutation, and the antisense primer for the PCS gene with the sense primer containing the site-directed mutation in two independent PCR reactions. The two PCR products from the first round reactions were purified by the WizardSV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA) after agarose gel electrophoresis. For the second round PCR reaction 1 µl from each of the two PCR products was mixed with 8 µl of dH₂O and 1 µl of the mixture provided the template. Sense and antisense primers for PCS were used as primers for the second round PCR. The PCR products were purified as before and cloned into pGEM T-Easy vector and transformed into TOP10 competent *E. coli* cells (Invitrogen, USA). A total of 10 colonies for each mutagenesis were selected and their plasmids were isolated and sequenced. The plasmids with desired mutation were digested with *HindIII* and *XhoI* and then inserted into the respective sites of pET-24b for expression as a His-tagged fusion protein.

Overexpression of PCS in *E. coli* and its purification. For high level protein expression, plasmid pET24b-PCS and the 9 PCS Cys to Ala mutants were

electroporated into ArcticExpress (DE3) *E. coli* competent cells (Stratagene, USA). The transformed cells were grown in 10 ml LB medium containing 50 µg/ml kanamycin and 20 µg/ml gentamicin and shaken at 24°C. After overnight cultivation, the cultures were inoculated into 500 ml of the same medium, and shaken at 24°C for 24 h. The cultures were induced by IPTG (final concentration is 0.1 mM) and shaken at 10°C for 24 to 48 h.

The cells were harvested by centrifugation, washed twice in 500 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0), and then disrupted by sonication on ice using 6 × 10 s bursts at high intensity with 10 s cooling periods between bursts to prepare a cell-free extract. After centrifugation (3000 × g for 15 min at 4°C) the supernatant was applied to a 2 ml Probond™ Nickel-Chelating Resin (Invitrogen, USA) column. All purification procedures were performed at 0 to 4°C according to the Probond™ instruction manual. The enzyme was eluted from the column with 8 ml of native elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0) and stored at 4°C. The homogeneity of the purified protein was confirmed by SDS-PAGE.

PCS assay. PCS activity was assayed by measuring the amount of [¹⁴C] propionyl-CoA produced from labeled ¹⁴C-propionate [9, 10]. The assay mix contained 25 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.25 mM CoASH, 2.5 mM [1-¹⁴C] K-propionate (4 × 10⁶ cpm/µmole), 2.5 mM ATP, 5 mM MgCl₂ (pH 8.0) in a total volume of 0.1 ml. The amount of enzyme used ranged from 2.6 to 4.1 µg per assay for the purified enzyme and from 90 to 131 µg per assay for the crude bacterial extract. After 30 min of reaction at 26°C, a 75 µl aliquot of the reaction mix was transferred to a 2.5 cm DE-81 filter disk (Whatman, USA) which was promptly quenched in 2% acetic acid with 100 mM Na propionate. The filter disks were subjected to three 5-min washes in the same solution of acetic acid and Na propionate, rinsed briefly in acetone, and air dried. The amount of filter-bound radiolabeled propionyl-CoA was determined by liquid scintillation counting. Assays were performed in duplicate or triplicate. One unit of activity was defined as 1 µmol of propionyl-CoA produced per minute.

RESULTS

Characterization of recombinant purified PCS. PCS recombinant His-tag fusion protein was affinity purified and characterized by SDS-PAGE analysis. Two bands were observed following Coomassie Blue staining. One band had the expected molecular mass of approximately 70 kDa while the second band, tentatively identified as a PCS degradation product, had a lower molecular weight (Fig. 1). Average overall yield of recombinant protein was estimated at about 2 mg of

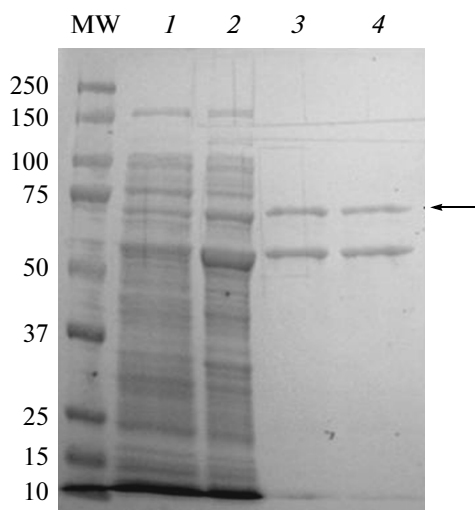


Fig. 1. Expression of *E. coli* PCS analyzed by SDS-PAGE. MW – molecular weight markers; 1 – crude extract from *E. coli* transformed with pET24b; 2 – crude extract from *E. coli* transformed with pET24b-PCS; 3 – crude pET24b-PCS sample purified with a nickel column and run without DTT in SDS loading buffer; 4 – crude pET24b-PCS sample purified with a nickel column and run with DTT in the SDS-PAGE loading buffer. The arrow indicates the expected position of PCS.

fusion protein purified per liter of induced *E. coli* cell culture.

The ability of the expressed PCS to use propionate and acetate as substrates was analyzed. When using propionate as substrate for the enzyme, the V_{\max} is 0.43 U/mg, and the K_m is 0.052 mM; when using acetate as substrate, the V_{\max} is 0.17 U/mg, and the K_m is 2.13 mM. Attempts were made to use isobutyrate as substrate, but no activity was detected. Clearly propionate is the preferred substrate for the enzyme with little activity toward acetate expected at physiological substrate concentrations.

The effect of redox reagents on the PCS activity.

PCS activity was greatly increased by preincubating the enzyme with the reducing agent dithiothreitol (DTT). Maximal enzymatic activity was observed at a DTT concentration of 10 mM (Fig. 2). In the absence of added DTT, the PCS activity was only 10% to 20% of maximum.

The results of DTT and diamide treatments of the *E. coli* PCS enzyme are shown in Fig. 3. Samples of enzyme were preincubated with 10 mM DTT or 10 mM diamide (sometimes followed by DTT) for 30 min before the enzyme activity was assayed. The enzyme was activated by DTT and inhibited by diamide in a reversible manner. In our previous work, we found that the *Arabidopsis* acetyl-CoA synthetase also shows the same property, and it was assumed to contain a redox-sensitive thiol group [10]. The similar results with the *E. coli* PCS suggest that it contains a redox active thiol group and that the enzyme is active

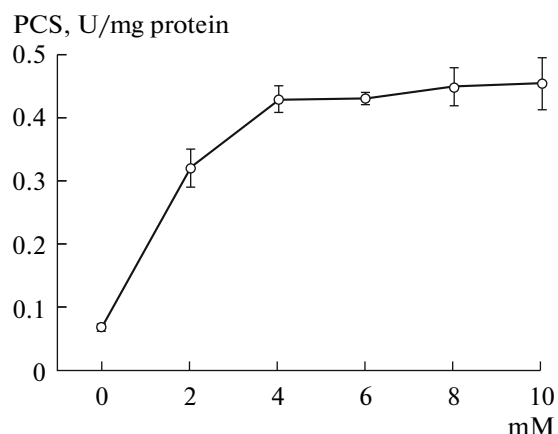


Fig. 2. The effect of different DTT concentrations on the activity of *E. coli* PCS. The purified enzyme was incubated with the indicated DTT concentration for 30 min before the enzyme assay.

when the thiols are reduced to two Cys and inactive when they are oxidized to a cystine residue.

Characterization of the role of Cys residues in PCS.

There are 9 Cys in the *E. coli* PCS. To directly test the role of each cysteine in the redox regulation, a series of site specific Cys to Ala mutations were constructed, and the mutant proteins were expressed in *E. coli*. PCS activity was measured in crude extracts of bacterial cells with or without added DTT (Table 1). The wild type and most of the mutant enzymes were activated from 4 to 10-fold by DTT treatment. Activation was always less in crude extracts than in purified proteins suggesting that the Cys residues became more oxidized during the purification process. The two exceptions were C315A and C128A. For these two mutants DTT

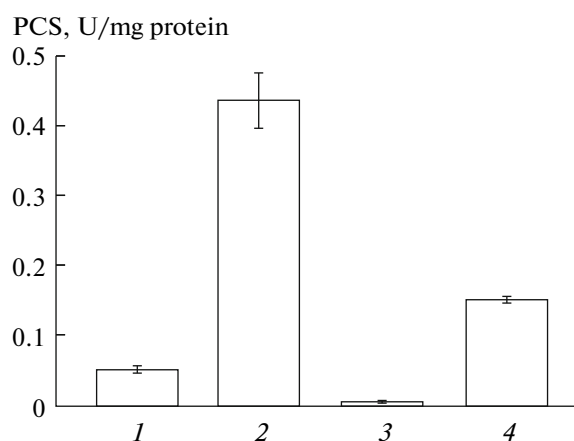


Fig. 3. The effect of DTT and diamide on *E. coli* PCS activity. 1 – PCS preincubated without DTT for 30 min; 2 – PCS preincubated with 10 mM DTT for 30 min; 3 – PCS preincubated with 10 mM diamide for 30 min; 4 – enzyme preincubated with 10 mM diamide for 30 min and then with 10 mM DTT.

Role of Cys in *E. coli* PCS activity and DTT activation of the enzyme. PCS proteins with the indicated Cys to Ala mutants were expressed in *E. coli*. The cells were disrupted and the enzyme activities measured with or without incubation in DTT

Type of PCS	PCS activity + 10 mM DTT, U/mg protein	DTT activation, fold
WT	0.36 ± 0.01	5.0
C47A	0.45 ± 0.03	4.0
C54A	0.50 ± 0.03	9.4
C236A	0.48 ± 0.02	10.3
C279A	0.24 ± 0.01	4.5
C431A	0.41 ± 0.01	4.2
C450A	0.44 ± 0.03	7.8
C602A	0.22 ± 0.01	10.2
C315A	0.83 ± 0.03	1.5
C128A	0.51 ± 0.07	1.5

activation was only about 1.5 fold. In other words, these two mutant enzymes were functionally fully activated without the DTT treatment. Also neither mutant enzyme was inhibited by more than 50% by diamide treatment (data not presented). These results suggest that the disulfide bond(s) that was reduced by DTT treatment and formed by diamide treatment involved Cys 128 and Cys 315.

It is interesting that none of 9 Cys to Ala mutants had activity in the presence of DTT that was less than 60% of the activity of the wildtype enzyme. These data include the Cys 128 and Cys 315 mutants. This suggests that none of these Cys residues is essential for the catalytic function of PCS and that the redox control of

the enzyme's activity is not directly caused by regulating the catalytic core of the active site.

Based on the results presented above, the most reasonable explanations for the redox control shown are either an intramolecular disulfide bond formed between C128 and C315 of one protein molecule or bonds involving these two residues on different PCS molecules. These could include intermolecular C128–C315, C128–C128, or C315–C315 bonds (in the latter two cases reduction of both bonds would be necessary for full activation). This question was approached by examining how the oxidized and reduced forms of the proteins migrated in SDS-PAGE. As can be seen in Fig. 1, there is no apparent difference in the migration of the protein following DTT treatment. This indicates that the disulfide bonds were not between two PCS molecules and that C128 and C315 are joined by an intramolecular disulfide bond.

Earlier work has demonstrated that the *Salmonella* PCS is regulated by the reversible propionylation of a Lys residue at the active site of the enzyme [5]. The enzyme CobB catalyzes the removal of the propionate from the active site Lys and the subsequent reactivation of PCS. While this process is mechanistically different from the redox process described here we confirmed that these types of regulation of enzyme activity were independent mechanisms (Fig. 4). With the purified wildtype PCS preparation from *E. coli* used in this experiment both DTT treatment and incubation with recombinant CobB protein and NAD⁺ each independently increase the *in vitro* rate of PCS by approximately 5-fold. When DTT and CobB/NAD⁺ were added at the same time, PCS activity increased over 25-fold. Clearly, the two mechanisms of regulation of the PCS activity function independently.

DISCUSSION

PCS is the first committed step in propionate metabolism and has been shown to be regulated by a feedback inhibition that involves the reversible propionylation of an essential Lys residue [5]. In this report we have identified a potential redox-dependent regulation of this same enzyme. The reversible formation of an intramolecular disulfide bond between C128 and C315 appears to have the potential to control the *E. coli* PCS activity *in vitro*. The formation of the bond, either naturally or following treatment with diamide inhibited the enzyme while reduction with DTT stimulated activity. Mutagenizing either of these Cys residues to Ala resulted in an enzyme that is fully activated irrespective of the redox treatment of the protein.

The *E. coli* PCS appears to undergo redox regulation *in vitro* via an intramolecular sulfhydryl-disulfide mechanism. Does this mechanism contribute to regulating propionate metabolism *in vivo*? Generally it is assumed that structural disulfides in the cytosol of

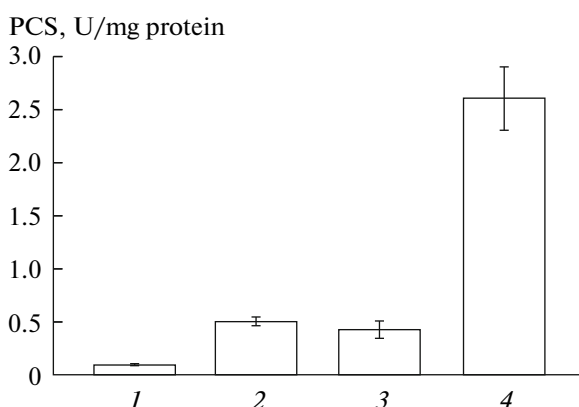


Fig. 4. The activation of the wildtype *E. coli* PCS by DTT and CobB/NAD⁺. The enzyme was incubated in the conditions indicated for 30 min before activity was assayed. 1 – control; 2 – +10 mM DTT; 3 – +0.40 µg of CobB and 1 mM NAD⁺; 4 – +0.40 µg of CobB, 1 mM NAD⁺ and 10 mM DTT.

E. coli are fully reduced and that disulfide oxidation does not occur until the proteins are exported to the periplasm. This process is not the general result of the redox level in the cytosol but is specifically catalyzed by the thioredoxins and glutaredoxin of the thioredoxin and glutathione/glutaredoxin pathways [11]. Not all cytosolic proteins in *E. coli*, however, are reduced with the best known example the OxyR transcription factor containing a disulfide group that can either be oxidized or reduced under physiological conditions [12]. Additional work will be needed in the future to determine if this redox regulation is physiologically significant and if so how it interacts with the propionylation system.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the U. S. National Science Foundation under Award No. EEC-0813570 for NSF Engineering Research Center for Biorenewable Chemicals.

REFERENCES

1. Horswill, A.R. and Escalante-Semerena, J.C., *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181, no. 18, pp. 5615–5623.
2. Garrity, J., Gardner, J.G., Hawse, W., Wolberger, C., and Escalante-Semerena, J.C., *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282, no. 41, pp. 30239–30245.
3. Tsang, A.W. and Escalante-Semerena, J.C., *J. Bacteriol.*, 1996, vol. 178, no. 23, pp. 7016–7019.
4. Starai, V.J., Celic I., Cole, R.N., Boeke, J.D., and Escalante-Semerena, J.C., *Science*, 2002, vol. 298, no. 5602, pp. 2390–2392.
5. Garrity, J., Gardner, J.G., Hawse, W., Wolberger, C., and Escalante-Semerena, J.C., *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282, no. 41, pp. 30239–30245.
6. Tsang, A.W. and Escalante-Semerena, J.C., *J. Bacteriol.*, 1996, vol. 178, no. 23, pp. 7016–7019.
7. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
8. Bradley R.D. and Hillis D.M. *Mol. Biol. Evol.*, 1997, vol. 14, no. 5, pp. 592–593.
9. Roughan, G.R. and Ohlrogge, J.B. *Anal. Biochem.*, 1994, vol. 216, no. 1, pp. 77–82.
10. Behal, R.H., Lin M., Back S., and Oliver D. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002, vol. 402, no. 2, pp. 259–267.
11. Stewart, E.J., Aslung, F., and Beckwith, J., *EMBO J.*, 1998, vol. 17, no. 19, pp. 5543–5550.
12. Zheng, M., Aslund, R., and Storz, G., *Science*, 1998, vol. 279, no. 5357, pp. 1719–1721.

УДК 541.13.620.193.8

РОЛЬ ЭКЗОПОЛИМЕРНОГО КОМПЛЕКСА В ФОРМИРОВАНИИ БИОПЛЕНКИ НА ПОВЕРХНОСТИ СТАЛИ КОРРОЗИОННО-АГРЕССИВНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

© 2012 г. Л. М. Пуриш, Л. Г. Асауленко, Д. Р. Абдулина, В. Н. Васильев, Г. А. Иутинская

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Д 03680

e-mail: purish@serv.imv.kiev.ua

Поступила в редакцию 15.06.2011 г.

Исследован состав экзополимерных комплексов (ЭПК), синтезируемых монокультурами *Desulfovibrio* sp. 10, *Bacillus subtilis* 36, *Pseudomonas aeruginosa* 27 и микробными ассоциациями, принимающими участие в коррозии металлических поверхностей. Методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) проведен анализ моносахаридного состава углеводных компонентов и жирнокислотного состава липидной части ЭПК. Установлено, что в условиях биопленки бактерии синтезировали полимеры, в которых преобладала глюкоза, а при росте в суспензии отмечено высокое содержание рамнозы. В составе ЭПК *B. subtilis* 36, *P. aeruginosa* 27 выявлены гексурановые кислоты и гексозамины. Обнаружены качественные отличия жирнокислотного состава экзополимеров в биопленке и в бактериальной суспензии. Показано, что при переходе к биопленочной форме роста, степень ненасыщенности жирных кислот в экзополимерах ассоциативных культур возросла. Полученные результаты могут быть использованы для разработки методов борьбы с микробной коррозией металлических поверхностей.

Исследования последних десятилетий показали, что в природных экосистемах большинство бактерий существуют в виде специфически организованных биопленок, прикрепленных к субстратам [1–3]. Биопленки представляют собой высокоорганизованное, структурированное сообщество, создаваемое бактериями одного или нескольких видов [3, 4]. Микробное сообщество функционирует в биопленке как скоординированный консорциум, погруженный в экзополимерный матрикс синтезированных им внеклеточных компонентов: полисахариды, липиды, белки, нуклеиновые кислоты и другие вещества [4–6]. Экзополимеры бактерий играют важную роль не только в формировании структуры биопленки, но и во взаимодействии биопленки с поверхностью, на которой она развивается. Образование биопленки всегда сопровождается модификацией поверхности и изменениями свойств бактерий в сообществе [2, 6].

Развитие и функционирование микробных сообществ в биопленке не всегда учитывается должным образом при оценке их роли в окружающей среде, особенно в местах, подвергаемых антропогенному воздействию. Такими, в частности, являются зоны прокладки подземных коммуникаций: тепломагистралей, нефте- и газопроводов.

Ранее нами было показано, что в грунте, который непосредственно соприкасается с поверхностью трубопроводов, формируется сульфидогенное микробное сообщество, способствующее воз-

никновению очагов биокоррозии [7]. Основную роль в микробной коррозии стали играют сульфатредуцирующие бактерии, которые принимают непосредственное участие в биоэлектрострохимическом процессе, протекающем на поверхности металла, в биопленке [7–9]. Нами установлено, что наряду с сульфатредукторами, доминантными представителями такого сульфидогенного сообщества являются бактерии родов *Bacillus* и *Pseudomonas* [10].

Однако, несмотря на многочисленные работы, посвященные исследованиям биопленок, в настоящее время в литературе мало сведений о формировании биопленки на стали коррозионно-агрессивным микробным сообществом и роли экзополимерного комплекса в коррозионном процессе.

Цель работы – изучение состава экзополимерного комплекса, синтезированного моно- и ассоциативными культурами, выделенными из естественного сульфидогенного сообщества, и определение роли его доминантных представителей в формировании биопленки на поверхности стали.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В работе использованы бактерии *Desulfovibrio* sp. 10, *Bacillus subtilis* 36 и *Pseudomonas aeruginosa* 27, выделенные нами из биопленки, сформированной на стали-3 [10], а также искусственно созданная из вышеуказанных монокультур ассоциация. Для создания ассо-

циации использовали выращенные на жидкой среде Постгейта “В” [11] культуры бактерий *Desulfovibrio* sp. 10, *B. subtilis* 36 и *P. aeruginosa* 27 в экспоненциальной фазе роста. Суспензии бактерий смешивали в соотношении 1 : 1 : 1. Параллельно на среде Постгейта “В” выращивали естественную сульфидогенную ассоциацию бактерий, выделенную нами ранее из грунта, отобранного на поверхности трубы действующего газопровода в Карпатах.

Изучение развития бактерий в бактериальной суспензии и биопленке, образованной на стальных пластинах, проводили в условиях лабораторного опыта. Исследования проводили во флаконах объемом 500 мл, заполненных питательной средой Постгейта “В”, инокулированной в зависимости от варианта опыта одной или несколькими культурами бактерий в экспоненциальной фазе роста. Количество посевного материала составляло 10% от объема среды, начальный титр монокультур – 10^7 кл./мл. Во флаконы погружали подвешенные на леске образцы стали-3 размером $4.8 \times 1.5 \times 0.5$ см, предварительно взвешенные, простерилизованные и обработанные 6 н. H_2SO_4 для снятия оксидных пленок и активизации электрохимических процессов [12]. Затем флаконы герметически закрывали резиновыми пробками и инкубировали при $28^\circ C$ в течение 90 сут. Каждый опыт ставили в 3 повторностях. Показателем развития бактерий было накопление биомассы (по белку) и сероводорода. Содержание клеточного белка определяли по методу Лоури. Для этого клетки биопленки и суспензии разрушали ультразвуком 2 мин трижды с интервалом 1 мин на приборе УЗДН-2Т (СССР). Центрифугировали для осаждения клеточных стенок при 7000 г 30 мин, сливали надосадочную жидкость и измеряли в ней содержание белка. Накопление сероводорода в среде определяли методом йодометрического титрования [13].

Выделение экзополимерного комплекса (ЭПК).

Для выделения экзополимеров, продуцируемых клетками биопленки, образцы стали-3 извлекали из культуральной среды и погружали в 100 мл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.0). Биопленку снимали с образцов ультразвуком при 22 кГц (30 с), обработку проводили дважды с интервалом 30 с на приборе УЗДН-2Т (СССР). Полученную суспензию центрифугировали при 15000 г и $20^\circ C$ в течение 40 мин для отделения клеток. Надосадочную жидкость диализировали в дистиллированной воде 3 сут [14]. Полученные диализаты упаривали на роторном испарителе (“Heidolph”, Германия) до 50 мл для концентрирования раствора экзополимеров, затем лиофилизировали. В осажденных после центрифугирования клетках определяли количество белка, как описано выше. После удаления биопленки образцы стали обрабатывали раство-

ром для снятия продуктов коррозии следующего состава: серная кислота 84 г, лимоннокислый аммоний двузамещенный 100 г, тиомочевина 10 г, вода дистиллированная 880 мл. Срок экспозиции 10–40 мин, затем образцы промывали дистиллированной водой, высушивали фильтровальной бумагой и взвешивали. О коррозионной агрессивности бактерий судили по уменьшению массы стали по сравнению с исходной на единицу площади поверхности пластины в единицу времени [12].

Экзополимерный комплекс, продуцируемый клетками в суспензии, выделяли из супернатанта после центрифугирования при 15000 г и $20^\circ C$, 40 мин, как описано выше.

Моносахаридный состав ЭПК. Определение проводили методом газожидкостной хроматографии. Для анализа образцы предварительно обрабатывали, согласно процедуре [15]. К 2 мг лиофилизированного препарата добавляли 0.4 мл 2 н. HCl. Полученную смесь ЭПК запаивали в ампулу, затем проводили гидролиз в течение 4–5 ч при $100^\circ C$. Гидролизат упаривали досуха и трижды промывали дистиллированной водой на роторном испарителе при $45–50^\circ C$. Пробу ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды и добавляли боргидрид натрия. Образцы оставляли в темном месте на 12 ч, затем пробы нейтрализовали с помощью катионита КУ-2 в H^+ -форме. Катионит удаляли фильтрованием на стеклянном фильтре № 4 с размером пор 5–15 мкм, фильтрат упаривали досуха, трижды промывали метанолом, упаривали на роторном испарителе при комнатной температуре и добавляли 0.5 мл пиридина и 0.5 мл уксусного ангидрида, выдерживали при $100^\circ C$ 15 мин. Полученную смесь упаривали досуха в несколько этапов, добавляя метанол и дистиллированную воду. Образцы ресуспендировали в 2–3 мл хлороформа и центрифугировали при 5000 г 20 мин. Супернатант упаривали досуха.

Анализ полученных производных нейтральных моносахаридов в виде их полных ацетатов полиолов проводили на газовом хроматографе 6890N с масс-спектрометрическим детектором 5973 inert (“Agilent Technologies”, США). Колонка капиллярная DB-225ms (J&W Scientific) 30 м \times 0.25 мм \times 0.25 мкм. Хроматографическое разделение проводили в изотермическом режиме при $220^\circ C$, газ-носитель – гелий, скорость потока через колонку – 1.0 мл/мин. Температура испарителя $250^\circ C$, ввод пробы с разделением потока 1 : 100, температура ГХ-МС интерфейса $280^\circ C$. Детекцию проводили в режиме сканирования в диапазоне 100–600 m/z.

Определение кислых и нейтральных моносахаридов проводили в виде их ацетилированных метилгликозидов, которые анализировали на колонке HP-5MS по следующей температурной

Таблица 1. Метаболическая и коррозионная активность монокультур бактерий и сообществ

Культура бактерий	Белок в клетках, мкг/мл		Накопление сероводорода, мг/л	Скорость коррозии, г м ² ч ⁻¹
	био пленка	суспензия		
Ассоциация естественная	1720	159	332 ± 5.1	0.239 ± 0.01
Ассоциация искусственная	1800	100	286 ± 4.8	0.178 ± 0.003
<i>Desulfovibrio</i> sp. 10	1880	200	291 ± 4.4	0.307 ± 0.01
<i>P. aeruginosa</i> 27	75	690	48 ± 2.3	0.086 ± 0.0035
<i>B. subtilis</i> 36	48	485	23 ± 0.6	0.072 ± 0.0022

программе: 150°C – 5 мин, от 150 до 250°C – по 3°C за 1 мин, 250°C – 10 мин [16].

Определение жирнокислотного состава липидной части ЭПК. К лиофильно высушенному ЭПК (5–10 мг) добавляли 1.5 мл смеси хлористого метилена и метанола (2 : 1), после интенсивного встряхивания оставляли на 12 ч. Далее добавляли 2 мл воды, встряхивали 10 мин, оставляли до расслоения фаз и отбирали нижнюю фазу (0.5 мл), которую переносили в ампулу емкостью 5 мл, упаривали досуха на роторном испарителе при 40°C, высушивали 2 ч в вакуумном эксикаторе над КОН, добавляли 1 мл 4 М HCl в метаноле, ампулу запаивали, оставляли на 4 ч при 80°C, переносили в колбочку и упаривали досуха, второй раз с 2 мл метанола. К полученному сухому остатку добавляли 1 мл насыщенного раствора хлорида натрия в воде и дважды, хорошо перемешивая, экстрагировали 2 мл хлороформа. Нижнюю фазу отбирали и упаривали досуха. Добавляли 1.5 мл гексана, образец переносили в емкость для анализа. ГЖХ-МС-анализ проводили на капиллярной колонке HP-5 MS с 5% фенилметилсилоксана, размером 30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм, при 150–210°C (4°C/мин), газ-носитель – гелий, скорость потока – 1 мл/мин, хроматограф 6890N с масс-спектрометрическим детектором 5973 inert (“Agilent Technologies”, США) [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В естественных условиях наиболее коррозионноагрессивные сульфатредуцирующие бактерии, как правило, развиваются в микробном сообществе, каждый член которого может играть определенную роль в формировании биопленки [7–9]. Исходя из этого факта, наши исследования были сосредоточены на изучении формирования биопленки как сульфидогенным сообществом, так и монокультурами *Desulfovibrio* sp. 10, *B. subtilis* 36 и *P. aeruginosa* 27, постоянными компонентами сообщества.

Визуальные наблюдения показали, что после экспозиции в питательной среде с бактериями на поверхности образцов стали образовываться биопленка. О развитии бактерий судили по на-

коплению биомассы как в среде, так и в биопленке (табл. 1). Установлено, что сульфидогенные ассоциации и монокультура *Desulfovibrio* sp. 10 значительно лучше развивались в биопленке. По окончании экспозиции определение клеточного белка показало, что в биопленке его было на порядок больше, по сравнению с суспензией. Значительное накопление биомассы в биопленке, возможно, связано со способностью сульфатредуцирующих бактерий к позитивному хемотаксису к железу [7]. Кроме того, присутствие на поверхности субстрата катионов Fe³⁺ значительно увеличивает количество адгезированных анаэробных бактерий *Desulfovibrio* sp. [3]. Именно хемотаксис к Fe³⁺ и адгезия на поверхности металла способствуют концентрации этих бактерий в специфической эконише, где вследствие электрохимических процессов происходит накопление ионов металлов и формируется коррозионно-агрессивное микробное сообщество. Гетеротрофные спутники сульфатредукторов *B. subtilis* 36 и *P. aeruginosa* 27 синтезировали значительно меньше белка в биопленке, но при этом существенно возросло накопление их биомассы в суспензии.

Свидетельством развития бактерий, а также их коррозионной агрессивности было продуцирование сероводорода. При культивировании сульфидогенных ассоциаций и *Desulfovibrio* sp. 10 количество сероводорода составляло 286–332 мг/л. Накопление сероводорода коррелировало с коррозионным разрушением стальных образцов, которое в монокультуре *Desulfovibrio* sp. 10 достигало 0.307 г м² ч⁻¹. Это доказывает, что сероводород, образованный при восстановлении серы сульфатов из среды (S⁺⁶ → S⁻²), может принимать непосредственное участие в коррозионном процессе. Взаимодействие сероводорода с ионами железа приводит к образованию сульфида железа, который служит дополнительным катодом, усиливающим электрохимические процессы [9, 18]. В культуральной среде с *P. aeruginosa* 27 и *B. subtilis* 36 выявлено незначительное количество сероводорода и низкая коррозионная активность. Скорость коррозии в присутствии этих бактерий была в 2–4.3 раза ниже, чем при участии сульфатредукторов.

Коррозионная агрессивность микробного сообщества определяется способностью сформированной им биопленки катализировать электрохимические процессы на поверхности металла, которые вызывают его разрушение [19, 20]. Важным фактором коррозии в зоне взаимодействия биопленки с металлом является экзополимерный матрикс, в который погружены бактерии и синтезируемые ими внеклеточные полимеры, так называемый экзополимерный комплекс (ЭПК) [8, 20]. Однако роль компонентов ЭПК в общей картине биокоррозии в настоящее время четко не определена. Известно, что доминирующим компонентом экзополимерного комплекса являются экзополисахариды, играющие ключевую роль в адгезии и формировании структуры биопленки [2, 6]. При взаимодействии бактерий с корродируемым металлом продуцируемые экзополисахариды, благодаря своим полианионным свойствам, способствуют закреплению в биопленке продуктов коррозии [20]. С другой стороны, есть данные, что экзополисахариды некоторых бактерий способны образовывать на поверхности металла плотную пленку, которая может существенно угнетать коррозионный процесс [21]. Целесообразно провести сравнительное исследование синтеза углеводных компонентов ЭПК моно- и ассоциативными культурами бактерий при разных моделях роста: в биопленке и среде.

Нами установлено, что состав углеводных компонентов ЭПК различался в зависимости от вида продуцирующих его бактерий и модели роста.

Характерным для экзополимерного комплекса как биопленки, так и суспензии клеток было наличие в моносахаридном составе нейтральных углеводов — глюкозы, галактозы, маннозы, рамнозы, фукозы и ксилозы. В биопленке, сформированной естественной сульфидогенной ассоциацией и монокультурами *P. aeruginosa* 27, *B. subtilis* 36, кроме вышеуказанных углеводов, обнаружены рибоза и арабиноза. Последние синтезировались также суспензионными клетками *Desulfovibrio* sp. 10 (табл. 2).

В моносахаридном составе экзополимеров биопленки доминировала глюкоза, количество которой достигало 25.2–36.4%. Структура матрикса биопленки стабилизируется в основном за счет полисахаридов, мономерами которых чаще всего являются гексозы, в частности глюкоза [6, 21].

В составе экзополимерного комплекса в среде также преобладала глюкоза, ее содержание колебалось от 17.5 до 31.4%. В среде отмечено более высокое по сравнению с биопленкой содержание рамнозы, которая может находиться в составе ЭПК в виде остатков рамнозы в полисахариде, гликопротеине, гликолипиде. Больше всего рамнозы (до 24%), характерного компонента гликолипидов, продуцировали культуры гетеротрофов *P. aeruginosa* 27, *B. subtilis* 36 при стационарном вы-

ращивании. Эти бактерии являются продуцентами рамнолипидов, которые в структуре биопленки могут играть значительную роль в ее формировании [22]. Такое предположение подтверждается исследованиями синтеза рамнолипидов в биопленке *P. aeruginosa*. Авторами [23] было показано, что продуцирование рамнолипидов *P. aeruginosa* необходимо для предотвращения плотного прикрепления и слипания бактерий внутри биопленки, что способствует формированию каналов, по которым в биопленке циркулируют кислород и продукты метаболизма.

Согласно исследованиям [6, 20], структура биопленки в значительной степени зависит от содержания в составе полисахаридов моносахаридных звеньев, обладающих зарядом, а именно урновых кислот (галактуроновая, глюкуроновая), а также аminosахаров (галактозамин и глюкозамин). Поэтому мы обратили внимание на содержание в экзополимерном комплексе именно этих мономеров. Наибольшее разнообразие урновых кислот и аminosахаров выявлено в составе экзополимеров гетеротрофных спутников сульфатредукторов: *P. aeruginosa* 27, *B. subtilis* 36. В биопленке *P. aeruginosa* обнаружено в 4.6 и 1.6 раз больше урновых кислот и аminosахаров (соответственно), чем в суспензии бактерий. Галактозамин и глюкозамин обнаружены также в экзополимерах, синтезируемых ассоциативными культурами. В составе экзополимеров *Desulfovibrio* sp. 10 обнаружен только галактозамин. При сравнении моносахаридного состава ЭПК монокультур *Desulfovibrio* sp. 10, *P. aeruginosa* 27 и *B. subtilis* 36 очевидно, что именно гетеротрофные ассоциаты сульфатредуцирующих бактерий продуцировали полисахариды, в составе которых выявлен наибольший спектр нейтральных углеводов, а также урновых кислот и глюкозамин, которые, как известно, взаимодействуя с другими компонентами экзополимеров с помощью карбоксильных и аминок групп, способствуют формированию биопленки и укреплению ее структуры [2, 14]. Кроме того, синтезируемые бактериями полисахариды способны связывать ионы металлов и сульфиды в матриксе, активизируя коррозионный процесс [20].

В последние годы появились сведения о значительной роли в формировании и функционировании биопленки минорных компонентов экзополимерного комплекса, а именно липидов и жирных кислот [24–27]. Исследования ЭПК *Acidithiobacillus ferrooxidans* показали, что значительную его часть составляли жирные кислоты, которые, по мнению авторов [24], принимают участие в адгезии клеток к сульфидным минералам. При биосинтезе экзополимерного комплекса жирные кислоты способны ковалентно связываться с гидрофильными молекулами, образуя поверхностно-активные соединения: гликолипи-

Таблица 2. Моносахаридный состав экзополимерного комплекса монокультур и их сообществ при разных моделях роста

Культура бактерий	Мо-дель роста*	Моносахариды, %**												
		гексозы			дезоксигексозы		пентозы			гексуроновые кислоты		гексозамины		
		глюкоза	галактоза	манноза	рамноза	фукоза	ксилоза	рибоза	арабиноза	галактуро-новая	глюкуро-новая	галакто-замин	глюкоза-мин	
Ассоциация естественная	БП	33.41	8.79	9.51	8.20	14.56	2.62	2.20	1.67	—	—	—	10.40	4.79
	СБ	31.36	9.28	15.75	13.42	17.29	3.89	3.74	—	—	—	—	11.32	—
Ассоциация искусственная	БП	36.40	3.47	5.89	3.21	20.39	2.15	—	—	—	—	7.42	3.27	—
	СБ	19.63	17.99	16.81	8.77	14.46	3.32	4.22	—	—	—	—	14.73	1.32
<i>Desulfovibrio</i> sp. 10	БП	34.17	4.76	4.95	3.83	19.16	2.46	—	—	—	—	—	2.66	—
	СБ	25.19	17.41	26.99	9.76	5.92	2.31	2.90	1.24	—	—	—	8.40	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27	БП	33.03	9.33	11.49	7.50	17.02	2.63	0.57	0.23	3.03	4.17	—	9.28	10.07
	СБ	25.21	8.59	20.79	23.72	7.54	2.39	1.17	1.68	1.56	—	—	10.60	1.25
<i>Bacillus subtilis</i> 36	БП	25.19	6.50	6.79	14.76	18.21	2.92	2.33	1.39	8.42	1.44	—	5.66	—
	СБ	17.47	17.89	30.91	24.12	8.02	2.11	1.20	—	—	—	—	9.59	0.09

* БП – биопленка, СБ – суспензия бактерий, “—” не обнаружено углеводов.

** % от общей суммы площади пиков на хроматограмме.

Таблица 3. Жирнокислотный состав липидной части ЭПК биопленки

Жирная кислота*	Число атомов углерода	Ассоциация естественная	Ассоциация искусственная	<i>Desulfovibrio</i> sp. 10	<i>P. aeruginosa</i> 27	<i>B. subtilis</i> 36
Додекановая	C _{12:0}	1.76	1.55	1.35	1.77	1.99
β-гидрокси додекановая	C _{12:0-3-ОН}	1.75	1.33	1.64	3.98	0
Тетрадекановая	C _{14:0}	7.09	6.93	7.14	6.37	7.83
Пентадекановая	C _{15:0}	4.02	4.28	4.37	3.83	4.47
Антиизопентадекановая	Антиизо C _{15:0}	1.74	1.81	2.41	1.81	0
Гексадекановая	C _{16:0}	37.48	35.65	39.06	36.76	47.34
Гексадеценовая	C _{16:1}	10.17	12.35	12.19	11.71	7.44
Гептадекановая	C _{17:0}	1.29	1.45	1.18	1.48	0
Октадекановая	C _{18:0}	14.11	13.51	12.69	13.88	19.3
Октадеценовая	C _{18:1}	15.44	16.8	15.53	15.53	11.63
Октадиеновая	C _{18:2}	3.09	3.35	2.45	2.88	0
Докозановая	C _{22:0}	2.06	0.99	0	0	0
Степень ненасыщенности		0.32	0.36	0.33	0.33	0.19

* – % от общей суммы жирных кислот.

ды (рамнолипиды) и липопептиды. С одной стороны, их синтез позволяет бактериям адгезироваться на гидрофобных субстратах [25], с другой – эти соединения ответственны за важные этапы формирования специфической структуры биопленки, а именно в матриксе биопленки каналов, по которым происходит активный перенос кислорода, воды, растворенных питательных веществ, ингибиторов и других соединений [22, 26].

Учитывая вышесказанное, мы выделили липидную составляющую ЭПК моно- и ассоциативных культур и определили ее жирнокислотный состав.

В составе липидных компонентов, выделенных из экзополимеров биопленки и суспензии бактерий, обнаружены насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты. В биопленке преобладали насыщенные гексадекановая и октадекановая кислоты (табл. 3). Количество гексадекановой кислоты в ЭПК сульфидогенных ассоциаций, *Desulfovibrio* sp. 10 и *P. aeruginosa* 27 было в пределах 35.65–39.06%, октадекановой – 12.69–14.11%. В биопленке, образованной *B. subtilis* 36, количество упомянутых кислот было выше и составляло соответственно 47.34 и 19.3%. Следует отметить, что в жирнокислотном составе липидной части экзополимеров биопленки *B. subtilis* 36 отсутство-

вали β-гидроксидодекановая кислота, антиизопентадекановая, гептадекановая кислоты, которые были обнаружены в биопленке сульфидогенных ассоциаций, *Desulfovibrio* sp. 10 и *P. aeruginosa* 27. В биопленке выявлены также ненасыщенные гексадеценовая (10.17–12.35%), октадеценовая (11.63–16.8%) и октадиеновая кислоты (2.45–3.35%).

Обнаружены качественные отличия жирнокислотного состава липидной части ЭПК биопленки и суспензии бактерий. Так, в ЭПК, синтезированной бактериями в суспензии, не выявлены присутствующие в биопленке додекановая, гидрооксидодекановая, гептадекановая и докозановая кислоты. В то же время ЭПК, синтезируемый суспензионными клетками, содержал цис- и транс-октадеценовые кислоты, отсутствующие в ЭПК биопленки (табл. 4).

В липидной составляющей ЭПК как биопленки, так и суспензии идентифицированы и другие жирные кислоты, но их количество было незначительным. При этом в липидной части экзополимерного комплекса биопленки выявлены 12 жирных кислот, а в суспензии – 9. Следует подчеркнуть, что в биопленке было выше содержание ненасыщенных жирных кислот. Значение степени ненасыщенности при переходе от суспензион-

Таблица 4. Жирнокислотный состав липидной части ЭПК суспензии бактерий

Жирная кислота*	Число атомов углерода	Ассоциация естественная	Ассоциация искусственная	<i>Desulfovibrio</i> sp. 10	<i>P. aeruginosa</i> 27	<i>B. subtilis</i> 36
Тетрадекановая	C _{14:0}	20.8	0	2.39	1.37	5.27
Гидрокситетрадекановая	C _{14:3ОН}	2.88	3.32	1.53	1.77	0
Пентадекановая	C _{15:0}	0.5	0	0	0	1.59
Антиизопентадекановая	Антиизо C _{15:0}	1.03	0	0.9	1.45	4.67
Гексадекановая	C _{16:0}	27.25	33.82	27.25	31.49	40.93
Гексадеценовая	C _{16:1}	0.67	0	2.84	1.62	0
Октадекановая	C _{18:0}	42.06	34.7	30.03	30.45	27.7
Октадеценовая	C _{18:1цис}	15.9	20.7	22.67	19.03	17.55
Октадеценовая	C _{18:1транс}	7.6	7.46	12.38	12.81	2.29
Степень ненасыщенности		0.24	0.28	0.38	0.33	0.20

* – % от общей суммы жирных кислот.

ной к биопленочной форме роста отличалось. В микробных ассоциациях степень ненасыщенности жирных кислот в ЭПК биопленок существенно выше, чем в суспензии. Известно, что ненасыщенные жирные кислоты имеют большую реакционную способность и могут взаимодействовать с белками, полисахаридами и др. полимерами. Связывание липидов, в частности жирных кислот, может способствовать формированию каналов биопленки и усилению ее стабильности [22]. Кроме того, обсуждается роль некоторых жирных кислот в “quorum sensing” регуляции биопленок. В частности, цис-2-деценовая мононенасыщенная жирная кислота оказалась сигнальной молекулой, способной к индукции распада микроколоний биопленки. Среди внеклеточных жирных кислот бактерий возможно наличие и других сигнальных молекул [27].

Таким образом, продуцируемые коррозионно-агрессивными бактериями экзополимеры могут способствовать адгезионным, формообразующим и коммуникативным процессам, содействующим функционированию и формированию структуры биопленки.

Наши исследования роли экзополимерного комплекса в формировании биопленки на стали – начальный этап моделирования микробной коррозии в естественных условиях. Понимание фундаментальных и экологических механизмов функционирования биопленок позволит разработать новую стратегию управления по защите и

борьбы с ними, что будет способствовать созданию новых методов противокоррозионной защиты металлов от биокоррозионных повреждений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. // Annu. Rev. Microbiol. 1995. V. 49. P. 711–745.
2. Lewandowski Z. Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control / Ed L.V. Evans. Harwood: Academic Publishers, 2000. P. 1–17.
3. Watnick P., Kolter R. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. № 10. P. 2675–2679.
4. Davey M.E., O'Toole G.A. // Microbiol. Molec. Biol. Rev. 2000. V. 64. № 4. P. 847–867.
5. Смирнова Т.А., Дибенко Л.В., Азизбекян Р.Р., Романова Ю.М. // Микробиология. 2010. Т. 79. № 4. С. 435–446.
6. Sutherland I.W. // Microbiology. 2001. V. 147. № 1. P. 3–9.
7. Андреюк Е.И., Козлова И.А., Контева Ж.П., Пиляшенко-Новохатный А.И., Занина В.В., Пуриш Л.М. Микробная коррозия подземных сооружений. К.: Наукова думка, 2005. 258 с.
8. Lee W., Lewandowski Z., Nielsen P.H., Hamilton W.A // Biofouling. 1995. V. 8. № 3. P. 165–194.
9. Hamilton W.A. // Annu. Rev. Microbiol. 1985. V. 39. P. 195–217.
10. Асауленко Л.Г., Абдулина Д.Р., Пуриш Л.М. // Микробиол. ж. 2009. Т. 72. № 4. С. 3–10.

11. Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоёмов. Л.: Наука, 1974. 194 с.
12. Коррозия: Справоч. изд. / Ред. Л.Л. Шраер. М.: Металлургия, 1981. 632 с.
13. Лурье Ю.Ю. Унифицированные методы анализа вод. М.: Химия, 1971. 194 с.
14. Beech I., Hanjagsit L., Kalaji M., Neal A., Zinkevich V. // *Microbiology*. 1999. V. 145. № 6. P. 1491–1497.
15. Albersheim P., Nevis D.J., English P.D., Karr A. // *Carbohydr. Res.* 1976. V. 5. № 3. P. 340–345.
16. Corsaro M.M., Lanzetta R., Parrilli E., Parrilli M., Tutino M.L. // *Eur. J Biochem.* 2001. V. 268. № 19. P. 5092–5097.
17. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. Киев: Наукова думка, 2006. 238 с.
18. Pérez E.J., Cabrera-Sierra R., González I., Ramírez-Vives F. // *Corrosion Sci.* 2007. V. 49. № 9. P. 3580–3597.
19. Kuhl M., Jorgensen B.B. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. V. 58. № 4. P. 1164–1174.
20. Beech I., Zinkevich V., Tapper R., Gubner R., Avci R. // *J. Microbiol. Methods*. 1999. V. 36. № 1–2. P. 3–10.
21. Christensen B.E. // *J. Biotechnol.* 1989. V. 10. № 3–4. P. 181–202.
22. Pamp S.J., Tolker-Nielsen T. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 6. P. 2531–2539.
23. Davey M.E., Caiazza N.C., O'Toole G.A. // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. № 3. P. 1027–1036.
24. Kinzler K., Gehrke T., Telegdib J., Sand W. // *Hydrometallurgy*. 2003. V. 71. № 1–2. P. 83–88.
25. Satpute S.K., Banat I.M., Dhakephalkar P.K., Banpurkar A.G., Chopade B.A. // *Biotechnol. Adv.* 2010. V. 28. № 4. P. 436–450.
26. Abdel-Mawgoud A.M., Lepine F., Deziel E. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 86. № 5. P. 1323–1336.
27. Davies D.G., Marques C.N.H. // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191. № 5. P. 1393–1403.

Role of Polymer Complexes in the Formation of Biofilms by Corrosive Bacteria on Steel Surfaces

L. M. Purish, L. G. Asaulenko, J. R. Abdulina, V. N. Vasil'ev, and G. A. Iutinskaya

Zabolotnii Institute of Microbiology and Virology, National

Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

e-mail: purish@serv.imv.kiev.ua

Received June 15, 2011

Abstract—The composition of exopolymer complexes (EPCs), synthesized by the monocultures *Desulfovibrio* sp. 10, *Bacillus subtilis* 36, and *Pseudomonas aeruginosa* 27 and by microbial associations involved in the corrosion of metal surfaces has been studied. An analysis of the monosaccharide composition of carbohydrate components, as well as the fatty acid composition of the lipid part of EPCs, was carried out by gas-liquid chromatography (GLC). It was found that bacteria in biofilms synthesized polymers; this process was dominated by glucose, while the growth of bacteria in a suspension was marked by a high rhamnose content. Hexouronic acids and hexosamine have been revealed as a part of *B. subtilis* 36 and *P. aeruginosa* 27 EPCs. Qualitative differences were revealed in the fatty acid composition of exopolymers in biofilms and in a bacterial suspension. It was shown that the transition to a biofilm form of growth led to an increase in the unsaturation degree of fatty acids in the exopolymers of associative cultures. The results can be used to develop methods to control microbial corrosion of metal surfaces.

УДК 620.193.8

РОЛЬ СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА В БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОРРОЗИИ МЕТАЛЛОВ

© 2012 г. Д. В. Белов*, А. А. Калинина*, Т. Н. Соколова*, В. Ф. Смирнов**,
М. В. Челнокова*, В. Р. Каргашов*

*Нижегородский государственный технический университет
им. Р.Е. Алексеева, Нижний Новгород, 603600

**Научно-исследовательский институт химии Нижегородского государственного университета
им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950
e-mail: 777aleksa777_87@mail.ru,
biotehno@nntu.nnov.ru

Поступила в редакцию 16.08.2011 г.

Установлена способность 7 штаммов бактерий участвовать в коррозионном повреждении алюминия, его сплавов, а также цинка. Наиболее активными по отношению к изучаемым металлам были бактерии *Proteus vulgaris* 1212 и *Pseudomonas aeruginosa* 969. Показана роль супероксидного анион-радикала в инициировании коррозионного разрушения алюминия и цинка, а также экзометаболитов бактерий – органических кислот в развитии этого процесса.

Многие металлы и промышленные изделия на их основе при контакте с микроорганизмами подвергаются значительным коррозионным повреждениям [1–2]. В работах [3–5], на основе результатов исследования коррозии алюминия и его сплавов под воздействием грибов, нами было сделано предположение, что процесс обусловлен воздействием на поверхность металла супероксидного анион-радикала $O_2^{\cdot-}$, образующегося при жизнедеятельности микроорганизмов. Была предложена схема инициирования коррозии и ее дальнейшего развития, которая хорошо согласуется с данными, полученными при использовании более широкого ряда металлов [6].

Существенный ущерб металлоконструкциям в естественной среде – почве, влажной атмосфере, воде, наносят также бактерии. Механизм воздействия на металл некоторых видов бактерий, таких, как железобактерии, сульфатредуцирующие, нитрифицирующие, тионовые, достаточно широко изучен [7]. В то же время коррозия под воздействием бактерий-органотрофов, способных использовать в качестве питательной среды органические загрязнения на поверхности металлов (технические масла, смазки органической природы, масложировые продукты), является до сих пор мало исследованной. Остается открытым вопрос о начальной стадии инициирования, вызывающей каскад химических превращений на поверхности металла, сопровождающийся глубокими коррозионными повреждениями.

Цель работы – исследование способности бактерий-органотрофов к образованию $O_2^{\cdot-}$, как од-

ного из факторов инициирования коррозии металлов, а также выявление изменений поверхности в динамике и определение роли экзометаболитов в развитии коррозионного процесса.

МЕТОДИКА

В качестве тест-организмов использовали следующие культуры бактерий: *Echerichia coli* 321-5, *Proteus vulgaris* 1212, *Pseudomonas aeruginosa* 969, *Staphylococcus aureus* 956, *Staphylococcus epidermidis* 1061, *Streptococcus salivarius*, *Bacillus megaterium*, которые были предоставлены Всероссийской коллегией микроорганизмов ИБФМ РАН (г. Пушкино, Московской обл.).

В качестве объектов исследования были выбраны алюминий марки АД0, сплавы на его основе Д16 (Al – 90.8%; Cu – 4.3%; Mg – 1.5%; Mn – 0.6%), Д16Т (Al – 91.7%; Cu – 3.99%; Mg – 1.39%; Mn – 0.5%), В65 (Al – 97.2%; Cu – 4.2%; Mg – 0.25%; Mn – 0.4%), а также цинк (Zn – 99.99%; Pb, Cd, Fe, Sn, Cu, Al – 0.01%), которые широко используются в качестве конструкционных материалов.

Образцы металлов предварительно шлифовались до получения гладкой поверхности и полировались до зеркального блеска. После этого они промывались водой, поверхность обезжиривалась тетрахлорметаном, затем этиловым спиртом, вторично промывались водой и высушивались. Стерилизация образцов до и после экспозиции проводилась фламбированием.

Бактериальные культуры выращивали на МПА в чашках Петри в термостате при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажности воздуха 90%. Водную суспензией суточных культур бактерий, выращенных в пробирках на скошенном агаре, высевали на плотную питательную среду. После чего на поверхность питательной среды помещали подготовленные металлические образцы (средняя масса – 0.5 г) и инкубировали в термостате при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$ и влажности воздуха 90% в течение 3–90 сут в зависимости от цели эксперимента. Контрольный эксперимент проводили в аналогичных условиях на плотной питательной среде, не засеянной культурами бактерий.

По окончании инкубирования поверхность образцов исследовали визуально для выяснения изменения состояния поверхности. Оценку состояния поверхности производили по разработанной бальной шкале: А – образование жидкого экссудата; Б – локальное потускнение поверхности; В – образование полупрозрачного слоя легко удаляемых продуктов коррозии; Г – коррозия с образованием продуктов аморфного, рыхлого характера (в т.ч. гидроксидов); Д – коррозия по всей поверхности с образованием продуктов коррозии, покрывающих более 50% поверхности образца [3–6].

С образцов, подвергшихся длительной экспозиции (около 90 сут) под воздействием бактерии *Pseudomonas aeruginosa* 969, состояние поверхности которых соответствовало баллам А–Д, механическим способом собирали продукты коррозии, после чего определялся химический состав собранной массы. Эксперимент проводился в шестикратной повторности, в каждой из которых обрабатывалась поверхность 10 образцов.

Полученная масса загружалась в аппарат Соклета для непрерывной экстракции последовательно диэтиловым эфиром, этилацетатом, ацетоном, ацетонитрилом, диоксаном. Полученные экстракционные растворы фильтровались, высушивались над безводным Na_2SO_4 . Органические кислоты, содержащиеся в остатке после полного удаления диэтилового эфира и этилацетата, переводились в метиловые и триметилсилильные эфиры по стандартным методикам и анализировались методами ГЖХ и ТСХ с использованием веществ-свидетелей.

Растворы в ацетоне, ацетонитриле и диоксане концентрировали путем частичного удаления растворителя и анализировали методами ТСХ с использованием веществ-свидетелей на содержание свободных аминокислот и свободных органических кислот соответственно.

Газожидкостная хроматография осуществлялась на хроматографе Кристалл-4000 (Россия, Метта-хром) с плазменно-ионизационным детектором, длина колонки 30 м; сорбент – метилсилико-

новый эластомер с толщиной пленки 0.21 мкм; температура колонки $100\text{--}200^\circ\text{C}$, в зависимости от нанесенного образца; температура испарителя – 270°C , детектора – 180°C ; расход газа-носителя азота – $60\text{ см}^3/\text{мин}$; расход воздуха $300\text{ см}^3/\text{мин}$. Объем пробы составлял от 1 до 5 мкл.

Анализ методом тонкослойной хроматографии проводился на пластинах Silufol UV 254 фирмы “Kavalier” (Чехословакия) по стандартным методикам [8].

Наличие в экссудате ионов калия, натрия и аммония определяли методами микрохимического анализа [9].

Возможность генерации O_2^- бактериями и транспорт его в окружающую среду исследовались нами при культивировании микроорганизмов на плотной питательной среде. Бактерии предварительно выращивались в оптимальных условиях ($37 \pm 2^\circ\text{C}$, влажность 90%) в течение 24 ч. При проведении опытов суспензию бактерий кишечной группы (9.3×10^6 кл./мл) получали смывом с поверхности твердой среды 0.05 М фосфатным буфером, pH 7.4. К 2 мл полученной суспензии бактерий добавляли 0.5 мл 0.01 М нитросинего тетразолия (НСТ), в параллельном опыте к полученной суспензии бактерий сначала добавлялось 0.15 мл супероксиддисмутазы (СОД, 15 ед. активности), а затем НСТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

За динамикой изменения состояния поверхности металлов под воздействием бактерий наблюдали визуально, фиксируя характерные изменения через определенные промежутки времени с начала экспозиции (табл. 1–2).

Как видно из табл. 1, через 5–10 сут после заражения на поверхности алюминия и его сплавов появляются локальные участки с матовыми и темными пятнами, а поверхность в целом утрачивает исходный блеск. Следует отметить, что особенностью коррозионного изменения алюминия и его сплавов при воздействии бактерий *E. coli* 321-5, *P. vulgaris* 1212, *S. aureus* 956, *S. epidermidis* 1061, *S. salivarius*, *B. megaterium*, в отличие от грибов, является отсутствие образования характерного экссудата на отдельных участках поверхности.

Однако при воздействии бактерии *P. aeruginosa* 969 на сплавы алюминия Д16 и Д16Т подобное проявление коррозии имело место через 3–5 сут – на торцах большинства образцов формировался экссудат с $\text{pH} \approx 10\text{--}11$, наряду с полупрозрачным слоем легко удаляемых продуктов коррозии. При коррозии цинка на начальных стадиях процесса образование жидкого экссудата с $\text{pH} \approx 11$ (рис. 1) происходило при воздействии всех исследуемых бактерий, хотя и в разной степени.

Таблица 1. Изменения поверхности сплавов алюминия в процессе коррозии под действием бактерий*

Бактерии	Время экспозиции, сут													
	Сплав В65						Сплав АД0							
	3	5	20	30	40	60	3	5, 10	15	20	30	40	60	
<i>B. megaterium</i>	А	Б	Б	В	Г	Г	А	Б	Б	Б	В	В	Г	
<i>E. coli 321-5</i>	А	Б	Б	Б	Б	В	А	Б	Б	Б	Б	Б	В	
<i>P. vulgaris 1212</i>	А	Б	Г	Д	Д	Д	А	Б	В	Г	Д	Д	Д	
<i>P. aeruginosa 969</i>	А	Б	Г	Д	Д	Д	А	Б	В	Г	Д	Д	Д	
<i>S. aureus 956</i>	А	Б	Б	В	Г	Г	А	Б	Б	Б	В	Г	Г	
<i>S. salivarius</i>	А	Б	Б	Б	Б	Б	А	Б	Б	Б	Б	Б	В	
	Сплав Д16							Сплав Д16Т						
	3	5	10	20	30	40	60	3	5	10	20	30	60	
	<i>B. megaterium</i>	А	Б	Б	Б	Б	В	В	А	Б	В	Г	Д	Д
<i>E. coli 321-5</i>	А	Б	Б	В	Г	Г	Г	А	Б	Б	Б	Б	Б	
<i>P. vulgaris 1212</i>	А	Б	Б	В	Г	Г	Д	А	Б	Б	В	Г	Д	
<i>P. aeruginosa 969</i>	А	В	Г	Г	Д	Д	Д	А	В	Г	Г	Д	Д	
<i>S. aureus 956</i>	А	Б	Б	В	Г	Г	Д	А	Б	В	Г	Г	Д	
<i>S. salivarius</i>	А	Б	В	В	Г	Г	Г	А	В	Г	Г	Д	Д	

*А – образование жидкого экссудата; Б – локальное потускнение поверхности; В – образование полупрозрачного слоя легко удаляемых продуктов коррозии; Г – коррозия с образованием аморфных, рыхлых продуктов, в том числе гидроксидов; Д – коррозия по всей его поверхности с образованием продуктов, покрывающих более 50% поверхности.

Таблица 2. Характеристика изменений поверхности при биокоррозии цинка под воздействием бактерий*

Бактерии	Время экспозиции, сут						
	10	20–30	35	40	50–57	64–70	90
<i>E. coli 321-5</i>	А	А	А	А, Б	Б, В	Б, В	В
<i>P. vulgaris 1212</i>	А	А	А,Б	А, Б	Б, В	В, Г	Г
<i>P. aeruginosa 969</i>	А	А, Б	А	А, Б	Б, В	В, Г	Г
<i>S. aureus 956</i>	А	А	А, Б	А	Б, В	В	В
<i>S. epidermidis 1061</i>	А	А	А, Б	А, Б	Б, В	Г	Г

* Обозначения см. в табл. 1.

Как видно из табл. 1–2, по отношению к исследованным металлам бактерии проявляли различную коррозионную активность. Наиболее активными по отношению к алюминию, его сплавам и цинку оказались *P. vulgaris 1212*, *P. aeruginosa 969*, хотя по степени воздействия на эти два типа металлов они существенным образом различались (рис. 2, 3). Так, на поверхности сплавов алюминия под воздействием *P. vulgaris 1212* уже через 5 сут наблюдалось образование полупрозрачных продуктов коррозии, легко удаляемых с поверх-

ности образцов (рис. 2а), а через 40 сут коррозия распространялась на всю поверхность (рис. 2б).

Начальные этапы бактериальной коррозии в ряде случаев были аналогичны вызываемой грибами, хотя ее характерные признаки, отмеченные в работах [3–6], были выражены менее ярко.

Наблюдаемая аналогия дает основание считать, что процесс бактериальной коррозии также инициируется взаимодействием супероксидного анион-радикала, выделяемого клетками бактерий, с поверхностью металла. Происходящие при

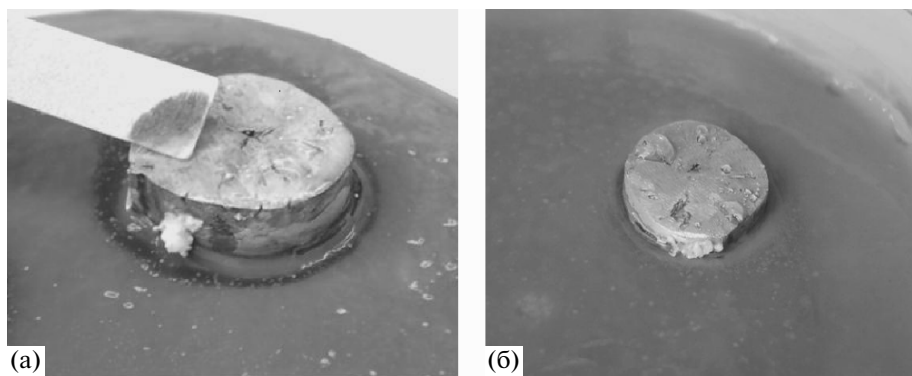


Рис. 1. Изменение поверхности цинка под воздействием бактерий *P. vulgaris* 1212 (а) и *P. aeruginosa* 969 (б) на 3 сут экспозиции.

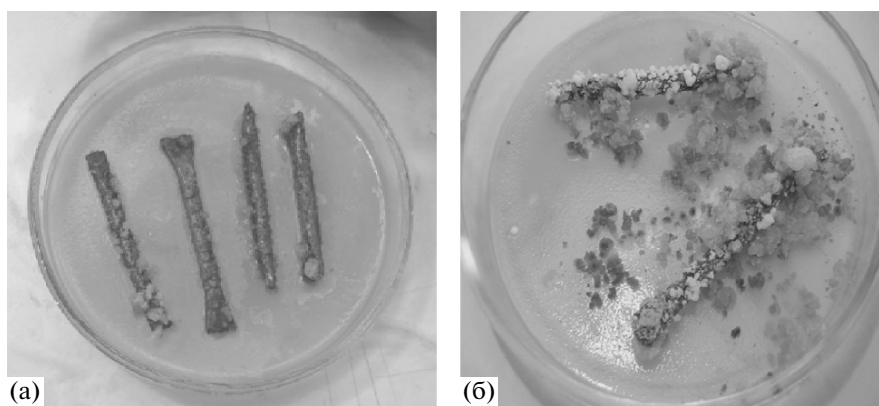


Рис. 2. Динамика коррозионных разрушений образцов сплава В65 при воздействии бактерии *P. vulgaris* 1212: а – 5 сут; б – 40 сут экспозиции.

этом физико-химические изменения состояния поверхности, по-видимому, аналогичны тем, которые описаны в работах [3–6].

Для подтверждения такой интерпретации нами изучалась способность бактерий генерировать супероксидный анион-радикал.

В настоящее время одним из общепринятых методов [10] фиксации внеклеточного $O_2^{\cdot-}$ является его реакция с НСТ. Реакция проходит путем последовательного четырехэлектронного восстановления НСТ (хлорид 2,2'-ди-(4-нитрофенил)-5,5'-дифенил-3,3'-(3',3'-диметокси-4,4'-дифенилен)-дитетразолия) с образованием сначала моно-, а затем диформаза, окрашенных в глубокий сине-фиолетовый цвет [11, 12].

НСТ – реагент высокочувствительный, но не избирательный, поскольку способен восстанавливаться другими относительно слабыми восстановительными системами [13, 14], поэтому для строгого заключения о возможности генерации $O_2^{\cdot-}$ биологическими объектами и его транспорта

во внеклеточную среду анализы с применением НСТ проводятся с использованием фермента СОД [11, 15, 16].

Скорость ферментативной реакции намного выше, чем скорость реакции $O_2^{\cdot-}$ с НСТ. Так, по данным работ [12, 14], скорость реакции $O_2^{\cdot-}$ с НСТ равна $5.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, в то время как константа скорости ферментативного разложения $O_2^{\cdot-}$ имеет значение $1.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [10]. Было установлено, что после инкубации бактерий в течение 15 мин в присутствии НСТ наблюдалось появление синей окраски разной интенсивности. Наиболее глубокое окрашивание фиксировалось в опытах с бактериями *P. vulgaris* 1212 и *P. aeruginosa* 969, а наименьшее – с бактерией *S. epidermidis* 1061. В контрольных вариантах опыта, содержащих СОД, водная суспензия бактерий к этому моменту времени оставалась практически неокрашенной. При более длительном выдерживании контрольных образцов они также приобретали синюю окраску. Очевидно, что после дезакти-

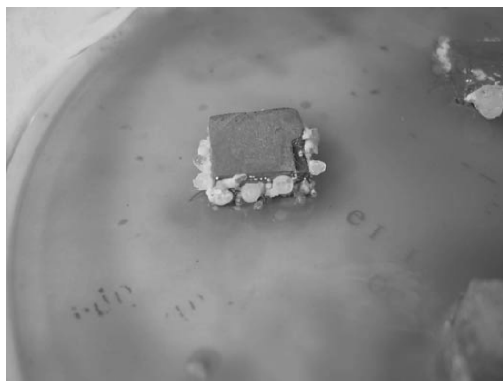


Рис. 3. Внешний вид образца цинка, находящегося под воздействием наиболее активного биодеструктора – бактерии *P. vulgaris* 1212, 90 сут экспозиции.

вазии СОД бактерии продолжали выделять в окружающую среду O_2^- , который и фиксировался реакцией с НСТ.

Полученные данные показывают, что некоторая часть внутриклеточного супероксидного анион-радикала может переходить в окружающую среду и принимать участие в химических реакциях, в том числе и в реакциях на поверхности металла. Наблюдаемую при этом корреляцию между количеством O_2^- , переходящим во внешнюю среду, и интенсивностью коррозии металлов можно рассматривать, как свидетельство участия O_2^- в химических процессах на их поверхности.

Известно, что клеточная стенка бактерий образована фосфолипидами и гликопротеинами (грамотрицательные бактерии) или гликопротеинами, покрытыми слоем фосфорилированных многоатомных спиртов (грамположительные) [17]. Оба типа соединений клеточной стенки, находящиеся в непосредственном контакте с окружающей средой, являются сильнополярными. Поэтому можно предположить, что бактерии легко должны адсорбироваться на полярных адсорбентах, включая поверхность металлов, как это показано в работах [18].

С учетом этих данных литературы можно предположить, что именно на участках с неоднородной поверхностью начинается воздействие бактерий с последующими химическими превращениями с участием O_2^- , описанными в работах [3–6].

По-видимому, динамика коррозии металлов тесно связана с жизнедеятельностью бактерий. Поскольку для выращивания используется среда с полипептидами, то в экспоненциальной фазе роста (более 18 ч) следует ожидать выделения в окружающую среду аммиака, как продукта дезаминирования аминокислот. В экссудате, образующемся на поверхности металлов, подвергшихся

коррозии, после 3 сут экспозиции, методами микрохимического анализа [9] нами, действительно, были обнаружены ионы аммония, а также калия и натрия, последние, по-видимому, диффундируют в экссудат из питательной среды. Наличие ионов калия и натрия в экссудате ранее наблюдали и при грибной коррозии [3–6]. Таким образом, в жидком экссудате с $pH > 7.0$, образующемся на начальных стадиях бактериальной коррозии, присутствуют гидроксиды калия и натрия, а также аммония. Ранее образование жидкого экссудата с основными свойствами, содержащего ионы аммония, было описано также и в работах [3–6].

Образование основного экссудата при бактериальной коррозии хорошо объясняется схемой, предложенной ранее для коррозии под воздействием грибов, и является следствием участия в коррозии металлов супероксидного анион-радикала [3–6].

При длительной экспозиции вследствие автолиза клеток высвобождаются клеточные метаболиты. В качестве главных среди них нами были идентифицированы органические кислоты различных классов. Накопление органических кислот фиксируется уже на 7–10 сут с начала экспозиции и их содержание достигало 50% в продуктах, собираемых с поверхности алюминия после трехмесячной экспозиции. Методом ГЖХ были идентифицированы следующие кислоты (в виде метиловых эфиров): каприловая, каприновая, лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, линолевая, олеиновая, стеариновая, арахиновая, лигноцериновая. В виде триметилсилиловых эфиров были идентифицированы: пировиноградная, лимонная, фумаровая, янтарная; в виде свободных кислот: глюконовая, малоновая, уксусная, пропионовая, глутаровая, α -кетоглутаровая. Аналогичные кислоты найдены среди продуктов коррозии цинка.

Органические кислоты в состоянии взаимодействовать с чистой поверхностью металла с образованием солей, которые во влажной атмосфере проведения эксперимента гидролизуются до свободных кислот и гидроксидов металлов, переходящие со временем в оксидные соединения. На завершающем этапе экспозиции роль органических кислот в коррозионном разрушении металла, по-видимому, является ключевой.

Таким образом, нами установлено, что некоторые штаммы органотрофных бактерий способны вызывать значительные коррозионные разрушения цинка, алюминия и сплавов на его основе. Показана способность бактерий выделять в окружающую среду супероксидный анион-радикал и сделано предположение об участии O_2^- в инициировании коррозии бактериями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Герасименко А.А. // Защита металлов. 1998. Т. 34. № 2. С. 192–207.
2. Герасименко А.А., Матюша Г.В., Иванов С.Н., Плаксин Ю.В. // Защита металлов. 1998. Т. 34. № 1. С. 51–58.
3. Белов Д.В., Соколова Т.Н., Смирнов В.Ф., Кузина О.В., Косюкова Л.В., Карташов В.Р. // Коррозия: материалы, защита. 2007. № 9. С. 36–41.
4. Смирнов В.Ф., Белов Д.В., Соколова Т.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 2. С. 213–218.
5. Белов Д.В., Соколова Т.Н., Карташов В.Р., Смирнов В.Ф., Челнокова М.В., Ляпина М.А. // Известия Вузов. Сер. Химия и химическая технология. 2007. Т. 50. № 6. С. 60–64.
6. Белов Д.В., Челнокова М.В., Соколова Т.Н., Смирнов В.Ф., Карташов В.Р. // Коррозия: материалы, защита. 2009. № 11. С. 43–48.
7. Андреюк Е.И., Коваль Э.З., Билай В.И., Козлова И.А. Микробная коррозия и ее возбудители. Киев: Наукова думка, 1980. 288 с.
8. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография / Ред. В.Г. Березкина. Т. 1. М.: Мир, 1981. 616 с.
9. Столяров К.П. Методы микрохимического анализа. Л.: Изд-во ЛГУ, 1960. 192 с.
10. Свободные радикалы в биологии / Ред. У. Прайор. М.: Мир, 1979. Т. 2. 328 с.
11. Auclair C., Voisin E. // Handbook of Methods for Oxygen Radical Research / Ed. R.A. Greenwald. Boca Raton: CRC Press, 1987. P. 123–132.
12. Bielski B.H.J., Shiue G.G., Bajuk S. // J. Phys. Chem. 1980. V. 84. P. 830–833.
13. Van-Catledge F.A., Allinger N.L. // J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 6272–6273.
14. Bielski B.H.J., Richter H.W. // J. Am. Chem. Soc. 1977. V. 99. P. 3019–3023.
15. Amano D., Kagasaki Y., Usui T. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1975. V. 66. P. 272.
16. Auclair C., Torres M., Hakim Y. // FEBS Lett. 1978. V. 89. P. 26–28.
17. Современная микробиология: Прокариоты. Пер. с англ. / Ред. Й. Ленгелер, Г. Дреус, Г. Шлегель. М.: Мир, 2005. Т. 1. 656 с.
18. Beech I.B., Sunner J.A., Hiraoka K. // Int. Microbiol. 2005. V. 8. P. 157–168.

Role of Superoxide Anion Radicals in the Bacterial Corrosion of Metals

D. V. Belov^a, A. A. Kalinina^a, T. N. Sokolova^a, V. F. Smirnov^b,
M. V. Chelnokova^a, and V. R. Kartashov^a

^a Nizhni Novgorod State Technical University, Nizhni Novgorod

^b Chemistry Research Institute, Nizhni Novgorod State University, Nizhni Novgorod

e-mail: 777aleksa_87@mail.ru, biotekno@nntu.nnov.ru

Received August 16, 2011

Abstract—It was found that seven strains of bacteria can cause corrosion damage to aluminum, its alloys, and zinc. With respect to the studied metals, the most active bacteria were *Proteus vulgaris* 1212 and *Pseudomonas aeruginosa* 969. Superoxide anion radicals were demonstrated to play a role in the initiation of corrosive damage to aluminum and zinc, while bacterial exometabolites participate in the later stages of this process.

УДК 579.22, 57.047

ВЛИЯНИЕ ЛЕТУЧИХ МЕТАБОЛИТОВ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН НА РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ *Listeria monocytogenes* И *Yersinia pseudotuberculosis*

© 2012 г. М. Л. Сидоренко*, Л. С. Бузолева**

* Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток, 690022

** Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, г. Владивосток, 690087
e-mail: sidorenko@biosoil.ru

Поступила в редакцию 06.05.2011 г.

Изучена биологическая активность летучих метаболитов прорастающих семян капусты (*Brassica oleacea*), моркови (*Daucus carota*), салата (*Lactuca sativa*), кукурузы (*Zea mays* L.) в отношении *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis*, являющихся для последних факторами передачи. Показано, что летучие метаболиты прорастающих семян могут быть для этих бактерий единственным источником углерода и энергии. Основным веществом, влияющим на их рост и размножение, является метанол.

В последние десятилетия все большее внимание привлекает к себе группа патогенных микроорганизмов, жизненная программа которых состоит в непрерывном переходе из окружающей среды, где они ведут сапрофитный образ жизни, в организмы человека и теплокровных животных, в которых они проявляют паразитические свойства, вызывая инфекционный процесс, и реверсии к сапрофитизму при возврате в окружающую среду. Возможность сапрофитного существования ряда патогенных микроорганизмов в окружающей среде, совершенно отрицаемая в недавнем прошлом, находит все большее признание [1–6].

Научно-технический прогресс и связанная с ним урбанизация нарушили экологическое равновесие и открыли пути для проникновения патогенных микроорганизмов из внешней среды в окружение человека. Ярким примером в этом отношении являются *Yersinia pseudotuberculosis* – возбудитель псевдотуберкулеза (или дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки) и *Listeria monocytogenes* – возбудитель листериоза [7–13].

Анализ многочисленных вспышек этих заболеваний показал, что чаще всего факторами передачи бактерий человеку являются овощи и корнеплоды (блюда, приготовленные из них) и, прежде всего свежие капуста и морковь для иерсиний, кукуруза и салат для листерий, в которых эти бактерии активно размножаются и накапливаются в значительных количествах, поддерживая высокую степень вирулентности [14–18].

Внутри сложных ассоциаций, формируемых микроорганизмами с растениями в естественных и искусственных системах, складываются различные взаимоотношения [19–20]. В любом сообще-

стве эти взаимоотношения сложны и многообразны. Выделяемые растениями биологически активные вещества могут играть роль регулятора численности бактерий в сообществе “растение–микроорганизм”. Среди них особый интерес вызывают летучие метаболиты, так как известно, что летучие органические выделения прорастающих семян благодаря высокой проникающей способности и доступности для усвоения, могут быть источником углерода и энергии для микроорганизмов. В настоящее время доказано, что ряд бактерий и грибов могут потреблять летучие метаболиты прорастающих семян в качестве единственного источника углерода [21–28].

Известно, что растения являются ведущим компонентом биосферы и определяют главную форму жизни на Земле, поэтому раскрытие закономерностей взаимодействия растений и бактерий важно для понимания распространения патогенных микробов вне теплокровного организма, а также для обоснования механизмов адаптации эукариотических организмов к изменению условий существования, особенно при действии экстремальных факторов.

Цель работы – изучение использования бактериями видов *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pseudotuberculosis* летучих метаболитов прорастающих семян растений.

МЕТОДИКА

Культуры. В качестве объектов исследования использовали следующие штаммы бактерий из музея НИИ ЭМ СО РАМН: грамположительные *Listeria monocytogenes* (штамм 2L, 1/2a) и грамотрицательные *Yersinia pseudotuberculosis* (штамм

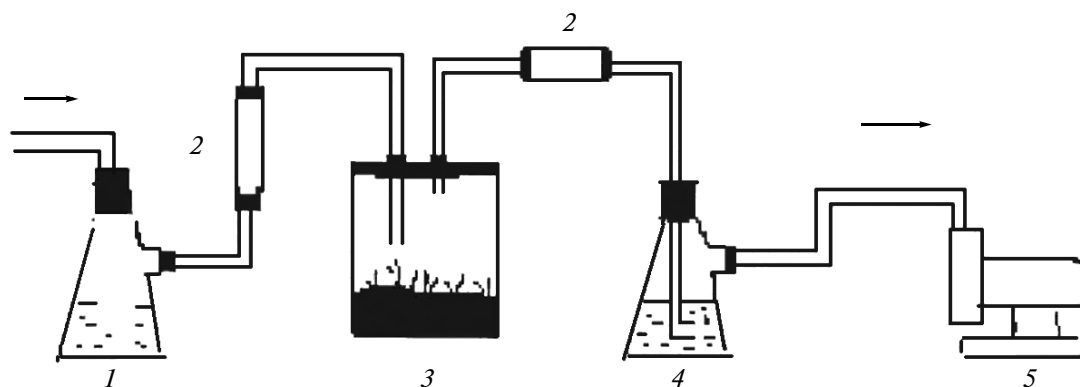


Рис. 1. Схема установки для изучения использования патогенными бактериями летучих метаболитов прорастающих семян: 1 – колба с КОН, 2 – ватные фильтры, 3 – сосуд с почвой и прорастающими семенами, 4 – колба с жидкой средой, инокулированной патогенными бактериями, 5 – перистальтический насос.

512, 3515). В опыте также использовали пророщенные семена растений, являющиеся факторами передачи для иерсиний, – капуста (*Brassica oleacea* L.), морковь (*Daucus carota* L.) и листерий – салат (*Lactuca sativa* L.), кукуруза (*Zea mays* L.) [2, 7].

В качестве источника летучих метаболитов использовали смесь из семян растений (салат, кукуруза, капуста, морковь). Кроме того, культивировали отдельно иерсиний на метаболитах капусты или моркови, а листерий – на метаболитах кукурузы или салата.

Среда. Культивирование микроорганизмов проводили на жидкой минеральной среде без источника углерода, содержащей (%): NH_4NO_3 – 0.3, KH_2PO_4 – 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, KCl – 0.025, pH 6.8–7.0.

Летучие метаболиты. Изучение влияния летучих метаболитов прорастающих семян на размножение бактерий проводили с помощью специально сконструированной установки по схеме Шенк и Стоцкого [5] в нашей модификации (рис. 1). Обработанные семена помещали в сосуд со стерильной почвой (3), который плотно закрывали для того, чтобы в него не поступал воздух извне. Через сосуд при помощи насоса (5) прокачивали стерильный и очищенный от CO_2 воздух. Степень удаления углекислого газа из воздуха проверялась пред постановкой эксперимента с помощью портативного газоанализатора Дукаст-В (“Дельта”, Россия). Стерилизацию воздуха осуществляли ватными фильтрами (2), а очистку воздуха от CO_2 проводили в ловушке (1) заполненной 30%-ным раствором КОН. Воздух, проходящий через сосуд с почвой и семенами, увлекал летучие метаболиты и поступал в колбу с жидкой минеральной средой (4), инокулированной культурой исследуемого микроорганизма. В сосуд с почвой помещали 20–40 семян, в зависимости от вида растения. Систему выдерживали при комнатной температуре 20–22°C.

Инокуляцию 100 мл минеральной среды осуществляли 0.1 мл 1-суточной культуры бактерий, выращенных на агаризованной среде, содержащей 10^2 колониеобразующих единиц (КОЕ). Через определенные промежутки времени отбирали пробы для подсчета количества колоний. Для этого по 0.1 мл инокулированной жидкости с учетом необходимых разведений высевали на плотные среды. Для индикации иерсиний использовали среду Серова, для листерий – казеиново-дрожжевой агар с глюкозой. Количество подсчитанных колоний выражали в общепринятых единицах lg КОЕ/0.1 мл. В качестве контроля использовали сосуд с почвой без семян.

Стерилизация. Внутренние поверхности стеклянных частей установки тщательно обрабатывали 70%-ным раствором этилового спирта, остальные детали – автоклавированием. Семена обрабатывали раствором марганцовокислого калия и промывали стерильной дистиллированной водой. Почву обрабатывали текучим паром трижды по 30 мин. После обработки проводили контроль всех частей установки, семян и почвы на наличие посторонней микрофлоры с использованием питательного агара.

ГЖХ. Определение летучих выделений прорастающих семян осуществляли методом газожидкостной хроматографии. Для хроматографического анализа семена проращивали в плотно закрытых сосудах. Через 24, 48, и 72 ч воздух из сосудов отбирали через резиновые колпачки при помощи 1 мл шприца и вводили его в дозатор хроматографа.

ГЖХ летучих метаболитов прорастающих семян проводили на газовом хроматографе Shimadzu-16A (“Shimadzu”, Япония) газ-носитель – гелий, неподвижная фаза – полиэтиленгликоль, колонка стеклянная, диаметр 0.32 см, длина 10 м, температура колонки – 35°C, испарителя – 100°C, детектора (пламенно-ионизационный) – 100°C,

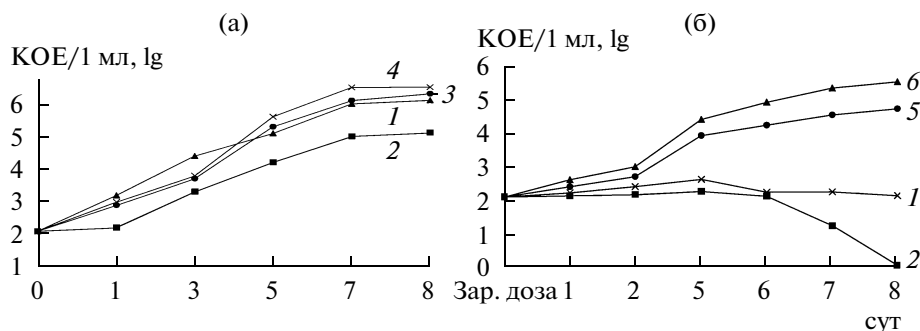


Рис. 2. Размножение *Y. pseudotuberculosis* шт. 512 (а) и *L. monocytogenes* шт. 10CN (б) на летучих выделениях прорастающих семян. 1 – смесь семян, 2 – контроль, 3 – морковь, 4 – капуста, 5 – салат, 6 – кукуруза.

давление водорода и воздуха на детекторе – 0.5 кг/см. Расчет и обработку хроматограмм проводили на специализированном компьютере Shimadzu-cR-4A (“Shimadzu”, Япония). Определение качественного состава летучих органических веществ производили путем сравнения полученных хроматографических пиков с пиками чистых летучих органических веществ (эталон).

Повторность опытов – трехкратная, результаты обрабатывались статистически в компьютерной программе электронных таблиц Excel 7 с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучали влияние летучих метаболитов смеси семян растений (салат, кукуруза, морковь, капуста) на размножение *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis* с помощью специально сконструированной установки. В результате эксперимента было показано, что летучие метаболиты прорастающих семян стимулировали размножение исследуемых бактерий в 10–100 раз по сравнению с контролем (рис. 2). Анализ полученных данных позволил сделать заключение, что интенсивность размножения листерий и иерсиний на летучих метаболитах смеси растений зависела от вида бактерий. Так, количество бактерий *Y. pseudotuberculosis* в минеральной среде увеличилось в 2 раза на 7 сут роста, по сравнению с листериями. Полученные результаты подтверждаются данными литературы, где имеется указание на то, что не все бактерии способны усваивать летучие метаболиты прорастающих семян [19]. Следует отметить также, что иерсинии размножались на летучих метаболитах на протяжении всего срока наблюдения (8 сут), а у листерий на 6 сут интенсивность размножения значительно снизилась (рис. 2).

Известно, что использование летучих органических соединений, зависит от вида бактерий и проращиваемых семян [24]. В связи с этим нами был изучен рост листерий и иерсиний на метаболитах растений в зависимости от вида проращи-

ваемых семян. Для этого исследуемые бактерии культивировали на летучих метаболитах прорастающих семян отдельных видов растений, являющихся для них факторами передачи: листерий – на кукурузе и салате, а иерсиний – на метаболитах моркови и капусты.

Обнаружено, что использование летучих соединений растений бактериями зависело как от свойств самих бактерий, так и от вида растений. При сопоставлении данных, полученных при культивировании микроорганизмов на летучих веществах смеси семян и отдельно взятых растениях, наблюдали избирательный рост бактерий на метаболитах прорастающих семян в зависимости от вида растений (рис. 2). Так, иерсинии практически одинаково размножались как на летучих метаболитах моркови, так и на летучих метаболитах капусты, достигая максимальной концентрации 400 100 КОЕ/0.1 мл, при заражающей дозе 130 КОЕ/0.1 мл, что несколько ниже (на 239 900 КОЕ/0.1 мл), чем в опыте с использованием смеси семян всех растений. Листерии предпочтительно размножались на летучих метаболитах кукурузы, достигая при этом значений 260 200 КОЕ/0.1 мл при заражающей дозе 130 КОЕ/0.1 мл, что на 25 759 800 КОЕ/0.1 мл выше, по сравнению с ростом на летучих метаболитах смеси растений. При этом регистрировали увеличение численности листерий и иерсиний на протяжении всего срока наблюдения (8 сут). В опыте с одновременным использованием семян всех растений увеличение численности листерий не было отмечено, а в контроле интенсивность размножения этих бактерий падала до нуля.

По данным некоторых авторов [19, 24], качественный состав летучих выделений может положительно либо отрицательно влиять на процесс потребления этих соединений бактериями. Ряд исследователей [20, 26] отмечает, что основными компонентами, служащими источниками углерода и энергии в выделениях прорастающих семян, являются этанол и ацетальдегид. Другие авторы указывают на то, что летучие метаболиты прорас-

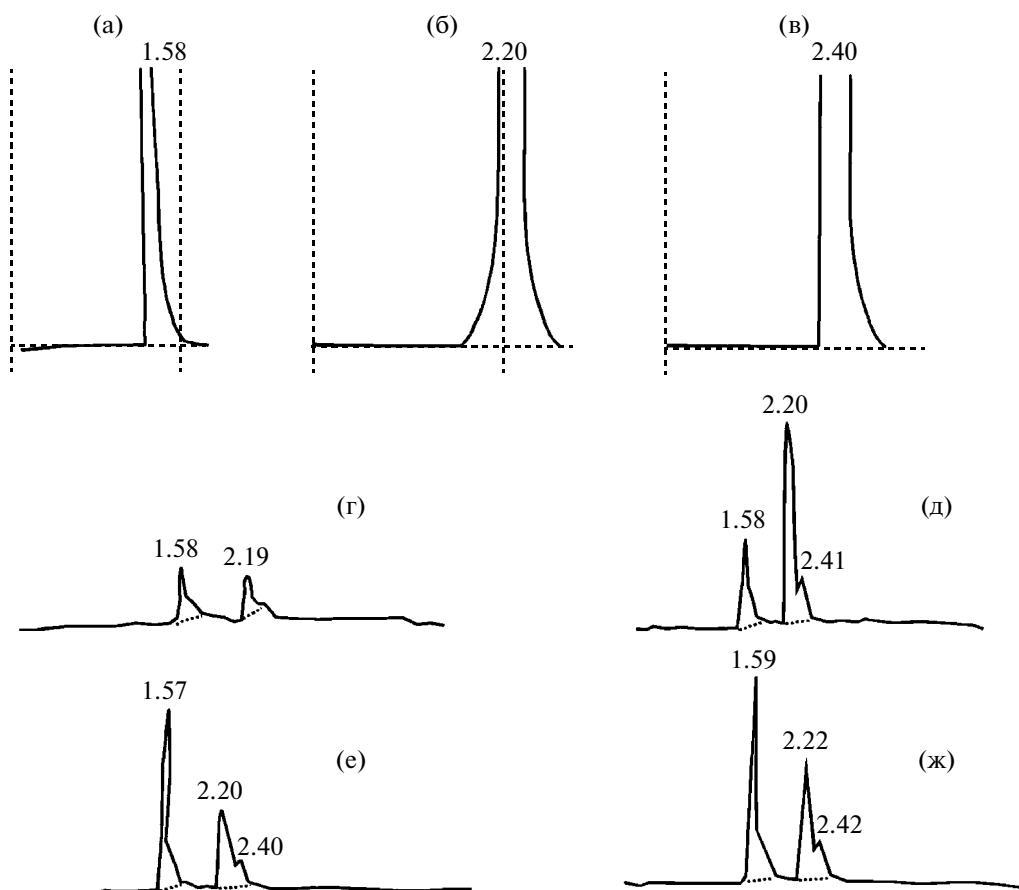


Рис. 3. Хроматограммы летучих метаболитов прорастающих семян (показаны наиболее информативные участки), а – ацетальдегид (контроль), б – метанол (контроль), в – этанол (контроль), г – морковь, д – кукуруза, е – капуста, ж – салат. Цифры на максимумах указывают время выхода пика на хроматограмме данного соединения для определения максимума его поглощения.

тающих семян содержат метанол, пропанол, муравьиный и пропионовый альдегиды, ацетон, этилен [21, 25].

Для выяснения зависимости между ростом численности бактерий и качественным составом летучих метаболитов прорастающих семян был проведен газохроматографический анализ летучих веществ. Из данных хроматографического анализа прорастающих семян кукурузы, моркови, салата, капусты, представленных на рис. 3, видно, что их летучие вещества содержали в достаточно высоких концентрациях ацетальдегид, метанол, этанол. При этом наибольшее количество метанола выделялось проростками кукурузы, гораздо меньше его содержали летучие выделения проростков моркови, капусты и салата. Поскольку в присутствии прорастающих семян кукурузы наблюдалось более интенсивное размножение *L. monocytogenes*, чем в опытах с салатом и смесью семян, установлено, что одним из основных веществ, влияющих на размножение листерий, являлся метанол.

По данным хроматографических исследований, летучие выделения капусты и моркови содержали метанола меньше, чем ацетальдегида (рис. 3). Кроме того, они выделяли меньшее количество метанола, чем кукуруза. Было показано, что при культивировании *Y. pseudotuberculosis* отдельно на летучих метаболитах прорастающих семян моркови и капусты бактерии размножались хуже, чем на летучих метаболитах смеси семян, в состав которых входила кукуруза. Полученные данные позволяют предположить, что в условиях лимитирования источника углерода, иерсинии так же, как и листерии, используют для питания метанол. В ранее опубликованных нами исследованиях было показано, что метанол стимулирует размножение иерсинии и листерии в физиологическом растворе и фосфатно-солевом буфере [29, 30].

Таким образом, установлен один из механизмов адаптации листерии и иерсинии к условиям окружающей среды: летучие метаболиты прорастающих семян могут являться для них единственным источником углерода и энергии. Показано, что основным летучим веществом, влияющим на

рост и размножение изучаемых бактерий, является метанол.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сомов Г.П., Литвин В.Ю. Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий: экологические аспекты. Новосибирск: Наука, 1988. 208 с.
2. Литвин В.Ю., Сомов Г.П., Пушкарева В.И. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2010. № 1. С. 10–16.
3. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М.: Медицина для всех, 2002. 200 с.
4. Литвин В.Ю., Гинцбург А.Л., Пушкарева В.К., Романова Ю.М., Боев Б.В. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий / Ред. С.В. Прозоровский. М.: Изд-во Фаргус-Принт, 1998. 256 с.
5. Гершун В.И. // Экология возбудителей сапронозов. М.: Наука, 1988. С. 80–85.
6. Литвин В.Ю. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунол. 1999. № 5. С. 26–33.
7. Тимченко Н.Ф., Булгаков В.П., Булах Е.В., Яснецкая Е.Г., Журавлев Ю.Н. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунол. 2000. № 1. С. 6–10.
8. Тирранен Л.С., Шиленко М.П. // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2008. Т. 42. № 6/1. С. 36–39.
9. Маркова Ю.А., Романенко А.С., Игумнова Е.К., Салеев Р.К. // Докл. РАН. 2002. Т. 386. № 2. С. 277–279.
10. Маркова Ю.А., Романенко А.С., Духанина А.В. // Микробиология. 2005. Т. 74. № 4. С. 1–4.
11. Сомов Г.П., Бузолева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. Владивосток: Примполиграфкомбинат, 2004. 168 с.
12. Alfano J.R., Collmer A. // Plant Cell. 1996. V. 8. P. 1683–1698.
13. Ausubel F.M. // Nat. Immunol. 2005. V. 6. № 10. P. 973–979.
14. Рожкова Л.П. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка (псевдотуберкулез человека). Владивосток: Дальнаука, 1974. С. 35–38.
15. Годова Г.В., Пушкарева В.К., Калашикова Е.А., Борисова Е.Ю., Ермолаева С.А., Литвин В.Ю. // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2009. № 4. С. 80–89.
16. Денисов К.А., Усенко А.Д., Слюсарь Л.И., Ванханен В.В., Беседина Е.И., Ванханен В.Д., Мельник В.А. // Вестник гигиены и эпидемиологии. 2000. Т. 4. № 2. С. 219–223.
17. Falkao D.P., Correa E.F., Falkao G.P. // Adv. Exp. Med. Biol. 2003. V. 529. P. 341–343.
18. Jacson A.O., Taylor C.B. // Plant Cell. 1996. V. 8. P. 1651–1668.
19. Morello J.E. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 5. P. 3103–3109.
20. Mounier J., Goerges S., Gelsomino R., Vancanneyt M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Brennan N.M., Scherer S., Swings J., Fitzgerald G.F., Cogan T.M. // J. Appl. Microbiol. 2006. V. 101. P. 668–681.
21. Бурмистрова А.Л. Антибиотики и антибиотикорезистентность. Проблемы и пути решения. Челябинск: Изд-во “Челябинский Дом печати”, 2004. 179 с.
22. Tirranen L.S. // Adv. Space Res. 2006. V. 38. P. 1227–1232.
23. Tirranen L.S., Gitelson I.I. // Adv. Space Research. 2006. V. 38. P. 1227–1232.
24. Tirranen L.S., Borodina E.V., Ushakova S.A., Rygalov V.Ye., Gitelson I.I. // Acta Astronautica. 2001. V. 49. № 2. P. 105–108.
25. Tirranen L.S. // Acta Astronautica. 2001. V. 49. № 1. P. 47–52.
26. Андреев Л.Н., Талиева М.Н. // Бюлл. ГБС. 1995. Вып. 171. С. 161–167.
21. Власов А.А., Павлова И.Б. // Сельскохозяйственная биология. 2009. № 4. С. 89–92.
22. Ermolaeva S., Belyi Y., Tartakovskii I. // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 174. № 1. P. 137–141.
29. Бузолева Л.С., Сомов Г.П. // Биохимия. 1999. Т. 64. Ж10. С. 1357–1361.
30. Сидоренко М.Л., Бузолева Л.С. // Микробиология. 2008. Т. 77. № 2. С. 273–277.

Effect of Volatile Metabolites from Germinating Seeds on the Reproduction of the Bacteria *Listeria monocytogenes* and *Yersinia pseudotuberculosis*

M. L. Sidorenko^a and L. S. Buzoleva^b

^a Institute of Biology and Soil Sciences, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia
e-mail: sidorenko@biosoil.ru

^b Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Vladivostok, 690087 Russia

Received May 6, 2011

Abstract—The biological activity of volatile metabolites of germinating seeds of cabbage (*Brassica oleacea*), carrot (*Daucus carota*), salad (*Lactuca sativa*), and corn (*Zea mays* L.) against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia pseudotuberculosis* was studied. It was shown that volatile metabolites are transfer factors and can be the sole carbon and energy source for these bacteria. Methanol is the main substance affecting their growth and reproduction.

УДК 577.112,582.284.51

СИНТЕЗ АУКСИНА ВЫСШИМ ГРИБОМ *Lentinus edodes* (Berk.) Sing В ПРИСУТСТВИИ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ СОЕДИНЕНИЙ ГРУППЫ ИНДОЛА

© 2012 г. О. М. Цивилева, Е. А. Лощина, О. Е. Макаров, В. Е. Никитина

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

e-mail: tsivileva@ibppm.sgu.ru

Поступила в редакцию 21.03.2011 г.

Исследовано образование ауксина в глубинной культуре ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] (шиитаке). Выявлены биологически активные вещества индольной природы, “эффект малых доз” которых заключается не только в стимулировании роста мицелия (индолил-3-уксусная кислота, 2×10^{-7} – 2×10^{-4} г/л), но и в индуцировании триптофан-независимого пути биосинтеза ауксина. Указанный путь реализуется в присутствии экзогенного индола (1×10^{-3} – 1×10^{-4} г/л), а также при индуцировании биосинтеза индолил-3-уксусной кислоты ее микродобавками (1×10^{-5} – 1×10^{-8} г/л), и сопровождается образованием антраниловой кислоты (до 1.5 мг/л). Выявлена индукция генеративной стадии развития шиитаке индольным производным. Установлено, что среди изученных соединений только индолацетамид в концентрации порядка $\times 10^{-4}$ г/л в культуральной жидкости *L. edodes* оказывает ярко выраженное стимулирующее влияние на формирование коричневой мицелиальной пленки шиитаке.

Свойства соединений фитогормональной природы, характеризующиеся высокой степенью изученности у высших растений и интенсивно исследуемые у почвенных ассоциативных микроорганизмов, лишь в несистематическом порядке и на явно недостаточном уровне описаны у макробазидиальных грибов. Ауксины являются наиболее изученной группой фитогормональных веществ. В качестве объекта исследований, наряду с другими микологическими объектами промышленного культивирования, особый интерес представляет высший гриб-ксилотроф, сочетающий высокую практическую значимость и явно недостаточно изученные физиолого-биохимические особенности, базидиомицет *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] (шиитаке). Достаточно давно выдвигаются предположения о том, что фитогормоны, в том числе представители группы ауксинов, принимают участие в процессах роста и цитодифференцировки не только у растений, но и у грибов. Однако этот вопрос до сих пор остается практически неисследованным.

Особый интерес вызывают эффекты и механизмы действия биологически активных веществ в “малых дозах”. В малых и сверхмалых концентрациях (10^{-20} – 10^{-13} моль/л) проявляют свою активность многие природные хемомедиаторы – токсины и противоядия, вещества, предупреждающие об опасности, феромоны, крипротекторы, другие соединения, в том числе фитогормоны [1]. Описан

парадоксальный характер действия низких концентраций токсичных веществ и лекарственных препаратов, который заключается, в частности, в бимодальной или полимодальной зависимости “доза–эффект”. Отмечается [2], что последствия от воздействия малых доз ксенобиотиков могут быть не менее серьезными, чем последствия от высоких разовых доз: под их влиянием могут меняться существующие связи, давать сбой некоторые системы адаптации, поскольку организм способен приспосабливаться лишь к эффектам, лежащим в обычном диапазоне действия.

Известно два основных пути биосинтеза фитогормона индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) – триптофан-зависимый (Трп-зависимый), при котором предшественником ИУК служит аминокислота триптофан, и триптофан-независимый (Трп-независимый), когда ИУК образуется из индола, антраниловой кислоты, индолил-3-глицерофосфата [3]. Трп-зависимый синтез ИУК микроорганизмами может проходить по одному из 4 путей: через индолил-3-пировиноградную кислоту и индолил-3-уксусный альдегид (наиболее распространенный путь); через триптамин и индолил-3-уксусный альдегид; через индолил-3-ацетамид либо через индолил-3-уксусный нитрил. По некоторым данным, индолилацетальдоксим может также конвертироваться в ИУК через индолилацетальдегид [4, 5]. Многие фитопатогенные грибы и бактерии обладают несколькими путями биосинтеза ИУК.

Пути биосинтеза ИУК у макробазидиомицетов рассматривались, в лучшем случае, только на уровне положительного/отрицательного влияния добавок триптофана к среде выращивания.

Цель работы – исследование состава группы индольных метаболитов, сопровождающих продукцию ИУК базидиомицетом *Lentinus edodes*, установление, является ли этот путь биосинтеза ИУК Трп-зависимым, либо происходит переключение на Трп-независимый путь при выращивании ксилотрофа в присутствии экзогенных синтетических аналогов соединений – предшественников ИУК.

МЕТОДИКА

В работе использовали культуру *Lentinus edodes*, штамм F-249, полученный из коллекции высших базидиальных грибов кафедры микологии и альгологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Культуру гриба поддерживали на сусло-агаре при 4°C.

В качестве инокулята использовали 14-суточную культуру *L. edodes*, выращенную на агаризованном пивном сусле (4° по Баллингу). Температура выращивания – 26°C. Из полученного мицелия в стерильных условиях с помощью металлического пробойника диаметром 5 мм получали блоки, которыми инокулировали жидкие питательные среды из расчета 2 блока на 20 мл среды.

Глубинную культуру гриба выращивали на жидкой синтетической глюкозо-аспарагиновой среде (глюкоза – 9, L-аспарагин – 1.5 г/л), на пивном сусле (1.2° по Баллингу). Для определения сухой биомассы мицелий фильтровали через предварительно взвешенные на аналитических весах фильтры и высушивали до постоянной массы.

Для исследования влияния соединений индольной природы их добавляли в виде растворов в смеси этанол – H₂O (1 : 1, по объему) к подвергнутой автоклавированию глюкозо-аспарагиновой среде непосредственно перед посевом в стерильных условиях. Концентрации индольных соединений в питательной среде 0.1; 1; 10 и 100 мг/л. Действие ИУК на рост культуры изучали в интервале 10⁻⁸–10⁻¹ г/л.

Индольные соединения определяли в культуральной жидкости методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием в качестве стандартов чистых коммерческих препаратов ИУК, Трп, триптамина (Там), индолилацетамида (ИААм), индолилпириновиноградной кислоты (ИПВК), индолилацетальдегида (ИААльд), индола, индолил-3-ацетонитрила, антраниловой кислоты и 5-гидрокси-индолил-3-ук-

сусной кислоты (5-гидрокси-ИУК). Для идентификации и количественного определения индольных соединений пробы культуральной жидкости отбирали в стерильных условиях в процессе роста культуры, фильтровали, используя фильтры фирмы “Millipore” (Ирландия) типа 0.22 мкм GVPP (торговой марки “Durgapore® membrane filters”), и анализировали. Распределительную обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на носителе с химически связанными гидрофобными остатками C₁₈ (5 мкм). Колонка (150 × 4.6 мм) “Luna 5μ C18(2)” (“Phenomenex”, США), снабженная предколонкой (типа Security Guard) той же марки. Элюент – смесь метанол–вода (36 : 64 либо 50 : 50, об./об.). Использовали детектор УФ-поглощения, работающий в диапазоне длин волн 250–300 нм. Объем пробы 20 мкл, давление 12 МПа.

Использовано массовое (*m/V*) выражение концентрации индольных соединений в жидких средах. Выбранный способ выражения концентрации используется в абсолютном большинстве опубликованных статей, имеющих отношение к представленной в настоящей работе тематике, и поэтому позволяет проводить сравнения в наиболее удобной для восприятия форме.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Промежуточные продукты биосинтеза ИУК у *L. edodes*. Нашим предположением о существовании Трп-зависимого синтеза ИУК грибом способствовали следующие наблюдения.

1. Обнаружено явление биосинтеза внеклеточного Трп изученным штаммом *L. edodes*. На синтетической среде, изначально не содержащей этой аминокислоты, концентрации Трп изменялись в пределах от 14 на 7 сут до 24 мг/л на 21 сут. При этом снижение концентрации наблюдалось на 7 и 14 сут. Для всех изученных возрастов культуры внесение в среду добавок Трп (10 и 100 мг/л) привело к значительному повышению содержания этого вещества в культуральной жидкости по сравнению с исходным. Максимальное количество Трп, составившее около 330 мг/л, отмечено на 14 сут на среде с добавкой 100 мг/л этой аминокислоты.

2. Выявлено, что глубинная культура *L. edodes* F-249, растущая на глюкозо-аспарагиновой среде, способна к образованию экстрацеллюлярной ИУК. В контрольном опыте наибольшая концентрация этого ауксина (около 7.5 мг/л) наблюдалась на 21 сут. При экзогенном введении в питательную среду Трп содержание ИУК повысилось, а максимума (9.4 мг/л) достигло на 14 сут на среде с добавкой 100 мг/л аминокислоты, т.е. при наибольшей концентрации Трп.

Влияние индола на образование внеклеточных индольных соединений грибом *L. edodes* F-249

Условия опыта	Конечная концентрация в культуральной жидкости, мг/л					
	Время культивирования, сут	ГАм	ИААм	ИУК	ИПВК	Трп
Контроль (среда без индола)	3	3.7±	3.3	3.7	н.о.*	19.5±
	7	3.8	3.2	н.о.	н.о.	13.8
	10	4.2	3.1	н.о.	н.о.	18.6
	14	3.4	2.3	3.7	0.9	16.9
	21	3.9	3.7	7.4	7.7	23.9
0.1	3	3.1	3.4	4.0	1.0	17.5
	7	1.3	н.о.	н.о.	0.3	9.5
	10	1.9	н.о.	н.о.	0.7	10.8
	14	2.5	2.6	6.9	5.3	16.1
	21	3.3	3.4	9.0	11.6	20.5
1	3	2.5	2.7	5.5	н.о.	14.8
	7	1.3	н.о.	н.о.	0.4	8.3
	10	1.5	н.о.	н.о.	0.9	9.8
	14	2.3	2.3	5.6	2.8	16.2
	21	2.9	2.7	7.4	5.9	16.7
10	3	2.9	3.0	3.4	0.5	17.1
	7	1.9	н.о.	н.о.	0.3	9.9
	10	1.8	н.о.	н.о.	0.9	7.9
	14	2.4	2.2	6.2	4.7	15.6
	21	3.7	2.7	8.1	7.7	17.2
100	3	3.1	3.5	н.о.	0.2	13.9
	7	1.2	н.о.	н.о.	0.4	13.9
	10	1.2	н.о.	н.о.	0.4	10.1
	14	2.4	2.2	6.1	4.2	15.5
	21	3.3	2.2	2.2	16.7	19.1

* н.о. — не определяется.

Таким образом, на стартовых позициях выявления способа образования фитогормона культурой гриба налицо была биосинтетическая способность гриба в отношении ИУК и ее предшественника Трп.

Основные известные пути биосинтеза ИУК связаны с Трп. Путь, не зависимый от триптофана (Трп-независимый), встречается у растений, а среди бактерий обнаружен у азоспирилл и цианобактерий. К настоящему времени превалирует мнение, что вклад Трп-независимого пути в биосинтез

ИУК незначителен, сам механизм этого пути биосинтеза ауксинов не изучен. И все-таки мнения исследователей разделились. Так, хотя предшествующие работы доказывают существование индолацетамидного пути у *Azospirillum brasilense* [6], приводят биохимические и генетические обоснования использования азоспириллами также пути через ИПВК [7, 8], и в то же время делают предположения о том, что 90% ИУК у *Azospirillum* биосинтезируется по триптофан-независимому пути [6].

Ранее полученные нами данные [9] показали, что в культуральной жидкости *L. edodes* F-249 присутствуют промежуточные соединения трех путей Трп-зависимого биосинтеза ИУК — через ТАм, ИААм и ИПВК (таблица). Это согласуется с известными данными, согласно которым способность синтезировать ИУК сразу по нескольким разным реакциям обнаружена у различных микроорганизмов, в том числе некоторых грибов. Интересно, что ИААльд, являющийся интермедиатом синтеза ИУК как из ИПВК, так и из ТАм, выявлен только на средах с добавкой ИПВК, где ИААльд накапливался в больших количествах, однако уровень ИУК в то же время был очень низким. Путь через ИПВК не реализуется до конца. Ни в одном из изученных образцов не был обнаружен индол-3-ацетонитрил, еще одно промежуточное соединение синтеза ИУК из Трп. Это согласуется с данными литературы, согласно которым у грибов случаев синтеза ИУК через это соединение до сих пор не было выявлено [5].

Предпосылки Трп-независимого пути синтеза ИУК у шиитаке. Наши предположения о возможности существования у изучаемой грибной культуры пути биосинтеза ИУК, отличного от Трп-зависимого, основывались изначально на следующем. Принято считать [10, 11], что бактериальный синтез ИУК — это путь детоксификации триптофана. Как указывают некоторые авторы [12], у бактерий, например *A. brasilense*, нет иного пути деградации токсичного для них Трп, кроме трансформации его в ИУК. Поэтому для бактериальных продуцентов именно Трп — наиболее эффективный и “целесообразный” предшественник ИУК [13].

Для изучаемого нами высшего гриба, в отличие от азоспирилл, Трп токсичным не является по крайней мере вплоть до относительно высоких концентраций, которые грибная культура создает при глубинном культивировании (до 330 мкг/мл, см. выше).

Трп-независимый путь связан с синтезом ИУК из индола, антраиловой кислоты, индолил-3-глицерофосфата. Одним из сложных моментов на пути доказательства Трп-независимости биосинтеза ИУК является то, что индол — вещество, которое может служить как предшественником ИУК при Трп-независимом биосинтезе, так и предшественником триптофана. Трп, синтезированный из индола, затем также может служить предшественником для ИУК [14].

В результате изучения биосинтеза ИУК бактериями многие авторы приходят к выводам, позволяющим им судить о предпочтительных веществах — предшественниках ИУК на пути ее биосинтеза. Аргументы таковы:

(1) бактерии не могут производить ИУК Трп-независимым путем при культивировании с индолом как предшественником этого фитогормона, потому что синтез ИУК не стимулировался при выращивании бактерий на средах с индолом [13]. Это предполагает, что индол не является предпочтительным предшественником ИУК в сравнении с Трп;

(2) использование микроорганизмами антраиловой кислоты или индола для синтеза ИУК “бестриптофановым” путем маловероятно, поскольку присутствие Трп в культуральной жидкости продемонстрировано во всех экспериментах.

На основании полученных в настоящей работе экспериментальных данных можно представить аргументы за и против сосуществования двух альтернативных путей биосинтеза ИУК у *L. edodes*, Трп-зависимого и Трп-независимого.

Среды с добавлением индола характеризовались достаточно высокими значениями ИУК (до 9 мг/л) на 14–21 сут культивирования, причем количества образовавшейся ИУК не зависели от исходной концентрации индола. Исключение составила среда со 100 мг/л индола, где на 21 сут уровень ИУК снизился, причем концентрация ИПВК в этой же точке резко увеличилась. Данные представлены в таблице. Таким образом, индол стимулировал синтез ИУК.

В наших экспериментах на синтетической среде, изначально не содержащей этого вещества, концентрации внеклеточного Трп колебались в пределах от 13.8 мг/л на 7 сут до 23.9 мг/л на 21 сут. То есть формально не отмечены случаи, когда ИУК синтезируется культурой в отсутствие триптофана, и Трп-зависимый путь биосинтеза ИУК имеет место у изучаемой грибной культуры. Тем не менее можно предположить, что происходит переключение на Трп-независимый путь или подключение этого альтернативного пути (что вероятнее), реализуемого в присутствии экзогенного индола в интервале концентраций 1×10^{-3} – 1×10^{-4} г/л (таблица).

Необходимо оговориться в отношении добавок индола, что и в этом случае фоновый уровень Трп есть, но, во-первых, он практически неизменен в сравнении с контрольным опытом, а ИУК синтезируется в 1.5–1.9 раз больше (рис. 1а). И это несмотря на снижение биомассы гриба под воздействием индола, который явно не оказывал положительного влияния на ростовые показатели *L. edodes*. Он вызывал заметное снижение биомассы по сравнению с контролем (до 34% на среде с 100 мг/л индола) и сильно замедлял рост культуры (рис. 2).

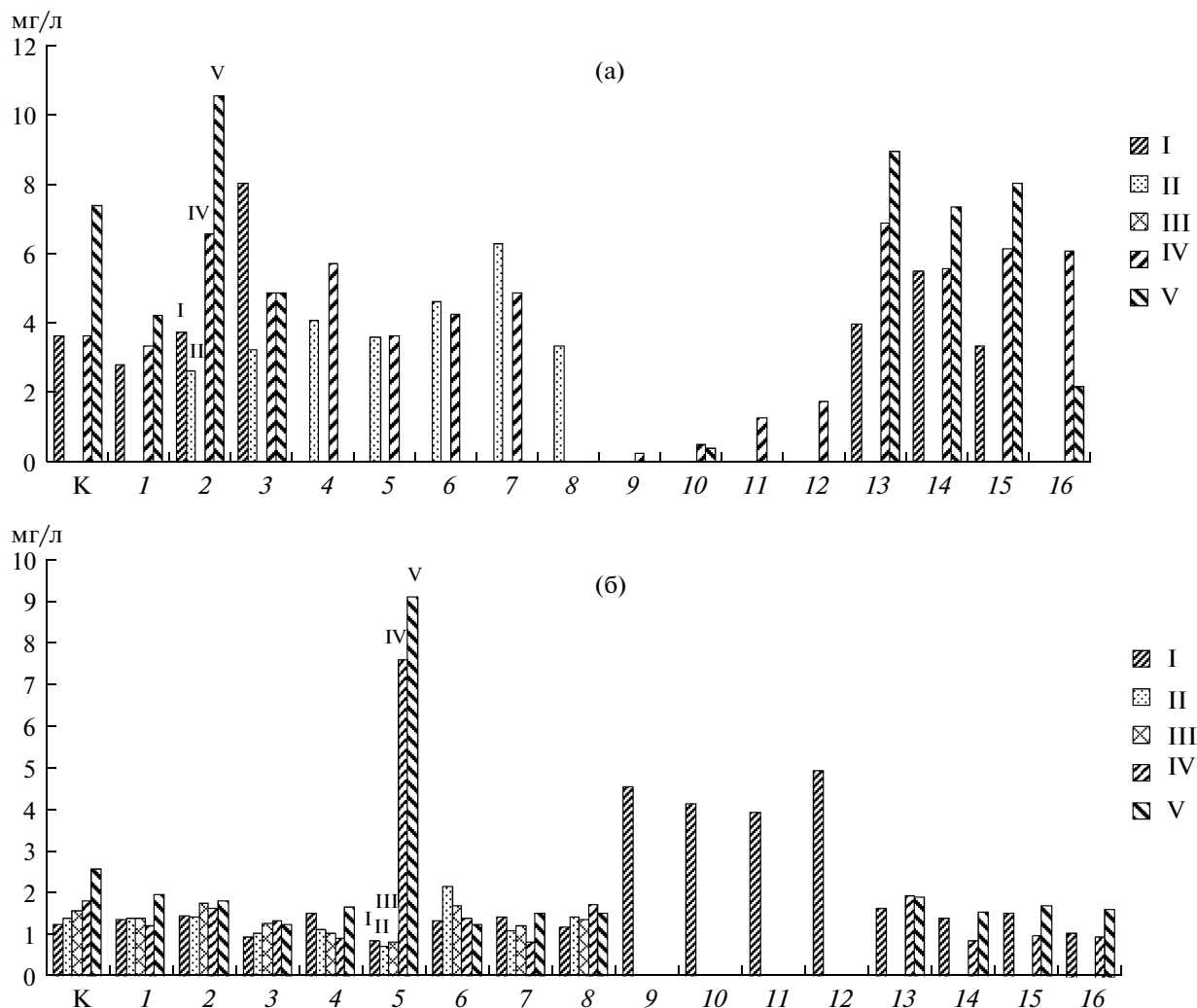


Рис. 1. Синтез (мг/л) внеклеточной ИУК (а) и 5-гидрокси-ИУК (б) глубинной культурой *Lentinus edodes* F-249 на средах с добавлением индольных соединений при различной продолжительности культивирования (сут): I – 3; II – 7; III – 10; IV – 14; V – 21; K - контроль; Там (1 – 0.1; 2 – 1; 3 – 10; 4 – 100 мг/л); ИААм (5 – 0.1; 6 – 1; 7 – 10; 8 – 100 мг/л); ИПВК (9 – 0.1; 10 – 1; 11 – 10; 12 – 100 мг/л); индол (13 – 0.1; 14 – 1; 15 – 10; 16 – 100 мг/л).

Во-вторых, концентрация Трп в среде совершенно индифферентна в отношении возрастания уровня экзогенного индола в 1000 раз (от 0.1 до 100 мг/л), а потому индол предположительно не является в данном случае сколько-нибудь значимым предшественником Трп с дальнейшим превращением последнего в ИУК. Повышенный уровень индола в культуральной среде усиливал биосинтез ИУК, а не триптофана. Поэтому мы говорим о подключении Трп-независимого пути.

Не только в случае с экзогенным индолом имеются признаки этого пути, но также при индуцировании биосинтеза ИУК ее экзогенными микродобавками (1×10^{-5} – 1×10^{-8} г/л). Например, при исходной концентрации 1×10^{-7} г/л ИУК на 10 сут выращивания уровень фитогормона составил около

4×10^{-4} г/л, т.е. возрос в 4000 раз (рис. 3а). Появление антраниловой кислоты (до 1.5 мг/л) как признака Трп-независимого пути отмечено нами только в этих экспериментальных условиях (рис. 3б). В то же время сам Трп в культуральной жидкости не был обнаружен ни при одной из 8 исследованных концентраций добавки ИУК.

Кроме антраниловой кислоты, в присутствии низких концентраций ИУК (1×10^{-4} – 1×10^{-8} г/л) синтезируется ИПВК, однако появления ИААльд – продукта конверсии ИПВК на пути Трп-зависимого синтеза ИУК – не наблюдалось. Эта ситуация с ИААльд меняется со сдвигом экзогенной ИУК в область более высоких концентраций (1×10^{-4} – 1×10^{-1} г/л), когда на 10 сут роста, например, накапливалось от 3.6 до 8.7 мг/л ИААльд (рис. 4а).

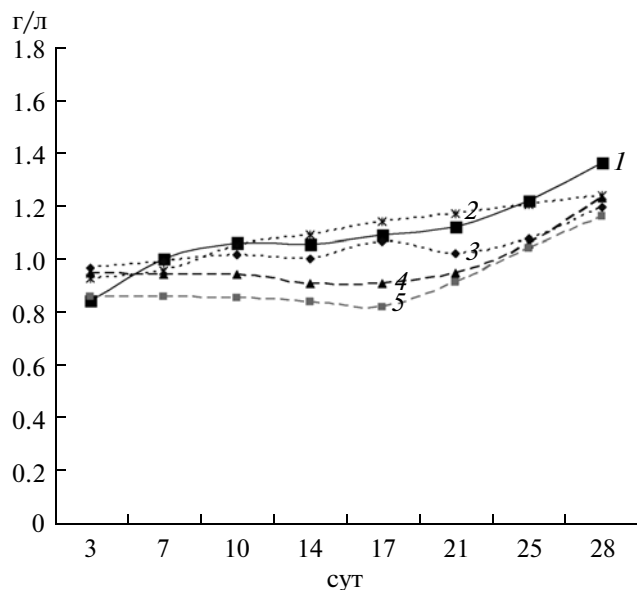


Рис. 2. Накопление биомассы мицелия (г/л) глубоководной культурой *Lentinus edodes* F-249 различного возраста (сут) на средах с добавлением индола (мг/л). 1 — 0; 2 — 0.1; 3 — 1; 4 — 10; 5 — 100.

Следовательно, обычно выдвигаемые в литературе причины отсутствия Трп-независимости биосинтеза ИУК у бактерий не имеют места в отношении *L. edodes*. Полученные результаты предполагают, что антраниловая кислота или индол достаточно эффективные предшественники ИУК по сравнению с Трп. А также позволяют выявить эффект низких концентраций экзогенных индольных соединений в изучаемой грибной культуре.

Эффект малых доз ИУК в глубоководной культуре шиитаке. Биологическая активность ИУК в низких концентрациях не изучена, окончательно не определен молекулярный механизм фитогормонального действия ИУК, нет объяснения двухфазности воздействия гетероауксина. Одно из проявлений указанной двухфазности обнаружено в работе С.М. Рогачевой [1]. При моделировании действия ИУК на популяцию использовалась культура зеленых протококковых водорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. (водоросли этого рода продуцируют ИУК и накапливают ее в культуральной среде). В качестве показателя воздействия химического вещества на популяцию использовалось изменение ее численности. Оказалось, что ИУК в концентрациях 10^{-17} – 10^{-11} моль/л сдерживает рост численности популяции, в концентрации 5.7×10^{-7} моль/л стимулирует рост, аналогичное действие наблюдается для высших растений. Установлен немонотонный дозозависимый характер воздействия ИУК на интенсивность фотосинтеза и дыхания гидробионтов. Показано, что в концен-

трации 5.7×10^{-11} моль/л ИУК стимулирует фотосинтез и ингибирует дыхание; в концентрациях 5.7×10^{-7} и 5.7×10^{-17} моль/л действует противоположным образом.

Кроме того, в работе [1] получены данные по адсорбции ИУК на границе раздела фаз вода–воздух в зависимости от концентрации. Они указывают на то, что теоретически ИУК должна вытесняться из поверхностных слоев воды, но характер экспериментально полученной зависимости позволяет заключить, что в отдельных концентрационных интервалах имеются области достоверного накопления вещества. Причем они хорошо совпадают с областями наиболее интенсивного светорассеяния. Т.е. ИУК в концентрациях порядка 10^{-9} и 10^{-15} моль/л лучше растворяется в воде поверхностных слоев, упорядочивает ее структуру, что может способствовать более эффективному взаимодействию с мембраной или рецептором. Таким образом, установлена способность ИУК в определенных концентрациях накапливаться на границе раздела фаз и вызывать фазовый λ -переход в структуре сетки водородных связей воды, что может обуславливать эффект малых доз и разнонаправленность биологического действия вещества.

В настоящей работе при использовании в качестве биологического объекта исследования культуры гриба шиитаке представляло интерес выявление “эффекта малых доз” биологически активных веществ индольной природы.

Под влиянием экзогенной ИУК наблюдали стимулирование роста глубоководного мицелия в определенном концентрационном интервале ауксина. Можно отметить, что набор кривых роста гриба (зависимости накопления сухой биомассы от продолжительности выращивания, рис. 5) практически во всем интервале значений по оси абсцисс делится на 2 группы кривых с пограничной кривой, соответствующей концентрации ИУК 10^{-4} г/л. Выше последней — область активированного ауксином роста, 10^{-8} – 10^{-5} г/л ИУК. Ниже — область с зависимостями противоположного свойства, где уровень добавок ИУК составлял 10^{-1} – 10^{-3} г/л. При продолжительности выращивания 3–7 и 12–28 сут (т.е. при всех изученных возрастах культуры, кроме интервала 8–11 сут) оптимальной концентрацией ИУК оказалась величина порядка 10^{-7} г/л.

При исследовании влияния добавок экзогенной ИУК на ее содержание в культуральной жидкости *L. edodes* концентрация ауксина 10^{-4} г/л оказалась переломной в том смысле, что уровень ИУК в среде стал выше исходного (рис. 3а). Концентрация добавки ИУК 10^{-7} г/л (0.57×10^{-9} моль/л) ока-

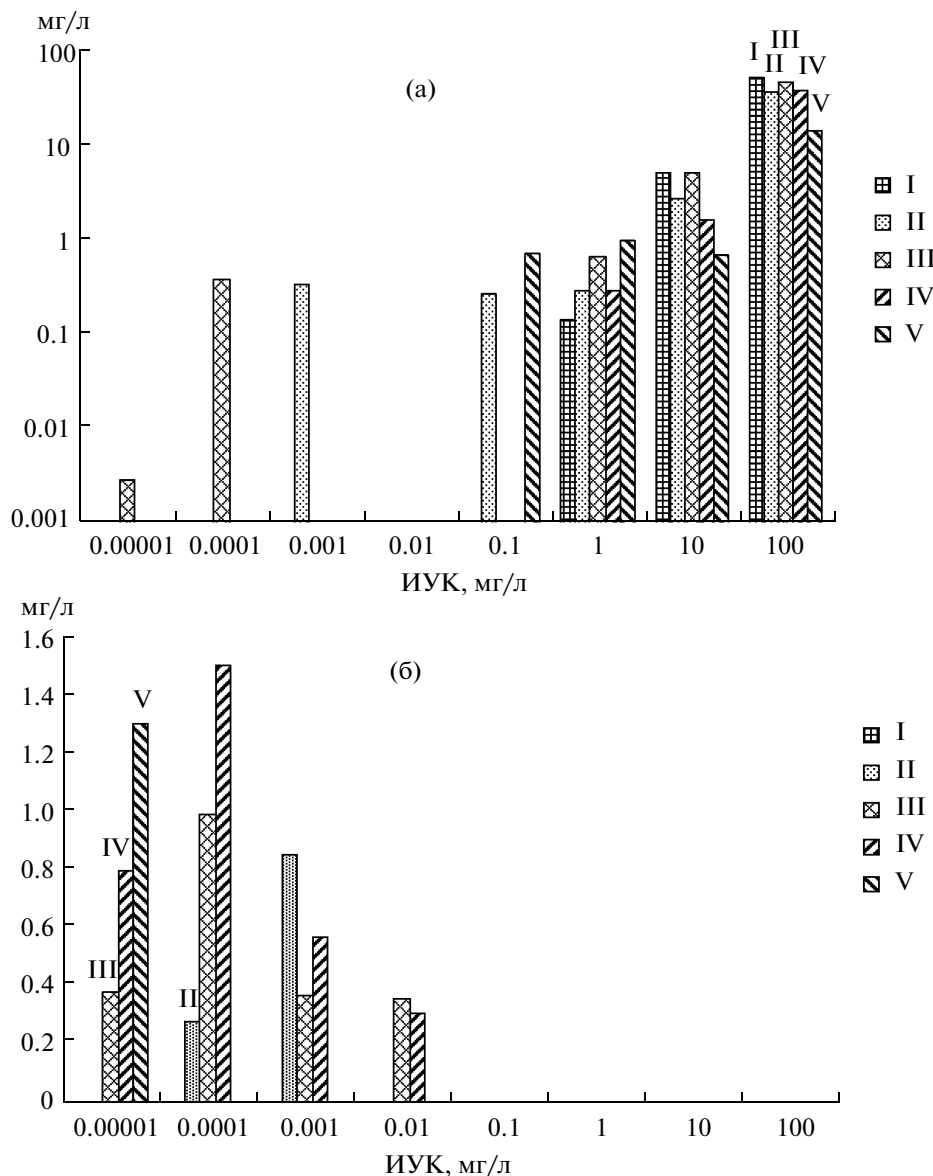


Рис. 3. Влияние добавок экзогенной ИУК (мг/л) на содержание (мг/л) ИУК (а) и антраниловой кислоты (б) в культуральной жидкости глубинной культуры *Lentinus edodes* F-249 разного возраста (сут): I – 3; II – 7; III – 10; IV – 14; V – 21.

залась примечательна тем, что индуцировала возрастание уровня фитогормона в 4100 раз.

При добавлении ИУК наблюдалось весьма значительное стимулирование биосинтеза ИААльд — до 9.7 мг/л на 21 сут выращивания шиитаке (рис. 4а). Однако так происходило лишь до достижения величины 10^{-4} г/л ИУК, ниже которой эффект отсутствовал.

Индолил-3-пировиноградная кислота накапливалась в среде через 21 сут культивирования гриба при любых концентрациях ауксина (рис. 4б), но лишь ниже величины 10^{-4} г/л экзогенной ИУК удалось обнаружить ИПВК уже на 14 сут, причем в значимых количествах (0.56 мг/л).

Синтез внеклеточной антраниловой кислоты глубинной культурой *L.edodes* F-249 разного возраста на средах с добавлением ИУК не наблюдался вплоть до уровня экзогенного ауксина 10^{-4} г/л (рис. 3б), ниже которого концентрация антранилата составила почти 0.4 мг/л уже на 10 сут культивирования. Максимум продукции антранилата (1.5 мг/л) приходился на вариант опыта с индуцирующей концентрацией ИУК порядка 10^{-7} г/л (0.57×10^{-9} моль/л).

В перечисленных разнонаправленных эффектах экзогенной ИУК получило дополнительную иллюстрацию вышеописанное действие малых доз фитогормона. Действительно, так же, как и в

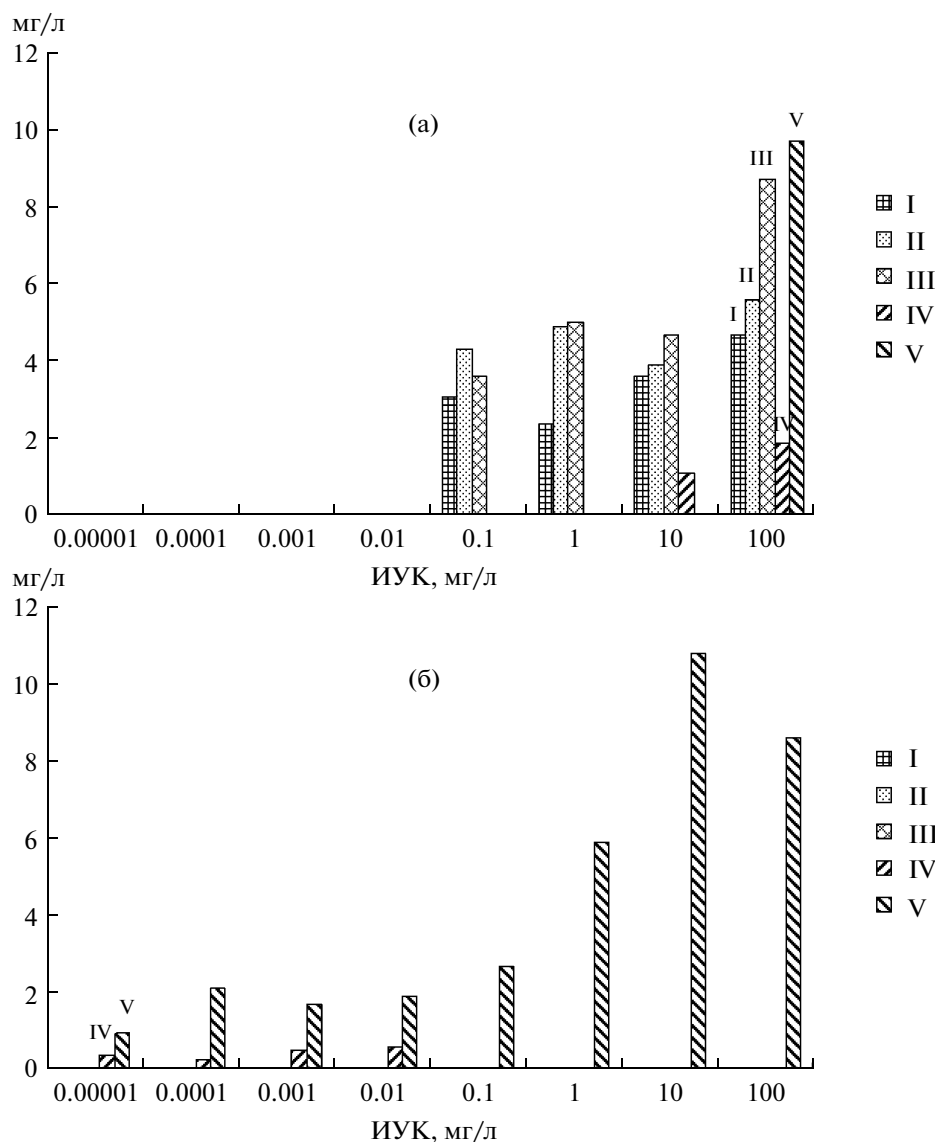


Рис. 4. Влияние добавок экзогенной ИУК (мг/л) на содержание (мг/л) ИААльд (а) и ИПВК (б) в культуральной жидкости глубинной культуры *Lentinus edodes* F-249 разного возраста (сут): I – 3; II – 7; III – 10; IV – 14; V – 21.

работе [1], своего рода точкой смены “знака” биологического действия ИУК стала концентрация 5.7×10^{-7} моль/л (1.0×10^{-4} г/л). Кроме того, при использовании ИУК в концентрации порядка 10^{-9} моль/л (1.75×10^{-7} г/л), способствующей, по данным вышеуказанной работы, более эффективному взаимодействию ауксина с мембраной или рецептором, мы наблюдали абсолютные максимумы в соответствующей серии экспериментов (образование ИУК и антранилата).

Влияние ИУК и ее предшественников на пигментацию глубинного мицелия *L. edodes* F-249. Значение растительных гормонов для морфообразования высших грибов-ксилотрофов практически не исследовано.

Некоторые доказательства участия фитогормона ИУК в процессах морфогенетической дифференциации грибов рода *Lentinus*, полученные в ходе простых экспериментов, существуют достаточно давно, хотя и описаны в единичных работах [15, 16]. Эти авторы предполагают, что фитогормонам принадлежит важное место в дифференциации грибной культуры и что процесс морфогенеза тесно связан с динамикой уровня эндогенных регуляторов роста, в том числе ауксина ИУК.

Исследование роли фитогормональных веществ в метаболизме *L. edodes* приобретает особую актуальность на стадии, предшествующей плодоношению и характеризующейся у шиитаке формированием специализированного вегетативного об-

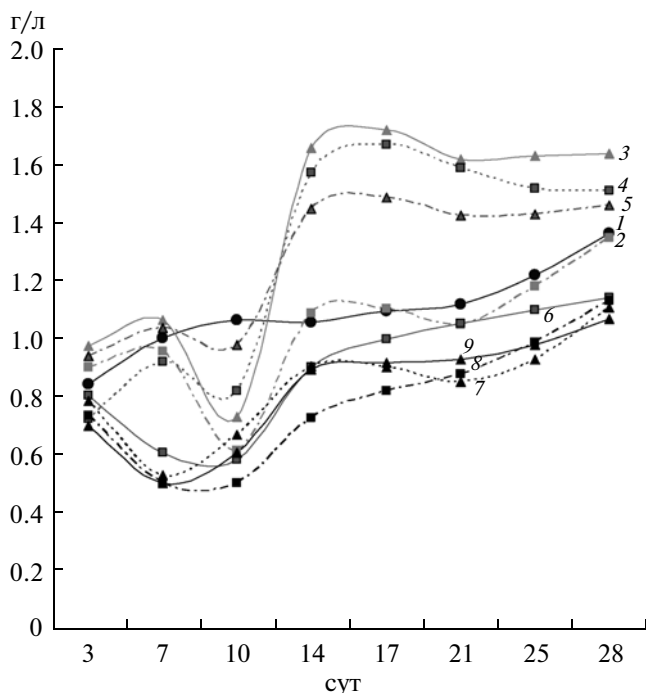


Рис. 5. Накопление биомассы мицелия (г/л) глубоинной культурой *Lentinus edodes* F-249 разного возраста (сут) на средах с добавлением ИУК (г/л):
 1 – 0; 2 – 10^{-8} ; 3 – 10^{-7} ; 4 – 10^{-6} ; 5 – 10^{-5} ; 6 – 10^{-4} ;
 7 – 10^{-3} ; 8 – 10^{-2} ; 9 – 10^{-1} .

разования – коричневой мицелиальной пленки (КМП), поскольку биохимические условия возникновения этой морфогенетической структуры до сих пор остаются малоизученными.

При изучении воздействия ИУК и ее предшественников – Трп, ТАМ, ИААм, ИПВК и индола – на рост погруженного мицелия *L. edodes* F-249 в большинстве случаев не наблюдалось изменений в морфологии культуры. Исключение составила среда с 0.1 мг/л ИААм. На данной среде отмечено сокращение времени появления коричневой мицелиальной пленки. Пленка появилась на среде с этой добавкой уже на 17 сут, тогда как в контрольном варианте, при других концентрациях ИААм и на средах с остальными индольными соединениями, ее образования не наблюдалось.

При исследовании интенсивности ростовых процессов *L. edodes* в присутствии ИААм оказалось, что именно уровень 0.1 мг/л ИААм в исходной питательной среде соответствовал наибольшему положительному эффекту в отношении накопления мицелиальной биомассы (рис. 6). При указанной оптимальной концентрации ИААм, в свою очередь, именно на 17 сут прирост биомассы был максимальным (24%).

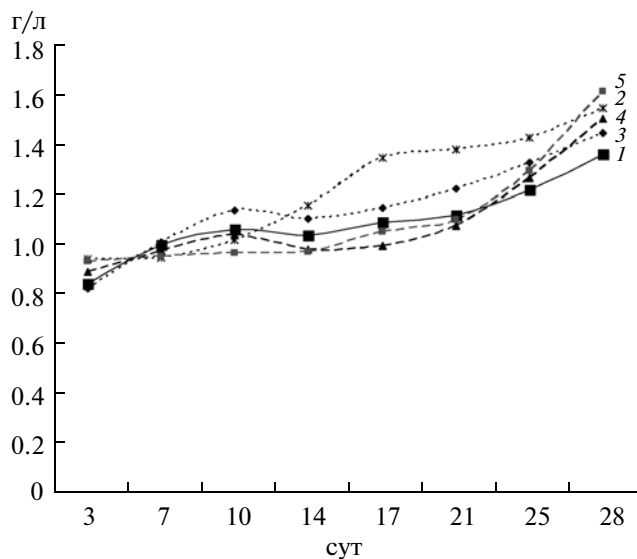


Рис. 6. Накопление биомассы мицелия (г/л) глубоинной культурой *Lentinus edodes* F-249 разного возраста (сут) на средах с добавлением ИААм (мг/л).
 1 – 0; 2 – 0.1; 3 – 1; 4 – 10; 5 – 100.

В исследованных нами образцах культуральной жидкости 5-гидрокси-ИУК – окисленная форма ИУК – присутствовала в контроле, на средах с ТАМ и ИААм при всех возрастах мицелия, концентрации ее при этом колебались в пределах от 0.78 до 2.63 мг/л (рис. 16). Исключение составила среда с 0.1 мг/л ИААм, где на 14–21 сут уровень 5-гидрокси-ИУК резко увеличился на порядок. Как было сказано выше, этот вариант опыта отличался от остальных ранним появлением коричневой мицелиальной пленки. На 14 сут наблюдалась заметная пигментация мицелия, а к 17 сут пленка полностью образовалась. Можно предположить, что 5-гидрокси-ИУК вовлекается в процесс формирования КМП.

Накопление значительной биомассы мицелия принадлежит к числу факторов, необходимых для перехода к морфогенетической стадии, предшествующей плодоношению (КМП у шиитаке), но не является достаточным условием развития КМП. В формирование пигментации мицелия должны быть вовлечены также окисленные производные индола, участие которых в превращениях 5,6-дигидроксииндол–индол-5,6-хинон-меланокром–меланин, в случае катализа грибными тирозиназами приводящих к образованию меланиновых пигментов грибов, известно достаточно давно [17].

Таким образом, при глубинном культивировании ксилотрофного базидиомицета *L. edodes* выявлена группа метаболитов индольной природы, состав и количественное соотношение которых позволяет судить о сосуществовании двух

альтернативных путей биосинтеза ИУК у *L. edodes*: Трп-зависимого (в основном через триптамин) и Трп-независимого, реализуемого не только в присутствии экзогенного индола в интервале концентраций 1×10^{-3} – 1×10^{-4} г/л, но и при индуцировании биосинтеза ИУК ее экзогенными микробавками. Выявлено участие индоллил-3-ацетамида и 5-гидрокси-ИУК в морфогенетических процессах культуры *L. edodes*. Установлена взаимосвязь уровня ИААм и 5-гидрокси-ИУК с формированием коричневой мицелиальной пленки в глубинной культуре, с процессами роста и развития грибного мицелия при глубинном культивировании.

Работа выполнена при поддержке РФФИ-БРФФИ, грант 10-04-90021-Бел_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Рогачева С.М.* Роль водной компоненты и полисахаридов клеточной поверхности в процессах коммуникации живых систем: анализ молекулярных моделей. Воронеж: Воронежский гос. университет, 2008. 40 с. <http://vak.ed.gov.ru/ru/dissertation/index.php?id54=1099>
2. *Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л.* // Биофизика. 2004. Т. 49. № 3. С. 551–564.
3. *Vaca B.E., Elmerich C.* // Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria, and Cyanobacterial Associations, chapter 6 / Eds. C. Elmerich, W.E. Newton. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2007. P. 113–143.
4. *Eckardt N.A.* // Plant Cell. 2001. V. 13. № 1. P. 1–3.
5. *Reineke G., Heinze B., Schirawski J., Buettner H., Kahmann R., Basse C.W.* // Molec. Plant Pathol. 2008. V. 9. № 3. P. 339–355.
6. *Prinsen E., Costacurta A., Michiels K., Vanderleyden J., Van Onckelen H.* // Mol. Plant-Microb. Interact. 1993. V. 6. № 5. P. 609–615.
7. *Bar T., Okon Y.* // Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology / Eds. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden, M. de Zamaroczy. Berlin: Springer-Verlag, 1995. P. 347–359.
8. *Costacurta A., Keijers V., Vanderleyden J.* // Mol. Gen. Genet. 1994. V. 243. № 4. P. 463–472.
9. *Лощинина Е.А., Цивилева О.М., Никитина В.Е., Макаров О.Е.* // Вавиловские чтения—2008: Материалы между. научно-практ. конф. Саратов: ИЦ “Наука”, 2008. С. 30–32.
10. *Lebuhn M., Heulin T., Hartmann A.* // FEMS Microbiol. Ecol. 1997. V. 22. № 4. P. 325–334.
11. *Bar T., Okon Y.* // Symbiosis. 1992. V. 13. № 1–3. P. 191–198.
12. *Lebuhn M., Hartmann A.* // Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria / Eds. M.H. Ryder, P.M. Stephens, G.D. Bowen. Australia: CSIRO, 1994. P. 145–147.
13. *Zakharova E.A., Shcherbakov A.A., Brudnik V.V., Skripko N.G., Bulkhin N.Sh., Ignatov V.V.* // Eur. J. Biochem. 1999. V. 259. № 3. P. 572–576.
14. *Dewick P. M.* // Nat. Prod. Rep. 1998. V. 15. № 1. P. 17–58.
15. *Rypacek V., Sladky Z.* // Mycopathologia et Mycologia applicata. 1972. V. 46. № 1. P. 65–72.
16. *Rypacek V., Sladky Z.* // Biologia Plantarum (Praha). 1973. V. 15. № 1. P. 20–26.
17. *Choi S.W., Sapers G.M.* // J. Agric. Food Chem. 1994. V. 42. № 5. P. 1183–1189.

Auxin Synthesis by the Higher Fungus *Lentinus edodes* (Berk.) Sing in the Presence of Low Concentrations of Indole Compounds

O. M. Tsivileva, E. A. Loshchinina, O. E. Makarov, and V. E. Nikitina

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia

e-mail: tsivileva@ibppm.sgu.ru

Received March 21, 2011

Abstract—The auxin formation in a submerged culture of the xylophilic basidiomycete *Lentinus edodes* (Berk.) Sing (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) (shiitake) is studied. Biologically active substances of an indole nature are identified, “the effect of small doses” of which lies in not only the stimulation of growth of the mycelium (indole-3-acetic acid, 2×10^{-7} – 2×10^{-4} g/l), but also in the induction of tryptophan-independent paths of auxin biosynthesis. The above-mentioned path is realized in the presence of exogenous indole (1×10^{-3} – 1×10^{-4} g/l), as well as while inducing the biosynthesis of indole-3-acetic acid by its microadditives (1×10^{-5} – 1×10^{-8} g/l), and is accompanied by the formation of anthranilic acid (up to 1.5 mg/l). Induction of the generative development stage of shiitake by indole derivatives is revealed. It was found that among the studied compounds only indoleacetamide at a concentration of an order of $\times 10^{-4}$ g/l in the culture fluid of *L. edodes* had a pronounced stimulatory effect on the formation of shiitake’s brown mycelial film.

UDC 577.151:582.28

INDUCTION, PURIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SULFHYDRYL OXIDASE FROM AN EGYPTIAN ISOLATES OF *Aspergillus niger*

© 2012 H. Moubasher*, A. A. Fahmi **, M. Abdur-Rahman**

*Department of Botany, Faculty of Science, Cairo University, Egypt

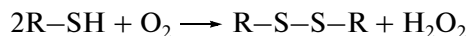
**Department of Chemistry, Faculty of Science, Cairo University, Egypt

e-mail: Moubasher54@hotmail.com

Received July 28, 2011

The conditions for the sulfhydryl oxidase (SOX) production and activity from an Egyptian isolate of *Aspergillus niger* were optimized. Purification and determination of the kinetic properties (K_m and V_{max}) of the purified enzyme have been done. The possibility for the SOX induction using L-Cys (as a natural substrate) was studied to determine whether SOX could be produced as an inducible enzyme in addition to being a constitutive one (i.e. whether induction leads to increase SOX production and activity or not). The optimum temperature and pH for its activity were found to be 60°C and 5.5, respectively. The activity of the induced intracellular SOX, was measured according to Ellman's method using the standard GSH oxidation where it reached 94% while that of non-induced one reached only 27.6%. This wide difference in activity between the induced and non-induced SOX indicates the successful L-Cys-induction of the SOX production (i.e. SOX from *A. niger* AUMC 4947 is an inducible enzyme). Molecular characterization of the pure SOX revealed that it is constituted of two 50–55 KDa subunits. K_m and V_{max} were found to be 6.0 mM and 100 μ M/min/mg respectively.

Sulfhydryl oxidase (SOX, EC 1.8.3.2) has an important and essential vital role in the generation of disulphide (S–S) bonds in proteins by the oxidation of the free thiol (–SH) groups of Cys residues in their polypeptide chains [1–3]:



These disulphide bonds (or bridges) maintaining the tertiary and quaternary structures of proteins which are essential for any protein to perform its specific function (i.e. structure-function relationship). SOX is known to be present in several mammalian systems including bovine milk and kidney and human skin [1], white avian eggs [4], rat immune, reproductive, respiratory, and digestive systems along with the retina and skin and various secretory endocrine glands (e.g. hypothalamus, pituitary, pineal, and adrenal) and the pancreatic islets of Langerhans [5]. *Aspergillus sojae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, and *Penicillium lilacinum* were found to produce SOX activity at levels high enough for its potential recovery but its biochemical role in microorganisms is not known [1]. Microbial sources of SOX enzymes have the advantage, over mammalian sources, of being available in large quantities and economic prices. SOX from microbial sources appear to be a constitutive enzyme, so, it does require induction. SOX is of interest in applications where oxidation of free sulfhydryls to disulphide linkages is sought, particularly instead of the non-specific oxidants such as hydrogen peroxide, peracids, borates, bromates, etc. having unwanted side

reactions. While enzyme-catalyzed reactions provide the selectivity desired, thereby avoiding side reactions [1]. One of the industrial applications of SOX is the removal of a burnt flavor from ultra-high temperature (UHT)-sterilized milk. This burnt flavor is evolved as a result of the increased level of SH-groups produced due to the breakage of cysteine disulphide bonds of this product. Treatment of the UHT-sterilized milk with SOX will oxidize these free thiol groups and lead to the restoration of the normal flavor of milk [1]. Biosensing approach for glutathione detection using the glutathione reductase and SOX bienzymatic system was made by [6].

The aim of this investigation was to study the effect of some cultural conditions on the production and activity of SOX yielded by an Egyptian soil isolate of *A. niger*, in addition to its molecular characterization.

MATERIALS AND METHODS

Four isolates of black *Aspergillus* (Section Nigri) were isolated from soil and air in Egypt and assayed for the production of SOX. *A. niger* AUMC 4947 was isolated from soil was selected for this study as a high producer of this enzyme and deposited in Assiut University Mycological Centre (Egypt).

Culture media. Czapek's medium of the following composition (g/l): sucrose – 20.0; NaNO₃ – 2.0; KH₂PO₄ – 1.0; MgSO₄ – 0.5, with or without yeast extract, was used for the growth of fungus. The com-

position of the medium was changed according to the requirements of the experiment.

Effect of nitrogen and sulphur sources on the production of SOX. Two sources were used, yeast extract, 1.0 g/l or urea 1.0 g/l, to replace NaNO_3 in liquid medium. Two sources were employed using liquid Czapek's medium + yeast extract, MgSO_4 (0, 0.5, 1 and 1.5 g/l) and L-Cys-HCl (0, 0.1, 0.2, and 0.3 mM) in the absence of MgSO_4 . The intracellular and extracellular SOX were extracted and enzyme activities were determined.

Fungal inoculum. The test organism was inoculated into liquid Czapek's medium with yeast extract and allowed to grow for 5 days at 28°C, then the culture was shaken vigorously to have a homogenous spore suspension. 0.5 ml of the suspension was dispensed into each of triplicate 250 ml flask containing 100 ml of liquid Czapek's medium with yeast extract and incubated in the dark at 28°C and 150 rpm.

Crude SOX extraction. The crude SOX was extracted from *A. niger* AUMC 4947 as intracellularly and extracellularly. The mycelia were harvested by filtration using Whatman filter paper No.1, lyophilized and then ground in a mortar for 3 min using liquid nitrogen. The total proteins were extracted using extraction (E) buffer, 50 mM sodium acetate buffer pH 5.5. Cell debris was removed by centrifugation at 12,000 g for 10 min at 4°C. Protein of the supernatant was gradually precipitated by incubation with chilled 2× acetone at 4°C overnight, followed by the same centrifugation. The supernatant was decanted and acetone was removed from the precipitated protein using desiccator under vacuum at room temperature. The protein was dissolved in 1.0 ml of E buffer and the enzyme activity was determined using Ellman's method [7]. The enzyme sample was incubated with 2.0 mM L-GSH at pH 5.5 and 25°C. At different time intervals, 100 µl of reaction mixture was added to 900 µl of 1.0 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB, mixed well and incubated at 37°C for 5 min. OD_{412} was measured against blank using Genway 6305 spectrophotometer (USA). The blank was prepared by adding 100 µl of E buffer to 900 µl 1mM DTNB. The remaining $[-\text{SH}]$ was calculated from:

$$\text{SH concentration in the sample } M = \frac{\text{total volume/sample volume} \times \text{OD}_{412}}{13600}.$$

In another experiment, the *A. niger* spore suspension was first cultured in liquid Czapek's media with 0.1% yeast extract and 0.05% MgSO_4 for 3 days in the dark at 28°C and 150 rpm. Then, mycelia were collected by filtration, washed three times with sterile distilled water, and transferred into different concentrations of pure L-Cys (1.0 or 5 mM Cys in 50 mM E buffer). The control (non-induced) sample was prepared by transferring mycelia into E buffer without L-Cys. The induced and control mycelia were incubated for further 3 days in the same conditions, and the de-

crease of L-Cys concentrations in the extracellular media was monitored using Ellman's method [7] indicating a successful induction of the SOX production.

Enzyme assay was carried out by incubating 65 µl of SOX with 260 µl of 2.0 mM GSH in E buffer pH 5.5 and at different temperatures (4, 15, 25, 37, 50, 60, 70, or 80°C). After 15, 30, and 60 min, 100 µl of reaction mixture was added to 900 µl of 1.0 mM DTNB, mixed well, and incubated at 37°C for 5 min. Then OD_{412} was measured and the concentrations of oxidized SH-groups and the SOX activities were determined. Assay was carried out at 60°C and different pH values.

Purification of SOX. Sephadex G-100 in E buffer was used for packing the column (50 × 2 cm). The crude protein sample, dissolved in the same buffer, was applied to the column, and 1.5 ml-fractions (54) were collected. To determine the protein concentration OD_{280} was measured and an assay of SOX was carried out in every fraction. Fractions that gave the positive SOX assay were collected and concentrated using incubation with chilled 2× acetone at 4°C overnight. Then centrifugation was carried out at 12,000 g for 10 min, the supernatant was decanted and acetone was removed from the partially purified precipitated protein. Then it was dissolved in E buffer (pH 5.5) and applied to 5 ml Q Sepharose column (GE Healthcare, UK) using peristaltic pump (HBI, multistaltic pump, USA), with a flow rate of 1.0 ml/min. 20 mM Tris HCl buffer (pH 7.0) was used as a mobile phase with increasing gradient of NaCl from 100 mM to 1M. The purified precipitated protein was then dissolved in E buffer and analyzed by SDS-PAGE.

10% SDS-PAGE was performed using the method of [8], where unstained protein molecular weight markers (Fermentas Life Sciences, Germany). The current was adjusted to 22 mA. Protein bands were visualized by the double staining of the gel using Coomassie Brilliant Blue R 250 and ProteoSilver Plus Silver Stain kit (Sigma, USA).

The pure SOX dissolved in E buffer (pH 5.5), was incubated with increasing concentrations of substrate (2.0–5.0 mM GSH in the same buffer) at 25°C and the different activities of SOX were determined as described above. Lineweaver-Burk plot was constructed and the Michaelis-Menten constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) of substrate oxidation were calculated.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of nitrogen and sulfur sources on the production of SOX. *A. niger* AUMC 4947 showed weak growth on liquid Czapek's medium containing sodium nitrate as inorganic nitrogen source after two weeks of the dark incubation at 28°C, and thus, there was no enzyme production. On the other hand, when 0.1% yeast extract was used as organic nitrogen source in the growth medium the fungus showed a good mycelial

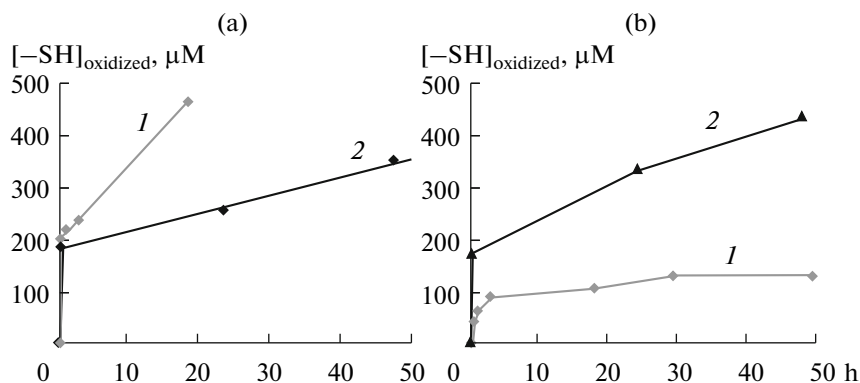


Fig. 1. Comparison between the intracellular and extracellular SOX production in the presence of yeast extract (a) and urea (b) as a nitrogen source in growth medium of *A. niger* AUMC 4947. 1 – intracellular SOX; 2 – extracellular SOX.

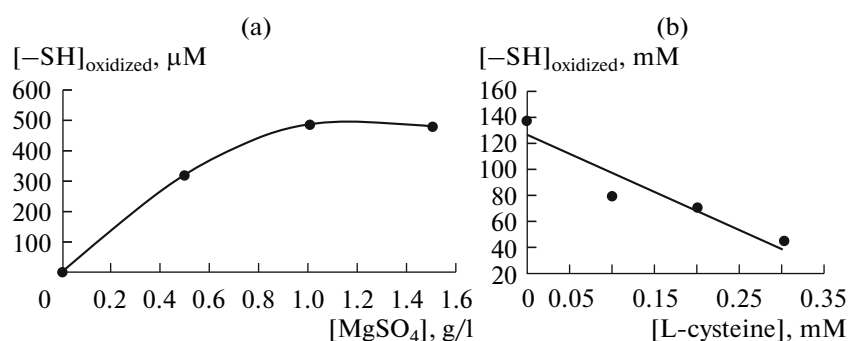


Fig. 2. Intracellular SOX production at different MgSO_4 (a) and L-cysteine (b) concentrations in growth medium of *A. niger* AUMC 4947.

growth and SOX was expressed both intracellularly and extracellularly. These results are in agreement with data of Oy [9] who reported that *A. niger* generates sufficient quantities of SOX both intracellularly and extracellularly. The intracellular purified SOX, however, was found to have higher activity than the extracellular one as shown in Fig. 1a. On the contrary, when urea was used as a nitrogen source, the activity of the extracellular enzyme was much higher than that of the intracellular SOX as shown in Fig. 1b. This study demonstrates the importance of organic nitrogen sources (yeast extract and urea) for both the mycelial growth of *A. niger* AUMC 4947 and the SOX enzyme production, in comparison with the inorganic nitrogen source (sodium nitrate) supported weak mycelial growth. These results are in agreement with other authors [9–11] who reported that for *A. niger* growth, the best nitrogen sources were found to be yeast extract, casein and other sources of the protein nitrogen, comparatively to the mineral nitrogen. Also it was reported [11–13] that organic nitrogen sources were better supplements for the fungus than inorganic nitrogen sources.

It was noticed that in the absence of MgSO_4 the mycelial growth of *A. niger* AUMC 4947 was markedly

weak and there was no enzyme production and the SOX activity. The enzyme activity increased with the increasing of MgSO_4 concentration until it reached 0.1% (Fig. 2a). On the other hand, the results obtained revealed a very weak mycelial growth, and the SOX activity in the presence of L-Cys (Fig. 2b). These results proved the importance of oxidized sulphate (MgSO_4) for both mycelial growth and the SOX production and inability of the fungus to use L-Cys as a sulfur source instead of sulfate. Some microorganisms other than *A. niger* also preferred oxidized sulfur sources over reduced ones. For example, Rothwell [14] investigated the nutritional requirements of *Penicillium variabilie* and found that its isolate utilized inorganic sulfur (MgSO_4). Thus, it could be concluded that *A. niger* AUMC 4947 prefers the oxidized inorganic sulfur compounds much better than the reduced organic sulfur compounds for both mycelial growth and the SOX production.

Induction of SOX enzyme using L-Cys-HCl. After mycelial growth for 3 days on Czapek's medium in the presence of yeast extract and MgSO_4 , the mycelial mate was transferred to pure L-Cys taken in different concentrations (Fig. 3) for 1 h. In these conditions the fungus *A. niger* AUMC 4947 produced an excessive

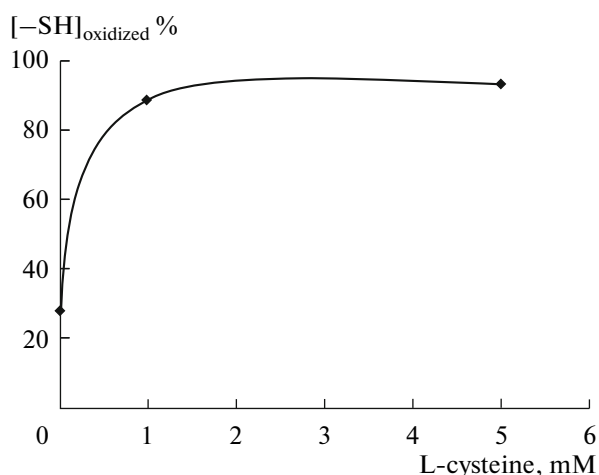


Fig. 3. The intracellular SOX induction after incubation of 3-days mycelial mat of *A. niger* AUMC 4947 in the presence of pure L-cysteine.

amount of both intracellular and extracellular SOX (i.e. L-Cys-induced SOX) compared to the control grown in the absence of L-Cys. The $[\text{SH}]_{\text{oxidized}}\%$, reflecting the activity of the induced intracellular SOX, was measured according to Ellman's method [7] using the standard GSH oxidation where it reached 94% while that of non-induced one reached only 27.6%. This wide difference in activity between the induced and non-induced SOX indicates the successful L-Cys-induction of the SOX production (i.e. SOX *A. niger* AUMC 4947 is an inducible enzyme). Starnes et al. [1] reported that the microbial SOX was constitutive and did not need induction. So, it could be concluded that L-Cys, being a natural substrate of SOX enzyme, when added to the media of *A. niger* AUMC would induce the fungus to produce an increasing amount of both intracellular and extracellular SOX. Thus, this is the

first report of an excessive induction of this enzyme by L-Cys after mycelial growth for three days on Czapek's media in the presence of yeast extract and MgSO_4 .

The results presented in Fig. 4a showed that the enzyme activity was performed at a wide range of temperatures (15–70°C) and the optimal temperature was found to be 60°C (using GSH as a substrate). Oy [9] reported that the optimum temperature for the *A. niger* SOX is in the range of about 30 to about 45°C in the acetate buffer. Also, the optimum temperature for the *Aspergillus sojae* SOX is about 42°C [1] and for SOX from chicken white eggs is 25°C [4]. From that, it could be concluded that the temperature optima of SOX activity differ with the different sources of SOX enzyme and also with the geographical distribution.

As shown in Fig. 4b, the *A. niger* AUMC 4947 SOX exhibited activity over a range of pH values (4.5–7.5), i.e. from acidic range to slightly alkaline, where the optimum pH was found to be pH 5.5. This result is in agreement with the fact that the optimum pH for the *A. niger* SOX is slightly acidic of about pH 5.0–5.6 when the substrate is GSH dissolved in sodium acetate buffer [9, 15, 16] Also, the optimum pH for the *A. sojae* SOX is about 6.5 [1]. On the other hand, SOX can exhibit its optimum activity at a neutral or slightly alkaline pH as in the case of a *Penicillium* species having an optimum pH of the enzyme about pH 7.0–7.8 using GSH as a substrate [17], rat seminal vesicle having its optimum pH of about 7.0 [18] and chicken white eggs having an optimum pH its of about pH 7.0–8.0 [4]. Thus, it can be concluded that the optimum pH for the SOX activity is quite different among different organisms, genera and species.

Purification of SOX. Purification of the *A. niger* AUMC 4947 SOX was performed in two steps by gel-filtration (Sephadex G-100) and anion-exchange chromatography (Q-Sepharose) where the purified

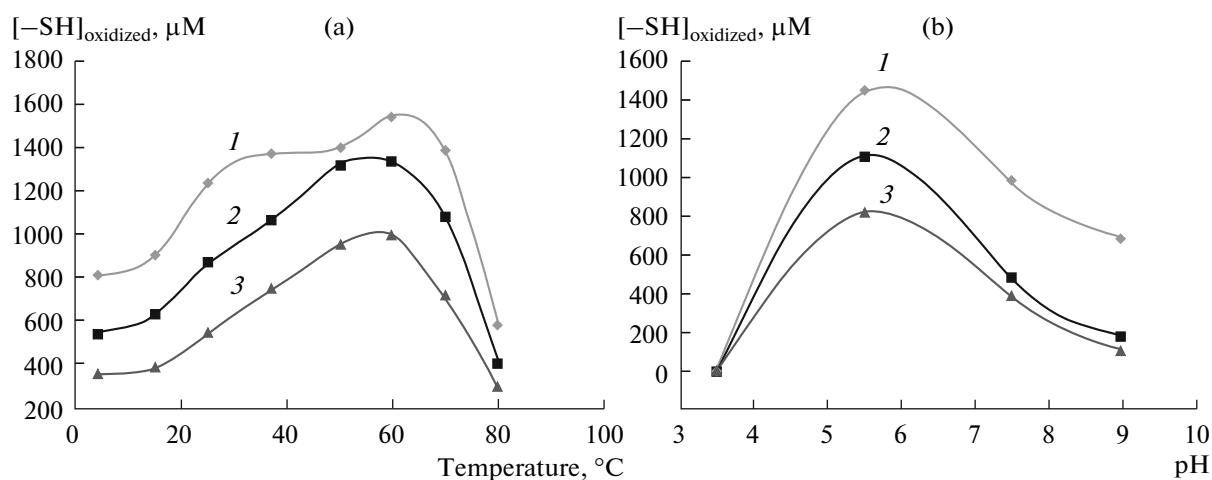


Fig. 4. Effect of temperature (a) and pH (b) on the SOX activity of *A. niger* AUMC 4947 after different periods of incubation: 1 – 15 min, 2 – 30 min, 3 – 75 min (for a) and 60 min (for b).

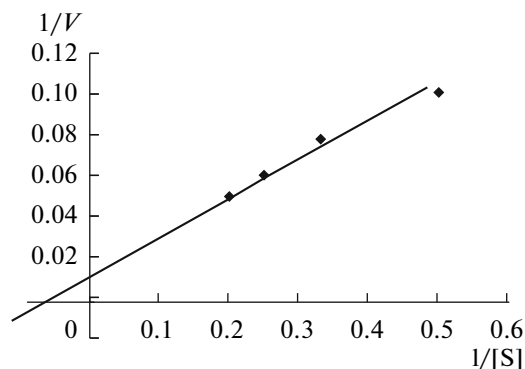


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for the purified SOX of *A. niger* AUMC 4947.

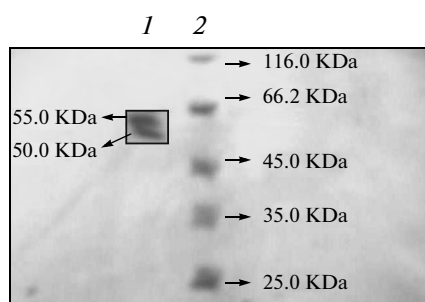


Fig. 6. SDS-PAGE of the purified SOX from *A. niger* AUMC 4947 (lane 1), and protein markers (lane 2) stained by Coomassie Brilliant Blue R-250.

SOX enzyme was eluted between 100–300 mM NaCl. Lineweaver-Burk plot was constructed, (Fig. 5) and the Michaelis-Menten constant ($K_m = 6.7$ mM) and maximum velocity ($V_{max} = 100$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) of substrate oxidation were calculated for the purified SOX of *A. niger* AUMC 4947. This enzyme was found to be a dimer enzyme, with two 50–55 kDa subunits visualized as two bands by the double staining of the gel after SDS-PAGE using Coomassie Brilliant Blue R 250 (Fig. 6). Oy [9] recorded that the *A. niger* SOX had a

molecular weight of about 106 kDa and it was constituted by two subunits with a molecular weight of about 50 to 55 kDa as determined by SDS-PAGE. Vignaud et al. [16] reported that molecular weight of the *A. niger* SOX was 110 kDa. These data are in agreement with our results.

REFERENCES

1. Starnes, R.L., Katkocin, D.M., Miller, C.A., Strobel, Jr., and Robert, J., US Patent 4632905, 1986.
2. Heckler, E.J., Rancy, P.C., Kodali, V.K., and Thorpe, C., *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.*, 2008, vol. 1783, pp. 567–577.
3. Fass, D., *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.*, 2008, vol. 1783, pp. 557–566.
4. Hooper, K.L., Joneja, B., White III, H.B., and Thorpe, C., *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, pp. 30510–30516.
5. Tury, A., Mairet-Coello, G., Esnard-Feve, A., Benayoun, B., Risold, P.Y., Griffond, B., and Fellmann, D., *Cell Tissue Res.*, 2006, vol. 323, pp. 91–103.
6. Timur, S., Odaci, D., Dincer, A., Zihnioglu, F., and Telefoncu, A., *Talanta*, 2008, vol. 74, pp. 1492–1497.
7. Ellman, G.L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, vol. 82, pp. 70–77.
8. Laemmli, U.K., *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685.
9. Oy, S.S., US Patent 4894340, 1990.
10. Cruz, V.D., Belote, J.G., Belline, M.Z., and Cruz, R., *Rev. Microbiol.*, 1998, vol. 29, pp. 301–306.
11. Paulchamy, C., *Inter. J. Microbiol.*, 2008, vol. 5, pp. 1–6.
12. Forgarty, W.M. and Kelly, C.T., *Ecol. Microbiol.*, 1980, vol. 5, pp. 116–120.
13. Anto, H., Trivedi, U.P., and Patel, K.C., *Biores. Technol.*, 2006, vol. 97, pp. 1161–1166.
14. Rothwell, F.M., *Amer. J. Bot.*, 1956, vol. 43, pp. 28–32.
15. De la Motte, R.S. and Wagner, F.W., *Biochemistry* 1987, vol. 26, pp. 7363–7371.
16. Vignaud, C., Kaid, N., Rakotozafy, L., Davidou, S., and Nicolas, J., *J. Food Sci.* 2002, vol. 67, pp. 2016–2022.
17. Kusakabe, H., Kuninaka, A., and Yoshino, H., *Agric. Biol. Chem.*, 1982, vol. 46, pp. 2057–2067.
18. Ostrowski, M.C. and Kistler, W.S., *Biochemistry*, 1980, vol. 19, pp. 2639–2645.

UDC 577.154

α -L-RHAMNOSIDASE FROM *Aspergillus clavato-nanicus* MTCC-9611 ACTIVE AT ALKALINE pH

© 2012 Vinita Yadav, Saroj Yadav, Sarita Yadav, K. D. S. Yadav

Department of Chemistry, D.D.U. Gorakhpur University, Gorakhpur-276009, India

e-mail: kds_chemistry@rediffmail.com

Received October 10, 2011

An α -L-rhamnosidase secreting fungal strain has been isolated and identified as *Aspergillus clavato-nanicus* MTCC-9611. The enzyme was purified to homogeneity from the culture filtrate of the fungus using concentration by ultrafiltration membrane and ion-exchange chromatography on CM-cellulose. The native PAGE analysis confirmed the homogeneity of the purified enzyme. The SDS-PAGE analysis of the purified enzyme revealed a single protein band corresponding to the molecular weight 82 kDa. The α -L-rhamnosidase activity of *Aspergillus clavato-nanicus* MTCC-9611 had optimum at pH 10.0 and 50°C. The K_m values of the enzyme were 0.65 mM and 0.95 mM using p-nitrophenyl α -L-rhamnopyranoside and naringin as a substrates respectively. The enzyme transforms naringin to prunin at pH 10.0 and further hydrolysis of prunin to naringenin does not occur under these reaction conditions that makes α -L-rhamnosidase activity of *Aspergillus clavato-nanicus* MTCC-9611 promising enzyme to get prunin for pharmaceutical purposes.

α -L-rhamnosidase (EC 3.2.1.40) [1] cleaves terminal α -L-rhamnose specifically (Fig. 1) from large number of natural products [2]. The enzyme occurs widely in nature and has been found in animal tissues [3–4], plants [5–6], fungi [7–12] and bacteria [13–15]. It is a biotechnologically important enzyme due to its various applications, like debittering of citrus fruit juices [16–19], enhancement of wine aromas [20], preparation of many drugs and drug precursors by derhamnosylating the terminal L-rhamnose containing substrates [21–23].

α -L-rhamnosidases with different properties are suitable for various biotechnological applications. For example, α -L-rhamnosidases which have pH optima in the range 3.0–4.0 are more suitable for debittering of citrus fruit juices because they also have pH in the range 3.0–4.0. α -L-Rhamnosidases having pH optima in the alkaline range will be more suitable for the enzymatic conversion of naringin to prunin because β -glucosidase activity which is responsible for further hydrolysis of prunin to naringenin will not be active in alkaline pH range even if it is present in the preparation of α -L-rhamnosidase. The most of the α -L-rhamnosidases reported so far have pH optima either in the acidic [3, 11, 24, 25] or in neutral [4, 13, 26] pH ranges. No α -L-rhamnosidase with pH optimum greater than pH 8.0 has been reported so far.

The aim of the study is to purify an α -L-rhamnosidase from *Aspergillus clavato-nanicus* MTCC 9611 having pH optimum 10.0. The enzymatic properties like K_m , pH and temperature optima of the purified enzyme have been determined and its use in the enzymatic conversion of naringin to prunin has been demonstrated.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. p-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside, naringin, L-rhamnose, rutin, DEAE cellulose and CM cellulose were purchased from Sigma (USA). All the chemicals used in the PAGE including the protein molecular weight markers were procured from Bangalore Genei Pvt. Limited (India). All other chemicals were either from Merck Ltd Mumbai (India) or from S. D. Fine Chem. Ltd Mumbai (India) and were used without further purification.

Isolation of fungal strain and production of the enzyme. The fungal strain was isolated in our laboratory from decaying rice on the soil by streaking method on Petri plate using potato dextrose agar medium [27]. The fungal strain was identified as *A. clavato-nanicus* at MTCC Centre, Institute of Microbial Technology in Chandigarh (India) and was deposited there with identification number MTCC-9611. The fungal strain was maintained on slants of potato dextrose agar medium.

The secretion of α -L-rhamnosidase by the *A. clavato-nanicus* MTCC 9611 cells was studied in the liquid culture medium having composition (g/l): CaCl_2 – 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 3.0, KH_2PO_4 – 20.0, $\text{N}(\text{CH}_2\text{COONa})_3$ – 1.5, MnSO_4 – 1.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, sucrose – 40.0, ammonium tartarate – 8.0 and H_3BO_3 – 10.0 mg/l. One ml of the spore suspension (spore density 8×10^6 spores/ml) from the agar slant was inoculated aseptically into the liquid culture medium (20 ml) kept in 100 ml culture flask which also contained from 0.5 to 1.5% of naringin or rutin as inducer. The experiments were performed in triplicates. The culture flasks were incubated in a Biological Oxygen Demand incu-

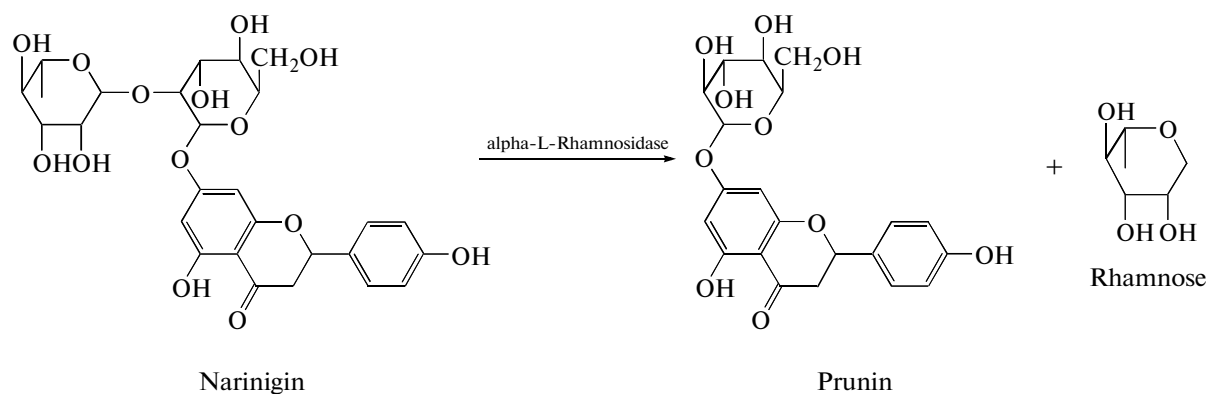


Fig. 1. The α -L-rhamnosidase reaction.

bator at 25°C under stationary conditions. Aliquots of one ml were withdrawn at the regular intervals of 24 h, filtered through Millex syringe filters (0.22 μ m) and analyzed for the presence of α -L-rhamnosidase activity as described below.

Assay of α -L-rhamnosidase activity. The activity of α -L-rhamnosidase was assayed using naringin as the substrate following the Davis method [28]. The reaction solution consisted of 2.5 ml of 0.86 mM naringin dissolved in 0.2 M Na-acetate-acetic acid buffer (pH 4.5) maintained at 60°C. 0.25 ml of the enzyme extract was added to the mixture, then 0.1 ml aliquot was withdrawn immediately and added to 2.5 ml of 90% diethylene glycol followed by the addition of 0.1 ml 4 N NaOH. 0.1 ml aliquots were withdrawn at the intervals of 5 min and treated in the same manner as mentioned above. The samples were maintained at the ambient temperature at least for 10 min and OD₄₂₀ were measured spectrophotometrically. The absorbance values were converted into the concentrations of naringin values by using a calibration curve for naringin. The rate of naringin hydrolysis was calculated from the plot of the concentration of naringin versus time. One unit of enzyme activity (IU) was defined as the amount of enzyme required to hydrolyze 1 μ mol of naringin per min of under the above assay conditions.

During the purification of α -L-rhamnosidase and the determination of K_m , pH, and temperature optima of the purified enzyme, the activity of α -L-rhamnosidase was assayed using p-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside as the substrate and monitoring the formation of p-nitrophenol spectrophotometrically at 400 nm by the method reported Romero et al. [29]. The molar extinction coefficient value 21.44 mM⁻¹ cm⁻¹ was used for the calculation of enzyme unit. UV-Visible spectrophotometer Hitachi (Japan) model U-2000 which was fitted with electronic temperature control unit was used for spectroscopic measurements. The steady state velocity measurements were reproducible within 5% errors.

Purification of α -L-rhamnosidase. For the purification of α -L-rhamnosidase, the fungus was grown in 15 sterilized 100 ml culture flasks containing 20 ml of liquid culture medium supplied with 1.0% rutin. The maximum activity of α -L-rhamnosidase was revealed on the third day of the growth. The fungal cultures were pooled and the mycelia were removed by filtering the culture medium through 4 layers of cheese cloth. The culture filtrate was centrifuged at 10,000 rpm for 20 min at 4°C and supernatant (250 ml) was concentrated to 15 ml using Amicon concentration cell model 8200 and ultrafiltration membrane PM10 with molecular weight cut off value of 10 kDa (Millipore, USA). Then it was concentrated by putting in the dialysis tube and covering with sucrose and dialyzed against 0.01 M citric acid-phosphate buffer, pH 4.0, for 24 h. The appropriate condition for the binding of α -L-rhamnosidase on CM cellulose was determined experimentally by the reported method [30]. Three ml of the dialyzed enzyme solution was loaded on CM-cellulose column of size 2.5 \times 15 cm equilibrated with 0.01 M citric acid-phosphate buffer, pH 4.0. The column was washed with the same buffer and α -L-rhamnosidase activity was eluted using the linear 0–1.0 M NaCl gradient in the same buffer (50 ml of the buffer + 50 ml buffer containing 1.0 M NaCl). 5 ml fractions were collected and analyzed for the α -L-rhamnosidase activity and for protein concentration (Lowry's method). The α -L-rhamnosidase active fractions were combined and concentrated using sucrose. The purified concentrated enzyme sample 2.8 ml was stored at –20°C until use.

SDS-PAGE and native PAGE analysis of the purified enzyme. The homogeneity of the enzyme preparation was checked by SDS-PAGE analysis using the method reported by Weber and Osborn. The resolving gel was 10% acrylamide in 0.375 M Tris-HCl buffer (pH 8.8) and stacking gel was 5% acrylamide in 0.063 M Tris-HCl buffer (pH 6.8). The electrophoresis buffer was 0.025 M Tris-glycine buffer (pH 8.5). The gel was run at constant current of 20 mA. The mo-

Purification steps of α -L-rhamnosidase from *Aspergillus clavato-nanicus* MTCC-9611

Steps	Total volume, ml	Activity, IU/ml	Protein, mg/ml	Specific activity, IU/mg	Total activity, IU	Total protein, mg	Purification, fold	Recovered, %
Culture filtrate	250	0.03	0.08	0.37	7.50	20.0	1	100
Concentration by ultra-filtration and dialysis	15	0.35	0.31	1.13	5.25	4.65	3	70
Eluted from CM-cellulose column	24.5	0.06	0.01	6.00	1.47	0.25	16	20

lecular weight markers used were phosphorylase-97.4, bovine serum albumin-66.0, ovalbumin-43.0, carbonic anhydrase-29.0 and soyabean trypsin inhibitor 20.1 kDa.

The native polyacrylamide gel electrophoresis was done using the reagent kit supplied by Bangalore Genei Pvt. Limited (India). The resolving gel was 8% acrylamide in 0.39 M Tris-HCl buffer (pH 8.8) and the stacking gel was 5% acrylamide in 0.068 M Tris-HCl buffer (pH 6.8). The molecular weight markers used was catalase (240.0 kDa). In both PAGE the proteins were visualized by silver staining.

Determination of the enzymatic characteristics.

The K_m value of the purified α -L-rhamnosidase for the substrate p-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside was determined by measuring the steady state velocity of the enzyme catalyzed reaction at different concentrations of p-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside (from 0.1 to 5.0 mM) using the method reported Romero et al. [29]. The K_m value was determined by linear regression analysis of the data points (average of triplicate measurements) of the double reciprocal plots. The value of K_m of the purified enzyme for the natural substrate naringin was also determined in the similar way except that the steady state velocity of naringin hydrolysis was determined by Davis method [28].

The pH and temperature optimum of the purified enzyme was determined by using p-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside as the substrate and measuring the steady state velocity of the enzyme catalyzed reaction in solutions of varying pH from 2 to 13 and temperature from 20 to 70°C. The buffers used were 0.1 M citric acid-NaH₂PO₄ (McIlvaine buffer, pH 3–7), Clarks and Lubs solution buffer (pH 8–10) and 0.1 M Naphosphate buffer (pH 11–13).

Studies on the enzymatic hydrolysis of naringin to prunin. One ml of 1.0 mM naringin in Na-phosphate buffer (pH 10.0) was treated with 200 μ l of the crude α -L-rhamnosidase containing 3.2×10^{-2} IU/ml. The reaction was allowed to occur at 30°C for 1 h. The reaction solution was extracted thrice with 1.0 ml of ethyl acetate. The extract was analyzed using HPLC with 4.6 \times 250 mm column, model M-600E with Spherisob, C₁₈, 5U (Waters, India Private Ltd). The solvent used was methanol–water 50 : 50 by volume at the flow rate of 2 ml/min. The peaks were detected at 254 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

The purification procedure of the α -L-rhamnosidase of *A. clavato-nanicus* MTCC-9611 is summarized in Table and the elution profile of the enzyme from the CM-cellulose column is shown in Fig. 2. The activity peak of the enzyme coincides with the major protein peak indicating that the eluted enzyme is relatively pure. The results of SDS-PAGE analysis are shown in Fig. 3a. The presence of single protein band in lane 2 in which purified enzyme has been loaded indicates that the enzyme is homogenous. The molecular weight calculated from the SDS-PAGE data was 82 kDa. The results of native PAGE analysis of the purified enzyme are shown in Fig. 3b in which catalase has been loaded in lane 1 and the purified enzyme has been loaded in lane 2. In the native PAGE, the purified α -L-rhamnosidase gives single protein band which supports the results of SDS-PAGE.

The K_m values determined for the purified enzyme at 50°C in 0.1 mM sodium phosphate buffer pH 10.0 using p-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside and naringin as the substrate from double reciprocal plots (data not shown) were 0.65 mM and 0.95 mM respectively. The K_m values using the same substrate for p-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside purified from *Fagopyrum esculentum* [31], *Bacteroides* JY-6 [13], *Pseudomonas paucimobilis* FP 2001 [32], *Fusobacterium* K-60 [14], *Penicillium decumbens* [29] and *Aspergillus aculeatus* RhaA and RhaB [11] have been reported to be 0.33, 0.29, 1.18, 0.057, 1.52 and 0.3 and 2.8 mM respectively. Similarly, the reported K_m values using naringin as the substrate for α -L-rhamnosidases from *Bacteroides* JY-6 [13], *Pseudomonas paucimobilis* FP 2001 [32], *Fusobacterium* K-60 [14] and *Penicillium decumbens* [29] were 0.89, 0.17, 0.021 and 7.0 mM respectively. Thus, the purified α -L-rhamnosidase from *A. clavato-nanicus* MTCC-9611 had intermediate affinities for both p-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside and naringin as compared to the reported α -L-rhamnosidases.

The results of the dependence of activity of the purified enzyme from *A. clavato-nanicus* MTCC-9611 on the variation of the pH of the reaction mixture are shown in Fig. 4a. The enzyme was active in a broad pH range 4–12 but the maximum activity was at pH 10.0. The most of the α -L-rhamnosidases reported so far have pH optima either in the acidic [3, 11, 24, 25] or

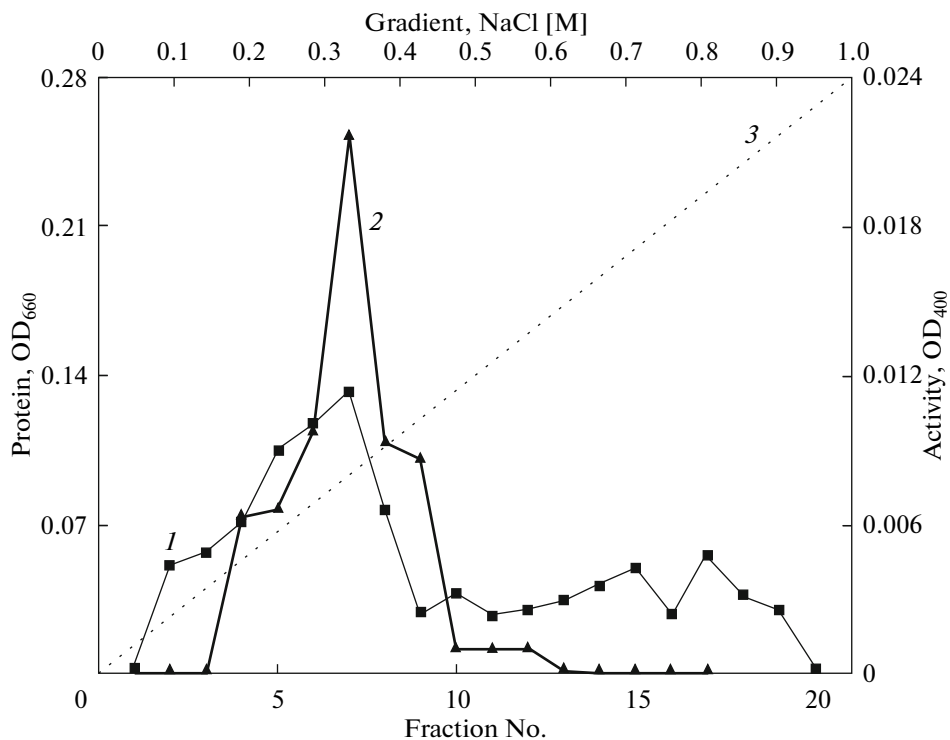


Fig. 2. Elution profile of the α -L-rhamnosidase from *A. clavato-nanicus* MTCC-9611 from CM-cellulose. 1 – protein; 2 – enzyme activity; 3 – NaCl gradient.

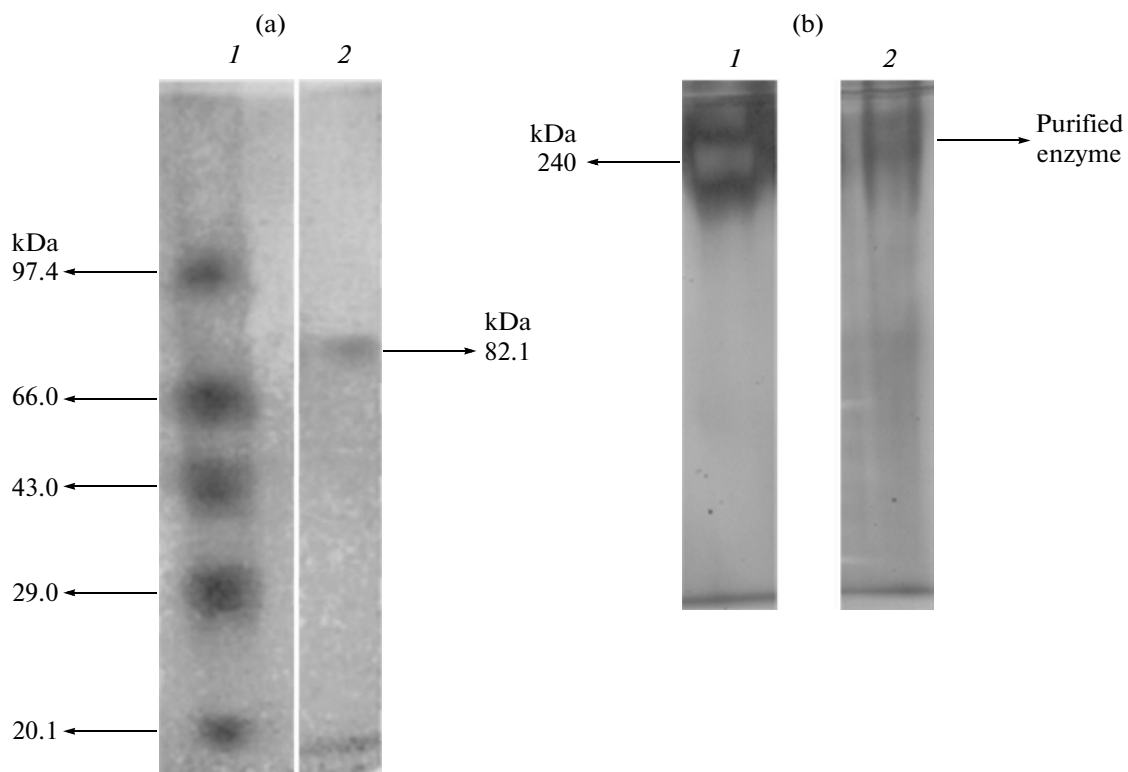


Fig. 3. PAGE of the purified α -L-rhamnosidase from *A. clavato-nanicus* MTCC-9611. a – SDS-PAGE: lane 1 – molecular weight markers; lane 2 – purified enzyme (0.63 μ g); b – native PAGE: lane 1 – molecular weight marker; lane 2 – purified enzyme (1.2 μ g). An arrow shows the position of α -L-rhamnosidase.

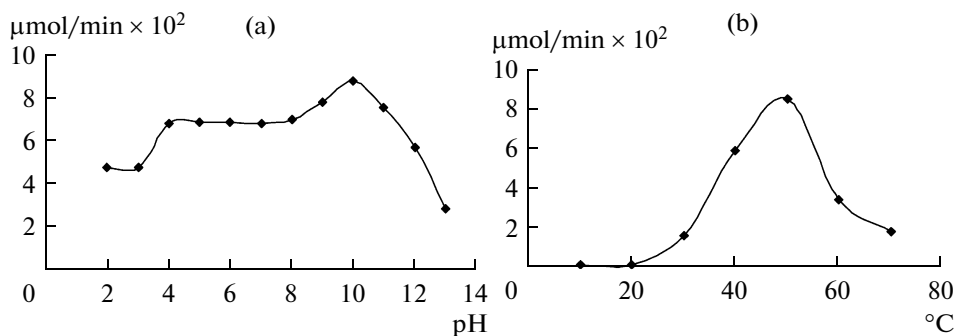


Fig. 4. Determination of pH (a) and temperature optima (b) for α -L-rhamnosidase from *A. clavato-nanicus* MTCC-9611. The dependence of the enzyme activity on pH of the reaction mixture at 50°C. The dependence of the enzyme activity on temperature of the reaction mixture in 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 10.0).

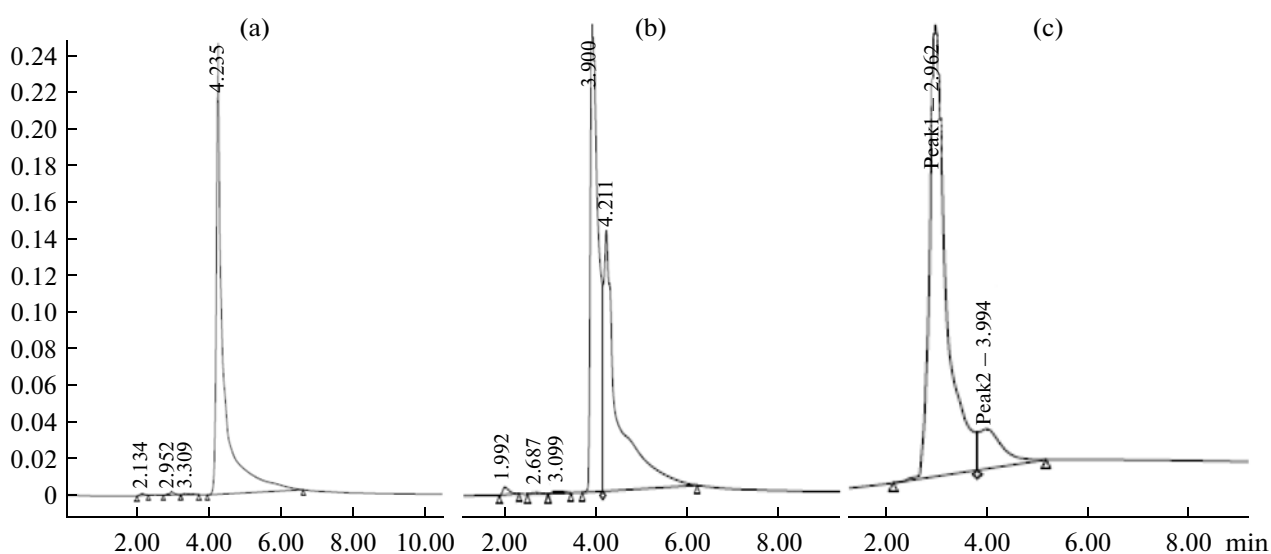


Fig. 5. HPLC of the ethyl acetate extract of the hydrolysis of naringin by α -L-rhamnosidase from *A. clavato-nanicus* MTCC-9611. a – control – the ethyl acetate extract of 1 mM naringin in 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 10.0); b – the ethyl acetate extract of the enzyme (3×10^{-3} IU) treated naringin after 30 min at 30°C; c – the ethyl acetate extract of the enzyme (3×10^{-3} IU) treated naringin after 1 h at 30°C.

neutral [4, 13, 26] pH ranges. Only α -L-rhamnosidas-es of *Clostridium stercorarium* [15], *Sphingomonas paucimobilis* [33], *Pseudomonas paucimobilis* FP2001 [32] and bacterium PRI-1686 [34] have their pH optima values of 7.5, 8.0, 7.9 and 7.8 respectively. Thus, the purified enzyme from *A. clavato-nanicus* MTCC-9611 is the only α -L-rhamnosidase having pH optimum at 10.0. This makes it more suitable for the enzymatic conversion of naringin to prunin, a pharmaceutically important rare compound, because at this pH, β -glucosidase activity even if present in the α -L-rhamnosidase preparation will not be able to further hydrolyze prunin to naringenin.

We detected also the pH stability of the purified enzyme in the pH range (2–12) and found that the enzyme was the most stable at pH 4.0.

The variation of the activity of the purified enzyme with temperature of the reaction solution is shown in the Fig. 4b. The temperature optimum of the enzyme was 50°C. The temperature optima of the α -L-rhamnosidas-es reported in the literature [7, 9, 10, 34, 35] were in the range 40–80°C.

One of the applications of α -L-rhamnosidase is in the conversion of naringin which is 4',5,7-trihydroxyflavanone 7-rhamnoglucoside to prunin which is 4',5,7-trihydroxyflavanone 7-glucoside. If β -glucosidase activity is present in the α -L-rhamnosidase preparation, the glucose unit of prunin is further cleaved giving naringenin which is 4',5,7-trihydroxyflavanone. To make the α -L-rhamnosidase preparation suitable for the conversion of naringin to prunin, it must not contain β -glucosidase activity or it must be active in alkaline pH range where β -glucosidase

should have no activity. Keeping these points in view, crude preparation of α -L-rhamnosidase from *A. clavato-nanicus* MTCC-9611 was tested at pH 10.0 for the conversion of naringin to prunin. The results of HPLC analysis of the ethyl acetate extract of the enzymatic hydrolysis products are shown in Fig. 5b, c. The peak at retention time 3.99 min is due to naringin and the peak with retention time 2.99 min is due to prunin. Pure samples of naringin and naringenin gave peaks at retention time 4.0 and 7.4 min respectively under identical conditions. In Fig. 5, there is no peak corresponding to retention time 7.4 min indicating that there is no naringenin present in the enzymatic hydrolysis products of naringin showing that prunin is not hydrolyzed to naringenin by crude enzyme preparation. In the ethyl acetate extract 76% of the enzymatic reaction products was prunin indicating that the purified α -L-rhamnosidase from *A. clavato-nanicus* MTCC-9611 can be used for the conversion of naringin to prunin and prunin is not hydrolyzed to naringenin under these conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

V. Yadav is thankful to the Department of Chemistry, Deen Dayal Upadhyaya Gorakhpur University for the award of UGC-DSA fellowship. S. Yadav is thankful to DST, Government of India, New Delhi for the award of Women Scientist-A. K.D.S. Yadav acknowledges the support of CSIR, New Delhi in the form of Emeritus Scientist Scheme no. 21(0774)/09/EMR-II.

REFERENCES

- Puri, M. and Banerjee, U.C., *Biotechnol. Adv.*, 2000, vol. 18, no. 3, pp. 207–217.
- Roitner, M., Schalkhammer, T., and Pittner, F., *Monatsh. Chem.*, 1984, vol. 115, no. 10, pp. 1255–1267.
- Kurosawa, Y., Ikeda, K., and Egami, F., *J. Biochem.* 1973, vol. 73, no. 1, pp. 31–37.
- Qian, S., Yu, H., Zhang, C., Lu, M., Wang, H., and Jin, F., *Chem. Pharm. Bull.*, 2005, vol. 53, no. 8, pp. 911–914.
- Suzuki H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, vol. 99, no. 3, pp. 476–483.
- Bourbouze, R., Pratiel-Sosa, F., and Percheron, F., *Phytochemistry*, 1975, vol. 14, no. 6, pp. 1279–1282.
- Yanai, T. and Sato, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2000, vol. 64, no. 10, pp. 2179–2185.
- Manzanares, P., Orejas, M., Ibanez, E., Valles, S., and Ramon, D., *Lett. Appl. Microbiol.*, 2000, vol. 31, no. 3, pp. 198–202.
- Scaroni, E., Cuevas, C., Carrillo, L., and Ellenrieder, G., *Lett. Appl. Microbiol.*, 2002, vol. 34, no. 6, pp. 461–65.
- Puri, M. and Kalra, S., *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2005, vol. 21, no. 5, pp. 753–58.
- Manzanares, P., Broeck, H.C.V., Graaff, L.H.D., and Visser, J., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, vol. 67, no. 5, pp. 2230–34.
- Yu, H., Gong, J., Zhang, C., and Jin, F., *Chem. Pharm. Bull.*, 2002, vol. 52, no. 2, pp. 175–178.
- Jang, I.S. and Kim, D.H., *Biol. Pharm. Bull.*, 1996, vol. 19, no. 12, pp. 1546–1549.
- Park, S., Kim, J., and Kim, D., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, vol. 15, no. 3, pp. 519–24.
- Zverlov, V.V., Hertel, C., Bronnenmeier, K., Hroch, A., Kellermann, J., and Schwarz, W.H., *Mol. Microbiol.*, 2000, vol. 35, no. 1, pp. 173–79.
- Gray, G.M. and Olson, A.C., *J. Agric. Food. Chem.*, 1981, vol. 29, no. 6, pp. 1299–1301.
- Manjon, A., Bastida, J., Romero, C., Jimeno, A., and Iborra, J.L., *Biotechnol. Lett.*, 1985, vol. 7, no. 7, pp. 477–482.
- Tsen, H.Y., Tsai, S.Y., and Yu, G.K., *J. Ferment. Bioeng.*, 1989, vol. 67, no. 3, pp. 186–189.
- Prakash, S., Singhal, R.S., and Kulkarni, P.R., *J. Sci. Food Agric.*, 2002, vol. 82, no. 4, pp. 394–397.
- Caldini, C., Bonomi, F., Pifferi, P.G., Lanzarini, G., and Galante, Y.M., *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, vol. 16, no. 4, pp. 286–291.
- Elujoba, A.A. and Hardman, R., *Fitoterapia*, 1987, vol. 58, pp. 299–303.
- Monti, D., Pisevcova, A., Kren, V., Lama, M., and Riva, S., *Biosci. Biotechnol. Bioeng.*, 2004, vol. 87, no. 6, pp. 763–771.
- Feng, B., Ma, B., Kang, L., Xiong, C., and Wang S., *Tetrahedron*, 2005, vol. 61, no. 49, pp. 11758–63.
- Kaji, A. and Ichimi, T., *Agric. Biol. Chem.*, 1973, vol. 37, no. 2, pp. 431–432.
- Feng, B., Kang, L., Ma, B., Quan, B., Zhou, W., Wang, Y., Zhao, Y., Liu, Y., and Wang, S., *Tetrahedron*, 2007, vol. 63, no. 29, pp. 6796–6812.
- Hashimoto, W., Nankai, H., Sato, N., Kawai, S., and Murata, K., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, vol. 368, no. 1, pp. 56–60.
- Seeley, J.H.W., Vandemark, P.J., and Lee, J.J., *Microbes in Action, A Laboratory Manual of Microbiology*. 4th Ed. New York: W.H. Freeman and Co., 1991, pp. 37–55.
- Davis D.W., *Anal. Chem.*, 1947, vol. 19, no. 7, pp. 476–478.
- Romero, C., Manjon, A., Bastida, J., and Iborra, J.L., *Anal. Biochem.*, 1985, vol. 149, no. 2, pp. 566–71.
- Pharmacia Fine Chemicals AB. Ion Exchange Chromatography: principles and Methods. BOX 175, S-75104 Uppsala 1, Sweden 1983.
- Bourbouze, R., Perchecon, F., and Courtois, J.E., *Eur. J. Biochem.*, 1976, vol. 63, no. 2, pp. 331–37.
- Miake, F., Satho T., Takesue, H., Yanagida, F., Kashige, N., and Watanabe, K., *Arch. Microbiol.*, 2000, vol. 173, no. 1, pp. 65–70.
- Hashimoto, W. and Murata, K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1998, vol. 62, no. 6, pp. 1068–1074.
- Birgisson, H., Hreggvidsson, G.O., Fridjónsson, O.H., Mort, A., Kristjánsson, J.K., and Mattiasson, B., *Enzyme Microb. Technol.*, 2004, vol. 34, no. 6, pp. 561–571.
- Busto, M.D., Meza, V., and Mateos, N.P., *Food Chem.*, 2007, vol. 104, no. 3, pp. 1177–1182.

УДК 582.282.123.2:547

БИОСИНТЕЗ ФУМИХИНАЗОЛИНОВ ГРИБОМ *Penicillium thymicola*

© 2012 г. В. П. Желифонова, Т. В. Антипова, А. Г. Козловский

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов

им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, 142290;

e-mail: kozlovski@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 3.10.2011 г.

Биосинтез фумихиназолинов F и G (ФХ), РС-2 и пигментов грибом *P. thymicola* ВКМ FW-869 напрямую зависит от количества углеродного субстрата (маннит) в среде. При всех изученных концентрациях маннита преобладала продукция пигментов. Условием преимущественного биосинтеза ФХ грибом *P. thymicola* является лимитирование источником углерода (маннитом) и присутствие NaCl в среде культивирования гриба. NaCl оказывает регуляторное влияние на образование вторичных метаболитов, увеличивая биосинтез ФХ и снижая образование пигментов. Максимальные показатели биосинтеза ФХ и подавление продукции пигментов достигнуты при концентрации маннита в среде 20 г/л и 2.5% NaCl.

Мицелиальные грибы являются продуцентами биоактивных вторичных метаболитов, относящихся как к микотоксинам, так и к метаболитам, обладающих важными терапевтическими свойствами, которые нашли применение в медицине. К ним относятся хиназолиновые алкалоиды, встречающиеся у грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Neosartorya*. Для хиназолиновых соединений в зависимости от заместителей показан разнообразный биологический эффект: болеутоляющий, противовоспалительный, антимикробный, бронхолитический, седативный, противоопухолевый и др. [1]. Представителями хиназолиновых алкалоидов являются фумихиназолины А-Г, образующиеся из антраниловой кислоты, триптофана и аланина. Их продуцируют некоторые штаммы грибов *Aspergillus fumigatus* и *Penicillium thymicola* [2, 3]. Фумихиназолины F и G обладают противораковой активностью на клетки лимфолейкоза Р 388 (ED₅₀ 13.5 мкг/мл и 13.8 мкг/мл соответственно) [2].

Ранее у штамма *P. thymicola* ВКМ FW-869, выделенного из образца криопэга возрастом 100–120 тыс. лет, были идентифицированы фумихиназолины F и G (ФХ) и метаболит поликетидной природы РС-2 (6-(1-гидроксипентил)-4-метоксипиранон) [4].

Цель работы – изучение влияния различных факторов на биосинтез фумихиназолинов F и G грибом *P. thymicola* ВКМ FW-869 и выявление условий, оптимальных для продуцирования этих метаболитов.

МЕТОДИКА

Использовали штамм *P. thymicola* ВКМ FW-869 из Всероссийской коллекции микроорганизмов

ИБФМ РАН (ВКМ). Гриб выращивали глубинным способом в 150 мл минеральной среды в колбах объемом 750 мл при 24 ± 1°C на качалке (220 об/мин). Постоянными компонентами среды были (г/л): янтарная кислота – 5.4, MgSO₄ · 7H₂O – 0.3, KН₂РO₄ – 1.0, рН доводили до 5.4 концентрированным раствором NH₄ОН. Влияние концентрации маннита на продукцию вторичных метаболитов изучали при концентрации субстрата 10, 20, 30, 40 или 50 г/л. Поверхностное культивирование гриба и влияние ионов цинка (4.4 мг/л ZnSO₄ · 7H₂O) проводили на среде с 50 г/л маннита. Влияние 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 4.0 и 5.0% NaCl на рост и биосинтез вторичных метаболитов изучали при концентрации маннита 20 г/л. Дрожжевой экстракт (“Difco”, США) (0.1 г/л), KCl (0.5 г/л), повышенное количество янтарной кислоты (10.8 г/л) и ионов аммония вносили в среду с 20 г/л маннита и 2.5% NaCl. Влияние глюкозы, маннита, ксилозы, арабинозы, сахарозы, глицерина и этанола (8 г углерода на 1 л среды) на рост и продукцию вторичных метаболитов изучали в среде (г/л): (NH₄)₂SO₄ – 3.0, KН₂РO₄ – 1.0, K₂НРO₄ – 0.1, MgSO₄ · 7H₂O – 0.7. Этанол вносили дробно ежедневно (3 об. %). Засев сред осуществляли водной суспензией конидий (1–2 × 10⁷ спор/мл) 14-суточной культуры, выращенной на скошенном сусло-агаре. Рост штамма оценивали по сухой массе мицелия.

Метаболиты извлекали из фильтрата культуральной жидкости экстракцией хлороформом, а из мицелия – экстракцией метанолом. Метанольную вытяжку разбавляли дистиллированной H₂O в соотношении 1 : 10 и экстрагировали хлороформом. Хлороформные экстракты высушивали над Na₂SO₄ (безводный) и упаривали в вакууме. Ана-

Таблица 1. Содержание внутриклеточных и внеклеточных ФХ (мг/л) при глубинном и поверхностном культивировании *P. thymicola* на минеральной среде с 50 г/л маннита

Культивирование	Возраст мицелия, сут	Биомасса, г/л	Внутриклеточные		Внеклеточные		Суммарные	
			мг/л	q_6 , мг/г сут	мг/л	q_9 , мг/г сут	мг/л	q , мг/г сут
Глубинное	6	1.2	1.3	0.2	11	1.5	12.3	1.7
	10	1.8	6.5	0.7	40	4.0	46.5	4.7
	13	3.9	13	0.6	97	4.9	110	5.5
Поверхностное	10	1.6	8.3	0.5	33	2.1	41.3	2.6
	17	4.8	18	0.3	50	0.5	68.0	0.8

лиз экстрактов осуществляли методом тонко-слойной хроматографии на пластинках силикагеля (Silica gel 60 F₂₅₄, “Merck”, Германия) в системах: хлороформ–метанол–25%-ный NH₄OH (конц.) (90 : 10 : 0.1) (I) и (80 : 20 : 0.2) (II). Вещества обнаруживали по поглощению в УФ-свете и после опрыскивания пластин реактивами Эрлиха для обнаружения индолсодержащих и Драгендорфа для идентификации азотсодержащих метаболитов.

Концентрацию метаболитов определяли спектрофотометрически (Specord UV VIS, “Carl-Zeiss Jena”, Германия): желтый пигмент (П-1) при 460 нм в смеси (1 : 1) фильтрата культуральной жидкости и карбонатного буфера (рН 10.3), желто-коричневых пигментов (П-2) при 365 нм в фильтрате культуральной жидкости. Концентрацию ФХ и РС-2 определяли после их выделения из хлороформного осадка с помощью препаративной ТСХ, в метаноле при 285 и 280 нм соответственно. Расчет производили, используя соответствующие калибровочные кривые.

Тоничность или осмоляльность сред (m_0) рассчитывали по формулам $m_0 = -128 \log a_w$; $a_w = N/(n + N)$; где a_w – активность воды, N – моли воды в растворе, n – моли растворенных веществ; для электролитов – вместо n подставляли vn , где v – число ионов на молекулу [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что накопление вторичных метаболитов в среде культивирования связано с процессами их экскреции из клеток и определяется прежде всего физико-химическими свойствами соединений, местом их биосинтеза и способом их выделения из клеток организмом-продуцентом. Ранее ФХ выделяли из мицелия *Aspergillus fumigatus* и *P. thymicola*, выращенных поверхностным способом на комплексных средах [2, 3, 6]. Нами было проведено изучение распределения ФХ между мицелием и культуральной жидкостью при глубинном и поверхностном культивировании штамма FW-869 на минеральной среде (маннит

50 г/л). У гриба, независимо от способа культивирования, основная часть ФХ от их общего количества находилась в культуральной жидкости (табл. 1). Так, при глубинном культивировании содержание внутриклеточных ФХ составило 12–14%, а при поверхностном культивировании – 25–35% от суммы ФХ. Причем при глубинном культивировании удельные скорости биосинтеза (q_6) и экскреции (q_9) ФХ были выше на 30 и 57% соответственно по сравнению с поверхностным ростом. Сравнение этих результатов с данными литературы [3] показало практически аналогичные значения для внутриклеточного содержания ФХ – 13 и 9 мг/л соответственно. Таким образом, наши результаты однозначно свидетельствовали, что наиболее эффективным является глубинное культивирование с последующим выделением ФХ из фильтрата культуральной жидкости.

Было обнаружено, что в процессе роста гриба *P. thymicola* в различных средах происходило окрашивание культуральной жидкости сначала в ярко-желтый, затем в насыщенный желто-коричневый цвет. Анализ экстрактов методом ТСХ показал присутствие одного желтого пигмента (R_f 0.7 (I)) и двух желто-коричневых пигментов (R_f 0.62 и 0.66 (II)). Все эти вещества не давали положительной реакции с реактивом Драгендорфа, что свидетельствовало об отсутствии азота в структуре соединений. УФ-спектр желтого пигмента (П-1) имел $\lambda_{\text{макс}}$ в областях 224, 302, 461 нм, а спектры желто-коричневых пигментов (П-2) были идентичны при 208, 274, 368, 446 нм. Близкие значения хроматографической подвижности желто-коричневых пигментов и одинаковый хромофор, указывает на то, что данные соединения имеют сходную структуру. Для пенициллов известен биосинтез пигментов разнообразной структуры, синтезирующихся из ацетил- и малонил-КоА по поликетидному пути [7].

Известно, что биосинтезу индолсодержащих метаболитов различной структуры способствуют среды, содержащие два источника углерода – кислоту цикла Кребса и медленно утилизируемый углевод, например янтарную кислоту и ман-

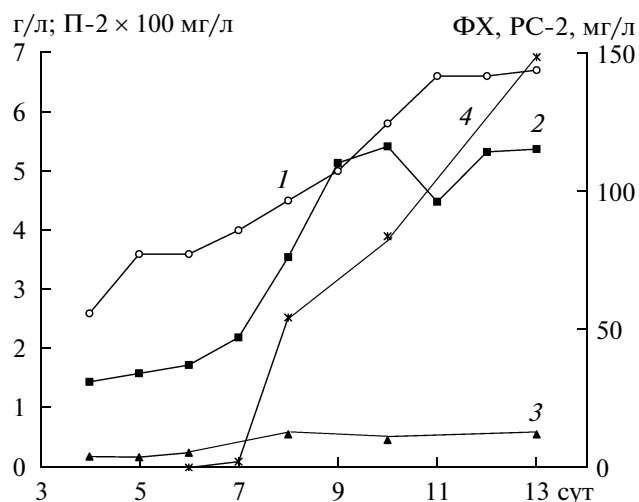


Рис. 1. Динамика роста и биосинтеза вторичных метаболитов при культивировании *P. thymicola* в среде с 50 г/л маннита:

1 — биомасса, г/л; 2 — ФХ, мг/л; 3 — РС-2, мг/л; 4 — П-2, мг/л.

нит [8]. Было изучено влияние различных концентраций маннита при постоянной концентрации других компонентов среды на рост и биосинтез метаболитов *P. thymicola*. Следует отметить, что маннит рассматривался не только как углеродный субстрат, но и как осмопротектор, так как тоничность сред изменялась от 0.28 до 0.50 осмолей. Рост гриба характеризовался диауксией, что свидетельствовало о последовательной утилизации углеродных субстратов (рис. 1). Влияние концентрации маннита на максимальные показатели роста и биосинтеза метаболитов *P. thymicola* представлены в табл. 2. Можно видеть, что биомасса возрастала до концентрации 30 г/л маннита в среде, а затем оставалась постоянной. Максималь-

ные значения удельной скорости роста гриба на сукцинате (μ_1) увеличивались до концентрации 40 г/л маннита, а далее не менялись, что свидетельствовало о влиянии тоничности среды на μ_1 . Оптимальная тоничность среды для роста на сукцинате была выше 0.45 осмолей. Максимальная удельная скорость роста на манните (μ_2) возрастала до концентрации 30 г/л маннита в среде. Дальнейшее увеличение маннита не влияло на содержание биомассы, но приводило к снижению μ_2 в 1.5 раза по сравнению с максимальным значением. Эти данные свидетельствуют о том, что маннит до концентрации 30 г/л является лимитирующим рост субстратом, а дальнейшее увеличение его концентрации в среде приводит к переключению на другой лимитирующий компонент среды. Для подтверждения этого в среду, содержащую 50 г/л маннита, вносили ионы цинка. Обнаружено увеличение в 1.6 раза биомассы (x) и μ_2 по сравнению с контролем, что свидетельствовало о наличии лимитирования по цинку.

В состав метаболома *P. thymicola* выращенного на этих средах входили ФХ, РС-2 и желто-коричневые пигменты (П-2). Динамика биосинтеза каждого из метаболитов имела свои особенности (рис. 1). Биосинтез ФХ проходил параллельно росту и имел циклический характер. Падение концентрации алкалоидов и снижение удельной скорости их накопления в культуральной жидкости наблюдалось во вторую лаг-фазу (5–6 сут) и в начале стационарной фазы роста (11 сут). Максимальная концентрация алкалоидов в культуральной жидкости наблюдалась в начале второй стационарной фазы роста. Поликетид РС-2 обнаруживался в культуральной жидкости одновременно с ФХ, и его содержание мало изменялось в процессе роста гриба. П-2 начинал синтезироваться в фазу активного роста гриба на манните с 7 сут, скорость

Таблица 2. Влияние концентрации маннита на максимальные показатели роста и биосинтеза метаболитов *P. thymicola*

Показатель	Маннит, г/л				
	10	20	30	40	50
Тоничность среды, осмоль	0.28	0.33	0.39	0.45	0.50
Биомасса, г/л	2.8	3.9	6.3	6.3	6.3
μ_1 , ч ⁻¹	0.003	0.005	0.008	0.018	0.018
μ_2 , ч ⁻¹	0.009	0.013	0.014	0.009	0.008
ФХ, мг/л	18	26	35	46	116
$Y_{\text{ФХ}/x}$, мг/г	6.4	6.6	5.6	7.3	18.4
РС-2, мг/г	1.8	7.9	5.9	7.3	12.0
$Y_{\text{РС-2}/x}$, мг/г	0.6	2.0	1.0	1.2	1.9
П-2, мг/л	48	528	595	662	692
$Y_{\text{П-2}/x}$, мг/г	17.1	135.4	94.4	105.1	109.8

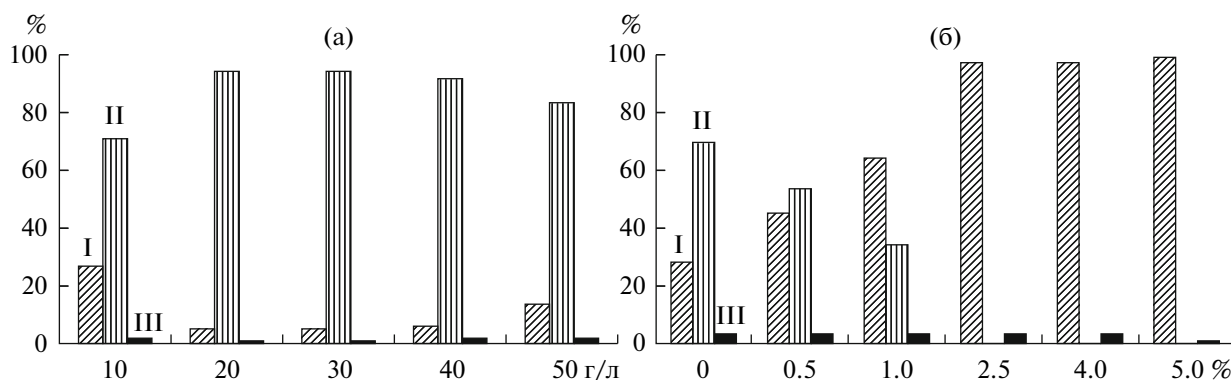


Рис. 2. Влияние концентрации маннита (г/л) (а) и NaCl (%) (б) на содержание метаболитов гриба *P. thymicola* (% от суммы метаболитов):
I – ФХ; II – П-2; III – РС-2.

его биосинтеза возрастала и в стационарную фазу достигала максимальных значений. Таким образом, динамика биосинтеза П-2 проходила по классической идиофазной модели, известной для различных вторичных метаболитов и, в том числе для пигментов [9].

Концентрация маннита в среде оказывала влияние на продукцию всех метаболитов (табл. 2). Максимальные значения показателей их биосинтеза получены при 50 г/л маннита. Содержание в культуральной жидкости ФХ, РС-2 и П-2 было выше в 6.4, 6.7 и 14.4 раза соответственно по сравнению с 10 г/л маннита. При всех изученных концентрациях маннита преобладал П-2 (71–84% от суммы метаболитов). Концентрация маннита оказывала влияние на соотношение метаболитов в экстракте (рис. 2а). Так, ФХ и П-2 при 50 г/л маннита составили 14 и 84%, а при 10 г/л маннита – 27 и 71% соответственно. Преимущественный биосинтез пигмента свидетельствовал об избытке углеродного субстрата в среде культивирования гриба *P. thymicola*. Известно, что образованию пигментов способствует избыток углеродного субстрата, присутствие в питательной среде ионов железа, меди, цинка и другие факторы [10]. Следует отметить, что при внесении ионов цинка в среду с 50 г/л маннита, концентрация пигментов и их выход на 1 г биомассы ($Y_{П-2/х}$) были выше в 3.5 и 2.3 раза соответственно, чем в контроле. Этот микроэлемент оказывал негативное влияние на биосинтез ФХ – концентрация и $Y_{ФХ/х}$ снижались в 1.5 и 2.4 раза соответственно по сравнению с контролем.

Таким образом, установлено, что у *P. thymicola* концентрация второго углеродного субстрата (маннит) оказывала регуляторное влияние как на количество синтезируемых метаболитов, так и на их соотношение.

Были изучены рост и биосинтез вторичных метаболитов грибом при различных концентрациях

NaCl в среде, не содержащей избытка углеродного субстрата (20 г/л маннита). Из результатов табл. 3 видно, что при увеличении концентрации NaCl происходило снижение биомассы, и при 5% NaCl она составила 70% от контроля. NaCl до 4% не повлиял на μ_1 , но при 5% NaCl наблюдалось снижение μ_1 . Зависимость удельной скорости роста на манните (μ_2) от концентрации NaCl имела вид куполообразной кривой с максимальным значением при 2.5% NaCl. Таким образом, при глубинном культивировании культура проявляла свойства умеренной галотолерантности.

Концентрация NaCl в среде оказывала влияние на биосинтез всех метаболитов (табл. 3). Было обнаружено, что при увеличении концентрации NaCl происходило снижение продукции метаболитов поликетидной природы (П-2, РС-2), а при концентрации свыше 2.5% П-2 не синтезировался вообще. Зависимость образования ФХ от концентрации NaCl имело куполообразную форму с максимумом при 2.5% NaCl. Причем в этих условиях содержание ФХ в культуральной жидкости достигло значений, наблюдаемых на среде с 50 г/л маннита (111 г/л). Концентрация NaCl оказывала регуляторное влияние как на количество синтезированных метаболитов, так и на их соотношение в экстракте (рис. 2б). При использовании NaCl в концентрации свыше 2.5% на долю ФХ приходилось 97–99, а в контроле 28%.

Ранее продуценты ФХ выращивали на комплексных средах, содержащих высокие концентрации дрожжевого экстракта, пептона, сахарозы или глюкозы [2, 6]. Нами было изучено влияние дрожжевого экстракта, KCl и повышенного количества янтарной кислоты и азота на рост и биосинтез метаболитов *P. thymicola* на минеральной среде, содержащей 20 г/л маннита и 2.5% NaCl. Внесение этих компонентов приводило к увеличению биомассы в 1.4, 1.5 или 2.2 раза соответственно по сравнению с контролем. Накопление

Таблица 3. Влияние концентрации NaCl на максимальные показатели роста и биосинтеза вторичных метаболитов *P. thymicola*

Показатель	NaCl, %					
	0	0.5	1.5	2.5	4.0	5.0
Тоничность среды, осмоль	0.33	0.66	0.84	1.18	1.75	2.15
Биомасса, г/л	3.8	3.5	3.1	3.0	2.9	2.7
μ_1 , ч ⁻¹	0.005	0.004	0.004	0.004	0.004	0.001
μ_2 , ч ⁻¹	0.014	0.014	0.017	0.020	0.013	0.012
ФХ, мг/л	57	84	90	111	84	79
$Y_{ФХ/х}$, мг/г	15.0	24.0	29.0	37.0	29.0	29.3
РС-2, мг/л	4.4	3.8	3.5	3.0	2.3	0.6
$Y_{РС-2/х}$, мг/г	1.1	1.1	1.1	1.0	0.8	0.2
П-2, мг/л	141	101	48	0	0	0
$Y_{П-2/х}$, мг/г	37.1	28.9	15.5	—	—	—

ФХ в среде с KCl возросло на 24% по сравнению с контрольной средой, при этом выход ФХ от биомассы ($Y_{ФХ/х}$) был ниже контроля на 26%. На средах с дрожжевым экстрактом и повышенным по сравнению с контрольной средой количеством янтарной кислоты и азота продукция ФХ была ниже контроля в 1.8 и 12.0 раз, а $Y_{ФХ/х}$ в 2.5 и 26.9 раз соответственно. Кроме того, на среде с повышенным количеством янтарной кислоты и азота наблюдался биосинтез П-2 (54 мг/л), несмотря на наличие в среде 2.5% NaCl.

Было установлено, что *P. thymicola* способен использовать в качестве единственного источника углерода и энергии глюкозу, маннит, ксилозу, арабинозу, сахарозу, глицерин и этанол. У культуры значения выхода биомассы от использованного углерода (Y_c) соответствовали данным, известным для этих субстратов [5]. Состав метаболитов при росте на углеводах и глицерине был идентичен и состоял из ФХ, РС-2 и желтого пигмента (П-1). При использовании культурой этанола биосинтез П-1 не происходило, что, возможно, связано как с особенностью метаболизма этого субстрата, так и с отсутствием его избытка в среде из-за дробного внесения в процессе культивирования гриба. В этих экспериментах в зависимости от источника углерода количество ФХ составило 5–15 мг/л, а метаболитов поликетидной природы (П-1, РС-2) – 55–148 мг/л. Биосинтез алкалоидов проходил параллельно росту гриба. Таким образом, показано, что у *P. thymicola* ферменты биосинтеза ФХ конститутивны, и глюкоза не является катаболическим репрессором их биосинтеза. Для более эффективного биосинтеза ФХ требуется присутствие второго углеродного субстрата – янтарной кислоты.

Известно, что геном мицелиальных грибов содержит кластеры генов, ответственных за образо-

вание вторичных метаболитов. В биосинтез вторичных метаболитов вовлечены мультифункциональные ферменты: поликетидсинтаза (ПКС), нерибосомальная пептидсинтаза (НРПС) и гибридная ПКС-НРПС. Недавно у *A. fumigatus* был охарактеризован кластер генов, контролирующих биосинтез фумигиназолинов А-Г, состоящий из 8 генов [11]. Трехмодульная антранилатзависимая НРПС (Afl2080) осуществляет биосинтез фумигиназолинов F и G, остальные домены активируют дальнейшее превращение этих метаболитов. Можно предположить, что в геноме штамма *P. thymicola* ВКМ FW-869 содержится только НРПС, ответственная за биосинтез ФХ. Присутствие метаболитов поликетидной природы у данного штамма указывает на наличие ПКС в геноме гриба.

Таким образом, культура *P. thymicola* ВКМ FW-869 проявляла осмоотолерантность в исследованном диапазоне концентрации маннита (10–50 г/л). По результатам изучения влияния концентрации NaCl (0.5–5.0%) на рост штамм можно отнести к умеренным галофилам. Установлена прямая зависимость между концентрацией маннита в среде и биосинтезом пигментов. Их преимущественный биосинтез культурой (73–95%) связан с избытком углеродного субстрата в среде. Показано, что концентрация NaCl выше 2.5% оказывает негативное влияние на биосинтез пигментов. Установлена прямая зависимость между концентрацией NaCl в среде и биосинтезом ФХ. Максимальные показатели биосинтеза алкалоидов и подавление продукции пигментов достигнуты при концентрации в среде 20 г/л маннита и 2.5% NaCl.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического

комплекса России на 2007–2013 годы” (контракт 16.518.11.7035).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vijaychand A., Manjula S.N., Bharath E.N. Divya B.* // Int. J. Pharm. and Biosci. 2011. V. 2. № 1. P. 780–809.
2. *Takahashi C., Matsushita T., Doi M., Minoura K., Shingu T., Kumeda Y., Numata A.* // J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 1. 1995. № 18. P. 2345–2353.
3. *Larsen T.O., Frydenvang K., Frisvad J.C., Christophersen C.* // J. Nat. Prod. 1998. T. 61. № 9. P. 1154–1157.
4. *Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В., Баскунов Б.П., Кочкина Г.А., Озерская С.М.* // Микробиология. 2012 (в печати).
5. *Перт С.Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. 331 с.
6. *Svendson J.A., Frisvard J.C.* // Mycol. Res. 1994. V. 98. P. 1317–1328.
7. *Samson R.A., Frisvad J.C.* // Stud. Mycol. 2004. № 49. P. 1–143.
8. *Rehacek Z., Sajdl P.* Ergot alkaloids. Chemistry, biological effect, biotechnology. Praha: Academia, 1990. 383 p.
9. *Betina V.* // Folia Microbiol. 1995. V. 40. № 1. P. 51–67.
10. *Medentsev A.G., Akimenko V.K.* // Phytochemistry. 1998. V. 47. № 6. P. 935–959.
11. *Brian D. A., Xinyu L., Christopher T.W.* // Biochemistry. 2010. V. 49. № 39. P. 8564–8576.

Biosynthesis of Fumiquinazolines by the Fungus *Penicillium thymicola*

V. P. Zhelifonova, T. V. Antipova, and A. G. Kozlovskii

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

e-mail: kozlovski@ibpm.pushchino.ru

Received October 3, 2011

Abstract—Biosynthesis of fumiquinazolines F and G (FQs), PC-2, and pigments by the fungus *P. thymicola* VKM FW-869 is directly dependent on the content of carbon substrate (mannitol) in the medium. Pigment production prevailed at all of the tested mannitol concentrations. The necessary conditions for predominant FQ biosynthesis by the fungus *P. thymicola* are carbon source (mannitol) limitation and presence of NaCl in the cultivation medium. NaCl has a regulatory effect on the formation of secondary metabolites by enhancing FQ biosynthesis and reducing pigment formation. The maximum values of FQ biosynthesis and inhibition of pigment production are obtained at a mannitol concentration of 20 g/l and 2.5% NaCl in the medium.

УДК 577.34

ХИТИН-ГЛЮКАНОВЫЙ КОМПЛЕКС В КЛЕТОЧНЫХ СТЕНКАХ ЛИШАЙНИКА *Peltigera aphthosa*

© 2012 г. Н. Р. Мейчик, Д. В. Воробьёв

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991;
e-mail: meychik@mail.ru

Поступила в редакцию 5.07.2011 г.

Исследовали клеточные стенки и хитин-глюкановые комплексы, изолированные из разновозрастных частей таллома лишайника *Peltigera aphthosa*. С возрастом увеличивалась массовая доля клеточной стенки и хитин-глюкановых комплексов, но уменьшалось содержание азота в этих структурах. Наибольшей массовой долей хитин-глюканового комплекса от сухой массы таллома характеризовалась базальная зона таллома, апикальная — наибольшей массовой долей хитина в комплексе. Показано, что у *P. aphthosa* степень деацетилирования хитина в комплексе в зависимости от возраста составляла 33 и 54% в апикальной и базальной зонах соответственно. Предложенная методика функционального анализа хитин-глюкановых комплексов на присутствие в них свободных аминогрупп может быть применена при исследовании других лишайнизированных грибов.

Хитин-глюкановые комплексы — основные структурные полисахариды клеточных стенок грибов — привлекают внимание ученых и технологов как экологически безопасные природные полимеры, получаемые из возобновляемых источников. Их высокая биологическая активность и отсутствие токсичности препаратов на их основе определяют перспективы их использования в медицине, биотехнологиях, косметической, пищевой, текстильной и других отраслях промышленности [1]. Особенно широко хитин-глюкановые комплексы используются в лечебно-профилактических целях как пищевые добавки, т.к. обладают высокой адсорбционной способностью по отношению к ионам тяжелых металлов [2–4] и являются эффективными энтеросорбентами [5].

Грибы, как сырье для получения хитин-глюкановых комплексов, имеют преимущество по сравнению с другими организмами, продуцирующими хитинсодержащие соединения, главные из которых — их высокая скорость роста и низкое содержание в них минеральных веществ [6]. Известно, что хитин-глюкановый комплекс грибов состоит из хитина, глюканов и содержит следовые количества белка [7], при этом структура комплекса существенно зависит от состава среды, температуры и других факторов [1, 7–10].

Хитин является неоднородным полисахаридом, т.к. в его структуре имеются звенья со свободными аминогруппами в составе D-глюкозамина [1, 11–15]. В клеточной стенке грибов хитин связан с глюканами β -1,3- и β -1,6-гликозидными связями [16, 17], а с белками — пептидной связью, образованной деацетилированными аминогруппами и диаминомонокарбонными аминокисло-

тами неароматического строения [1, 18]. Установлено, что в хитин-глюкановых комплексах ковалентно связанные пептидные цепочки выполняют связующую роль между цепями хитина и глюкана [19].

Содержание хитина в хитин-глюкановом комплексе зависит от вида гриба и возраста таллома. Показано, что у *Armillariella mellea* (класс Basidiomycetes) содержание хитина в комплексе составляло 70%, а у *Morchella esculenta* (класс Ascomycetes) — 50% [20]. У мицелиального гриба *Coprinus sterquilinus* содержание хитина в хитин-глюкановом комплексе было 1.54 и 5.85% в апексе и во вторичной клеточной стенке соответственно [21].

В талломах симбиотических организмов — лишайников, сформированных гифами гриба, клетками микроводорослей и (или) цианобактерий, клеточные стенки грибного компонента составляют основную долю (90–98%) клеточных стенок таллома [22, 23]. В этой связи последние могут рассматриваться, как альтернативные источники для получения хитин-глюкановых комплексов. В клеточных стенках грибов хитин-глюкановый комплекс участвует в формировании лишайникового симбиоза, а также играет важную роль в процессах поступления и накопления минеральных веществ из атмосферных осадков [9]. Его состав (соотношение компонентов) свидетельствует о важнейших структурных изменениях в составе клеточных стенок с возрастом таллома.

Таким образом, у лишайников хитин-глюкановый комплекс является важным структурным компонентом клеточной стенки, которая выполняет разнообразные физиологические функции в клетках этих симбиотических организмов [23–

26]. Однако до настоящего времени данных о биохимическом составе хитин-глюкановых комплексов в клеточной стенке лишайников, изменении его содержания в оболочке и зависимости биохимических показателей от возраста таллома получено не было.

Цель работы – выделение и анализ состава хитин-глюкановых комплексов из частей таллома *P. aphthosa* разного возраста.

МЕТОДИКА

Объект, исследования. В работе использовали трехкомпонентный листоватый лишайник *Peltigera aphthosa* (L.) Willd, который распространен по всему миру в арктических, северных и умеренных зонах и, в частности, в лесах и на лугах по всей России. Сбор материала проводили в окрестностях Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, расположенной в Ружозерской губе Кандалакшского залива Белого моря. Выбор этого вида обусловлен тем, что для лишайника *P. aphthosa* характерны поверхностные цефалодии – специализированные структуры, в которых локализованы цианобактерии (цианобионт), – которые возможно отделить от поверхности таллома, что позволяло получать из трехкомпонентной системы двухкомпонентную систему. Талломы лишайника предварительно очищали от частичек почвы, отделяли цефалодии (цианобионт) от поверхности таллома и последний разделяли на три зоны: апикальную (1 см от края лопасти), медиальную (2–4 см до конца лопасти, исключая апикальную зону) и базальную (основная масса слоевища).

Выделение хитин-глюканового комплекса. Хитин-глюкановый комплекс выделяли, как описано [27]. Навеску воздушно сухого таллома (5 г) гомогенизировали в ступке, помещали в круглодонную колбу, добавляли 200 мл дистиллированной воды и нагревали на кипящей водяной бане в 1 ч. Затем осадок многократно промывали дистиллированной водой на фильтре и выдерживали в 0.1%-ном растворе Na-ДДС в течение 1.5 ч при нагревании (40°C) в колбе. Реакционную смесь охлаждали, фильтровали, а осадок промывали до нейтрального pH, переносили в коническую колбу с 1%-ным раствором NaOH и перемешивали при комнатной температуре. Через 30 мин колбу с реакционной смесью нагревали и выдерживали на кипящей водяной бане в течение 2 ч, постоянно перемешивая раствор. Полученный осадок помещали на фильтр, промывали водой до нейтрального pH, переносили в круглодонную колбу и заливали 2%-ной HCl. Смесью нагревали на кипящей водяной бане 1.5 ч, после чего осадок промывали водой до нейтрального pH, добавляли к нему 3%-ный раствор NaOH и снова нагревали на

кипящей водяной бане 2.5 ч. Конечный продукт промывали водой до нейтрального pH, а затем спиртом и водно-спиртовыми растворами понижающейся концентрации (96, 70, 50, 35%).

Выделение клеточной стенки. В описанную ранее для корней высших растений методику [28, 29] внесли некоторые изменения. Высушенный материал (~4 г) помещали в стеклянную ионообменную колонку (~200 мл), промывали последовательно 1%-ным раствором NaOH (~0.5 л), дистиллированной H₂O (~2 л), 1%-ным раствором HCl (~0.5 л), далее дистиллированной водой до отсутствия ионов Cl⁻ в промывных водах. Определение хлорид-иона проводили титрометрическим методом с азотнокислой ртутью [30]. На конечной стадии препараты обрабатывали спиртом и ацетоном для удаления лишайниковых веществ, а затем высушивали в термостате с CaCl₂ до постоянной массы при 55–60°C. Оценку степени очистки изолированных клеточных стенок от внутриклеточных структур проводили описанным ранее способом [29, 31], используя флуоресцентную микроскопию (микроскоп AxioPlan 2 imaging MOT, “Carl Zeiss”, Германия). В выделенных клеточных стенках отсутствовали внутриклеточные структуры, а в препаратах полностью сохранялась архитектура клеток таллома.

Содержание аминокрупп. Количество аминокрупп в полимерном матриксе клеточных стенок определяли методом неводного титрования в уксусной кислоте [32]. Навеску сухого растертого препарата клеточных стенок (20 мг) заливали 7 мл 10 мМ раствора хлорной кислоты в ледяной уксусной кислоте. По истечении 2 сут образцы отделяли от раствора. До и после контакта с клеточными стенками раствор титровали 10 мМ раствором бифталата калия в ледяной уксусной кислоте в присутствии индикатора кристаллического фиолетового. Содержание свободных аминокрупп (N_{NH_2}) определяли по формуле [32]:

$$N_{NH_2} = \frac{(V_{исх} - V_{кон})KV_{общ}}{V_a g}, \quad (1)$$

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

Определение элементов. Элементный анализ таллома лишайника и выделенных из него клеточных стенок и хитин-глюкановых комплексов определяли на полуавтоматическом CHNS анализаторе (“Perkin Elmer” Швейцария).

Таблица 1. Массовая доля клеточной стенки (КС, %) и хитин-глюкановых комплексов (ХГК, %) в различных зонах таллома лишайника *P. aphthosa**

Зона таллома	КС, %	ХГК, %
Апикальная	44 ± 1	4.3 ± 0.1
Медиальная	49 ± 11	6.8 ± 0.6
Базальная	55 ± 2	15.1 ± 1.7

* Расчеты проведены на единицу сухой массы таллома.

Таблица 2. Общее содержание азота (%) в разных частях таллома *P. aphthosa* (Т) и изолированных из него препаратах клеточных стенок (КС) и хитин-глюкановых комплексов (ХГК)*

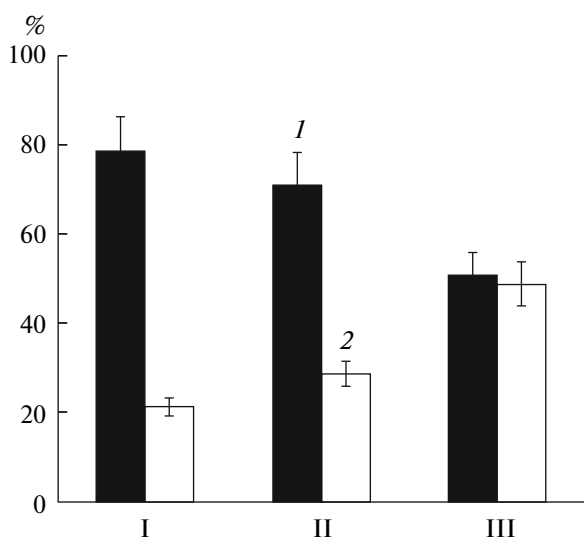
Зона таллома	Т	КС	ХГК
Апикальная	3.31 ± 0.3	3.43 ± 0.3	5.4 ± 0.1
Медиальная	3.03 ± 0.4	3.29 ± 0.1	4.9 ± 0.4
Базальная	2.81 ± 0.3	2.92 ± 0.2	3.5 ± 0.2

* Приведены средние значения 5 повторностей и их стандартные отклонения.

Статистическая обработка. Использовали редактор Excel 7.0. Приведены средние значения из 3–5 повторностей и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Лишайник *P. aphthosa* имеет толстую клеточную стенку, так как ее доля от сухой массы таллома составляет от 44 до 55% при переходе от апи-



Содержание (%) хитина (1) и глюкана (2) в хитин-глюкановых комплексах, выделенных из разных зон таллома (I–III) лишайника *P. aphthosa*. I – апикальная, II – медиальная, III – базальная.

кальной зоны к базальной (табл. 1). С возрастом увеличивалась и доля хитин-глюканового комплекса в клеточных стенках: в базальной зоне значение этого показателя более чем в 2 и 3 раза выше по сравнению с медиальной и апикальной зоной соответственно (табл. 1). Возрастное содержание хитин-глюканового комплекса от апикальной к базальной зоне у *P. aphthosa* может быть связано с функционированием цефалодиев, участвующих в азотном обмене лишайников [22, 33].

В клеточных стенках и хитин-глюкановых комплексах лишайника содержание азота зависит от возраста таллома (табл. 2). Однако в базальной и апикальной зонах клеточных стенок различие в этом показателе не превышает 5–15%, тогда как в этих же зонах хитин-глюкановых комплексов достигает 65%. Разное содержание азота в комплексах разновозрастных частей таллома указывает на различное соотношение в них хитина и глюканов. Расчеты показывают, что наибольшей массовой долей хитина характеризуется хитин-глюкановый комплекс апикальной зоны, где этот показатель достигал 70% (рисунок). В базальной зоне содержание хитина было почти вдвое меньше, чем в молодых частях таллома. Таким образом, у *P. aphthosa* с возрастом в хитин-глюкановом комплексе клеточной стенки массовая доля хитина уменьшалась, а глюканов увеличивалась. Следует отметить, что у *P. aphthosa* во всех частях таллома содержание хитина в комплексе более чем в 10 раз выше, чем у мицелиального гриба *Coprinus sterquilinus* [21] и приблизительно соответствует таковому у *Armillariella mellea* (класс Basidiomycetes) и у *Morchella esculenta* (класс Ascomycetes) [20].

Преобладание хитина в составе хитин-глюканового комплекса апикальной зоны *P. aphthosa*, возможно, связано с процессами роста и формирования структуры таллома, ведущую роль в которых играет жесткость первичных клеточных стенок, напрямую зависящая от содержания в них хитина [1]. Большое содержание глюкана в хитин-глюкановом комплексе базальной зоны, где преобладают процессы структурной деградации таллома, может свидетельствовать о разрыхлении вторичной клеточной стенки и об ослаблении ее структурных функций. Можно предположить, что уменьшение доли хитина и увеличение доли глюкана в хитин-глюкановом комплексе приводит к формированию в базальной зоне более массивной клеточной стенки.

Важной характеристикой хитин-глюканового комплекса является количество деацетилированных аминогрупп. Ранее для их определения использовали ИК-спектроскопию [34], результаты которой в значительной мере зависят от подготовки пробы. Нами разработана методика функционального анализа хитин-глюкановых комплексов на присутствие в них свободных аминогрупп, ос-

Таблица 3. Содержание свободных аминогрупп (N_{NH_2}), общего азота (N) и доля свободных аминогрупп ($\frac{N_{NH_2}}{N} \times 100$) в хитине, хитозане и альбумине*

Образец	N_{NH_2}	N	$\frac{N_{NH_2}}{N} \times 100$
Хитин	1295 ± 84	5057 ± 50	27
Хитозан	680 ± 33	650 ± 25	104
Альбумин	1330 ± 100	11 500	11

* N_{NH_2} и N выражены в микромолях азота на 1 г сухой массы образца, $\frac{N_{NH_2}}{N} \times 100$, %. N – рассчитано по данным элементного анализа в соответствии с формулой $N = \frac{N(\%)}{1.4}$. Приведены средние значения трех независимых опытов и их стандартные отклонения.

нованная на методе неводного титрования, принцип которого для низкомолекулярных соединений описан в работе [35].

Отработку методики с целью ее применения к полученным высокомолекулярным препаратам проводили на образцах хитина (“ICN”, США) и хитозана (“ICN”) с известным содержанием азота и свободных аминогрупп (табл. 3), а также альбумина. Контрольные измерения количества аминогрупп в образцах показали, что избранный ме-

тод анализа может быть применен к шитым структурам. Для хитозана данные, полученные методом неводного титрования, и результаты элементного анализа полностью согласуются между собой (табл. 3). Этот вывод также подтверждают данные анализа хитина и альбумина. Установлено, что доля свободных аминогрупп в первом составляет 27, а во втором – 11% (табл. 3). Результаты анализа хитина на содержание неацетилированных аминогрупп полностью соответствуют данным других исследователей [9], а результаты анализа альбумина – представлениям о содержании свободных аминогрупп в белках (~10%), которые принадлежат заряженным остаткам аргинина и лизина [36, 37].

Результаты неводного титрования препаратов клеточных стенок свидетельствуют о том, что они содержат от 0.36 до 0.66 мМ аминогрупп на 1 г сухой массы клеточных стенок в зависимости от зоны таллома, т.е. от 14 до 31% от общего количества азота в экстраклеточном компартменте ($\frac{N_{NH_2}}{N_{кc}} \times 100$, табл. 4) соответственно. Эти резуль-

таты показывают, что в полимерной структуре клеточной стенки *P. aphthosa*, помимо структурных белков, присутствуют и другие азотсодержащие полимеры, имеющие свободные аминогруппы. Известно, что содержание последних в белках растительных организмов составляет не более 10% [36, 37]. В соответствие с данными литературы о составе клеточной стенки лишайников и на основании полученных результатов можно пола-

Таблица 4. Содержание свободных аминогрупп (N_{NH_2}), общего азота (N) и доля свободных аминогрупп ($\frac{N_{NH_2}}{N} \times 100$) в препаратах клеточных стенок и хитин-глюкановых комплексов, выделенных из разных зон таллома *P. aphthosa**

Зона таллома	Клеточная стенка			Хитин-глюкановый комплекс		
	N_{NH_2}	N	$\frac{N_{NH_2}}{N} \times 100$	N_{NH_2}	N	$\frac{N_{NH_2}}{N} \times 100$
Апикальная	355 ± 76	2450	14	1266 ± 41	3857	33
Медиальная	406 ± 58	2350	17	1307 ± 10	3500	37
Базальная	655 ± 92	2086	31	1354 ± 31	2500	54

* N_{NH_2} и N выражены в микромолях азота на 1 г сухой массы образца, $\frac{N_{NH_2}}{N} \times 100$, %. N – рассчитано по данным элементного анализа в соответствии с формулой $N = \frac{N(\%)}{1.4}$. Приведены средние значения трех независимых опытов и их стандартные отклонения.

гать, что у *P. aphthosa* отличные от белков полимеры оболочки являются хитин-глюкановыми комплексами.

В изолированных из таллома *P. aphthosa* хитин-глюкановых комплексах содержание свободных аминокислот незначительно увеличивалось от апикальной к базальной зоне от 1.26 до 1.35 мМ на 1 г сухой массы хитин-глюканового комплекса соответственно, но степень деацетилирования этих комплексов резко различалась (табл. 4). В хитин-глюкановом комплексе апикальной зоны степень деацетилирования составляла 33%, тогда как комплекс базальной зоны содержал приблизительно равное количество свободных и ацетилированных аминокислот.

Предполагая, что изолированные хитин-глюкановые комплексы состоят только из хитина, хитозана и глюкана, используя данные табл. 4, рассчитано содержание углерода и водорода в них. Сопоставление расчетных данных (данные не приведены) с результатами элементного анализа показало, что показатели совпадают в пределах 3–8% относительной погрешности. Оценка дает основание предполагать, что в полученных препаратах отсутствует внутриклеточное содержимое и неструктурные компоненты клеточных стенок.

Таким образом, нами был выделен хитин-глюкановый комплекс из клеточных стенок лишайника *P. aphthosa*. Показано, что с возрастом доля хитин-глюканового комплекса в клеточных стенках увеличивалась, при этом массовая доля хитина больше в апикальной зоне, чем в базальной. Хитин-глюкановые комплексы из разных частей таллома отличались и по числу деацетилированных аминокислот. В базальной зоне их количество было почти в два раза больше, чем в апикальной. Рассмотренные методы выделения и анализа хитин-глюкановых комплексов могут быть использованы при изучении других лишайнизированных грибов для установления возможности их использования в качестве исходного сырья для получения хитинсодержащих комплексов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варомова. М.: Наука, 2002. 368 с.
2. Нудьга Л.А., Ганичева С.И., Петрова В.А., Быстрова Е.С., Львова Е.Б., Галкин А.В., Петропавловский Г.А. // Журн. прикл. химии. 1997. Т. 70. № 2. С. 242–245.
3. Феофилова Е.П., Марьин А.П., Терешина В.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 1994. Т. 30. № 1. С. 149–155.
4. Терешина В.М., Марьин А.И., Косяков В.Н., Козлов В.Н., Феофилова Е.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. № 4. С. 432–436.
5. Феофилова Е.П. // Микробиология. 1997. Т. 66. № 3. С. 302–309.
6. Ivshin V.P., Artamonova S.D., Ivshina T.N., Sharnina F.F. // Polymer Sci., Ser. B. 2007. V. 49. № 11–12. P. 305–310.
7. Феофилова Е.П. Клеточная стенка грибов. М.: Наука, 1983. 230 с.
8. Dahlman L., Näsholm T., Palmqvist K. // New Phytologist. 2002. V. 153. № 2. P. 307–315.
9. Ugrozov V.V., Artamonova S.D., Sharnina F.F., Ivshin V.P., Grunin L.Y., Kataeva L.I. // Colloid J. 2008. V. 70. № 6. P. 780–783.
10. Aguilar-Uscanga B., Francois J.M. // Lett. Appl. Microbiol. 2003. V. 37. № 3. P. 268–274.
11. Gooday G.W. The Growing Fungus. London: Chapman and Hall, 1995. P. 43–62.
12. Klis F.M., Boorsma A., De Grot P.W.J. // Yeast. 2006. V. 23. № 3. P. 185–202.
13. Гальбрайт Л.С. // Сорос. образоват. журн. 2001. № 1. С. 51–56.
14. Урьяш В.Ф., Кокурина Н.Ю. // Вестн. Нижегородского ун-та им. Н.И. Лобачевского. 2007. № 3. С. 98–104.
15. Дебриер Ж., Бабак В.Г. // Росс. хим. журн. 2008. № 1. С. 75–83.
16. Lipke P., Ovalle R. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 15. P. 3735–3740.
17. Sietsma J.H., Wessels J.G.H. // J. Gen. Microbiol. 1981. V. 125. № 1. P. 209–212.
18. Leštan M., Pečavar A., Leštan D., Perdih A. // Amino Acids. 1993. V. 4. № 1–2. P. 169–176.
19. Шабрукова Н.В., Зябликова Т.А., Зайнетдинова Д.Р., Халитов Ф.Г., Гамаюрова В.С. // Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения. 2001. Т. 1. № 4. С. 1–4.
20. Ившина Т.Н., Артамонова С.Д., Ившин В.П., Шарнина Ф.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 3. С. 348–353.
21. Koteček P., Raclavský V. // Folia Microbiol. 1999. V. 44. № 4. P. 397–400.
22. Palmqvist K. // New Phytologist. 2000. V. 148. P. 11–36.
23. Бязров Л.Г. Лишайники — индикаторы радиоактивного загрязнения. М.: КМК, 2005. 476 с.
24. Nieboer E., Richardson D.H.S., Tomassini F.D. // Bryologist. 1978. V. 81. № 2. P. 226–246.
25. Loppi S., Nelli L., Ancora S., Bargagli R. // Bryologist. 1997. V. 100. № 2. P. 251–253.

26. *Wösten H.A.B., Wessels J.G.H.* // *Mycoscience*. 1997. V. 38. P. 363–374.
27. *Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С.* // *Микробиология*. 1995. Т. 64. № 1. С. 27–31.
28. *Meuchik N.R., Yermakov I.P.* // *Plant and Soil*. 2001. V. 234. № 2. P. 181–193.
29. *Воробьев Д.С., Мейчик Н.Р., Лобакова Е.С., Матвеева Н.П., Ермаков И.П.* // *Микробиология*. 2009. Т. 78. № 5. С. 702–708.
30. Унифицированные методы анализа вод / Ред. Ю.Ю. Лурье. М.: Химия, 1973. 375 с.
31. *Meuchik N.R., Nikolaeva J.I., Yermakov I.P.* // *Plant and Soil*. 2005. V. 277. № 1–2. P. 163–174.
32. *Мейчик Н.Р., Николаева Ю.И., Ермаков И.П.* // *Биохимия*. 2009. Т. 74. № 8. С. 1145–1151.
33. *Schlarmann G., Peveling E., Tenberge K.* // *Bibliotheca Lichenologica*. 1990. V. 38. P. 395–409.
34. *Шарнина Ф.Ф., Ившина Т.Н., Ившин В.П.* // *Структура и динамика молекулярных систем*. 2003. Т. 10. № 2. С. 274–277.
35. *Черонис Н.Д., Ма Т.С.* *Микро- и полумикрометоды органического функционального анализа*. М.: Химия, 1973. 576 с.
36. *Gassab G.I.* // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1998. V. 49. P. 281–309.
37. *Gassab G.I., Varner J.E.* // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1988. V. 39. P. 321–353.

Chitin–Glucan Complex in Cell Walls of the *Peltigera aphthosa* Lichen

N. R. Meichik and D. V. Vorob'ev

Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

e-mail: meychik@mail.ru

Received July 5, 2011

Abstract—Cell walls and chitin–glucan complexes isolated from uneven-aged components of the thallus of the *Peltigera aphthosa* lichen were studied. The mass fraction of the cell wall and chitin–glucan complexes increased with age, but the content of nitrogen in these structures decreased with age. The basal area of the thallus was characterized by the largest mass fraction of the chitin–glucan complex from the dry mass of the thallus; the apical area, by the largest mass fraction of chitin in the complex. It was demonstrated that in *P. aphthosa*, the degree of deacetylation of chitin in the complex (depending on the age) was 33 and 54% in the apical and basal areas, respectively. The suggested method of functional analysis of chitin–glucan complexes for the presence of free amino groups in them can be used for studying other lichenified fungi.

УДК 577.15;573.6.086.835:633/635

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ПОЛИСАХАРИДОВ УЛЬТРАДИСПЕРСНЫХ ЧАСТИЦ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ РАЗМЕРА

© 2012 г. В. В. Шутова*, А. И. Юсипович**, Е. Ю. Паршина**, Д. О. Захаркин*, В. В. Ревин*

* Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева,
Саранск, 430005, e-mail: vshutova@yandex.ru

** Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119899, e-mail: sanyavor@gmail.com

Поступила в редакцию 1.07.2011 г.

Исследовали эффективность ферментативного гидролиза полисахаридов древесины, измельченной до образования ультрадисперсных частиц (УДЧ). Установлено, что содержание редуцирующих сахаров (РС) в измельченном сырье и выход их при ферментативном гидролизе полисахаридов зависит от размера УДЧ. Методами лазерной интерференционной микроскопии и динамического рассеяния выявлено, что увеличение времени измельчения субстратов от 20 до 40 мин приводило к появлению в среде частиц от 2 до 200 нм. В ферментативных гидролизатах УДЧ наблюдалось накопление в основном глюкозы и галактозы. Интенсивность измельчения (скорость вращения мельницы) и время существенно влияли на полноту ферментативного гидролиза древесины.

В настоящее время в связи с сокращением запасов ископаемого топлива ставится вопрос о получении альтернативных видов горючего из возобновляемых ресурсов [1, 2]. Наиболее перспективно для производства биоэтанола дешевое древесное целлюлозосодержащее сырье [3, 4]. Однако полисахариды древесины без предварительной обработки не полностью гидролизуются ферментами. В настоящее время в промышленности в основном применяется технология SPORL (Sulfite Pretreatment for Overcoming the Recalcitrance of Lignocellulose), заключающаяся в сульфитной предобработке субстрата [5]. Кроме этого существует ряд перспективных технологий, которые пока не используются в промышленности.

Ультразмельчение — процесс обработки материала на шаровых мельницах и дезинтеграторах, конечным продуктом которого являются частицы субстрата с размерами 10^{-6} – 10^{-9} м. В процессе ультразвукового измельчения происходит разрушение лигноцеллюлозного комплекса древесины, являющегося главным препятствием для ферментов. Разрушение надмолекулярной структуры древесины приводит к увеличению степени гидролиза полисахаридов. Оценить размеры частиц, образующихся при ультразвуковом измельчении, в широком диапазоне (от нескольких нанометров до нескольких микрон) можно при помощи методов динамического светорассеяния и лазерной интерференционной микроскопии [6–10].

Цель работы — установление корреляции между степенью измельчения и эффективностью ферментативного гидролиза полисахаридов дре-

весины, определение размера получающихся при ультразвуковом измельчении частиц, а также влияния ультразвукового измельчения на гидролиз древесины.

МЕТОДИКА

Объектами исследования были осинового опилки, полученные с помощью дисковой циркулярной пилы, и ультрадисперсные древесные частицы (УДЧ).

Измельчение опилок проводили с помощью планетарной шаровой мельницы RetschPM-100 (“Retsch”, Германия). Использовали две скорости вращения рабочего органа мельницы 400 и 600 об/мин. Продолжительность измельчения составляла 20, 25, 30, 35 и 40 мин. Для определения размеров УДЧ их помещали в дистиллированную воду (5%) на 24 ч для отделения крупных частиц.

Оценка размеров частиц была выполнена с использованием лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ) и методом динамического светорассеяния (ДС). ЛИМ позволяет количественно с высокой точностью измерять оптическую разность хода (ОРХ), пропорциональную высоте объекта и показателю преломления [9]. Исследования проводились с использованием автоматизированного интерференционного микропрофилометра МИА-1, разработанного во Всероссийском научно-исследовательском институте оптико-физических исследований (Москва, Россия) с длиной волны лазера 650 нм. Погрешность измерения в плоскости составляла около 0.5 мкм, а по высоте погрешность измерения ОРХ \approx 5 нм.

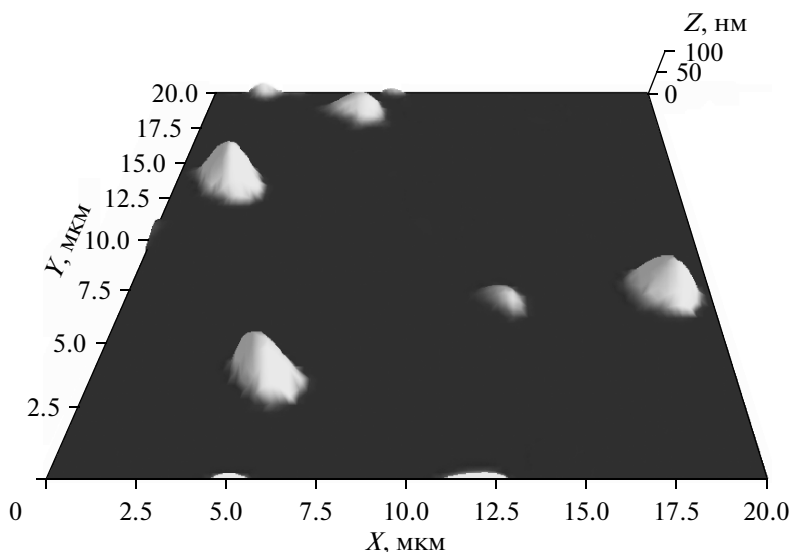


Рис. 1. Изображение УДЧ в супернатанте. Время ультраизмельчения 20 мин, скорость вращения 600 об/мин. Максимальное значение высоты частицы соответствует ее диаметру.

Величина ОРХ (Φ) связана с высотой (z) следующим соотношением:

$$\Phi = (n - n_0)z, \quad (1)$$

где n и n_0 – показатели преломления частицы и раствора (для воды $n_0 = 1.333$) соответственно. Используя высокую точность измерения ОРХ, можно оценить диаметр частиц по формуле 1. Если предположить, что частицы являются однородными сферическими, то максимальная толщина (максимальное значение ОРХ) соответствует диаметру частиц [11]. Для расчета толщины частиц их показатель преломления принимался равным показателю преломления целлюлозы (1.468) [12]. Таким образом, метод ЛИМ позволяет оценивать размеры частиц высотой менее 5 нм (точность измерения прибора), что для частиц целлюлозы составляет 37 нм (см. формулу 1). Типичное изображение частиц в супернатанте, полученное при помощи лазерной интерференционной микроскопии, представлено на рис. 1.

В опыте 2 мкл супернатанта, взятого из средней части пробирки, помещали на зеркальную поверхность предметного стекла, накрывали покровным стеклом и помещали в микроскоп. В каждой пробе оценивалось не менее 80 объектов. Для обработки изображений использовалась основанная на базе ImageJ, бесплатная для некоммерческого использования программа FIJI (<http://fiji.sc/>).

При использовании динамического светорассеяния для оценки размеров частиц 1.5 мл супернатанта, разбавленного в 5 раз, заливали в кювету и помещали в прибор Zetasizer Nano (“Malvern”, England).

Количество легкогидролизуемых сахаров в опилках определяли по методу [13], редуцирующих сахаров (РС) – по реакции с пикриновой кислотой, целлюлозы – по методу [13].

Для гидролиза УДЧ использовали ферментный препарат “Ламинекс ВГ” (“Genencor International BVBA”, Бельгия; активность эндоцеллюлазы – 4700 Е/мл, активность ксиланазы – 1500 Е/мл, активность β -глюканазы – 3100 Е/мл). В качестве субстрата для определения активности эндоцеллюлазы использовали 1%-ную натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) в 0.05 М ацетатном буфере, рН 4.5 с 0.1 М NaCl. К 1 мл субстрата добавляли 1 мл культуральной жидкости, инкубировали 30 мин при 50°C и определяли РС по реакции с пикриновой кислотой. За единицу активности принимали количество фермента, при действии которого на Na-КМЦ образовывался 1 мг глюкозы за 1 ч при 50°C.

Обработку ферментным препаратом “Ламинекс ВГ” (“Genencor International BVBA”, Бельгия) проводили в колбах емкостью 100 мл с 30 мл ацетатного буфера (рН 5.0) и 3% УДЧ. В колбы добавляли ферментный препарат в объеме, соответствующем 200 ед./г субстрата (по Na-КМЦ) и помещали на 24 ч в шейкер-термостат при 50°C. Пробы для анализа отбирали по 5 мл, центрифугировали 10 мин, образцы супернатанта после подготовки проб анализировали методом ВЭЖХ. Методика подготовки проб заключалась в удалении растворимых белков при нагревании образца, осветлении раствора 10%-ным ацетатом свинца и фильтрации полученного осадка на фильтре с порами 0.45 мкм и центрифугировании при 10000 g до исчезновения опалесценции. Режим анализа на хроматографе Shimadzu LC-20A (“Shimadzu”,

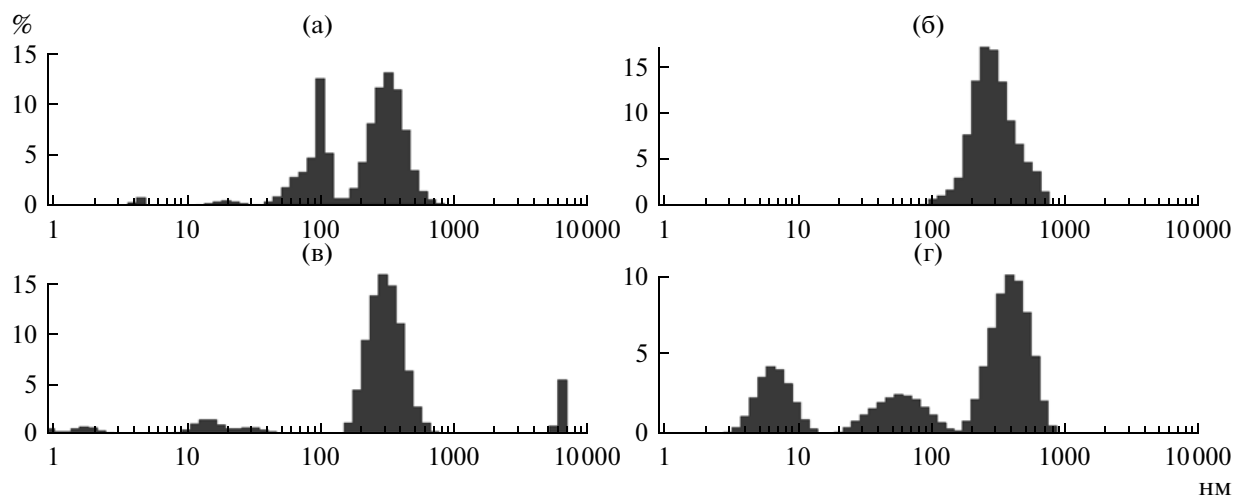


Рис. 2. Распределение размеров УДЧ (диаметр), полученное с помощью динамического светорассеяния, при разной длительности (мин) и скорости вращения (об/мин) при ультразвукомельчении:

а – 20 мин, 400 об/мин; б – 20 мин, 600 об/мин; в – 40 мин, 400 об/мин; г – 40 мин, 600 об/мин.

Япония) с бинарным градиентным насосом высокого давления LC-20AB с одинарной предколонкой Supelguard Pb: подвижная фаза – деионизированная вода 1 мл/мин, колонка Supelcogel Pb 300 × 7.8 (Supelco, США), термостатирование 80°C [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Механическую обработку древесины осины проводили при скорости вращения 400 и 600 об/мин в течение 20–40 мин.

Размер УДЧ измеряли методом динамического светорассеяния, который позволяет оценивать наличие частиц в растворе в широком диапазоне – от нескольких нанометров до микрометров (рис. 2). Установлено, что в растворах присутствуют УДЧ различных размеров от 2 до 1100 нм. Показано, что при увеличении времени измельчения в среде появляются более мелкие частицы (рис. 2). Измельчение в течение одинаковых промежутков времени, но с большей скоростью приводило к уменьшению полидисперсности частиц.

Таблица 1. Измеренные методом ЛИМ средние размеры диаметра частиц

Параметр измельчения	Среднее, нм	Мода*, нм	Стандартное отклонение
20 мин 400 об/мин	206.1 ± 23.0	75.6	451.5
20 мин 600 об/мин	311.9 ± 53.2	75.6	781.3
40 мин 400 об/мин	103.6 ± 16.0	41.7	239.0
40 мин 600 об/мин	91.4 ± 12.4	40.4	275.7

* Размер наиболее часто встречающихся в растворе частиц.

Метод динамического светорассеяния позволил получить информацию о присутствии в растворе частиц различного размера. Для оценки распределения частиц по размерам использовался метод ЛИМ. При измерении УДЧ методом ЛИМ было обнаружено, что в супернатанте находятся частицы от ~30 нм до более 1 мкм, при этом показано, что наибольшее число частиц в супернатанте составляли частицы размером менее 100 нм (рис. 3). На гистограммах (рис. 3) они показаны как самый высокий пик распределения по размерам и соответствуют моде (наиболее часто встречаемому значению размера).

Установлено, что увеличение времени обработки приводило к уменьшению размера наиболее часто встречаемых частиц примерно в 2 раза. Средние, наиболее часто встречаемые (мода) значения, а также стандартные отклонения диаметра частиц при различных режимах измельчения приведены в табл. 1. Чем больше среднее отличается от моды, тем более неоднородные по размерам частицы находятся в супернатанте. Таким образом, судя по увеличению стандартного отклонения, характеризующего разброс размеров измеренных частиц, можно предположить, что увеличение скорости вращения мельницы приводит к некоторому увеличению дисперсности системы (см. табл. 1).

Таким образом, с помощью двух методов было показано, что с увеличением скорости и длительности ультразвукомельчения происходило уменьшение среднего размера частиц (появление частиц более мелкого размера), при этом увеличение скорости приводило к некоторому увеличению дисперсности частиц в супернатанте.

Для выявления доступности компонентов УДЧ для ферментов проводили ферментативный гид-

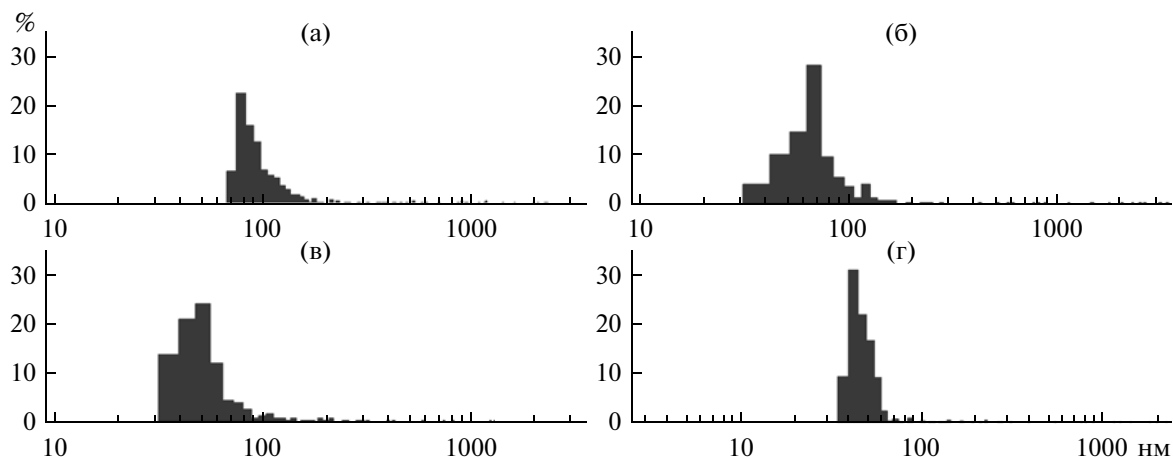


Рис. 3. Распределение УДЧ по размерам в пробах, измеренных методом лазерной интерференционной микроскопии при разной длительности (мин) и скорости вращения (об/мин) при ультразвумельчении:

а – 20 мин, 400 об/мин; б – 20 мин, 600 об/мин; в – 40 мин, 400 об/мин; г – 40 мин, 600 об/мин.

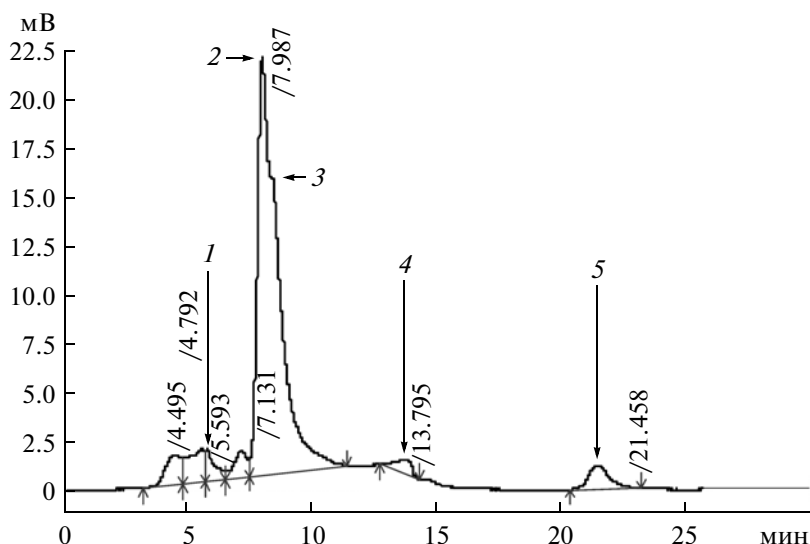


Рис. 4. Хроматограмма ферментативного гидролизата УДЧ, измельченных при 600 об/мин в течение 40 мин.

1 – галактосодержащий дисахарид, 2 – глюкоза, 3 – галактоза, 4 – ксилоза, 5 – арабиноза.

ролиз полисахаридов препаратом “Ламинекс”. После осахаривания в течение 24 ч определяли концентрацию редуцирующих сахаров (РС) методом ВЭЖХ.

В ходе исследования было показано (рис. 4, 5 и табл. 2), что глубина ферментативного гидролиза УДЧ зависит как от скорости вращения мельницы, так и от времени предобработки. После гидролиза УДЧ в среде накапливались, в основном, глюкоза и галактоза (табл. 2). При использовании УДЧ, полученных при 600 об/мин в течение 40 мин, обнаружены максимальные количества глюкозы и галактозы – 9.58 и 6.43 мг/мл соответственно (рис. 5). При этом режиме в среде были обнаружены также галактозосодержащий дисаха-

рид, арабиноза и ксилоза и ряд других моно- и дисахаридов (менее 1 мг/мл), суммарная концентрация редуцирующих сахаров составила 18.75 мг/мл (табл. 2).

При меньшей скорости вращения мельницы (400 об/мин) содержание глюкозы в среде зависело от времени предобработки (рис. 5): при 20 мин оно составляло 1.92 мг/мл и при 40 мин – 3.73 мг/мл, галактозы 1.47 и 1.90 мг/мл соответственно. Аналогичная динамика накопления моносахаридов обнаружена при получении УДЧ при 600 об/мин: концентрация глюкозы составила 6.11 мг/мл, галактозы – 4.05 мг/мл при 20-минутном измельчении и 9.58 и 6.43 мг/мл при 40 минутном соответственно (табл. 2).

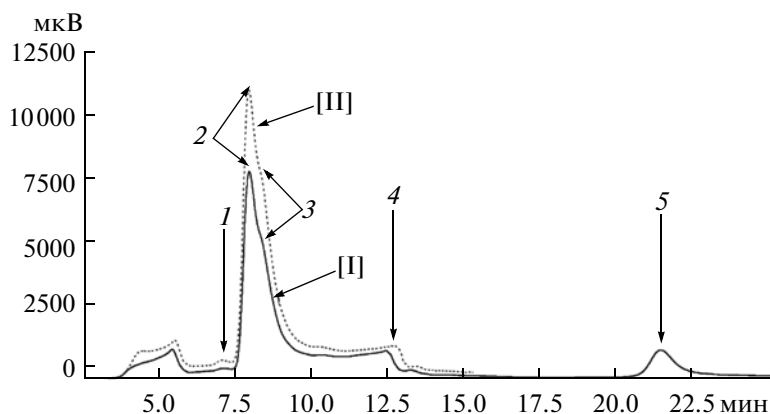


Рис. 5. Сравнение хроматограмм ферментативных гидролизатов УДЧ, измельченных при 400 об/мин в течение 20 [I] и 40 [II] мин.

1 – галактосодержащий дисахарид, 2 – глюкоза, 3 – галактоза, 4 – ксилоза, 5 – арабиноза.

Концентрация РС после ферментативной обработки УДЧ, полученных при 600 об/мин, была значительно выше, по сравнению с УДЧ, полученными при 400 об/мин. Итак, интенсивность вращения мельницы и длительность измельчения существенно влияли на последующий ферментативный гидролиз древесины.

Большая концентрация РС свидетельствовала о большей полноте и интенсивности гидролиза, а также и об увеличении доступности целлюлозы для гидролаз. Лигноцеллюлозный комплекс препятствует проникновению ферментов и затрудняет гидролиз целлюлозы и других полисахаридов [15]. Однако при ультраизмельчении происходит резкое увеличение площади поверхности частиц древесины и в результате этого повышение степени гидролиза.

Было исследовано содержание РС в исходных опилках и УДЧ (табл. 3). Как известно, в необработанной древесине редуцирующие сахара присутствуют в очень малых концентрациях. Содержание РС в УДЧ оказалось значительно выше, чем в грубоизмельченных опилках, что свидетельствует о разрушении полисахаридных цепей с образованием низкомолекулярных сахаров.

В каждой целлюлазе имеется два домена: сорбционный, или целлюлозосвязывающий, и каталитический домен, осуществляющий реакцию гидролиза. Сначала образуется комплекс целлюлозосвязывающего домена и молекулы целлюлозы, затем вступает в действие каталитический домен, при этом фермент как бы “перетекает” через ряд непрочных комплексов, в конце чего образуется конечный продукт реакции [16]. Совершенно очевидно, что рыхлая надмолекулярная структура будет гораздо легче поддаваться гидролизу, чем плотноупакованный лигноцеллюлозный комплекс. Более того, уменьшение размера гидролизующих частиц также увеличит скорость ферментативной реакции из-за появления более коротких участков молекул целлюлозы. Это можно оценить по изменению степени конверсии полисахаридов. Степень конверсии полисахаридов древесины, k_k – отношение массы образовавшихся РС к сумме массы целлюлозы и легкогидролизуемых полисахаридов, можно определить из уравнения:

$$k_k = \frac{m_{pc} V_c}{m_{ц} + m_{лгп}}, \quad (2)$$

где m_{pc} – количество РС в 1 мл гидролизата, мг/мл; V_c – объем гидролизата, мл; $m_{ц}$ – масса

Таблица 2. Зависимость концентрации редуцирующих сахаров, мг/мл в ферментных гидролизатах УДЧ от времени ультраизмельчения

Время измельчения, мин	Скорость вращения мельницы, об/мин					
	400			600		
	глюкоза	галактоза	суммарный выход сахаров	глюкоза	галактоза	суммарный выход сахаров
20	1.92 ± 0.04	1.47 ± 0.01	3.92 ± 0.15	6.11 ± 0.16	4.05 ± 0.21	11.53 ± 0.21
40	3.73 ± 0.07	1.90 ± 0.05	6.21 ± 0.13	9.58 ± 0.28	6.43 ± 0.24	18.75 ± 0.39

целлюлозы в навеске древесины, мг; $m_{\text{лгп}}$ — масса легкогидролизуемых полисахаридов в навеске древесины, мг.

Мы установили, что содержание целлюлозы в УДЧ осины составляло 37.5%, а легкогидролизуемых полисахаридов — 34%. Степень конверсии в случае измельчения образцов при 40 мин и 600 об/мин составила 87.5%, что практически равно выходу сахаров при кислотном гидролизе [3]. При ферментной обработке образцов, полученных при 20 мин и 600 об/мин, выход РС составил только 53.8% общего числа полисахаридов древесины.

Из рис. 3 видно, что увеличение длительности измельчения, как и его интенсивности приводят к увеличению доли более мелких частиц в УДЧ. Размер частиц, в свою очередь, коррелирует с эффективностью гидролиза древесины: чем меньше размер УДЧ, тем эффективнее гидролиз. Методом динамического светорассеяния нами показано, что при режимах измельчения 40 мин и 600 об/мин обнаруживаются частицы размером 2–11 нм, которые обеспечивали максимальный выход РС по сравнению со всеми имеющимися пробами. Однако в образцах, полученных при обработке при 400 об/мин в течение 40 мин было зафиксировано небольшое количество частиц диаметром 2–7 нм, но это не привело к увеличению выхода РС при ферментативном гидролизе.

Установлено, что содержание РС в измельченной древесине и выход сахаров при ферментативном гидролизе полисахаридов зависел от размера УДЧ. Максимальные значения выявлены при размере УДЧ 10–20, 100–110 и 800 нм. Увеличение времени обработки субстратов при измельчении от 20 до 40 мин привело к появлению в среде частиц от 2 до 200 нм.

Предполагается, что в зависимости от длительности и скорости измельчения опилок наноразмерные частицы в водной среде могут агрегировать, что меняет выход РС при последующем ферментативном гидролизе. Это доказывается тем, что образец, в котором зафиксированы самые мелкие частицы, не дал максимального образования сахаров при гидролизе.

В ферментативных гидролизатах УДЧ наблюдалось накопление в основном глюкозы и галактозы. Кроме того, детектировались в следовых количествах лактоза, арабиноза и ксилоза, а также ряд других моно- и дисахаридов в концентрациях менее 1 мг/мл.

Показано, что как интенсивность, так и время измельчения (скорость вращения мельницы) существенно влияют на последующий ферментативный гидролиз древесины. Максимальная концентрация РС обнаружена после ферментативной обработки УДЧ при 600 об/мин в течение 40 мин: максимальный выход сахаров составил 19 мг/мл

Таблица 3. Количество редуцирующих сахаров в исходном сырье

Продолжительность ультразвукового измельчения, мин	Скорость вращения мельницы, об/мин	Концентрация РС, мг/г субстрата
Грубоизмельченные опилки	—	1.50 ± 0.08
20	400	1.68 ± 0.08
	600	2.75 ± 0.12
40	400	2.27 ± 0.11
	600	4.70 ± 0.19

гидролизата, а степень конверсии полисахаридов древесины достигала 87.5%.

Таким образом, ультразвуковое измельчение можно использовать для повышения степени гидролиза полисахаридов древесины, а в дальнейшем правильная комбинация нескольких методов предобработки древесины приведет к развитию технологии перспективного топлива — биоэтанола, путем сбраживания полученного гидролизата дрожжами.

Авторы выражают благодарность сотрудникам МГУ им. Ломоносова, профессору Максиму Г.В. и чл.-корр. РАН Гудилину Е.А. за возможность проведения и обсуждения результатов работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sedlacek D.* // Renewable Fuel Accociations. 2002. № 2. P. 19–28.
2. *Карпов С.А.* // Химия и технология топлив и масел. 2008. № 1. С. 3–5.
3. *Badger P.C.* // Trends in New Crops and New Uses. 2002. № 11. P. 17–21.
4. *Хвалин И.В.* // Строительные и дорожные машины. 2006. № 11. С. 18–19.
5. *Zhu J.Y., Zhu W., Obryan P., Dien B.S., Tian S., Gleisner R., Pan X.J.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 86. № 5. P. 1355–1365.
6. *Farinas J., Verkman A.S.* // Biophys. J. 1996. V. 71. P. 3511–3522.
7. *Вишняков Г.Н., Закарян К.С., Левин Г.Г., Стрелецкая Е.А.* // Измерительная техника. 1999. Т. 1. С. 46–49.
8. *Tychinsky V., Kretushev A., Vyshenskaja T.* // Eur. Biophys. J. 2004. V. 33. P. 700–705.
9. *Yusipovich A.I., Parshina E.Y., Brysgalova N.Y., Brazhe A.R., Brazhe N.A., Lomakin A.G., Levin G.G., Maksimov G.V.* // J. Appl. Phys. 2009. V. 105. 102037.

10. Rappaz B., Barbul A., Hoffmann A., Boss D., Korenstein R., Depeursinge C., Magistretti P.J., Marquet P. // *Blood Cells Mol. Dis.* 2009. V. 42. P. 228–232.
11. Юсипович А.И., Новиков С.М., Казакова Т.А., Ерохова Л.А., Браже Н.А., Лазарев Г.Л., Максимов Г.В. // *Квант. электроника.* 2006. Т. 36. С. 874–878.
12. Kasarova S.N., Sultanova N.G., Ivanov C.D., Nikolov I.D. // *Optical Materials.* 2007. V. 29. P. 1481–1490.
13. Кадималиев Д.А., Ревин В.В., Шутова В.В., Самуилов В.Д. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2004. Т. 40. № 1. С. 57–61.
14. Lough W.J., Wainer I.W. *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice.* London, Tokyo: Blackie Acad. & Prof., 2004. 282 с.
15. Lau M.J., Lau M.W., Gunawan C., Dale B.E. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. V. 162. № 7. P. 1847–1857.
16. Рабинович М.Л., Мельник М.С. // *Успехи биологической химии.* 2000. Т. 40. С. 205–266.

Effect of Particle Size on the Enzymatic Hydrolysis of Polysaccharides from Ultrafine Lignocellulose Particles

V. V. Shutova^a, A. I. Yusipovich^b, E. Yu. Parshina^b, D. O. Zakharkin^a, and V. V. Revina^a

^a *Ogarev State University, Mordovia, Saransk, 430005 Russia*

e-mail: vshutova@yandex.ru

^b *Moscow State University, Moscow, 119899 Russia*

e-mail: sanyavor@gmail.com

Received July 1, 2011

Abstract—The efficiency of the enzymatic hydrolysis of wood polysaccharides ground into ultrafine particles (UFPs) has been investigated. The content of reducing sugars (RS's) in powdered raw materials and the yield of sugars during enzymatic hydrolysis have been shown to depend on the particle size. Laser interference microscopy and dynamic light scattering studies have shown that increasing the grinding time from 20 to 40 min resulted in the formation of particles ranging from 2 to 200 nm in size. Enzymatic hydrolyzates of UFPs mostly contained glucose and galactose. The grinding intensity (mill rotation rate) and time had a significant effect on the extent of the enzymatic hydrolysis of wood.

Сдано в набор 27.12.2011 г.	Подписано к печати 13.03.2012 г.	Формат 60 × 88 ¹ / ₈	
Цифровая печать	Усл. печ. л. 12.0	Усл. кр.-отт. 1.4 тыс.	Уч.-изд. л. 12.0
	Тираж 114 экз.		Бум. л. 6.0
		Зак. 155	

Учредители: Российская академия наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Издатель: Российская академия наук. Издательство “Наука”, 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90
 Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”
 Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099 Москва, Шубинский пер., 6