

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	<b>СОПРЯЖЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ ВОДОРОДА (ОБЗОР)</b> Текучева Д.Н., Цыганков А.А.	357	4
<input type="checkbox"/>	<b>ВЫДЕЛЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПАЗЫ ИЗ ТЕРМОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ THERMOSYNTROPHIA LIPOLYTICA</b> Гумеров В.М., Марданов А.В., Колосов П.М., Равин Н.В.	376	3
<input type="checkbox"/>	<b>СИНТЕЗ 1-БУТАНОЛА КЛЕТКАМИ ESCHERICHIA COLI ПРИ ФОРМИРОВАНИИ БУТИРИЛ-КОА ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМИ ФЕРМЕНТАМИ КЛОСТРИДИЙ И НАТИВНЫМИ ФЕРМЕНТАМИ <math>\beta</math> - ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ</b> Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Моржакова А.А., Антонова С.В., Сухоженко А.В., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г.	383	1
<input type="checkbox"/>	<b>PUTATIVE DOWN-STREAM SIGNALING MOLECULE OF GTPASE IN PORPHYROMONAS GINGIVALIS</b> Chun M.J., Park K.J., Ohk S.H.	389	0
<input type="checkbox"/>	<b>РОЛЬ АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В РЕГУЛЯЦИИ И ФОРМИРОВАНИИ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА</b> Макарова Л.Е., Смирнов В.И., Клыба Л.В., Петрова И.Г., Дударева Л.В.	394	3
<input type="checkbox"/>	<b>BIOFILM, ICE RECRYSTALLIZATION INHIBITION AND FREEZE-THAW PROTECTION IN AN EPIPHYTE COMMUNITY</b> Wu Z., Kan F.W.K., She Y.M., Walker V.K.	403	0
<input type="checkbox"/>	<b>MICROBIAL ACTIVITY IN THE LANDFILL SOIL</b> Swiontek Brzezinska M., Burkowska A., Walczak M.	411	0
<input type="checkbox"/>	<b>ОБРАЗОВАНИЕ БИОГАЗА МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ ПРИ РАЗЛОЖЕНИИ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ПИЩЕВЫХ ОТХОДОВ</b> Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Петрова Е.В., Нетрусов А.И.	417	6
<input type="checkbox"/>	<b>УДАЛЕНИЕ ИЗ ВОЗДУХА ЛЕТУЧИХ ВЕЩЕСТВ ТАБАЧНЫХ ЛИСТЬЕВ МЕТОДОМ БИОФИЛЬТРАЦИИ</b> Загустина Н.А., Мишарина Т.А., Веприцкий А.А., Жуков В.Г., Ружицкий А.О., Теренина М.Б., Крикунова Н.И., Куликова А.К., Попов В.О.	425	4
<input type="checkbox"/>	<b>ДЕГРАДАЦИЯ ЭДТА ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ НА БИОФИЛЬТРЕ КЛЕТКАМИ CHELATIVORANS OLIGOTROPHICUS</b> Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Ежов В.А., Троценко Ю.А.	437	1
<input type="checkbox"/>	<b>ВНЕКЛЕТОЧНАЯ <math>\beta</math>-D-ГЛЮКОЗИДАЗА МОРСКОГО ГРИБА PENICILLIUM CANESCENS</b> Дубровская Ю.В., Сова В.В., Слинкина Н.Н., Анастюк С.Д., Пивкин М.В., Звягинцева Т.Н.	442	0
<input type="checkbox"/>	<b>FUSANT TRICHODERMA HF9 WITH ENHANCED EXTRACELLULAR CHITINASE AND PROTEIN CONTENT</b> Balasubramanian N., Thamil Priya V., Gomathinayagam S., Lalithakumari D.	450	0
<input type="checkbox"/>	<b>ОЧИСТКА ХИМЕРНОГО БЕЛКА АЛЬБУРОНА16 ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ ДРОЖЖЕЙ PICHIA PASTORIS</b> Карабельский А.В., Падкина М.В.	457	2
<input type="checkbox"/>	<b>РЕЦЕНЗИЯ НА МОНОГРАФИЮ Ю.А. ТРОЦЕНКО, М.Л. ТОРГОНСКОЙ "МЕТИЛОТРОФНЫЕ ДРОЖЖИ", МОСКВА: "ТР-ПРИНТ", 2011. 313 С</b>	463	0

УДК 579.6

## СОПРЯЖЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ ВОДОРОДА (ОБЗОР)

© 2012 г. Д. Н. Текучева, А. А. Цыганков

Институт фундаментальных проблем биологии РАН

e-mail: tekuchevadn@rambler.ru; ttt-00@mail.ru

Поступил в редакцию 29.06.2011 г.

Описаны возможные пути совмещения различных биологических процессов получения биоводорода. Некоторые из них интенсивно исследуются в настоящее время, другие — теоретически возможны, но пока не изучены. Особое внимание уделено факторам, влияющим на эффективность сопряженных систем.

### БИОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ВОДОРОДА И ПУТИ ИХ ИНТЕГРАЦИИ

Способность микроорганизмов синтезировать водород интересна не только как метаболический феномен, но и потому, что водород является перспективным энергоносителем. Он характеризуется высокой теплотой сгорания, а при сжигании водорода образуется в основном вода. Кроме того, водород может непосредственно использоваться в топливных элементах. Поэтому разработка методов экологически чистого синтеза водорода может обеспечить человечество дешевым и экологически безопасным энергоносителем.

Молекулярный водород присутствует в метаболических путях многих микроорганизмов. Часто один микроорганизм способен выделять или поглощать  $H_2$  с участием нескольких метаболических путей. Для каждого биологического процесса выделения водорода характерны свои первичные источники энергии и ключевые ферменты.

Темновые гетеротрофные процессы обладают большими скоростями образования  $H_2$  [1], не требуют больших площадей для размещения реакторов в сравнении со светозависимыми процессами. В ходе светозависимых процессов, в свою очередь, субстраты преобразуются в водород с большей эффективностью.

В процессах выделения водорода, не требующих присутствия света (темновые), используется энергия органических субстратов [2]. Наиболее широко изучается темновое брожение с выделением водорода за счет фермента гидрогеназы (1А, табл. 1). При этом наибольшая объемная скорость выделения водорода была получена с использованием гранулированной биомассы и достигала 15 л/л реактора в 1 ч при росте на глюкозе [3]. Это значение уже близко к расчетным практически значимым величинам [4, 5]. Эффективность процесса низка (теоретически из 1 моля гексозы можно получить 12 молей  $H_2$ , тогда как при брожении мак-

симальное теоретическое значение выхода  $H_2$  — 4 моля).

Смешанное брожение с выделением водорода за счет формиатгидрогеназной системы осуществляют бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (1Б, табл. 1). Эти бактерии — факультативные анаэробы, поэтому при наличии кислорода культуры остаются жизнеспособными, что важно при практическом применении. Однако максимально возможный выход водорода составляет всего 2 моль/моль гексозы [23]. Важным преимуществом получения водорода двумя вышеописанными методами является возможность использования широкого круга органических отходов.

Нитрогеназа — ключевой фермент фиксации азота, побочной реакцией которого является выделение водорода. Вполне вероятно, что представители рода *Clostridia* при недостатке азота в анаэробных условиях имели бы достаточно высокие скорости выделения водорода за счет действия нитрогеназы (2, табл. 1). Однако этот процесс обычно сопутствует брожению с выделением водорода, и их трудно разделить.

Некоторые пурпурные бактерии способны использовать  $CO$  в качестве единственного источника углерода при росте в темноте без доступа кислорода [24]. При этом окисление угарного газа идет с одновременным восстановлением протонов до водорода, катализируемым гидрогеназой (3, табл. 1) [7]. Такой процесс, вероятно, имеет практическое применение для очистки от  $CO$  газа, полученного конверсией природного газа и называемого синтезгазом. Очищенный от каталитического яда водород может подаваться в топливные элементы. Однако существуют только единичные опубликованные работы на эту тему.

Весьма привлекательным является недавно показанный, но в настоящий момент малоизученный, процесс преобразования органики с приложением внешнего электрического тока в

**Таблица 1.** Преимущества и недостатки различных метаболических путей получения водорода в связи с их практическим применением

Метаболический путь и ключевой фермент синтеза водорода	Преимущества	Недостатки	Микроорганизмы, ссылка
Темновые процессы получения водорода			
1 А. Брожение; гидрогеназа.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Широкий спектр используемых субстратов.</li> <li>• Возможность применения органических отходов.</li> <li>• Возможность использования микробных сообществ вместо чистых культур.</li> <li>• Высокие скорости выделения водорода.</li> <li>• Хорошая изученность процесса.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Относительно низкий теоретически возможный выход водорода (4 моль/моль гексозы).</li> <li>• Присутствие органических продуктов брожения (кислоты, спирты) делает очистку отходов неполной.</li> <li>• Высокое парциальное давление водорода ингибирует процесс.</li> <li>• Необходимость предотвращения метаногенеза.</li> <li>• Наличие водородпоглощающих организмов в сообществе приводит к снижению эффективности процесса.</li> </ul>	Многие гетеротрофные анаэробы (роды клостридии, энтеробактерии, термофильные археи, некоторые пурпурные бактерии)[2].
Б. Брожение с образованием формиата и его дальнейшим разложением: $\text{НСООН} \rightarrow \text{H}_2 + \text{CO}_2$ . Формиатгидрогеназный комплекс	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Факультативные анаэробы.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Низкий теоретический и практический выходы водорода (2 моль <math>\text{H}_2</math>/моль гексозы).</li> </ul>	Enterobacteriaceae [6]
2 Брожение или дыхание совместно с фиксацией азота; нитрогеназа	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Все органические субстраты могут аэробно или анаэробно разлагаться в условиях фиксации азота.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Те же, что в процессе 1.</li> </ul>	Все хемотрофные бактерии, способные к азотфиксации.
3 Анаэробное окисление СО как источника углерода; СО-толерантная гидрогеназа совместно с СО-дегидрогеназой.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Субстратом является токсичный газ — компонент синтезгаза.</li> <li>• Возможная очистка водорода от СО перед подачей в топливные элементы.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Высокая чувствительность к кислороду.</li> <li>• Присутствие органических субстратов и водорода ингибируют процесс.</li> </ul>	Бактерии разных систематических групп (некоторые грамотрицательные ( <i>Rhodospirillum rubrum</i> , <i>Rubrivax gelatinosus</i> ) [7] и грамположительные ( <i>Carboxydotherrmus hydrogeniformans</i> ) бактерии, археи ( <i>Methanosarcina barkeri</i> ) [8].
4 Микробные топливные элементы (см. описание в тексте, рис. 3).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Единственный способ получения водорода из органических соединений с приложением электрической энергии.</li> <li>• Возможно применение для очистки сточных вод с низким содержанием органики.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Необходимо использовать катализатор на аноде для получения <math>\text{H}_2</math>.</li> <li>• Наличие водородпоглощающих организмов в анодном пространстве приводит к снижению эффективности процесса.</li> </ul>	Показано при использовании анаэробных гетеротрофных сообществ [9] или <i>Geobacter sulfurreducens</i> [9], <i>Shewanella oneidensis</i> [10] живущих в МТЭ.

Таблица 1. Окончание

	Метаболический путь и ключевой фермент синтеза водорода	Преимущества	Недостатки	Микроорганизмы, ссылка
Светозависимые процессы получения водорода				
5	Аноксигенный фотосинтез в условиях лимитирования азотом; нитрогеназа.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Высокие скорости выделения водорода (особенно у пурпурных несерных бактерий).</li> <li>• В процессе может использоваться свет ближней инфракрасной области.</li> <li>• Низкая чувствительность к парциальному давлению <math>H_2</math>.</li> <li>• Высокий теоретически возможный выход водорода (12 моль <math>H_2</math>/моль гексозы).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Чувствительность к присутствию связанного азота (инактивация и репрессия синтеза нитрогеназы).</li> <li>• Чувствительность нитрогеназы к кислороду.</li> <li>• Узкий спектр используемых субстратов, (не способны использовать органические полимеры).</li> <li>• Низкая эффективность (потребность в электронах и АТФ).</li> </ul>	Азотфиксирующие аноксигенные фотосинтетики [11] (серные и несерные пурпурные бактерии, зеленые бактерии).
6	Аноксигенный фотосинтез в перевосстановленных условиях; обратимая гидрогеназа.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Относительно высокая эффективность процесса (нет потребности в АТФ).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Процесс возможен только кратковременно при перевосстановленности электрон-транспортной цепи (на данном уровне исследований).</li> <li>• Высокое парциальное давление водорода ингибирует процесс.</li> </ul>	Аноксигенные фотосинтетики [12, 13] или цианобактерии [14] в анаэробных условиях, обладающие обратимой гидрогеназой ( <i>hox YH</i> ).
7	Оксигенный фотосинтез; нитрогеназа.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Преобразует энергию света в водород в стехиометрии, близкой к реакции разложения воды: <math>2H_2O \leftrightarrow 2H_2 + O_2</math>.</li> <li>• Низкая чувствительность к парциальному давлению <math>H_2</math>.</li> <li>• Естественное временное или пространственное разобщение синтеза <math>O_2</math> и <math>H_2</math>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Низкие скорости выделения водорода.</li> <li>• Низкая эффективность (потребность в электронах и АТФ).</li> </ul>	Азотфиксирующие цианобактерии: синхронные культуры одноклеточных цианобактерий (временное разделение) [15, 16], гетероцистные цианобактерии (пространственное разделение) [17].
8	Оксигенный фотосинтез; гидрогеназа	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Преобразование энергии света в водород в стехиометрии, близкой к реакции разложения воды: <math>2H_2O \rightarrow 2H_2 + O_2</math>.</li> <li>• Высокая эффективность процесса.</li> <li>• Высокие скорости выделения водорода.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Процесс возможен только кратковременно в начале освещения культуры после анаэробного роста (инкубации) в темноте.</li> </ul>	Микроводоросли, содержащие гидрогеназу [18].
9	Временное разделение кислородного фотосинтеза и светозависимого выделения водорода в условиях недостатка серы; гидрогеназа.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Преобразование энергии света в водород.</li> <li>• Длительный, стабильный процесс.</li> <li>• Возможность одну культуру повторно вводить в цикл "оксигенный фотосинтез с запасанием крахмала — светозависимое выделение водорода".</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Низкие скорости выделения водорода.</li> <li>• Высокая чувствительность к кислороду.</li> <li>• Присутствие органических продуктов реакции — органические кислоты (в основном ацетат), этанол →.</li> <li>• До сих пор не ясна эффективность процесса.</li> </ul>	Микроводоросли, содержащие гидрогеназу [19].
10	Временное разделение кислородного фотосинтеза с накоплением запасных полисахаридов и последующее их сбраживание с выделением $H_2$ ; гидрогеназа.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Преобразование энергии света в водород.</li> <li>• Возможно повторение цикла "оксигенный фотосинтез — брожение".</li> <li>• Длительный, стабильный процесс.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Низкие скорости выделения водорода.</li> <li>• Инактивация кислородом.</li> <li>• Присутствие органических продуктов реакции — органические кислоты (в основном ацетат), этанол.</li> </ul>	Цианобактерии с обратимой гидрогеназой ( <i>hoxYH</i> ) [20, 21] и морские микроводоросли [22].

водород в микробных топливных элементах (МТЭ) [25] (4, табл. 1). В качестве микробных агентов применяются как чистые культуры (*Geobacter*, *Shewanella*), так и микробные сообщества. Наличие водородпоглощающих микроорганизмов, в частности метанобразующих бактерий, в анодном пространстве снижало эффективность системы [9].

Среди светозависимых процессов получения водорода с наибольшими скоростями протекает фотоферментация, осуществляемая пурпурными несерными бактериями посредством нитрогеназы в условиях лимитирования азотом (5, табл. 1). Термин “фотоферментация” требует некоторого пояснения. В последние годы в зарубежной литературе этот термин (photofermentation) появился при описании светозависимого выделения водорода пурпурными бактериями при недостатке азота за счет действия нитрогеназы. Несмотря на то, что этот процесс не имеет ничего общего с брожением, возможность использования одного термина кажется привлекательной, и мы будем его использовать для обозначения указанного процесса. Для пурпурных и зеленых серных бактерий характерны менее высокие скорости выделения водорода. Недостатком такого метаболического пути является использование узкого спектра органических доноров электронов [11].

Выделение водорода в условиях избытка восстановителя на свету за счет действия обратимой гидрогеназы — процесс, описанный несколько лет назад для цианобактерии *Synechocystis* sp. [14] и пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS [12, 13] (6, табл. 1). Несмотря на то, что скорости выделения водорода и другие практически значимые параметры до сих пор не изучены, путь, в котором сложный и АТФ-затратный фермент нитрогеназа заменен гидрогеназой, может оказаться в центре исследовательского внимания.

Цианобактерии, образующие гетероцисты, способны к выделению водорода посредством нитрогеназы при окисненном фотосинтезе (7, табл. 1). Одновременное проведение строго анаэробного процесса (функционирование нитрогеназы) и фотосинтеза с выделением кислорода в данных бактериях оказалось возможным благодаря их пространственному разделению. Окислительный фотосинтез проходит в вегетативных клетках, а нитрогеназа локализована в гетероцистах. Стехиометрическое соотношение образуемых  $H_2$  и  $O_2$  в определенных условиях близко к реакции биофотоллиза воды [26].

Одноклеточные цианобактерии также способны к азотфиксации (и следовательно, к ее побочной реакции — образованию водорода) за счет аэробного фотосинтеза (7, табл. 1). Однако анаэробноз, необходимый для нитрогеназы, достигается за счет временного разобщения фотосинтеза и азотфиксации посредством циклического осве-

щения в синхронных культурах [26]. Многие физиологические характеристики, следовательно, и перспективы применения данного биологического процесса пока не ясны, но синхронные культуры *Synechococcus* при определенных условиях показывают высокие скорости выделения водорода [15, 16].

Микроводоросли, адаптированные к темноте, способны выделять водород в ответ на освещение [27] (9, табл. 1). Такой биофотоллиз воды возможен только кратковременно, пока накапливающийся кислород не инактивирует гидрогеназу, что приводит к прекращению выделения водорода. Этот процесс имеет высокую эффективность преобразования солнечной энергии [28].

Устойчивое выделение водорода *Chlamydomonas reinhardtii* было зарегистрировано в культуре, использующей ацетат, при недостатке серы. Сначала это явление было показано для фотогетеротрофных [29], позднее и для фотоавтотрофных культур [30].

Цианобактерии и микроводоросли способны синтезировать АТФ в ходе брожения из накопленных при фотосинтезе углеводов. В процессе брожения при определенных условиях микроводоросли, наряду с ацетатом и другими минорными продуктами, образуют водород [20–22]. Таким образом, в одной клетке совмещаются процессы накопления полисахаридов за счет энергии света и их сбраживания с выделением  $H_2$  (10, табл. 1).

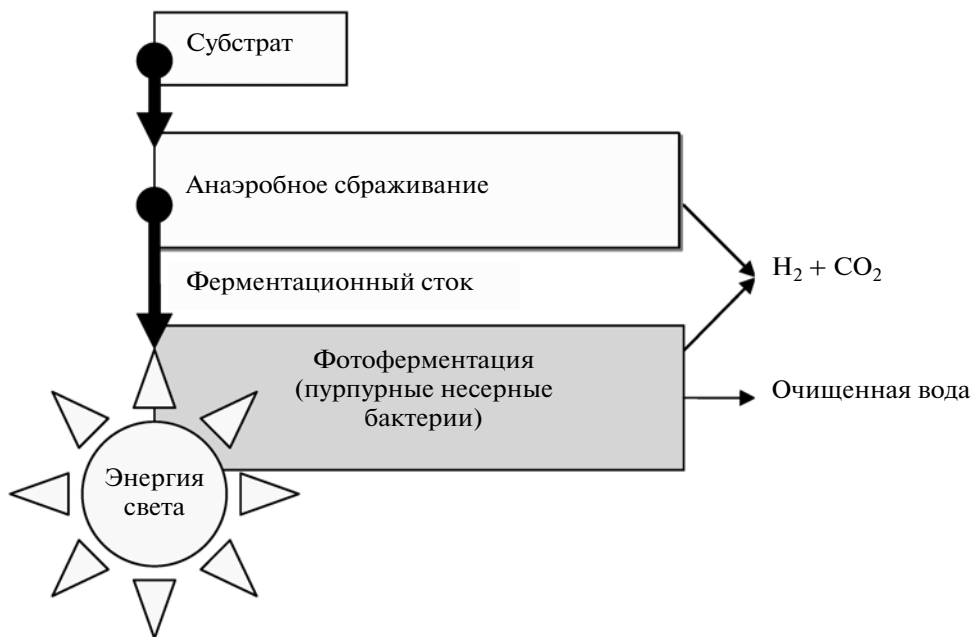
Краткий обзор известных биологических способов получения водорода показывает, что в каждом процессе наряду с практически значимыми преимуществами есть и недостатки. Однако, интегрируя описанные процессы в одну систему, можно преодолеть некоторые из них. В данном обзоре дается рассмотрение и оценка существующих схем интеграции биологических процессов получения водорода для их возможного применения в практике.

Совмещение двух биологических процессов подразумевает, что побочные продукты одной стадии будут субстратами для организмов, осуществляющих вторую, при этом повышается эффективность использования источника энергии (органические соединения или свет).

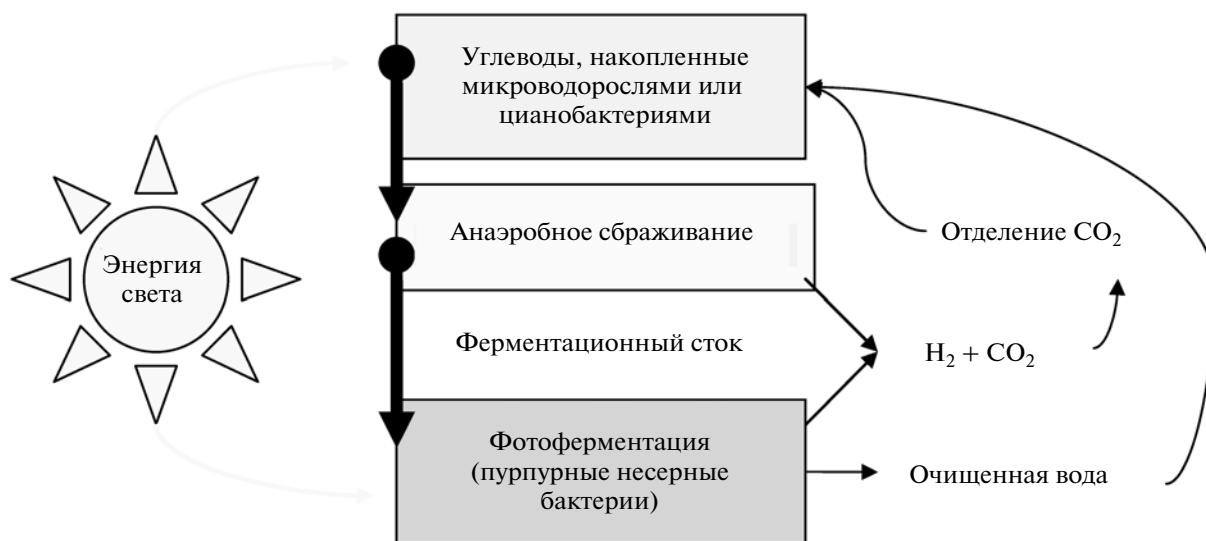
Возможные пути интеграции для получения водорода (и электрического тока).

1. Совмещение получения водорода за счет брожения с образованием органических кислот (1, табл. 1) и их дальнейшее преобразование в водород аноксигенными фотосинтетиками на свету в условиях недостатка азота (5, табл. 1) (рис. 1).

2. Субстратом для двухстадийной системы с участием анаэробных гетеротрофных бактерий (1, табл. 1) и аноксигенных фотосинтетиков (5, табл. 1, рис. 2) может быть биомасса микроводорослей вместо органических отходов. Таким образом, добавляется дополнительный этап в схему



**Рис. 1.** Схема получения водорода в интегрированной системе за счет сбраживания органики и фотоферментации (схема интеграции № 1).



**Рис. 2.** Схема совмещения накопления биомассы микроводорослями и ее двухстадийного разложения по схеме № 1 (схема интеграции № 2).

совмещения, изображенную на рис. 1, при этом система становится замкнутой по углероду.

3. Совмещение сбраживания органических субстратов (1, табл. 1) с получением водорода и ацетата анаэробными гетеротрофными бактериями и МТЭ (4, табл. 1), которые дают возможность

получать водород из простой органики (такой, как ацетат) с применением электрического тока (рис. 3).

4. Объединение временно разобщенного оксигенного фотосинтеза и темнового сбраживания накопленного крахмала с выделением водорода в

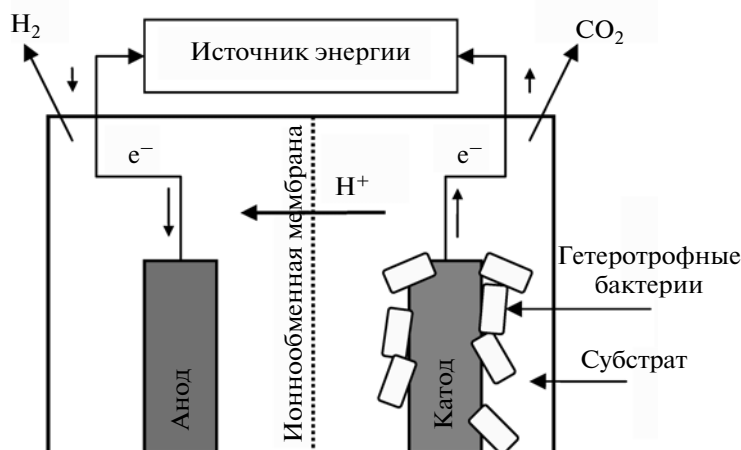


Рис. 3. Микробный топливный элемент (МТЭ).

одном организме (10, табл. 1) и фотогетеротрофное выделение водорода из образовавшихся органических кислот (5, табл. 1). Такой путь интеграции можно модифицировать, применив на первой стадии метод лимитирования микроводорослей серой (9, табл. 1).

5. Совмещение окислительного фотосинтеза (7–10, табл. 1) и фотогетеротрофного выделения водорода при лимитировании по азоту (5, табл. 1). В основе такой схемы лежит использование разности в спектрах поглощения микроводорослей и пурпурных бактерий. При совмещении процессов в одном пространстве повышается эффективность поглощения света и сокращается место для размещения реакторов.

### СОВМЕЩЕНИЕ БРОЖЕНИЯ И ФОТОФЕРМЕНТАЦИИ

Интеграция двух процессов с наибольшими скоростями выделения водорода дает возможность преодолеть сразу два недостатка — удалить побочные продукты темного брожения (органические кислоты) и использовать их как донор электронов для фотогетеротрофного выделения водорода (то есть решить вопрос о доноре электронов для второй стадии). Основным преимуществом такой схемы является повышение теоретически возможного выхода водорода до 12 моль на 1 моль глюкозы. Более того, становится возможным использование органических сточных вод и твердых отходов в качестве субстратов. В настоящий момент эта схема наиболее очевидная и широко изучаемая [31, 32].

Для успешного объединения этих процессов необходимо решить ряд задач: подобрать подходящие отходы (органосодержащие сточные воды или твердые отходы), организмы для обеих стадий, способ объединения стадий и соотношение

объемов темного и светового реакторов для наиболее эффективного преобразования поступающих субстратов.

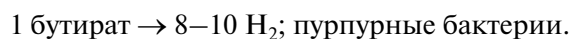
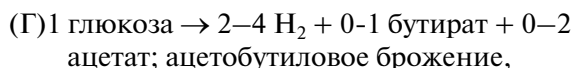
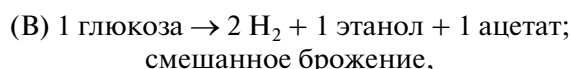
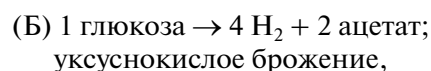
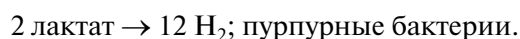
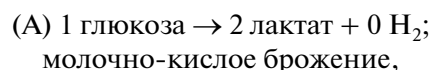
Предпосылки, на основе которых может быть сделан выбор субстрата для двухстадийной системы.

1. Органические субстраты, входящие в состав отходов, должны перерабатываться в темновой стадии с образованием продуктов, которые легко используются пурпурными бактериями.

2. Нитрогеназная активность пурпурных бактерий не должна снижаться из-за избыточной концентрации азотистых соединений, содержащихся в стоке темного биореактора первой стадии.

3. Наличие и концентрация минеральных компонентов отходов не должны лимитировать или ингибировать совмещаемые процессы.

Подбирая бактерии для двухстадийного процесса, необходимо учитывать, что, теоретически, 4 различных комбинации бактериальных метаболических путей могут давать выход 12 моль водорода при использовании 1 моль глюкозы [31]:



Однако при использовании бактериальных сообществ возникает “конкуренция” между метаболическими путями Б, В и Г. Показано, что значения рН влияют на спектр получаемых продуктов брожения и состав микробных сообществ. Так, поддержание рН ниже 6.0 приводит к доминированию ацетата и бутирата, а нейтральные значения — пропионата и органических спиртов [33]. Более того, в реальных процессах одновременно реализуется несколько типов ферментации.

Таким образом, выход водорода всей системы и состав продуктов темновой стадии зависят от способа преобразования органики в этой стадии. Более того, соотношение объемов реакторов должно подбираться, исходя из стехиометрических соотношений в уравнениях, описывающих совмещаемые процессы.

**Субстраты для первой стадии.** К модельным субстратам, используемым в лабораторной практике для изучения комбинированных систем, относятся глюкоза, сахароза, крахмал, гидролизат целлюлозы. Проводятся также и исследования с реальными органическими отходами (табл. 2, 3).

Классификация различных видов сельскохозяйственных отходов и выходы водорода, полученные при их сбраживании, описаны ранее [33]. Так, максимальные выходы наблюдались при использовании подсырной сыворотки, свиного навоза, пищевых отходов, кукурузных стеблей в качестве субстратов.

Практически все субстраты могут потребляться микроорганизмами с одновременным выделением водорода на обеих стадиях. Однако, если среда содержит избыточное количество азота, выделение водорода на второй стадии не происходит [38, 64]. Использование высоких концентраций органического сырья в первой стадии дает ингибирующие для пурпурных бактерий концентрации органических кислот во второй стадии. Для решения этих проблем многие исследователи используют различные водные разведения стока темнового реактора [53].

В некоторых случаях, эффективность фотогетеротрофного выделения водорода была низкой при разведении стока первой стадии. Обнаружено, что вследствие разведения уменьшаются концентрации не только органических кислот, но и других элементов среды — сульфатов, железа, магния [59]. Добавление фосфатов в среду, предназначенную для второй стадии, увеличивало выход водорода благодаря стабилизации рН [59]. Если в качестве субстрата для сбраживания в первой стадии использовались углеводы, вполне вероятно, что в сливе темнового реактора будет недостаточно азота для нормального роста пурпурных бактерий. Так, показано, что при использовании продукта ферментации сахарозы дополнение среды глутаматом и дрожжевым экстрактом

приводило к повышению выхода водорода с 3.07 до 5.13 моль/моль глюкозы [47].

Эффективность преобразования органических субстратов в водород в ходе двухстадийного процесса, по результатам разных исследований, колеблется от 3.1 до 7.1 моль  $H_2$ /моль глюкозы (табл. 2–3). Однако из-за того, что на эффективность выделения водорода влияют и другие параметры интегрированных систем, сделать вывод о том, какой субстрат является наиболее подходящим, не представляется возможным.

**Микроорганизмы, применяемые в темновой стадии.** В двухстадийных системах на первом этапе используются чистые культуры, их искусственные смеси или природные сообщества. Среди чистых культур наиболее широко применяются различные штаммы семейств Clostridiaceae или Enterobacteriaceae, молочнокислые бактерии, бактерии рода *Cellulomonas*, *Klebsiella* и термофильные бактерии *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* и *Thermotoga neapolitana* (табл. 2). Чистые культуры и искусственные среды удобны для лабораторных исследований, например для определения продуктов ферментации, расчета скоростей выделения водорода, определения эффективности преобразования субстратов. Для практических целей чистые культуры неперспективны из-за больших энергетических затрат на стерилизацию подаваемых сред, а также из-за того, что сообщества, в отличие от чистых культур, способны перерабатывать более широкий спектр органических веществ и относительно устойчивы [69]. Однако в естественных бактериальных сообществах присутствуют сульфатредуцирующие, гомоацетатные и метаногенные бактерии, которые, потребляя  $H_2$ , снижают эффективность всего процесса.

Для подавления нежелательных микробиологических процессов естественные сообщества обрабатывают различными химическими или физическими способами (прогревание, аэрация, обработка химическими ингибиторами метаногенеза) (табл. 3) [70, 71]. Поддержание низких значений рН также эффективно для подавления метаногенеза [72]. Применяют и создание искусственных комбинаций из уже существующих бактериальных сообществ [73, 74]. Показано, что такие искусственные бактериальные сообщества применимы в различных биотехнологических целях [75, 76]. Трудно предсказать устойчивость таких сообществ, хотя при использовании искусственно созданной смеси термофильных культур был получен высокий выход водорода — 3.7 моль/моль глюкозы [74].

В табл. 2 и 3 приведены выходы водорода (моль/моль глюкозы), полученные в темновых стадиях интегрированных процессов. Они составляли от 1.3 до 3.3 моль водорода в расчете на 1 моль гексозы, причем последняя величина была получена только в одном случае [45]. В других ис-



Таблица 2. Интегрированные системы получения водорода с применением чистых культур в первой стадии

Субстрат для темновой стадии	Источник азота*	Возбудитель первой стадии	Выход водорода в первой стадии (моль/моль глюкозы)	Доминирующие продукты первой стадии	Возбудитель второй стадии	Общий выход водорода (моль/моль глюкозы)	Ссылка
Глюкоза	—	<i>Clostridium butyricum</i>	—	—	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV	7.0	[34]
Глюкоза	Пептон, ДЭ	<i>C. butyricum</i> NCIB 9576	1.3	Ацетат, бутират	<i>R. sphaeroides</i> E15-1	1.6	[35]
Глюкоза	Солодовый экстракт, ДЭ	<i>Entherobacter cloacae</i> DM 11	1.9	Ацетат	<i>R. sphaeroides</i> O.U.001	5.3	[36]
Глюкоза	Глютамаг натрия	<i>Lactobacillus debrueckii</i>	—	—	<i>R. sphaeroides</i> RV	7.1	[37]
Глюкоза	Питательный раствор Охoid (триптон, ДЭ)	<i>Escherichia coli</i> HD701	2.4	Ацетат, лактат, этанол	<i>R. sphaeroides</i> O.U. 001	2.4	[38]
Глюкоза	Пептон, мясной экстракт, цистеин	<i>Ethanoligenens harbinense</i> B49	1.8	Ацетат, этанол	<i>Rhodospseudomonas faecalis</i> RLD-53	6.3	[39]
Глюкоза	Глютамаг натрия, мясной экстракт, цистеин	<i>C. butyricum</i>	—	Ацетат, бутират	<i>R. faecalis</i> RLD-53	4.1	[40]
Глюкоза	Цистеин	<i>C. butyricum</i>	1.7	Ацетат, бутират	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	5.5	[41]
Глюкоза	ДЭ, триптон, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	3.1	Ацетат	<i>R. sphaeroides</i> , NCIMB 8253	5.6	[42]
Глюкоза	Мясной экстракт, цистеин	<i>C. butyricum</i>	1.6	Ацетат, бутират	<i>R. faecalis</i> RLD-53	5.4	[43]
Глюкоза	Глютамаг натрия, ДЭ, цистеин	<i>E. harbinens</i> B49	—	—	<i>R. faecalis</i> RLD-53	3.1	[44]
Сахароза	ДЭ	<i>E. cloacae</i> DM11	3.3	Ацетат	<i>R. sphaeroides</i> O.U. 001	6.7	[45]
Сахароза	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<i>C. pasteurianum</i> CH <sub>4</sub>	1.9	Ацетат, бутират	<i>R. palustris</i> WP3-5	7.1	[46]
Сахароза	ГК, ДЭ	<i>C. pasteurianum</i> CH <sub>4</sub>	1.9	Ацетат, бутират	<i>R. palustris</i> WP3-5	5.1	[47]
Целлюлоза	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<i>Cellulomonas</i> sp.	—	Ацетат, лактат, формиаг	<i>R. capsulatus</i> B100	4.3	[48]
Крахмал	ДЭ, ГК	<i>C. butyricum</i>	1.9	Ацетат, лактат, бутират	<i>Rhodobacter</i> sp. M-19	6.4	[6]

Таблица 2. Окончание

Субстрат для темновой стадии	Источник азота	Возбудитель первой стадии	Выход водорода в первой стадии (моль/моль глюкозы)	Доминирующие продукты первой стадии	Возбудитель второй стадии	Общий выход водорода (моль/моль глюкозы)	Ссылка
Проваренный крахмал ферментированный <i>Caldimonas taiwanensis</i> On1	$\text{NH}_4^+$	<i>C. butyricum</i> CGS2	1.4	Ацетат, бутират	<i>R. palustris</i> WP3-5	3.1	[49]
Отходы от переработки батата	Полипептон	<i>C. butyricum</i> и <i>Entherobacter aerogenes</i>	2.4	Ацетат, лактат, бутират	<i>Rhodobacter</i> sp.	7.0	[50]
Активный ил из муниципальных очистных сооружений	—	<i>Clostridium beijerinckii</i>	0	—	<i>R. sphaeroides</i> RV	Темновая: 0 $\text{H}_2$ + 850 мг/л органических кислот; Световая: 160.5 мл $\text{H}_2$ /г органических кислот	[51]
Отходы от перегонки спирта	ДЭ	<i>Citrobacter freundii</i> 01 и <i>E. aerogenes</i> E10	—	Этанол, ацетат, бутират	<i>R. palustris</i> P2 Культивирование проводилось в темноте!!	2.8	[52]
Гидролизат мискантуса	—	<i>Thermotoga neopolitana</i>	—	Ацетат, лактат	<i>R. capsulatus</i>	—	[53]
Свекольная патока	Цистеин, ДЭ, $\text{NH}_4^+$	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	2.1	Лактат, ацетат	<i>R. capsulatus</i> YO3 — hup <sup>-</sup> mutant	6.9	[44]
Сахароза	—	<i>E. coli</i> EGY и <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	2.4	—	<i>R. capsulatus</i> DSM 1710	3.5	[54]
Испорченные финики	—	—	2.6	—	—	3.9	
Картофельная кожура, обработанная $\alpha$ -амилазой	—	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	2.4	—	<i>R. capsulatus</i> DSM 1710	3.9	[55]
Меласса	—	—	2.1	—	—	5.8	

\*ДЭ — дрожжевой экстракт, ГК — глутаминовая кислота.

Таблица 3. Интегрированные системы получения водорода с применением гетеротрофных сообществ в первой стадии

Субстрат	Источник азота*	Возбудитель первой стадии	Обработка консорциума	Выход H <sub>2</sub> первой стадии (моль/моль глюкозы)	Доминирующие продукты первой стадии	Возбудитель второй стадии	Общий выход H <sub>2</sub> (моль/моль глюкозы)	Ссылка
Сахароза	ДЭ	Термически обработанный навоз	112°C, 5 ч	1.8	Ацетат, бутират	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> SH2C	3.3	[56]
Гидролизванный ферментативно крахмал маниоки	пептон, цистеин	Анаэробное сообщество с завода по производству метана	Кипячение 30 мин	1.8 (240 мл/г крахмала)	Ацетат, бутират	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	2.9	[57]
Проваренный пшеничный порошок	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Сообщество из ацидогенного реактора завода по очистке стоков	Концентрирование, обработка 10 ч при 90–100°C	–	–	<i>R. sphaeroides</i> NRRL B-1727	1.2	[58]
Гомогенат картофеля	Пептон	Сообщество из силосной ямы	Кипячение 10 мин, добавление Zn	1.6	Ацетат, бутират	<i>R. capsulatus</i> B10	5.6	[59, 60]
Проваренная молотая пшеница	Цистеин, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Сообщество из ацидогенного реактора завода по очистке стоков	Концентрирование, кипячение 1 час при pH 5.9	1.5	–	<i>R. sphaeroides</i> RV	4.6	[61]
Проваренная молотая пшеница	Цистеин, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Сообщество	Концентрирование, кипячение 1 час при pH 5.9	–	–	<i>R. sphaeroides</i> RV	1.5	[62]
Проваренная молотая пшеница	–	Сообщество из ацидогенного реактора завода по очистке стоков	Концентрирование, кипячение 1 час при pH 5.9	–	–	<i>R. sphaeroides</i> NRRL B-1727	0.4	[63]

\*ДЭ – дрожжевой экстракт, ГК – глутаминовая кислота.

Таблица 4. Двухстадийные системы с совместным культивированием организмов

№	Субстрат	Гетеротрофная бактерия	Пурпурная несерная бактерия	Иммобилизация	Общий выход водорода (моль/моль гексозы)	Ссылка
1	Целлюлоза	<i>Cellulomonas</i> sp.	<i>Rhodobacter capsulatus</i> B100	–	4.3	[65]
2	Глюкоза	<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV	+	7.0	[34]
3	Крахмал	<i>C. butyricum</i>	<i>Rhodobacter</i> sp.	–	6.4	[50]
4	Глюкоза	<i>C. butyricum</i>	<i>R. sphaeroides</i>	+	–	[66]
5	Глюкоза	<i>Lactobacillus debrueckii</i>	<i>R. sphaeroides</i> RV	+	7.1	[37]
6	Отходы от перегонки спирта	<i>Citrobacter freundii</i> 01 и <i>Enterobacter aerogenes</i> E10	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> P2 Культивирование проводилось в темноте!!!	–	2.8	[52]
7	Глюкоза	<i>C. butyricum</i>	<i>Rhodopseudomonas faecalis</i> RLD-53	+	4.1	[40]
8	Проваренная измельченная пшеница	Сообщество	<i>Rhodobacter</i> sp.	–	1.2	[58]
9	Проваренный, отфильтрованный пшеничный порошок	Сообщество	<i>R. sphaeroides</i> RV	–	1.1	[62]
10	Глюкоза	<i>Ethanoligenes harbinense</i> B49	<i>R. faecalis</i> RLD-53	+	3.1	[67]
11	Проваренный пшеничный порошок	Сообщество	<i>R. sphaeroides</i> RS-NRRL	–	0.4	[63]

следованиях показаны значительно меньшие значения.

**Микроорганизмы, применяемые в фотосинтетической стадии.** Пурпурные серные и несерные бактерии и зеленые серные бактерии – теоретически возможные кандидаты для применения во второй стадии совмещенных биосистем. Пурпурные несерные бактерии используют широкий спектр органических субстратов и способны быстро расти за счет дыхания, а в анаэробных условиях проявляют очень высокую нитрогеназную активность и, соответственно, скорость выделения водорода [77]. Напротив, пурпурные и зеленые серные бактерии более чувствительны к кислороду, обладают меньшей скоростью роста и нитрогеназной активностью. Поэтому большинство исследователей используют в совмещенных системах пурпурные несерные бактерии: *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobium marinum* и некоторые новые неидентифицированные штаммы (табл. 2–6). Продолжаются работы по выделению штаммов приспособленных для использования в двухстадийных системах [64, 78]. Использование смешанных культур пурпурных несерных бактерий увеличивало скорость образования водорода, эффективность преобразования субстратов и общий выход водорода [79]. Несмотря на то что устойчивость чистых культур пурпурных бактерий и их смесей в нестерильных условиях – предмет будущих исследований, показана принципиальная возможность выделения водорода в нестерильных условиях фотогетеротрофными пурпурными бактериями [80].

Отдельным направлением улучшения выделения водорода пурпурными несерными бактериями является их генетическая модификация. Так, например, проводилось уменьшение коровой и периферической антенны для снижения эффекта самозатенения культуры и увеличения эффективности поглощения света [81], удаление большой субъединицы водородпоглощающей гидрогеназы (*hupL* ген) [82] или обеих субъединиц (*hupSL*) [83, 84], а также удаление *hupSL* одновременно с геном синтеза полигидроксиалканатов (ПГА) [40] у *Rhodobacter sphaeroides*, клонирование кластридальной (*hydA*) или сверхэкспрессия гидрогеназы (*hydC*), содержащей только железо в активном центре, в *Rhodospirillum rubrum* [85]. Все перечисленные генетические модификации бактерий приводили к некоторому увеличению выделения водорода.

**Соотношение объемов темного и светового реакторов.** Оптимальное соотношение объемов реакторов зависит от конечной цели. Если конечной целью является полная очистка органических отходов, то скорости выделения водорода будут понижены. Объемы реакторов должны рассчитываться на основе полного поглощения органических кислот, полученных при максимальном разложении отходов в первой стадии.

Если конечная цель – это получение водорода с максимальной скоростью, то при подборе объемов реакторов необходимо учитывать оптимальные концентрации субстратов для получения максимальных скоростей.

Таблица 5. Двухстадийные системы с последовательным культивированием организмов

№	Субстрат	Гетеротрофная бактерия	Обработка стока темного процесса	Пурпурная несерная бактерия	Максимальный суммарный выход водорода (моль на моль глюкозы)	Ссылка
1	Крахмал	<i>Clostridium butyricum</i>	Центрифугирование (ц/ф), автоклавирование (а/к)	<i>Rhodobacter</i> sp. M-19	3.6 (1.9 + 1.7)	[6]
2	Отходы от переработки багата	<i>C. butyricum</i> и <i>Enterobacter aerogenes</i>	Доведение рН до 7.5, добавление Мо и ЭДТА	<i>Rhodobacter</i> sp.	7.0 (2.4 + 4.6)	[50]
3	Глюкоза (пептон, дрожжевой экстракт)	<i>C. butyricum</i> NCIB 9576	–	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> E15-1	1.6	[35]
4	Глюкоза	<i>Enterobacter cloacae</i> DM 11	–	<i>R. sphaeroides</i> O. U.001	5.3 (1.9 + 3.4)	[36]
5	Глюкоза	<i>Escherichia coli</i> HD701	Разведение (1 : 2), ц/ф, ультра-фильтрация	<i>R. sphaeroides</i> O. U. 001	2.4 (2.4 + 0)	[38]
6	Сахароза	Сообщество	Разведение, ц/ф, доведение рН	<i>R. sphaeroides</i> SH2C	3.3 (1.8 + 1.5)	[56]
7	Сахароза	<i>E. cloacae</i> DM11	Разведение, ц/ф	<i>R. sphaeroides</i> O. U. 001	6.7 (3.3 + 3.4)	[45]
8	Сахароза	<i>C. pasteurianum</i> CH <sub>4</sub>	Разведение, ц/ф, доведение рН	<i>R. palustris</i> WP3-5	7.1 (1.9 + 5.2)	[46]
9	Проваренный крахмал гидролизованый <i>Calditonas taiwanensis On I</i>	<i>C. butyricum</i> CGS2	Разведение, ц/ф, а/к, доведение рН, добавление дрожжевого экстракта, Fe	<i>R. palustris</i> WP3-5	3.1 (1.4 + 1.7)	[49]
10	Глюкоза	<i>Ethanoligenens harbinense</i> B49	Разведение, ц/ф, а/к, доведение рН	<i>R. faecalis</i> RLD-53, иммобилизованная в агар.	6.3 (1.8 + 4.5)	[39]
11	Гидролизат мискантуса	<i>Thermotoga neapolitana</i>	Разведение, ц/ф, а/к, доведение рН, добавление буфера	<i>R. capsulatus</i>	–	[53]
12	Гидролизанный ферментативно ( $\alpha$ -амилаза и глюкоамилаза) крахмал маниоки	Анаэробное сообщество, выделенное на заводе по производству метана	Разведение, ц/ф, а/к, фильтрация, доведение рН до 7.0, добавление некоторых минеральных солей	<i>R. palustris</i>	2.9	[57]

Таблица 5. Окончание

№	Субстрат	Гетеротрофная бактерия	Обработка стока темнового процесса	Пурпурная несерная бактерия	Максимальный суммарный выход водорода (моль на моль глюкозы)	Ссылка
13	Гомогенат картофеля	Сообщество	Разведение, ц/ф, а/к, доведение рН до 6, 8, добавление Fe, Mg	<i>R. capsulatus</i> B10	5.6 (1.6 + 4.0)	[59, 60]
14	Глюкоза	<i>C. butylicum</i>	Разведение, ц/ф, фильтрование, добавление базовой среды для фотогетеротрофных организмов	<i>R. palustris</i>	5.5 (1.3 + 4.2)	[41]
15	Глюкоза	<i>C. saccharorebutylacetonicum</i> N1-4	а/к	<i>R. sphaerooides</i> , NCIMB 8253	5.6 (3.1 + 2.5)	[42]
16	Свекольная патока	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Разведение, ц/ф, а/к, добавление Fe и Mo	<i>R. capsulatus</i> YO3 – hup <sup>-</sup> мутант	6.9 (2.1 + 4.8)	[44]
17	Картофельная кожура, обработанная α-амилазой	<i>C. saccharolyticus</i>	Разведение, ц/ф, а/к, добавление буфера, Fe и Mo, витамины	<i>R. capsulatus</i> DSM1710	3.9 (2.4 + 1.5)	[55]
	Меласса					
18	Проваренная молотая пшеница.	Сообщество	Разведение, ц/ф, а/к, доведение рН до 10.0, добавление ЭДТА и Fe, аэрация (для удаления NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	<i>R. sphaerooides</i> RV	4.6 (1.5 + 3.0)	[61]
19	Проваренная молотая пшеница.	Сообщество	Разведение, ц/ф, доведение рН до 7.0, добавление Mo, Fe, Mg, ЭДТА, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<i>R. sphaerooides</i> NRRL B-1727	– (– + 0.9)	[68]
20	Глюкоза	<i>C. butylicum</i>	Разведение, ц/ф, а/к, доведение рН до 7.0	<i>R. faecalis</i> RLD-53	5.4 (1.6 + 3.8)	[43]
21	Сахароза	<i>C. pasteurianum</i> CH <sub>4</sub>	Разведение, ц/ф	<i>R. palustris</i> WP3-5	5.1 (1.9 + 3.2)	[47]

Таблица 6. Двухстадийные системы с автоматизированным объединением реакторов

Субстрат	Гетеротрофная бактерия	Пурпурная несерная бактерия	Конструктивные особенности совмещенного реактора	Суммарный выход водорода (моль/моль гексозы)	Ссылка
Активный ил из муниципальных очистных сооружений	<i>Clostridium beijerinckii</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> RV	Одновременно работающие фото- и темновой реакторы с промежуточным мембранным реактором	Темновая – 0 H <sub>2</sub> + 850 мг/л органических кислот, Световая – 160.5 мл H <sub>2</sub> /г органических кислот	[51]

Различные процессы на первой стадии (А–Г, см. выше), дают разную стехиометрию образования водорода и других продуктов. Поэтому для каждого из них требуются свои расчеты относительных объемов реакторов. Кроме того, необходимо учитывать и относительные скорости процессов в темновом и световом реакторах.

В литературе приводятся подобные данные. Так, темновому реактору объемом 80 л должен соответствовать фотореактор объемом 7684 л, то есть должна соблюдаться пропорция 1 : 96 [31]. Расчеты объемов реакторов с учетом продуктов сбраживания картофельного гомогената в искусственной среде дали отношение 1 : 10 для темновой и световой стадий интегрированного процесса [59]. Существенные различия в полученных результатах говорят о необходимости дальнейших исследований этого вопроса.

**Способы объединения двух стадий.** Использование слива темнового реактора непосредственно в качестве субстрата для фотобиореактора до настоящего времени остается сложной задачей. Однако показана принципиальная возможность получения водорода из необработанного стока в периодической культуре [64]. Такой подход привлекателен в плане практического применения и требует дальнейшего изучения. Возможные причины пониженного выхода водорода.

1. Различие в оптимумах рН. В ходе темнового сбраживания органики с контролируемым рН было показано, что оптимальным значением является рН 4.5–6.0 [86]. В то же время границы оптимума для пурпурных несерных бактерий 6.5–9.0 [87]. *Rhodospseudomonas acidophila* [88] имеет пониженный оптимум рН для роста (ниже 6.0), но скорости роста и выделения водорода в таких условиях не изучены.

2. Различие в температурных оптимумах. Оптимум для энтеробактерий и многих видов рода *Clostridia* 35–40°C. Пурпурные бактерии – мезофилы, их температурный оптимум приходится на 28–30°C. В случае использования термофильных культур сток темнового процесса должен охлаждаться.

3. Затенение фототрофных культур взвешенными частицами (клетки бактерий, их споры и непрозрачные частицы твердых отходов). Этим

обусловлена необходимость центрифугирования или фильтрации стока темнового реактора. Вместе с тем при использовании каких-либо специфических отходов, не имеющих взвешенных частиц и светопоглощающих соединений, это ограничение снимается.

4. Выделение токсических веществ. Существуют предположения о влиянии сульфида на рост пурпурных несерных бактерий [64]. Однако для большинства темновых бактерий и сообществ не изучены вещества, которые они могут выделять в среду, подавляя метаболизм пурпурных бактерий.

5. Известно, что нитрогеназная система пурпурных бактерий ингибируется и репрессируется повышенным содержанием связанных источников азота в среде [47]. Напротив, для более эффективного функционирования первой стадии в среду добавляются азотсодержащие вещества (табл. 4, 5), что может привести к понижению выхода водорода на второй стадии.

6. Концентрации органических кислот в сливе темнового реактора могут изменяться в широких пределах в зависимости от изменений подаваемого субстрата. Суммарные концентрации органических кислот в продуктах темновых процессов достигали более 50 [39, 44] и даже более 100 мМ [55, 56]. При концентрациях органических кислот выше 50 мМ наблюдается снижение выделения водорода пурпурными бактериями [89, 90]. Таким образом, необходимость поддержания оптимальной концентрации органических кислот для пурпурных бактерий часто вынуждает разводить ферментационные жидкости перед подачей в фотобиореактор (табл. 5).

Интересной особенностью является то, что пурпурные бактерии избирательно поглощают органические кислоты из смеси [44, 90, 91]. Кислоты с большей длиной углеродной цепи поглощаются позже. Это свойство можно использовать, создавая несколько последовательных фотобиореакторов или иммобилизовать несколько видов пурпурных бактерий в одном реакторе послойно для более полного использования длинноцепочечных органических кислот. Приведенные факты подтверждают необходимость поиска оптимальной предварительной обработки ферментационных стоков (табл. 5).

**Совместное культивирование.** Совмещение двух стадий получения водорода в одном пространстве — метод, привлекающий внимание своей простотой и экономичностью. В лабораторных экспериментах различные виды гетеротрофных бактерий или сообщества совмещают с пурпурными несерными бактериями в одной питательной среде (табл. 4). При этом не соблюдаются условия оптимумов роста и выделения водорода смешиваемых культур, прежде всего рН, что снижает эффективность процесса или скорость выделения водорода. Так, в системе с *Clostridium butyricum* и *Rhodobacter sphaeroides* с использованием глюкозы в качестве субстрата выделение водорода прекращалось уже через 3 сут культивирования из-за снижения рН до 6.5, в то время как в среде оставались ацетат (11.5 мМ) и бутират (13.5 мМ) [92]. Использование иммобилизованных культур дает возможность получать более высокие выходы водорода (табл. 4) [34, 37, 40, 66, 67]. Это можно объяснить тем, что иммобилизованные культуры имеют обособленное микроокружение, то есть отдельные области матрицы могут иметь разные значения рН, которые оказываются оптимальными для той или иной культуры.

**Последовательное объединение процессов.** Раздельное осуществление микробных процессов снимает все ограничения, перечисленные в предыдущем разделе. В такой системе сток темного реактора собирается и после обработки используется в качестве субстрата для фотоферментации. Из табл. 5 видно, что основными этапами обработки чаще всего являются разведение, стерилизация, центрифугирование и доведение рН до оптимальных значений. В некоторых случаях применяют фильтрование (табл. 5) [38, 41, 57] для освобождения ферментационного стока от непрозрачных частиц, затеняющих фототрофную культуру, или для отделения биологических компонентов (клетки, споры). Возможно использование азрации при повышенном содержании аммония (табл. 5) [61]. В зависимости от концентрации органических кислот в сброженном субстрате может потребоваться его разведение. Если разведение значительное, то перед подачей в световой реактор необходимо дополнять ферментационный сток минеральными компонентами и (или) буферными растворами. В результате эффективность интегрированного процесса варьирует от 1.6 до 7.1 моль водорода на 1 моль глюкозы (табл. 5). Такой подход в совмещении процессов удобен, когда различные стадии осуществляются в разных лабораториях, но его экономическая целесообразность требует дальнейшего изучения.

**Автоматизированное совмещение двух процессов, протекающих одновременно в разных реакторах.** Основными трудностями как совмещенных, так и разделенных реакторов является необходимость поддержания различных физико-химических условий для двух стадий, как указывалось

выше, а также необходимость отделения непрозрачных частиц ферментационной среды при ее перемещении в реактор для пурпурных несерных бактерий. Недавно была предложена система параллельно работающих биореакторов (темновой и фотобиореактор) для получения водорода из активного или муниципальные очистных сооружения (табл. 6) [51]. В описанной системе биореакторы отличались микроорганизмами, но жидкая фаза была единой. Для этого в системе реакторов существовал дополнительный объем, оснащенный диализной мембраной из полых волокон-микротрубок (диаметр пор 0.1 мкм), через которую среда из темного реактора попадала в фотобиореактор. Вся система поддерживалась при 35°C. В ходе темнового сбраживания образования водорода не наблюдалось. Однако общее содержание органических кислот в используемых отходах после сбраживания увеличивалось с 250 до 1100 мг/л. Фотогетеротрофное образование водорода шло со скоростью 100 мл/л/сут, образуя 160 мл H<sub>2</sub>/г органических кислот [51].

Предложенный подход перспективен ввиду рационального использования пространства в системе, сокращения общего времени ферментации и упрощения конструкции.

#### ИНТЕГРАЦИЯ ФОТОВАТРОФНОГО НАКОПЛЕНИЯ БИОМАССЫ И ЕЕ ДВУХСТАДИЙНОЙ ДЕГРАДАЦИИ

Если заменить органический субстрат, используемый для двухстадийной системы, описанной выше на биомассу микроводорослей, то возможно создание трехстадийной системы (рис. 2). Фототрофное накопление полисахаридов микроводорослями идет без выделения водорода, хотя есть и преимущества: единственным источником энергии для такой системы является солнечный свет; система замкнута с точки зрения выброса углекислого газа, который может использоваться микроводорослями; разработаны эффективные методы выращивания биомассы микроводорослей как в закрытых реакторах, так и в открытых системах [93]; микроводоросли способны поглощать избыточный азот и фосфор, которые приводят к эвтрофикации водоемов [19, 94]; можно использовать морскую воду, что уменьшает общую стоимость процесса. Микроводоросли характеризуются высокими скоростями роста и эффективным фотосинтезом, но из-за снижения обеспеченности культуры светом при большой концентрации биомассы или увеличенной толщине слоя суспензии рост может сильно замедляться.

Возможность выделения водорода при гетеротрофном сбраживании биомассы микроводорослей подтверждена несколькими исследовательскими группами [95–98]. Эффективность преобразования субстрата в водород, вычисленная на основе содержания крахмала в клетках микрово-



дорослей, достигала 7.1–8.3 моль  $H_2$  на моль глюкозы [95, 97]. Не исключено, что такие значения преувеличены, так как клетки содержат кроме крахмала другие органические соединения, пригодные для утилизации гетеротрофными микроорганизмами.

Узким местом этой системы является процесс переноса водородослевой биомассы в гетеротрофный реактор. В описанных экспериментах биомассу водородослей родов *Dunaliella* и *Chlamydomonas* подвергали временному замораживанию, для разрушения клеточных структур, что облегчало процесс сбраживания [97]. Предварительное высушивание биомассы снижало выход водорода на 20% [98]. В других случаях обработка биомассы не описывалась, но заключалась в концентрировании клеток или восстановлении биомассы из порошка [95]. Возможность прямого заполнения темного реактора живыми микроводородослями требует дополнительных исследований.

#### СОВМЕЩЕНИЕ МИКРОБНЫХ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ (МТЭ) С БРОЖЕНИЕМ

Продукты темного брожения – органические вещества, которые могут перерабатываться бактериями в водород, но в анаэробных условиях для этого необходима дополнительная энергия. Так, при выделении водорода в ходе аноксигенного фотосинтеза (фотоферментация) используется энергия света. Альтернативой использования аноксигенного фотосинтеза служит подход, в котором ацетат преобразуется в водород в микробном топливном элементе с затратой электрического тока [25]. МТЭ состоит из катода, катализирующего восстановление кислорода, и анода, снабженного электрогенными бактериями, которые способны окислять органику на поверхности анода и генерировать электрический ток. Недостатком такой системы является то, что кислород, подаваемый в катодное пространство, диффундирует к аноду и ингибирует брожение. МТЭ может быть преобразован в микробную электролизную ячейку, если в ячейке с катодом создать анаэробизацию и приложить электрический ток (при потенциале более –200 мВ). В этом случае электрогенные бактерии используют электроны от электрода, осуществляя “электротрофный” тип питания. При этом катод выполнен из платины, и в катодном пространстве образуется  $H_2$ .

При использовании ацетата в качестве субстрата для бактерий [25] общее количество восстановленных до водорода электронов составляло более 90%, то есть при приложении оптимального напряжения выход водорода составлял 2.9 моль на 1 моль ацетата. Усовершенствование технологии эксперимента повысило эффективность получения водорода до 99% при напряже-

нии 0.8 В [99]. В более поздних работах показано выделение водорода с общей эффективностью процесса до 92% в МТЭ при использовании глюкозы, масляной, молочной, пропионовой и валириановой кислот, а также целлюлозы [100]. Недавно появилось сообщение о разработке безмембранной единой ячейки МТЭ [101], в которой уменьшено внутреннее сопротивление за счет близкого расположения электродов. Средняя эффективность системы в данном исследовании составляла 78%, а максимальная – 86%. Скорость выделения водорода достигала 3.12 л  $H_2$  на 1 литр реактора в 1 сут.

Показана возможность применения МТЭ при использовании сточных вод свиной фермы [102], стока реактора, производящего водород совместно с этанолом [103], и в двухстадийной системе, сочетающей брожение и биоэлектрогенерацию водорода [104]. Таким образом, совмещение микробных топливных элементов с темновой ферментацией позволит преобразовывать практически любые органические субстраты в водород с высокой эффективностью. К сожалению, удельные скорости процесса пока далеки от практически значимых.

#### ИНТЕГРАЦИЯ ФОТОСИНТЕЗА С ТЕМНЫМ СБРАЖИВАНИЕМ В ОДНОМ ОРГАНИЗМЕ

В ходе фотосинтеза микроводоросли синтезируют запасные вещества, которые в дальнейшем могут использоваться как субстраты дыхания или брожения. Если микроводоросли находятся в темновых анаэробных условиях, продуктами их метаболизма становятся водород и органические кислоты, которые, в свою очередь, могут использоваться для фотоферментации и, следовательно, выделения водорода пурпурными бактериями.

Ранее был выделен штамм рода *Chlamydomonas* с относительно высокой эффективностью образования водорода при брожении [22], которая составляла 2 моль  $H_2$  на 1 моль глюкозы (рассчитано по потреблению крахмала). Другими идентифицированными продуктами брожения были уксусная кислота и этанол. Для того чтобы увеличить количество водорода, культуральную жидкость, содержащую органические кислоты, направляли в реактор с пурпурной бактерией *Rhodovulum sulfidofilum* W1S [105].

Подобное объединение процессов повысило эффективность системы до 10.5 моль  $H_2$  на 1 моль глюкозы. Следует отметить, что выделение водорода пурпурной бактерией продолжалось и после полной утилизации ацетата и этанола, что свидетельствует о наличии в среде и других продуктов метаболизма микроводорослей. Был создан био-реактор, где использовались данные штаммы, но, несмотря на то что процесс выделения водорода

оказался стабильным и продолжительным, эффективность системы понизилась до 5.8 моль  $H_2$  на 1 моль глюкозы [106, 107].

В описанной интегрированной системе на первой стадии могут быть использованы и цианобактерии, метаболизм которых изучался в условиях цикла свет – темнота (*Mycricystis aerogenosa* [106] и *Gloeocapsa alpicola* [108]). Однако опубликованных данных об объединении цианобактерий и пурпурных несерных бактерий пока нет.

Преимуществами данной схемы интеграции является то, что единственным источником энергии для микроводорослей (или цианобактерий) и пурпурных бактерий является свет, а также, что эти организмы способны выделять водород в морской воде.

### ИНТЕГРИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ УЛАВЛИВАНИЯ ЭНЕРГИИ СВЕТА

Учитывая различия в спектрах поглощения микроводорослей (400–750 нм) и пурпурных бактерий (400–1100 нм), логично совместить их для более полного использования энергии света. Было показано, что возможно совместное культивирование *Clamydomonas reinhardtii* и *Rhodospirillum rubrum* в одной среде [109], при этом в зависимости от интенсивности света в культуре преобладают одни или другие организмы. Недостатком такой системы является то, что при фотосинтезе зеленые микроводоросли выделяют кислород, блокирующий нитрогеназу и Fe-Fe гидрогеназу, что затрудняет получение водорода. Создание реактора с двумя различными отсеками для культивирования фототрофных организмов сможет решить эту проблему, но экспериментальные данные, описывающие такой подход, пока не опубликованы.

\*\*\*

Таким образом, анализ данных литературы и собственных результатов свидетельствует о том, что все предложенные интегрированные системы устраняют недостатки отдельных процессов. Более того, объединение процессов приводит к увеличению суммарной эффективности. Однако на пути к созданию новых биотехнологий существует еще множество нерешенных вопросов. Одним из них является вопрос о способе совмещения биологических процессов, т.к. описанные схемы либо высокочрезмерно затратны (требуют обработки ферментационных стоков перед использованием во второй стадии), либо малоэффективны. Другим слабоизученным вопросом является стабильность и эффективность фотоферментации при использовании сброженных отходов, состав которых может резко меняться.

Проблема интеграции разложения органических отходов и МТЭ в режиме потребления тока также перспективна, хотя для практического использования имеется множество нерешенных вопросов. Среди них следует особо выделить стабильность процесса и повышение удельной скорости. Узким местом МТЭ является также протоннообменная мембрана из-за ее недолговечности, высокой стоимости и повышенного сопротивления [110]. Необходим тщательный подбор катализатора для такой системы, так как платина и другие металлические катализаторы чувствительны ко многим продуктам брожения, например  $H_2S$ , CO и серосодержащим пептидам.

С появлением различных интегрированных систем биологического получения водорода появились и новые вопросы. Наряду с дальнейшим изучением отдельных процессов, необходимо интенсивно исследовать и интегрированные системы, поскольку их перспективность очевидна.

Работа поддержана проектом РФФИ №11-04-01383.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Das D., Veziroglu T.N. // Int. J. Hydrogen. Energ. 2001. V. 26. № 6. P. 13–28.
2. Nath K., Das D. // Appl. Microbiol. Biot. 2004. V. 65. № 5. P. 520–529.
3. Wu S.-Y., Hung C.-H., Lin C.-N., Chen H.-W., Lee A.-S., Chang J.-S. // Biotechnol. Bioeng. 2006. V. 93. № 5. P. 934–946.
4. Levin D.B. // Int. J. Hydrogen Energ. 2004. V. 29. № 13. P. 1425–1426.
5. Levin D.B., Pitt L., Love M. // Int. J. Hydrogen Energ. 2004. V. 29. № 2. P. 173–185.
6. Yokoi H., Mori S., Hirose J., Hayashi S., Takasaki Y. // Biotechnol. Lett. 1998. V. 20. № 9. P. 895–899.
7. Turker L., Gumus S., Tapan A. // J. Sci. Ind. Res. India. 2008. V. 67. № 11. P. 994–1016.
8. Bott M., Thauer R.K. // Eur. J. Biochem. 1989. V. 179. № 2. P. 469–472.
9. Call D.F., Wagner R.C., Logan B.E. // Appl. Environ. Microb. 2009. V. 75. № 24. P. 7579–7587.
10. Geelhoed J.S., Stams A.J. // Environ. Sci. Technol. 2011. V. 45. № 2. P. 815–820.
11. Bolton J.R. // Sol. Energy. 1996. V. 57. № 1. P. 37–50.
12. Rakhely G., Kovacs A.T., Maroti G., Fodor B.D., Csandi G., Latinovics D., Kovacs K.L. // Appl. Environ. Microb. 2004. V. 70. № 2. P. 722–728.
13. Rakhely G., Laurinavichene T.V., Tsygankov A.A., Kovacs K.L. // BBA-Bioenergetics. 2007. V. 1767. № 6. P. 671–676.
14. Cournac L., Guedeney G., Peltier G., Vignais P. // J. Bacteriol. 2004. V. 186. № 6. P. 1737–1746.
15. Suda S., Kumazawa S., Mitsui A. // Arch. Microbiol. 1992. V. 158. № 1. P. 1–4.
16. Borodin V.B., Rao K.K., Hall D.O. // Mar. Biol. 2002. V. 140. № 3. P. 455–463.
17. Liu J.G., Bukatin V.E., Tsygankov A.A. // Int. J. Hydrogen Energ. 2006. V. 31. № 11. P. 1591–1596.
18. Wykoff D.D., Davies J.P., Melis A., Grossman A.R. // Plant. Physiol. 1998. V. 117. № 1. P. 129–139.

19. Hernandez J.P., De-Bashan L.E., Bashan Y. // *Enzyme Microb. Tech.* 2006. V. 38. № 1–2. P. 190–198.
20. Asada Y., Miyake M., Tomizuka N. // *Photosynth. Res.* 1992. V. 34. № 1. P. 128.
21. Troshina O., Serebryakova L., Sheremetieva M., Lindblad P. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2002. V. 27. № 11–12. P. 1283–1289.
22. Miura Y., Ohta S., Mano M., Miyamoto K. // *Agric. Biol. Chem.* 1986. V. 50. № 11. P. 2837–2844.
23. Sauter M., Boehm R., Boeck A. // *Mol. Microbiol.* 1992. V. 6. № 11. P. 1523–1532.
24. Kerby L., Ludden P.W., Roberts G.P. // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. № 8. P. 2241–2244.
25. Liu H., Grot S., Logan B.E. // *Environ. Sci. Technol.* 2005. V. 39. № 11. P. 4317–4320.
26. Цыганков А.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2007. Т. 43. № 3. С. 279–288.
27. Gaffron H., Rubin J. // *J. Gen. Physiol.* 1942. V. 26. № 2. P. 219–240.
28. Бойченко В.А., Сатина Л.Я., Литвин Ф.Ф. // *Физиология растений.* 1989. Т. 36. № 2. P. 239–248.
29. Melis A., Zhang L.P., Forestier M., Ghirardi M.L., Seibert M. // *Plant. Physiol.* 2000. V. 122. № 1. P. 127–135.
30. Tsygankov A.A., Kosourova S.N., Tolstygina I.V., Ghirardi M.L., Seibert M. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2006. V. 31. № 11. P. 1574–1584.
31. Redwood M.D., Paterson-Beedle M., Macaskie L.E. // *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2009. V. 8. № 2. P. 140–185.
32. Ren N.Q., Wang A.J., Cao G.L., Xu J.F., Gao L.F. // *Biotechnol. Adv.* 2009. V. 27. № 6. P. 1051–1060.
33. Guo X.M., Trably E., Latrille E., Carrere H., Steyer J.-P. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 19. P. 10660–10673.
34. Miyake J., Mao X.-Y., Kawamura S. // *J. Ferment. Technol.* 1984. V. 62. № 6. P. 531–535.
35. Kim M.-S., Lee T.J., Yoon Y.S., Lee I.G., Moon K.W. // *Biohydrogen II. An approach to environmentally acceptable technology* / Eds. J. Miyake, T. Matsunaga, A. San Pietro. Amsterdam: Pergamon Press, 2001. P. 263–272.
36. Nath K., Kumar A., Das D. // *Appl. Microbiol. Biot.* 2005. V. 68. № 4. P. 533–541.
37. Asada Y., Tokumoto M., Aihara Y., Oku M., Ishimi K., Wakayama T., Miyake J., Tomiyama M., Kohno H. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2006. V. 31. № 11. P. 1509–1513.
38. Redwood M.D., Macaskie L.E. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2006. V. 31. № 11. P. 1514–1521.
39. Liu B.F., Ren N.Q., Xing D.F., Ding J., Zheng G.X., Guo W.Q., Xu J.F., Xie G.J. // *Bioresource Technol.* 2009. V. 100. № 10. P. 2719–2723.
40. Ding J.L.B., Ren N.Q., Xing D.F., Guo W.Q., Xu J.F., Xie G. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2009. V. 34. № 9. P. 3647–3652.
41. Su H.B., Cheng J., Zhou J.H., Song W.L., Cen K.F. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2009. V. 34. № 21. P. 8846–8853.
42. Alalayah W.M., Kalil M.S., Kadhum A.A.H., Jahim J.M., Jaapar S.Z.S., Alauj N.M. // *Pak. J. Biol. Sci.* 2009. V. 12. № 22. P. 1462–1467.
43. Liu B.F., Ren N.Q., Xie G.J., Ding J., Guo W.Q., Xing D.F. // *Bioresource Technol.* 2010. V. 101. № 14. P. 5325–5329.
44. Ozgur E., Mars A.E., Peksel B., Louwerse A., Yucel M., Gunduz U., Claassen P.A.M., Eroglu I. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 2. P. 511–517.
45. Nath K., Muthukumar M., Kumar A., Das D. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 4. P. 1195–1203.
46. Chen C.Y., Yang M.H., Yeh K.L., Liu C.H., Chang J.S. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 21. P. 4755–4762.
47. Chen C.Y., Yeh K.L., Lo Y.C., Wang H.M., Chang J.S. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 24. P. 13356–13364.
48. Odom J.M., Wall J. // *Appl. Env. Microbiol.* 1983. V. 45. № 4. P. 1300–1305.
49. Lo Y.C., Chen S.D., Chen C.Y., Huang T.I., Lin C.Y., Chang J.S. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 19. P. 5224–5233.
50. Yokoi H., Saitsu A., Uchida H., Hirose J., Hayashi S., Takasaki Y. // *J. Biosci. Bioeng.* 2001. V. 91. № 1. P. 58–63.
51. Jeong T.Y., Cha G.C., Yoo I.K., Kim D.J. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2007. V. 32. № 5. P. 525–530.
52. Vatsala T.M., Raj S.M., Manimaran A. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 20. P. 5404–5415.
53. Uyar B., Schumacher M., Gebicki J., Modigell M. // *Bioproc. Biosyst. Eng.* 2009. V. 32. № 5. P. 603–606.
54. Abd-Alla M.H., Morsy F.M., El-Enany A.E. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2011. V. 36. № 21. P. 13518–13527.
55. Ozgur E., Afsar N., de Vrije T., Yucel M., Gunduz U., Claassen P.A.M., Eroglu, I. // *J. Clean Prod.* 2010. V. 18. № S1. P. S23–S28.
56. Tao Y., Chen Y., Wu Y., He Y., Zhou Z. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2007. V. 32. № 2. P. 200–206.
57. Su H.B., Cheng J., Zhou J.H., Song W., Cen K. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2009. V. 34. № 4. P. 1780–1786.
58. Argun H., Kargi F., Kaplan I.K. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2009. V. 34. № 15. P. 6181–6189.
59. Laurinavichene T., Belokopytov B.F., Laurinavichius K.S., Tekucheva D.N., Seibert M., Tsygankov A. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 16. P. 8536–8543.
60. Belokopytov B.F., Laurinavichius K.S., Laurinavichene T.V., Ghirardi M.L., Seibert M., Tsygankov A.A. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2009. V. 34. № 8. P. 3324–3332.
61. Argun H., Kargi F. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 4. P. 1595–1603.
62. Argun H., Kargi F. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 4. P. 1604–1612.
63. Ozmihci S., Kargi F. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 37. № 4. P. 341–347.
64. Lee C.M., Chen P.C., Wang C.C., Tung Y.C. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2002. V. 27. № 11–12. P. 1309–1313.
65. Odom J.M., Peck H.D.J. // *Annu. Rev. Microbiol.* 1984. V. 38. № 7. P. 551–592.
66. Zhu H., Wakayama T., Asada Y., Miyake J. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2001. V. 26. № 11. P. 1149–1154.
67. Xie G.J., Feng L.B., Ren N.Q., Ding J., Liu C., Xing D.F., Qian G.W., Ren H.Y. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 5. P. 1929–1935.
68. Ozminchi S., Kargi, F. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2010. V. 35. № 13. P. 6674–6680.
69. Brenner K., You L.C., Arnold F.H. // *Trends Biotechnol.* 2008. V. 26. № 9. P. 483–489.
70. Ren N.Q., Guo W.Q., Wang X.J., Xiang W.S., Liu B.F., Wang X.Z., Ding J., Chen Z.B. // *Int. J. Hydrogen Energ.* 2008. V. 33. № 16. P. 4318–4324.
71. Li C.L., Fang H.H.P. // *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 2007. V. 37. № 1. P. 1–39.
72. Luo G., Karakashev D., Xie L., Zhou Q., Angelidaki I. // *Biotechnol. Bioeng.* 2011. V. 108. № 8. P. 1816–1827.

73. Collet C., Gaudard O., Peringer P., Schwitzguebel J.P. // J. Biotechnol. 2005. V. 118. № 3. P. 328–338.
74. Zeidan A.A., Radstrom P., van Niel E.W.J. // Microb. Cell Fact. 2010. V. 9. P. 102–115.
75. Fu N., Peiris P., Markham J., Bavor J. // Enzyme Microb. Tech. 2009. V. 45. № 3. P. 210–217.
76. Qian M., Tian S., Li X., Zhang J., Pan Y., Yang X. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2006. V. 134. № 3. P. 273–284.
77. Dasgupta C.N., Gilbert J.J., Lindblad P., Heidorn T., Borgvang S.A., Skjanes K., Das D. // Int. J. Hydrogen Energ. 2010. V. 35. № 19. P. 10218–10238.
78. Tao Y., He Y., Wu Y., Liu F., Li X., Zong W., Zhou Z. // Int. J. Hydrogen Energ. 2008. V. 33. № 3. P. 963–973.
79. Argun H., Kargi F., Kapdan I.K. // Int. J. Hydrogen Energ. 2008. V. 33. № 24. P. 7405–7412.
80. Mohan S.V., Srikanth S., Dinakar P., Sarma P.N. // Int. J. Hydrogen Energ. 2008. V. 33. № 2. P. 559–569.
81. Vasilyeva L., Miyake M., Khatipov E., Wakayama T., Sekine M., Hara M., Nakada E., Asada Y., Miyake J. // J. Biosci. Bioeng. 1999. V. 87. № 2. P. 619–624.
82. Zhu R., Wang D., Zhang Y., Li J. // Chin. Sci. Bull. 2006. V. 51. № 21. P. 2611–2618.
83. Kars G., Gunduz U., Yucel M., Rakhely G., Kovacs K.L., Eroglu I. // Int. J. Hydrogen Energ. 2009. V. 34. № 5. P. 2184–2190.
84. Kars G., Gunduz U., Rakhely G., Yucel M., Eroglu I., Kovacs K.L. // Int. J. Hydrogen Energ. 2008. V. 33. № 6. P. 3056–3060.
85. Kim E.J., Lee M.K., Kim M.S., Lee J.K. // Int. J. Hydrogen Energ. 2008. V. 33. № 5. P. 1516–1521.
86. Wang J., Wan W. // Int. J. Hydrogen Energ. 2009. V. 34. № 2. P. 799–811.
87. Rocha J., Barbosa H.R., Wijffels R.H. // Biohydrogen II. An approach to environmentally acceptable technology / Eds. J. Miyake; T. Matsunaga; A. San Pietro. Amsterdam: Pergamon Press, 2001. P. 3–32.
88. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. / Ред. Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Дж. Стейли, С. Уильямс. М.: Мир, 1997. 432 с.
89. Lo Y.C., Chen S.Y., Lee C.M., Chang J.S. // Int. J. Hydrogen Energ. 2011. V. 36. № 21. P. 14059–14068.
90. Laurinavichene T.V., Tekucheva D.N., Laurinavichius K.S., Ghirardi M.L., Seibert M., Tsygankov A.A. // Int. J. Hydrogen Energ. 2008. V. 33. № 23. P. 7020–7026.
91. Uyar B., Eroglu I., Yucel M., Gunduz U. // Int. J. Hydrogen Energ. 2009. V. 34. № 10. P. 4517–4523.
92. Fang H.H.P., Zhu H.G., Zhang T. // Int. J. Hydrogen Energ. 2006. V. 31. № 15. P. 2223–2230.
93. Chaumont D. // J. Appl. Phycol. 1993. V. 78. № 5. P. 593–604.
94. Mallick N. // BioMetals. 2002. V. 15. № 4. P. 377–390.
95. Kim M.S., Baek J.S., Yun Y.S., Sim S.J., Park S., Kim S.C. // Int. J. Hydrogen Energ. 2006. V. 31. № 6. P. 812–816.
96. Ike A., Kawaguchi H., Hirata K., Miyamoto K. // Biohydrogen II. An approach to environmentally acceptable technology / Eds. J. Miyake; T. Matsunaga; A. San Pietro. Amsterdam: Pergamon Press, 2001. P. 53–61.
97. Kawaguchi H., Hashimoto K., Hirata K., Miyamoto K. // J. Biosci. Bioeng. 2001. V. 91. № 3. P. 277–282.
98. Mussnug J.H., Klassen V., Schlüter A., Kruse O. // J. Biotechnol. 2010. V. 150. № 1. P. 51–56.
99. Cheng S.A., Logan B.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 47. P. 18871–18873.
100. Logan B.E., Call D., Cheng S., Hamelers H.V., Sleutels T.H., Jeremiasse A.W., Rozendal R.A. // Environ. Sci. Technol. 2008. V. 42. № 23. P. 8630–8640.
101. Call D.F., Logan B.E. // Env. Sci. Technol. 2008. V. 42. № 9. P. 3401–3406.
102. Wagner R.C., Regan J.M., Oh S.E., Zuo Y., Logan B.E. // Water. Res. 2009. V. 43. № 5. P. 1480–1488.
103. Lu L., Ren N.Q., Xing D., Logan B.E. // Biosens., Bioelectron. 2009. V. 24. № 10. P. 3055–3060.
104. Lalaurette E., Thammannagowda S., Mohagheghi A., Maness P.C., Logan B.E. // Int. J. Hydrogen Energ. 2009. V. 34. № 15. P. 6201–6210.
105. Miura Y., Saitoh C., Matsuoka S., Miyamoto K. // Biosci. Biotech. Biochem. 1992. V. 56. № 5. P. 751–754.
106. Asada Y., Kawamura S., Ho K.K. // Phytochemistry. 1987. V. 26. № 3. P. 637–640.
107. Miura Y., Akano T., Fukatsu K., Miyasaka H., Mizoguchi T., Yagi K., Maeda I., Ikuta Y., Matsumoto H. // Energ. Convers. Manage. 1997. V. 38. № 5. P. S533–S537.
108. Serebryakova L.T., Tsygankov A.A. // Biotechnol. Progr. 2007. V. 23. № 5. P. 1106–1110.
109. Melis A., Melnicki R. // Int. J. Hydrogen Energ. 2006. V. 31. № 11–12. P. 1563–1573.
110. Aki H., Akinobu M., Shigeo Y., Junji K., Tetsuhiko M., Hiroshi Y., Itaru I. // Int. J. Hydrogen Energ. 2005. V. 30. № 9. P. 943–952.

## Coupled Biological Hydrogen-Producing Systems: A Review

D. N. Tekucheva and A. A. Tsygankov

*Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences*

*e-mail: tekuchevadn@rambler.ru, ttt-00@mail.ru*

Received June 29, 2011

**Abstract**—Possible ways for combining various biological processes of biohydrogen production are described. Some of these processes are being intensively studied now, whereas others are theoretically feasible, but as yet have not been studied. A special focus is on the factors that influence the efficiency of coupled systems.

УДК 577.15

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПАЗЫ ИЗ ТЕРМОАЛКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *Thermosyntropha lipolytica*

© 2012 г. В. М. Гумеров, А. В. Марданов, П. М. Колосов, Н. В. Равин

Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312

e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 3.11.2011 г.

В результате расшифровки нуклеотидной последовательности генома термоалкалофильной липолитической бактерии *Thermosyntropha lipolytica* идентифицирован ген, кодирующий липазу, секретируемую в среду. Рекомбинантный фермент экспрессирован в *Escherichia coli*, проведены его выделение и предварительная функциональная характеристика. Липаза проявляла гидролитическую активность в отношении пара-нитрофениловых эфиров с различной длиной цепи, а также триглицеридов, в том числе растительных масел. Оптимальные условия реакции достигались при 70–80°C и pH 8.0. Фермент сохранял более 80% активности в присутствии 10% метанола. Выделенная новая термостабильная липаза может быть перспективным биокатализатором для органического синтеза, применения в пищевой промышленности, производстве моющих средств и получении биодизеля.

Липазы (КФ 3.1.1.3) осуществляют реакции гидролиза и синтеза длинноцепочечных эфиров жирных кислот [1, 2]. Они широко используются в качестве биокатализаторов в различных биотехнологиях, в том числе в пищевой, целлюлозно-бумажной и текстильной промышленности, при проведении тонкого органического синтеза, производстве детергентов, и др. [3, 4]. Перспективным направлением использования липаз является производство биодизеля из растительных масел [5]. Для многих биотехнологических процессов необходимы липазы, устойчивые, в первую очередь, к высоким температурам, а также щелочным и кислым условиям, органическим растворителям и другим экстремальным условиям [6]. Хотя некоторые липазы, выделенные из мезофильных организмов, обладают умеренной термостабильностью, естественным источником таких ферментов являются экстремофильные микроорганизмы, живущие при соответствующих физико-химических условиях.

*Thermosyntropha lipolytica* – термофильная анаэробная бактерия, выделенная из щелочного озера Богория в Кении [7]. Этот относящийся к порядку Clostridiales микроорганизм растет в широком диапазоне температур от 52 до 70°C при щелочных значениях pH (7.15–9.5). *T. lipolytica* использует органические субстраты, в том числе липиды, гидролиз которых осуществляется секретруемыми в окружающую среду липолитическими ферментами. Особенностью *T. lipolytica* является то, что эта бактерия способна расщеплять триглицериды (например, растительные масла) и утилизировать жирные кислоты в симбиотическом сообществе с метаногенной археей

рода *Methanobacterium* [7]. Ранее из одного штамма *T. lipolytica* были выделены и функционально охарактеризованы две липазы, проявлявшие максимум активности при температуре около 96°C и pH 9.5 [8, 9]. Ферменты были выделены из супернатанта культуры *T. lipolytica* и очищены до гомогенного состояния, однако кодирующие их гены не были идентифицированы [8], что не позволяет получать ферменты в практически значимых количествах.

Цель работы – идентификация генов, кодирующих секретруемые липазы, в результате расшифровки и анализа нуклеотидной последовательности генома *T. lipolytica*, экспрессия в *Escherichia coli*, очистка и характеристика рекомбинантной липазы TSLip1.

### МЕТОДИКА

**Штаммы микроорганизмов и условия культивирования.** Штамм *T. lipolytica* был выделен В.А. Светличным из щелочного озера Богория (Кения) [7]. Культивирование проводили при 60°C в 15 мл пробирках Хангейта на среде следующего состава (г/л): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.3, KCl – 0.3, NaCl – 0.5, NH<sub>4</sub>Cl – 1.0, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O – 0.3, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 0.05, NaHCO<sub>3</sub> – 3.0, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 3.0, Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O – 0.5, NaHCO<sub>3</sub> – 3.0, цистеин – 0.15, дрожжевой экстракт – 10, витамины – 2 мл/л, раствор микроэлементов [10] – 2.5 мл/л. Анаэробно приготовленную среду (pH 8.3, 25°C) разливали под током очищенной от кислорода смеси N<sub>2</sub>–CO<sub>2</sub> (80 : 20) порциями по 500 мл и автоклавились при 121°C.

Штамм *E. coli* Rosseta-gami (DE3) (*Dara-leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL* (DE3) F'[*lac<sup>+</sup> (lacI<sup>q</sup>) pro*] *gor522::Tn10 trxB pLysSRARE* (Cam<sup>R</sup>, Str<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>)) использовали для экспрессии рекомбинантной липазы TSLip1. Бактериальные культуры выращивали в условиях аэрации при 37°C в среде или на чашках с LB агаром. В случае необходимости в среду добавляли ампициллин (100 мкг/мл) и хлорамфеникол (20 мкг/мл).

**Определение нуклеотидной последовательности генома *T. lipolytica* и идентификация генов, кодирующих липазы.** Препарат геномной ДНК *T. lipolytica* выделяли следующим методом. В 1.5 мл микропробирке собирали клетки из 50 мл свежей культуры (~10<sup>7</sup> кл./мл). Осадок растворяли в 500 мкл ТЕ буфера (10 мМ Трис, рН 8.0, 50 мМ ЭДТА). Клетки лизировали добавлением 10 мкл ДДС-Na (20%-ный водный раствор) и 10 мкл протеиназы К (20 мг/мл). Полученную смесь инкубировали в течение 15 мин при 55°C. Затем вносили 20 мкл 5М NaCl и последовательно экстрагировали равным объемом фенола (рН 8.0), фенол-хлороформа (1 : 1) и хлороформа, перенося каждый раз надосадок в чистые микропробирки. ДНК осаждали изопропанолом.

Для секвенирования генома *T. lipolytica* конструировали библиотеку случайных фрагментов геномной ДНК и проводили ее секвенирование на геномном анализаторе GS FLX ("Roche", Швейцария) с использованием набора реактивов GS XLR70 Sequencing Kit. "Сборку" последовательностей отдельных чтений в объединяющие их протяженные контиги осуществляли с помощью программы GS De Novo Assembler ("Roche", Швейцария). Поиск открытых рамок считывания, способных кодировать белки, осуществляли с помощью программы Genemark [11]. Для предсказания функций белков соответствующие аминокислотные последовательности сравнивали с базой данных NCBI с помощью BLASTP [12]. Наличие сигнальных пептидов в аминокислотных последовательностях белков предсказывали с помощью программы SignalP v. 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) для грамположительных бактерий.

**Получение штамма *E. coli* – продуцента рекомбинантной липазы *T. lipolytica*, выделение и очистка фермента.** Для ПЦР-амплификации гена липазы TSLip1 без последовательности, кодирующей сигнальный пептид, использовали праймеры: LipF\_BamHI (5'-ATGGGGATCCCAAGAAATTC-GAGTAACA-3') и LipR\_SalI (5'-AAGGTC-GACTTCTACTCTTCAGCAATAT-3'), в качестве матрицы использовали геномную ДНК *T. lipolytica*. Полученный ПЦР-фрагмент обрабатывали рестриктазами BamHI и SalI и клонировали в экспрессионном векторе pQE80L (Qiagen), позволя-

ющем экспрессировать целевой белок с присоединенными 6 аминокислотными остатками гистидина на N-конце. Рекомбинантный экспрессионный вектор pQE80-Lip вводили в штамм *E. coli* Rosseta-gami (DE3). Полученный штамм выращивали на шейкере при 37°C до достижения D<sub>600</sub> ~ 0.6, затем индуцировали синтез рекомбинантного белка, внося ИПТГ (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид) до 1 мМ, и продолжали выращивать культуру в течение 20 ч при 37°C. Выделение и очистку рекомбинантной липазы TSLip1 осуществляли методом металл-аффинной хроматографии с помощью набора Spin-NTA KIT ("Qiagen", Германия). Препарат диализовали с помощью колонок Illustra NAP-10 ("GE Healthcare", США) и хранили при -20°C в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl, рН8.0, 100 мМ NaCl, 5 мМ 2-ME и 40% глицерин.

**Определение активности липазы.** Для определения активности липазы использовали два метода – спектрофотометрический и титрование [13]. В первом методе в качестве субстратов использовали 4-нитрофенил бутират (п-НБ, "Sigma" N9876), 4-нитрофенил валерат (п-НВ, "Sigma" N4377), 4-нитрофенил деканоат (п-НД, "Sigma" N0252) и 4-нитрофенил пальмитат (п-НП, "Sigma" N2752). Все субстраты, за исключением п-НП, разводили в чистом ацетонитриле до конечной концентрации 100 мМ. п-НП растворяли в смеси изопропанол-ацетонитрил в соотношении 1 : 1 до концентрации 50 мМ. Реакционная смесь содержала 5 мкМ CaCl<sub>2</sub>, 100 мМ Хепес (рН 7.5), 1.25 мкМ субстрата (п-НБ, п-НВ, п-НД или п-НП) и 0.02 мкг фермента в объеме 1 мл. Реакцию останавливали добавлением этанола в объеме, составляющем половину от объема реакционной смеси. Количество освобожденного в результате гидролиза пара-нитрофенола определяли спектрофотометрически при длине волны 405 нм.

Метод титрования использовали для определения активности фермента в отношении триглицеридов (растительное масло). Реакционную смесь, содержащую 100 мкл масла и 100 мкл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.0), прогревали при температуре проведения реакции в течение 10 мин, затем вносили 10 мкг фермента и инкубировали в течение 2 ч при периодическом перемешивании. По завершении гидролиза к пробе добавляли 10 мл смеси ацетона с этанолом (50 : 50) для растворения масла и остановки реакции. Затем вносили 11 мкл индикатора фенолфталеина (1% в 95%-ном этаноле) и проводили титрование образовавшихся свободных жирных кислот 0.1 М КОН. Определяли процент гидролиза по образовавшимся в образце свободным жирным кислотам от теоретически возможного максимального количества, по следующей формуле [14]:

$$\% \text{ гидролиза} = ((V \times M \times MW) / (Wt \times f)) \times 100,$$

MLKKNSTIALCFLLSFVFNIFLTPVLAQEISSNNKYPIVLVHGLGGFGRDEMLGFKYWG  
 GLYDIQEYLKAQGYEVYTVAVGVPVSSNWDRA CELYAQLVGGRVYGAANAHAAYGHARYGR  
 TYEGLIPDLGKVDPQTGEVKKVHLIGHSMGGQTVRTLVLQLLAEGDAEERSFPQDNMSPLF  
 AGGNWVKSVTITSTPHDGTSLDNAINNGLPWLQSFVGFMSLSTPNSLYDLKLDQWGLT  
 RCQGEKVADYLKRVFNSSFWKTSRDLSNWDLTVEGARELNGWVKAQPDVYFYSWATNATR  
 KSLFSNYQVPILSMNPFLLYPFALHIGSYTRNIPGQIPIDSSWWPNDGLVSLISQNGPKIN  
 STDTIINFNGNPQPGVWNYMGVMDTFDHMDIIGIGTLWNPCPWYLEIAKLLTSLPADYAV  
 VADGETENSCSASDLMNPDEAEITATEAADVSGENSTSAETIEENTIISYPDITDIAEE

**Рис. 1.** Аминокислотная последовательность белкового продукта гена *TSLip1*. Последовательность N-концевого сигнального пептида подчеркнута, консервативный мотив [LIV]-X-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-XG-[GSTAC], присутствующий в липазах и эстеразах, выделен серым.

где V – объем, взятой на реакцию KOH, M – молярность KOH (0.1 M), MW – средняя молекулярная масса жирных кислот (г/моль), Wt – вес реакционной смеси, f – доля масла в начале реакции.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Идентификация генов, кодирующих липазы, в результате расшифровки нуклеотидной последовательности генома *T. lipolytica*.** Традиционный путь поиска нового фермента из микроорганизма, обладающего определенной гидролитической активностью (например, липолитической), предполагает выделение и очистку белка, обладающего соответствующей активностью, из биомассы микроорганизма. В последующем данные об аминокислотной последовательности белка, полученные, например, в результате его секвенирования с N-конца, могут быть использованы для идентификации соответствующего гена путем скрининга библиотеки геномной ДНК микроорганизма или ПЦР-амплификации.

В данной работе для идентификации генов липаз мы использовали другой подход, предполагающий определение нуклеотидной последовательности генома *T. lipolytica* и поиск генов, кодирующих липазы, методами биоинформатики. Секвенирование проводили методом параллельного пиросеквенирования [15]. Была создана и просеквенирована на GS FLX библиотека случайных фрагментов геномной ДНК *T. lipolytica*. Общий объем секвенирования составил около 47.5 млн. нт., что соответствовало примерно 20-кратному перекрытию генома. Полученные последовательности отдельных чтений были собраны в 98 контигов общей длиной около 2.2 млн. нт.

Поиск открытых рамок считывания, потенциально кодирующих белки, проводили с помощью программы Genmark, а предсказание их функций – в результате сравнения с базами данных белковых последовательностей. Всего идентифицировано 7 ферментов, относящихся к классу липаз и эстераз, аминокислотные последовательности двух белков содержали N-концевые сигнальные последовательности, которые могут

обеспечивать их секрецию из клетки. Одна из этих липаз, названная нами *TSLip1*, была выделена и функционально охарактеризована.

Ген *TSLip1* кодирует полипептид длиной 478 а.о., включающий N-концевую сигнальную последовательность длиной 28 а.о. (рис. 1). Анализ аминокислотной последовательности *TSLip1* выявил наличие консервативного мотива [LIV]-X-[LIVFY]-[LIVMST]-G-[HYWV]-S-XG-[GSTAC], входящего в активный центр эстераз и липаз [16]. В C-концевой области белка отсутствовали трансмембранные домены, которые могут обеспечивать “заякоривание” фермента на поверхности клетки, что свидетельствует о том, что липаза, вероятно, просто секретируется в среду, а не остается связанной с клетками. В результате поиска сходных последовательностей в GenBank было обнаружено, что ближайшими гомологами *TSLip1* являются липазы бактерий типа Firmicutes, – *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum* и *Aneurinibacillus thermoaerophilus* (50–55% идентичности).

**Клонирование гена *TSLip1*, экспрессия и очистка рекомбинантного белка.** Ген *TSLip1* без последовательности, кодирующей сигнальный пептид, клонировали в экспрессионном векторе pQE80L (“Qiagen”, Германия) таким образом, что синтезируемый рекомбинантный белок *TSLip1* содержал на N-конце 6 аминокислотных остатков гистидина. Экспрессию *TSLip1* проводили в штамме *E. coli* Rosseta-gami (DE3). Полученная экспрессионная система обеспечивала конечный выход *TSLip1* на уровне около 20% от общего растворимого белка (рис. 2). Рекомбинантный белок *TSLip1* очищали с помощью металл-аффинной хроматографии на Ni-NTA колонках. В результате был получен гомогенный препарат белка *TSLip1* (рис. 2).

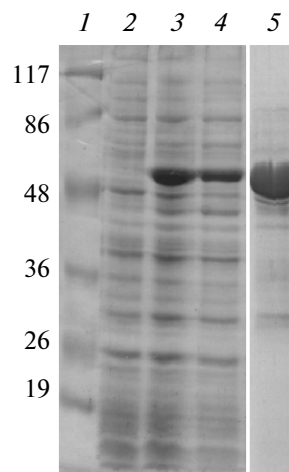
**Гидролитическая активность *TSLip1* в отношении 4-нитрофениловых эфиров.** Для определения субстратной специфичности *TSLip1*, а также зависимости активности фермента от температуры, pH и присутствия органических растворителей, в качестве субстратов использовали производные 4-нитрофенила с различной длиной цепи – 4-нитрофенил бутират (C4), 4-нитрофенил валерат

(C5), 4-нитрофенил деканоат (C10) и 4-нитрофенил пальмитат (C16). Известно, что липазы преимущественно гидролизуют длинноцепочечные ацилглицериды, с длиной цепи более 10 атомов углерода, а эстеразы проявляют максимальную активность в отношении короткоцепочечных молекул (C2-C4), а с увеличением длины цепи активность снижается [2, 17]. TSLip1 проявляла максимальную активность в отношении 4-нитрофенил бутирата (C4), при увеличении длины цепи активность сначала снижалась и составляла менее 10% максимальной для 4-нитрофенил деканоата, а затем вновь возрастала для 4-нитрофенил пальмитата (рис. 3а). Таким образом, TSLip1 проявляет активность, характерную как для эстеразы, так и для липазы.

Определение зависимости активности TSLip1 от температуры и pH проводили, определяя эффективность гидролиза на оптимальном субстрате, 4-нитрофенил бутирате. Оптимальная температура реакции составляла 70°C, не менее 80% активности липаза проявляла при 60 и 80°C (рис. 3б). При более высоких температурах активность фермента резко снижалась. Зависимость активности липазы от pH (рис. 3в) определяли в 0.1 М ацетатном (для pH 3.0–5.0), 0.1 М фосфатном (pH 6.0) или в 0.1М трис (pH 6.0–9.0) буферах, проводя реакцию гидролиза 4-нитрофенил бутирата при 70°C. Фермент не проявлял активности при pH ниже 5.0, максимальная активность наблюдалась при pH 8.0, при pH 9.0 активность незначительно снижалась. Нестабильность субстрата в щелочных условиях не позволила провести измерения активности липазы на 4-нитрофенил бутирате при более высоких значениях pH.

Для характеристики термостабильности TSLip1 препарат фермента инкубировали в реакционном буфере при 80°C различное время, затем охлаждали до 60°C, вносили 4-нитрофенил бутират и проводили реакцию при 60°C в стандартном реакционном буфере. Быстрое снижение активности примерно в 3 раза наблюдалось в течение первых 30 мин инкубации при 80°C, в дальнейшем активность снижалась намного медленнее (время 50%-ной инактивации фермента – около 90 мин, рис. 3г). Быстрая первоначальная инактивация фермента при 80°C может объяснять наблюдавшееся резкое снижение активности при температурах выше 80°C, реальный температурный оптимум активности фермента может быть выше 70°C.

Поскольку одним из перспективных направлений практического использования липаз является получение биодизеля из растительных масел, т.е. конверсия триглицеридов растительных масел в эфиры жирных кислот в реакции трансэстерификации с помощью спиртов, обычно этанола или метанола, мы протестировали устойчивость фермента к присутствию этих спиртов в реакци-

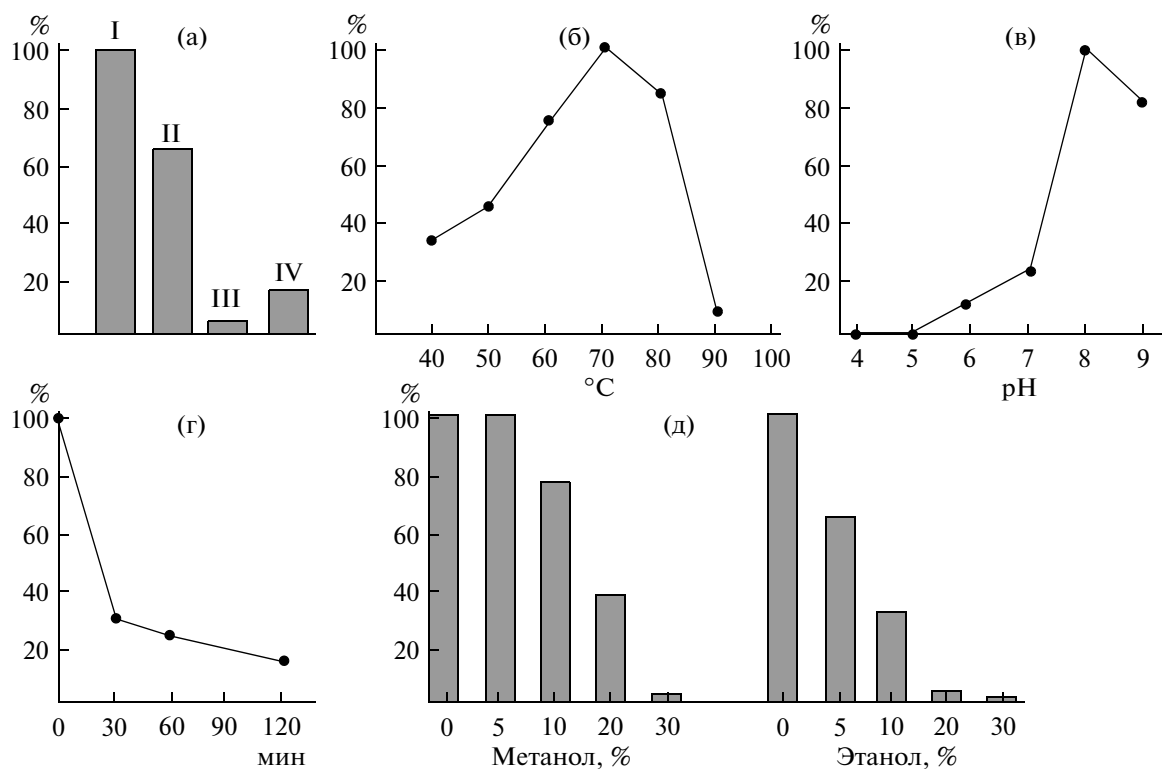


**Рис. 2.** Экспрессия TSLip1 в *E.coli*. ДДС-Na-ПААГ анализ белковых препаратов. 1 – маркер молекулярной массы (кДа), 2 – суммарный белковый препарат, выделенный из клеток штамма *E. coli* Rosseta-gami (DE3), содержащего плазмиду pQE80-TSLip1, до индукции синтеза TSLip1, 3 – то же, что на дорожке 2, но через 3 ч после индукции синтеза TSLip1 внесением в среду 1мМ ИПТГ, 4 – фракция растворимых белков, через 3 ч после индукции синтеза TSLip1 внесением в среду 1мМ ИПТГ, 5 – очищенный препарат рекомбинантной липазы TSLip1.

онной смеси. Для этого реакцию гидролиза 4-нитрофенил бутирата проводили в присутствии этанола или метанола. Полученные результаты (рис. 3д) показали, что метанол в концентрации до 10% практически не оказывал ингибирующего воздействия на ферментативную реакцию, полное ингибирование активности липазы наблюдалось лишь в присутствии 30% метанола. Этанол вызывал более сильное ингибирование активности TSLip1, наблюдавшееся уже при концентрации 5%, внесение этанола до 20% практически полностью ингибировало реакцию.

**Гидролитическая активность TSLip1 в отношении триглицеридов.** В ходе экспериментов по культивированию штамма-продуцента TSLip1 на чашках Петри с добавлением в агар 1% трибутирина в условиях индукции экспрессии липазы было обнаружено образование светлых участков вокруг колоний, что указывает на специфический гидролиз субстрата. В качестве природных триглицеридов для функциональной характеристики TSLip1 использовали растительные масла – оливковое, рапсовое, соевое, кукурузное и подсолнечное. Реакцию гидролиза проводили в смеси 0.1 М фосфатный буфер (pH 7.0) – масло (1 : 1), содержащей 0.01% (вес/объем) липазы при 50°C в течение 2 ч при периодическом перемешивании. Активность липазы измеряли методом титрования, количественно определяя образовавшиеся в результате гидролиза субстрата свободные жирные кислоты. Полученные результаты (рис. 4) пока-





**Рис. 3.** Гидролитическая активность (%) TSLip1. а – в отношении 4-нитрофениловых эфиров с различной длиной цепи (I – C4, II – C5, III – C10, IV – C16), 70°C, 3 мин.

б – зависимость активности TSLip1 от температуры. Субстрат – 4-нитрофенил бутират. Реакцию проводили в течение 2.5 мин, pH 7.0.

в – зависимость активности TSLip1 от pH буфера. Субстрат – 4-нитрофенил бутират. Реакцию проводили в течение 3 мин, 60°C.

г – термостабильность TSLip1 при 80°C. Фермент инкубировали в реакционном буфере с pH 7.0 при 80°C в течение указанного времени, затем проводили реакцию гидролиза с 4-нитрофенил бутиратом при 60°C в течение 3 мин.

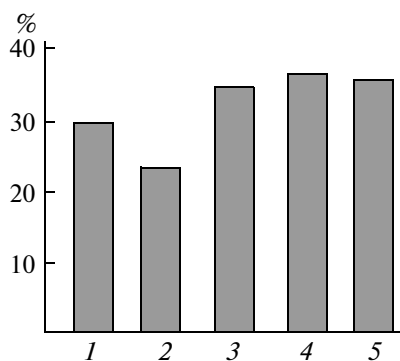
д – зависимость активности TSLip1 от содержания метанола и этанола (%) в реакционной смеси. Субстрат – 4-нитрофенил бутират. Реакцию проводили в течение 3 мин, реакционный буфер с pH 7.0, 70°C.

зывают, что TSLip1 осуществляет гидролиз всех использованных растительных масел, причем максимальная активность наблюдалась в отно-

шении подсолнечного, рапсового и кукурузного масел.

#### Функциональные характеристики и возможные области практического использования TSLip1.

*T. lipolytica* – липолитическая бактерия, растущая в ассоциации с метаногенными археями на триацилглицеридах, а также линейных насыщенных и ненасыщенных жирных кислотах [7]. Способность к росту на липидах предполагает наличие у бактерии липаз, секретируемых в окружающую среду. В результате расшифровки генома этой бактерии мы идентифицировали гены двух потенциальных липаз, аминокислотные последовательности которых содержали N-концевые сигнальные последовательности, наличие которых свидетельствовало о возможности секреции этих белков из клетки. Один из ферментов, TSLip1, был экспрессирован в *E. coli*, очищен и охарактеризован на модельных субстратах (пара-нитрофениловые эфиры) и растительных маслах. Оптимальные для активности рекомбинантной липазы температура 70°C и pH 8.0 примерно соответство-



**Рис. 4.** Гидролиз (%) липазой TSLip1 растительного масла: соевое (1), оливковое (2), кукурузное (3), подсолнечное (4) и рапсовое (5). Реакцию проводили в течение 2 ч, 50°C.

вали оптимальным условиям для роста *T. lipolytica* (диапазон температур от 52 до 70°C с оптимумом 60–66°C, диапазон pH от 7.15 до 9.5 с оптимумом 8.1–8.9). В частности, высокий оптимум pH для активности липазы TSLip1 подтверждает предположение о том, что этот фермент секретируется из клеток *T. lipolytica* и гидролизует липиды в окружающей среде.

Ранее из другого штамма *T. lipolytica* были выделены и функционально охарактеризованы две липазы [8]. Подчеркнем, что оба фермента были выделены непосредственно из культуры *T. lipolytica*, однако кодирующие их гены не были идентифицированы и имеющаяся о них информация ограничивалась N-концевыми аминокислотными последовательностями белков длиной 21–22 а.о. [8]. Сравнение этих последовательностей с аминокислотными последовательностями идентифицированных липолитических ферментов, показало, что найденные ферменты отличаются от ранее описанных, более того, указанные в работе [8] аминокислотные последовательности не встречаются в предсказанных белковых продуктах, кодируемых просеквенированным геномом *T. lipolytica*. Охарактеризованные в работе [8] липазы LipA и LipB отличаются от TSLip1 и по некоторым функциональным характеристикам. Так, эти ферменты обладали более высокой термостабильностью, сохраняя более половины активности после 2 ч инкубации при 100°C. Отметим, что TSLip1 менее термостабильна, причем ее термоинактивация была двухступенчатой, — быстрое снижение активности на протяжении первых минут с последующей более медленной инактивацией, что может отражать присутствие в выделенном из клеток *E. coli* препарате рекомбинантного фермента двух фракций, отличающихся фолдингом белка и (или) присутствием стабилизирующих его кофакторов. В целом, отличия термостабильности TSLip1 и липаз, выделенных непосредственно из *T. lipolytica* могут отражать как различия белков, выделенных из разных штаммов, так и быть связанными с тем, что TSLip1 представляет собой рекомбинантный фермент, экспрессированный в *E. coli* и содержащий N-концевую аффинную последовательность, которая может нарушать фолдинг фермента. Экспрессия и характеристика липазы TSLip1, не содержащей дополнительно включенных аминокислотных последовательностей, позволит прояснить эти вопросы.

Получение биодизеля из растительных масел является одной из перспективных биотехнологий, в которых могут быть использованы термостабильные липазы [5]. Эта реакция может осуществляться либо в одну стадию, в реакции трансэстерификации триглицеридов в присутствии спиртов, либо двустадийно, в реакциях гидроэсте-

рификации проводится гидролиз триглицеридов до глицерина и свободных жирных кислот с помощью липазы, а на второй стадии — эстерификация жирных кислот с образованием биодизеля. Чувствительность TSLip1 к высоким концентрациям метанола и этанола, используемых в реакции трансэстерификации, ограничивает ее применение в этой реакции. Липазы LipA и LipB также не проявляют активности в реакции эстерификации с метанолом или этанолом [6]. Напротив, TSLip1, обладающая достаточно высоким температурным оптимумом и активностью в отношении различных растительных масел, может быть использована при получении биодизеля в реакции гидроэстерификации на стадии гидролиза.

Другой практически значимой характеристикой новой липазы является устойчивость к щелочным условиям, в которых она проявляет максимум активности. Ежегодно около 1000 т липаз используются в качестве компонентов моющих средств (детергентов), в основном, это ферменты из мезофильных организмов [6]. Новая алкалолентная липаза может найти свое применение в этой области биотехнологии, а также при проведении органического синтеза и в пищевой промышленности.

Авторы выражают благодарность В.А. Светличному за предоставленный штамм *T. lipolytica* и рекомендации по условиям его культивирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы, государственный контракт П479). Работа В.М. Гумерова поддержана грантом Фонда содействия отечественной науке.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gupta R., Gupta N., Rathi P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 64. № 6. P. 763–781.
2. Sarda L., Desnuelle P. // Biochim. Biophys. Acta. 1958. V. 30. № 3. P. 513–521.
3. Ghosh P.K., Saxena R.K., Gupta R., Yadav R.P., Davidson W.S. // Science Progress. 1996. V. 79. № 2. P. 119–157.
4. Jaeger K.E., Reetz M.T. // Trends Biotechnol. 1998. V. 16. № 9. P. 396–403.
5. Bisen P.S., Sanodiya B.S., Thakur G.S., Baghel R.K., Prasad G.B. // Biotechnol. Lett. 2010. V. 32. № 8. P. 1019–1030.
6. Salameh M., Wiegel J. // Adv. Appl. Microbiol. 2007. V. 61. P. 253–283.
7. Svetlitsnyi V., Rainey F., Wiegel J. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. V. 46. № 8. P. 1131–1137.
8. Salameh M.A., Wiegel J. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 23. P. 7725–7731.
9. Salameh M.A., Wiegel J. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 36. № 10. P. 1281–1287.

10. Freier D., Mothershed C.P., Wiegel J. // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. № 1. P. 204–211.
11. Besemer J., Borodovsky M. // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33 (Web Server issue). W. 451–454.
12. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. № 17. P. 3389–3402.
13. Gupta R., Rathi P., Gupta N., Bradoo S. // Biotechnol. Appl. Biochem. 2003. V. 37. № 1. P. 63–71.
14. Rooney D., Weatherley L.R. // Process Biochem. 2001. V. 36. № 1. P. 947–953.
15. Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y.J., Chen Z., Dewell S.B., Du L., Fierro J.M., Gomes X.V., Godwin B.C., He W., Helgesen S., Ho C.H., Irzyk G.P., Jando S.C., Alenquer M.L.I., Jarvie T.P., Jirage K.B., Kim J.B., Knight J.R., Lanza J.R., Leamon J.H., Lefkowitz S.M., Lei M., Li J., Lohman K.L., Lu H., Makshijani V.B., McDade K.E., McKenna M.P., Myers E.W., Nickerson E., Nobile J.R., Plant R., Puc B.P., Ronan M.T., Roth G.T., Sarkis G.J., Simons J.F., Simpson J.W., Srinivasan M., Tartaro K.R., Tomasz A., Vogt K.A., Volkmer G.A., Wang S.H., Wang Y., Weiner M.P., Yu P., Begley R.F., Rothberg J.M. // Nature. 2005. V. 437. № 7057. P. 376–380.
16. Blow D. // Nature. 1990. V. 343. № 6260. P. 694–695.
17. Liu A.M.F., Somers N.A., Kazlauskas R.J., Brush T.S., Zocher F., Enzelberger M.M., Bornscheuer U.T., Horsman G.P., Mezzetti A., Schmidt-Dannert C., Schmid R.D. // Tetrahedron Asymmetry. 2001. V. 12. № 4. P. 545–556.
18. Cavalcanti-Oliveira E., da Silva P.R., Ramos A.P., Aranda D.A., Freire D.M. // Enzyme Res. 2011. Article ID 618692.

## Isolation and Functional Characterization of Lipase from the Thermophilic Alkali-Tolerant Bacterium *Thermosyntropha lipolytica*

V. M. Gumerov, A. V. Mardanov, P. M. Kolosov, and N. V. Ravin

*Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

*e-mail: nravin@biengi.ac.ru*

Received November 3, 2011

**Abstract**—As a result of sequencing the genome of the thermophilic alkali-tolerant lipolytic bacterium *Thermosyntropha lipolytica*, the gene encoding a lipase secreted into the medium was identified. The recombinant enzyme was expressed in *Escherichia coli*. It was isolated, purified, and functionally characterized. The lipase exhibited hydrolytic activity toward *para*-nitrophenyl esters of various chain lengths, as well as triglycerides, including vegetable oils. The optimal reaction conditions were achieved at temperatures from 70 to 80°C and pH 8.0. Enzyme saved more than 80% of its activity in the presence of 10% methanol. This new thermostable lipase may be a promising biocatalyst for organic synthesis; it may find application in the food and detergent industry and biodiesel production.

УДК 577.121

## СИНТЕЗ 1-БУТАНОЛА КЛЕТКАМИ *Escherichia coli* ПРИ ФОРМИРОВАНИИ БУТИРИЛ-КоА ГЕТЕРОЛОГИЧНЫМИ ФЕРМЕНТАМИ КЛОСТРИДИЙ И НАТИВНЫМИ ФЕРМЕНТАМИ $\beta$ -ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 2012 г. А. Ю. Гулевич, А. Ю. Скороходова, А. А. Моржакова, С. В. Антонова, А. В. Сухоженко, Р. С. Шакулов, В. Г. Дебабов

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

e-mail: gulevich@genetika.ru

Поступила в редакцию 08.12.2011 г.

Исследован анаэробный биосинтез 1-бутанола из глюкозы рекомбинантными штаммами *Escherichia coli*, формирующими бутирил-КоА под действием гетерологичного ферментативного комплекса клостридий или в результате обращенного действия нативных ферментов пути  $\beta$ -окисления жирных кислот. Обнаружено, что при инактивации основных путей образования уксусной и молочной кислот, за счет делеции генов *ackA*, *pta*, *poxB* и *ldhA*, эффективность биосинтеза бутирил-КоА и его восстановленного продукта 1-бутанола двумя типами рекомбинантных штаммов сравнима. Фактором, лимитирующим продукцию 1-бутанола полученными штаммами, является низкая субстратная специфичность по отношению к бутирил-КоА основной КоА-зависимой алкоголь/альдегид дегидрогеназы *E. coli* AdhE. Сделан вывод, что для конструирования эффективного продуцента 1-бутанола на основе модельного штамма, синтезирующего бутирил-КоА в результате обращенного действия ферментов  $\beta$ -окисления жирных кислот, необходимо обеспечить в клетках штамма интенсивное формирование ацетил-КоА и повышенную активность альтернативных алкоголь- и альдегид-дегидрогеназ.

Бутанол, благодаря своим физико-химическим свойствам, рассматривается как перспективное биотопливо, которое может быть получено из возобновляемого сырья [1]. Природными продуцентами 1-бутанола являются представители рода *Clostridium*. *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum* и др. способны сбраживать сахара с образованием смеси ацетона, 1-бутанола и этанола (так называемый **АБЭ-процесс**). Однако использование АБЭ-процесса для продукции 1-бутанола в настоящее время экономически не выгодно. Были предприняты попытки конструирования продуцентов 1-бутанола путем клонирования генов, кодирующих ферменты биосинтеза бутанола клостридий, в клетках *Escherichia coli* [2–4], *Bacillus subtilis* [4], *Pseudomonas putida* [4], *Saccharomyces cerevisiae* [5], *Lactobacillus brevis* [6]. Ключевым моментом во всех работах было обеспечение возможности биосинтеза этими микроорганизмами бутирил-КоА – метаболита в норме ими не образуемого. Недавно было показано, что в клетках *E. coli* биосинтез бутирил-КоА с последующим образованием масляной кислоты [7] или 1-бутанола [8–9] возможен в результате обращения нативного для клеток пути  $\beta$ -окисления жирных кислот. Цикл  $\beta$ -окисления жирных кислот является одним из основных биохимических путей, встречающимся во множестве организмов, и это значительно расширяет спектр

потенциальных продуцентов 1-бутанола и других высших спиртов. Формирующиеся в результате обращения  $\beta$ -окисления жирных кислот ацил-КоА-производные (в частности, бутирил-КоА) могут быть восстановлены в соответствующие спирты (в простейшем случае 1-бутанол) эндогенными КоА-зависимыми алкоголь/альдегид дегидрогеназами, также весьма широко распространенными ферментами.

Цель работы – сравнение эффективности биосинтеза 1-бутанола клетками *E. coli* при формировании бутирил-КоА гетерологичным ферментативным комплексом клостридий и нативными ферментами пути  $\beta$ -окисления жирных кислот.

### МЕТОДИКА

**Бактериальные штаммы, плазмиды и среды.** Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195) и ранее сконструированный штамм *E. coli* VOX-3 [9], способный синтезировать 1-бутанол по обращенному пути  $\beta$ -окисления жирных кислот, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе штаммов. Используемые в работе штаммы и плазмиды представлены в табл. 1. Бактерии культивировали в богатых средах LB, SOB, SOC и минимальной среде M9 [10], при необходимости с добавле-

Таблица 1. Использованные штаммы и плазмиды

Объект	Генотип	Ссылка
<b>Штамм</b>		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
MG Δ2	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i>	Данная работа
MG Δ3	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i>	»
MG Δ4	<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i>	»
MG [pHYc- <i>thl-bcs</i> ]	MG 1655 + pYHyc- <i>thl-bcs</i>	»
MG Δ2 [pYHyc- <i>thl-bcs</i> ]	MG Δ2 + pYHyc- <i>thl-bcs</i>	»
MG Δ3 [pYHyc- <i>thl-bcs</i> ]	MG Δ3 + pYHyc- <i>thl-bcs</i>	»
MG Δ4 [pYHyc- <i>thl-bcs</i> ]	MG Δ4 + pYHyc- <i>thl-bcs</i>	»
BOX-3	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> <sup>Q</sup>	[9]
	<i>P</i> <sub><i>tre-ideal-4</i></sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>adhE</i> (Glu568Lys), <i>P</i> <sub><i>tre-ideal-4</i></sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>atoB</i> , <i>P</i> <sub><i>tre-ideal-4</i></sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fadB</i> , <i>P</i> <sub><i>tre-ideal-4</i></sub> -SD <sub>φ10</sub> - <i>fadE</i>	
BOX-3 Δ2	BOX-3 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i>	Данная работа
BOX-3 Δ3	BOX-3 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i>	»
BOX-3 Δ4	BOX-3 Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i>	»
<b>Плазмида</b>		
pMW118-( <i>λattL</i> -Cm- <i>λattR</i> )	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>λattL-cat-λattR</i> cassette	[12]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , <i>P</i> <sub><i>araB</i></sub> - <i>λgam-bet-exo</i>	[11]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , <i>P</i> <sub>R</sub> - <i>λxis-int</i> , <i>cIts857</i>	[13]
pYHyc	pYH300PLK, <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>ori-pAMA1</i> , <i>ori-177</i>	[14]
pYHyc- <i>thl-bcs</i>	pYHyc с клонированными генами <i>crt</i> , <i>bcd</i> , <i>etfB</i> , <i>etfA</i> , <i>hbd</i> и <i>thlA</i> из <i>C. acetobutylicum</i>	[6]

нием ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

**Реагенты.** Использовали препараты рестриктаз и Т4 ДНК-лигазы (“Fermentas”, Литва), ДНК полимеразы Taq (“Fermentas”, Литва) и Phusion (“Finnzymes”, Финляндия). Олигонуклеотиды (табл. 2) синтезировали в ЗАО “Синтол” (Россия). Полученные ПЦР-продукты очищали с помощью электрофореза в агарозном геле и выделяли, используя QIAquick Gel Extraction Kit (“Qiagen”, США). Компоненты питательных сред, соли и другие реагенты были производства “Panreac” (Испания) и “Sigma” (США).

**Конструирование штаммов и плазмид.** Все хромосомные модификации осуществляли с использованием методики, разработанной Даценко и Ваннер [11]. Линейные фрагменты ДНК для инактивации генов *ackA-pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE*, содержащие маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием пар праймеров P1, P2; P5, P6; P9, P10; P13, P14 и плазмиды pMW118-(*λattL*-Cm-*λattR*) [12] в качестве матрицы.

Полученные фрагменты ДНК были по отдельности интегрированы в хромосому штамма *E. coli*

MG1655, несущего плазмиду-помощника pKD46. Последующее удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами (attachment) фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [13]. Факт соответствия предполагаемых и полученных экспериментально структур хромосом отобранных штаммов, с индивидуально инактивированными генами *ackA-pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE*, подтверждали ПЦР-анализом с помощью пар локус-специфичных праймеров P3, P4; P7, P8; P11, P12 и P15, P16 соответственно. Делеции генов *ackA-pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE* были объединены в хромосомах целевых штаммов серией последовательных P1-зависимых трансдукций [10].

Трансформацию штаммов плазмидами pYHyc [14] и pYHyc-*thl-bcs* [6] осуществляли по стандартной методике.

**Культивирование штаммов для биосинтеза 1-бутанола.** Клетки штамма *E. coli* дикого типа MG1655, а также клетки всех рекомбинантных штаммов выращивали в течение ночи в среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37°C. По 5 мл полученных ночных культур разбавляли в 50 раз, добавляя 45 мл среды M9, содержащей 10 г/л глюкозы. Полу-

Таблица 2. Используемые в работе олигонуклеотидные праймеры

Название	Последовательность
P1	5'-catgtcgagtaagtagtactggttctgaactgcgg-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac-3'
P2	5'-ttactgctgctgtgcagactgaatcgagtcagcgc-tgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P3	5'-cagtgcgatggttaatacataaatgt-3'
P4	5'-atgcagcgcagttaagcaag-3'
P5	5'-catgaaacaacgggtgcagcttatatcgccaaaac-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac-3'
P6	5'-ttaccttagccagttgttttcgccagttgatcac-tgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P7	5'-gtcagatgaactaaactgttaccg-3'
P8	5'-ggccatcatcgcttcgag-3'
P9	5'-tatgaaactcggctttatagcacaacagtagcga-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac-3'
P10	5'-ttaaccagttcgttcggcaggttcgcttttc-tgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P11	5'-gtggcatgttaaccgttcag-3'
P12	5'-gccatcagcaggcttagc-3'
P13	5'-tatgctgttactaatgtcgtgaactaacgcact-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac-3'
P14	5'-ttaagcggatttttcgctttttctcagcttagc-tgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P15	5'-cagtgagtgtagcgcgag-3'
P16	5'-gaagccgttatagtcctcag-3'

ченные культуры растили в колбах объемом 750 мл при 37°C на роторной качалке при 250 об/мин в течение 6 ч. В случае штамма ВОХ-3 и его производных спустя 3 ч от начала инкубации в среды культивирования добавляли изопропил-β-D-тио-галактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ. Полученные клеточные суспензии центрифугировали в течение 15 мин при 2000 g при 4°C. Осадки ресуспендировали в 15 мл среды М9 или LB, содержащих 10 г/л глюкозы. Инкубацию полученных клеточных культур проводили в течение 24 ч в пробирках объемом 15 мл, закрытых заворачивающимися крышками, при 37°C на роторной качалке при 150 об/мин в присутствии 1 мМ ИПТГ для штамма ВОХ-3 и его производных и 100 мкг/мл ампициллина для штаммов, содержащих плазмиды.

**Аналитические методы.** Концентрацию органических кислот и остаточной глюкозы в культуральных жидкостях определяли методом ВЭЖХ с использованием системы HPLC “Waters” (США). Для измерения концентрации органических кислот использовали ReproSil-Pur C18-AQ (“Dr. Maisch”, Германия) с детекцией при длине волны 210 нм. Для измерения концентрации глюкозы система была укомплектована рефрактивным детектором “Waters” 2414 и колонкой Spherisorb-NH2 (“Waters”, США). Концентрации 1-бутанола и этанола в культуральных жидкостях определяли методом ГХ с пламенно-ионизационным детектором на колонке OmegaWax (30 м, 0.25 мм в.д., 0.25 мкм толщина пленки) (“Supelco”, США). Использовали хроматограф GC-17A (“Shimadzu”, Япония), оснащенный автосамплером АОС-20i.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Биосинтез бутирил-КоА в клетках штамма *E. coli* дикого типа MG1655 и в его производных был обеспечен за счет экспрессии, в составе плазмиды, генов: *thlA*, кодирующего ацетил-КоА ацетилтрансферазу (КФ 2.3.1.8), *hbd*, кодирующего 3-гидроксибутирил-КоА дегидрогеназу (КФ 1.1.1.157), *crt*, кодирующего 3-гидроксибутирил-КоА дегидратазу (КФ 4.2.1.55), *bcd*, кодирующего бутирил-КоА дегидрогеназу (КФ 1.3.99.2) и *etfA* и *etfB*, кодирующих компоненты электрон-транспортного флавопротеина из *C. acetobutylicum*. У штамма ВОХ-3 и его производных синтез бутирил-КоА осуществлялся ферментами пути аэробного β-окисления жирных кислот при индукции экспрессии хромосомальных копий соответствующих генов, находящихся под контролем LacI-зависимого промотора [9]. Двухстадийное восстановление сформированного бутирил-КоА в 1-бутанол в штаммах катализировалось нативной алкоголь/альдегид дегидрогеназой *E. coli* AdhE (КФ 1.1.1.1/1.2.1.3).

При анаэробной утилизации глюкозы штамм MG [pHYc-*thl-bcs*], содержащий гетерологичные гены кластридий, и штамм ВОХ-3, не содержащий гетерологичных генов, синтезировали заметные количества 1-бутанола (табл. 3). Штамм MG1655 и его производные, содержащие плазмиду рHУс, не синтезировали детектируемых количеств 1-бутанола. Количество 1-бутанола, продуцируемое штаммом MG [pHYc-*thl-bcs*], значительно превосходило, образуемое штаммом ВОХ-3. Данный факт, по-видимому, объяснялся различным

**Таблица 3.** Концентрации\* метаболитов, продуцируемых сконструированными штаммами в условиях анаэробной утилизации глюкозы

Штамм	Потребленная глюкоза, мМ	Кислота, мМ				Этанол, мМ	1-Бутанол, мкМ
		пировиноградная	молочная	уксусная	янтарная		
MG [pH <sub>Yc</sub> - <i>thl</i> - <i>bcs</i> ]	24.0 (0.5)	0.5 (0.1)	6.1 (0.2)	10.0 (0.5)	1.6 (0.1)	10.2 (0.3)	170.0 (7.2)
VOX-3	22.8 (0.6)	0.2 (0.1)	6.1 (0.2)	11.5 (0.6)	1.5 (0.1)	7.2 (0.2)	12.1 (0.8)
MG Δ2 [pH <sub>Yc</sub> - <i>thl</i> - <i>bcs</i> ]	27.2 (0.9)	1.0 (0.2)	11.8 (0.3)	—	4.8 (0.2)	6.7 (0.2)	70.2 (3.4)
VOX-3 Δ2	26.1 (0.7)	0.7 (0.1)	12.9 (0.4)	—	4.1 (0.2)	5.8 (0.2)	—
MG Δ3 [pH <sub>Yc</sub> - <i>thl</i> - <i>bcs</i> ]	20.0 (0.5)	23.4 (0.5)	0.6 (0.1)	0.7 (0.1)	4.1 (0.2)	9.7 (0.3)	153.8 (6.8)
VOX-3 Δ3	21.6 (0.5)	25 (0.4)	0.8 (0.1)	1.2 (0.1)	3.1 (0.2)	7.4 (0.2)	137.0 (6.3)
MG Δ4 [pH <sub>Yc</sub> - <i>thl</i> - <i>bcs</i> ]	3.3 (0.2)	3.4 (0.2)	—	—	0.5 (0.1)	0.4 (0.1)	—
VOX-3 Δ4	3.3 (0.2)	3.7 (0.2)	—	—	0.7 (0.1)	0.7 (0.1)	—

\* Указанные значения являются средними для трех независимых экспериментов. В скобках указаны стандартные отклонения.

количеством в штаммах копий генов, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза бутирил-КоА. У штамма MG [pH<sub>Yc</sub>-*thl*-*bcs*] соответствующие гены экспрессировались в составе плазмиды, тогда как в штамме VOX-3 каждый ген, кодирующий фермент, участвующий в биосинтезе 1-бутанола, был представлен единственной хромосомной копией. Тем не менее, количество 1-бутанола, продуцируемое обоими штаммами, было невелико. В первую очередь, это связано с нехваткой ацетил-КоА для эффективного биосинтеза ацетоацетил-КоА и формирования дальнейших необходимых для образования целевого вещества предшественников. Действительно, практически вся потребленная штаммами глюкоза была утилизирована в продукты брожения под действием ферментов, вовлеченных в биохимические пути, конкурирующие с биосинтезом 1-бутанола за восстановленные эквиваленты и за прямые метаболические предшественники. При этом основным продуктом была уксусная кислота, при формировании которой под действием фосфотранс-ацетилазы Pta (КФ 2.3.1.8) и ацетаткиназы AckA (КФ 2.7.2.1) расходуется ацетил-КоА, а под действием пируватоксидазы PoxB (КФ 1.2.5.1), его прямой метаболический предшественник — пировиноградная кислота. Таким образом, для сбережения ацетил-КоА и повышения его доступности для биосинтеза 1-бутанола инактивировали в штаммах гены *pta*, *ackA* и *poxB*, кодирующие ферменты, катализирующие в клетках *E. coli* основные реакции образования уксусной кислоты.

В результате инактивации соответствующих генов штаммы MG Δ2 [pH<sub>Yc</sub>-*thl*-*bcs*] и VOX-3 Δ2 при анаэробном сбраживании глюкозы не синтезировали детектируемых количеств уксусной кислоты, однако демонстрировали увеличенное образование продуктов — производных фосфоенолпирувата (янтарная кислота) и пировино-

градной кислоты (молочная кислота). При этом наблюдалось снижение продукции штаммами этанола и 1-бутанола. В случае штамма VOX-3 Δ2 продукции 1-бутанола не отмечалось. Можно было предположить, что падение эффективности биосинтеза штаммами спиртов, формирующихся в результате восстановления ацетил-КоА или его производного бутирил-КоА, было обусловлено двумя взаимосвязанными причинами. Первая причина — снижение интенсивности потока углерода через ацетил-КоА в результате инактивации фосфотранс-ацетилазы Pta и ацетаткиназы AckA, а также в результате возросшего расхода его метаболических предшественников — фосфоенолпирувата и пировиноградной кислоты на синтез соответственно янтарной и молочной кислот. Вторая причина — снижение относительной доступности необходимых для биосинтеза спиртов восстановленных НАДН эквивалентов. Действительно, для формирования одной молекулы этанола из ацетил-КоА необходимо 2 молекулы НАДН, в то время как для образования одной молекулы 1-бутанола из двух молекул ацетил-КоА необходимо 4 восстановленных эквивалента. В отсутствие кислорода формирование из глюкозы двух молей пировиноградной кислоты сопровождается генерацией только двух молей гликолитического НАДН. При этом формирование молочной кислоты из пировиноградной сопровождается окислением эквивалентного количества НАДН, а образование янтарной кислоты из фосфоенолпирувата в восстановительной части цикла трикарбоновых кислот требует двукратного молярного избытка восстановленных эквивалентов. По этой причине, а также в силу того, что недавно была показана значимость для биосинтеза 1-бутанола “движущих сил” ацетил-КоА и НАДН [15], инактивировали в штаммах ген *ldhA*, кодирующий лактатдегидрогеназу LdhA (КФ 1.1.1.28), для повышения относи-

тельной доступности для биосинтеза 1-бутанола восстановленных НАДН эквивалентов.

Полученные штаммы MG Δ3 [pHyc-*thl-bcs*] и ВОХ-3 Δ3 более половины утилизированной глюкозы экскретировали в среду в виде пировиноградной кислоты, тем самым повышая доступность гликолитически сформированных НАДН для биосинтеза 1-бутанола из “остаточных” метаболитов предшественников. Действительно, биосинтез 1-бутанола штаммами MG Δ3 [pHyc-*thl-bcs*] и ВОХ-3 Δ3 возрос относительно штаммов MG Δ2 [pHyc-*thl-bcs*] и ВОХ-3 Δ2. При этом продукция 1-бутанола штаммами MG Δ3 [pHyc-*thl-bcs*] и ВОХ-3 Δ3 практически не отличалась. Данный результат свидетельствовал о том, что формирование бутирил-КоА в клетках *E. coli* в результате обращенного действия ферментов нативного пути β-окисления жирных кислот может быть сравнимо по эффективности с формированием этого метаболита под действием гетерологического ферментативного комплекса кластридий. Недавно эффективное образование в клетках *E. coli* ацил-КоА производных в результате обращения цикла β-окисления жирных кислот было показано при суперэкспрессии ключевых генов в составе плазмид [8]. Полученные нами результаты свидетельствовали о достаточности, при создании благоприятных условий, единичных хромосомных копий генов, кодирующих ферменты β-окисления жирных кислот, для эффективного биосинтеза бутирил-КоА в клетках *E. coli*.

Тем не менее количества 1-бутанола, синтезированные штаммами MG Δ3 [pHyc-*thl-bcs*] и ВОХ-3 Δ3 оставались низкими и не сравнимыми с количествами продуцируемого штаммами этанола. Причиной этому служило то, что ацетил-КоА является для алкоголь/альдегид дегидрогеназы AdhE гораздо более предпочтительным субстратом, нежели бутирил-КоА [2]. Однако алкоголь или альдегид-дегидрогеназную активность в клетках *E. coli* могут проявлять также и другие ферменты, такие, как, например, AdhP (КФ 1.1.1.1), YqhD (КФ 1.1.1.-), MhpF (КФ 1.2.1.10) и др. В норме активность данных ферментов в клетках не проявляется, но может активироваться в рекомбинантных штаммах. Так, в частности, остаточный биосинтез штаммами MG Δ3 [pHyc-*thl-bcs*] и ВОХ-3 Δ3 уксусной и молочной кислот с учетом инактивации основных путей их биосинтеза был обусловлен, по всей видимости, активацией действия альтернативных ферментов, таких, как ацил-КоА тиоэстераза YciA (КФ 3.1.2.20), ацетальдегиддегидрогеназа MhpF (КФ 1.2.1.10), альдегиддегидрогеназа AldB (КФ 1.2.1.4) и лактальдегид дегидрогеназа AldA (КФ 1.2.1.22). Таким образом, алкоголь/альдегид дегидрогеназа AdhE была инактивированна в клетках рекомбинантных штаммов.

Однако в результате такой модификации анаэробная утилизация глюкозы полученными штаммами MG Δ4 [pHyc-*thl-bcs*] и ВОХ-3 Δ4 резко снизилась. Можно было предположить, что фоновой активности альтернативных алкоголь- и альдегид-дегидрогеназ было недостаточно для эффективного биосинтеза спиртов, о чем свидетельствовало отсутствие в средах культивирования штаммов 1-бутанола и присутствие лишь незначительных количеств этанола. В результате сниженная интенсивность реокисления гликолитического НАДН в клетках рекомбинантных штаммов ограничивала их способность к анаэробному потреблению глюкозы. Очевидно, что для обеспечения в клетках модифицированных штаммов повышенной активности целевых алкоголь- и альдегид-дегидрогеназ требуется направленное изменение в хромосоме регуляторных областей кодирующих их генов.

Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что формирование в клетках *E. coli* бутирил-КоА в результате обращенного действия собственных ферментов пути β-окисления жирных кислот может быть, как минимум, не менее эффективным, чем катализируемое гетерологичным ферментативным комплексом кластридий. При этом для эффективного биосинтеза данного метаболита не требуется суперэкспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты, в составе плазмид. Данные, полученные в ходе характеристики рекомбинантных штаммов, позволили заключить, что для конструирования на основе модельного штамма ВОХ-3 Δ4 эффективного продуцента 1-бутанола необходимо обеспечить в клетках штамма повышенную интенсивность образования ацетил-КоА и достаточную активность специфичных алкоголь- и альдегид-дегидрогеназ, катализирующих терминальные стадии восстановления бутирил-КоА в целевой продукт.

Авторы выражают благодарность сотруднице ГосНИИгенетика Березиной О.В. за предоставленные препараты плазмид pHyc и pHyc-*thl-bcs*.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ФГУП “ГосНИИгенетика” при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 10-04-00766-а и 11-04-91184-ГФЕН\_а) и Министерства образования и науки РФ (ГК № 16.552.11.7029).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dürre P. // Biotechnol. J. 2007. V. 2. № 12. P. 1525–1534.
2. Atsumi S., Cann A.F., Connor M.R., Shen C.R., Smith K.M., Brynildsen M.P., Chou K.J., Hanai T., Liao J.C. // Metab. Eng. 2008. V. 10. № 6. P. 305–311.
3. Inui M., Suda M., Kimura S., Yasuda K., Suzuki H., Toda H., Yamamoto S., Okino S., Suzuki N., Yukawa H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 77. № 6. P. 1305–1316.



4. Nielsen D.R., Leonard E., Yoon S.H., Tseng H.C., Yuan C., Prather K.L. // *Metab. Eng.* 2009. V. 11. № 4–5. P. 262–273.
5. Steen E.J., Chan R., Prasad N., Myers S., Petzold C.J., Redding A., Ouellet M., Keasling J.D. // *Microb. Cell. Fact.* 2008. doi:10.1186/1475-2859-7-36.
6. Berezina O.V., Zakharova N.V., Brandt A., Yarotsky S.V., Schwarz W.H., Zverlov V.V. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 87. № 2. P. 635–646.
7. Серегина Т.А., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г., Мионов А.С. // *Биотехнология.* 2009. № 6. С. 24–35.
8. Dellomonaco C., Clomburg J.M., Miller E.N., Gonzalez R. // *Nature.* 2011. V. 476. № 7360. P. 355–359.
9. Gulevich A.Y., Skorokhodova A.Y., Sukhozhenko A.V., Shakulov R.S., Debabov V.G. // *Biotechnol. Lett.* 2011. doi: 10.1007/s10529-011-0797-z.
10. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* 2nd Ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
11. Datsenko K.A., Wanner B.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
12. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Машко С.В. // *Мол. биология.* 2005. Т. 39. № 5. С. 823–831.
13. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М., Зименков Д.В., Бирюкова И.В., Машко С.В. // *Мол. биология.* 2009. Т. 43. № 3. С. 547–557.
14. Iijima K., Suzuki K., Ozaki K., Yamashita H. // *J. Appl. Microbiol.* 2006. V. 100. № 6. P. 1282–1288.
15. Shen C.R., Lan E.I., Dekishima Y., Baez A., Cho K.M., Liao J.C. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. № 9. P. 2905–2915.

## 1-Butanol Synthesis by *Escherichia coli* Cells Through Butyryl-CoA Formation by Heterologous Enzymes of Clostridia and Native Enzymes of Fatty Acid $\beta$ -Oxidation

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

*All-Russia Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms,  
Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 113545 Russia*

*e-mail: gulevich@genetika.ru*

Received December 8, 2011

**Abstract**—Anaerobic biosynthesis of 1-butanol from glucose is investigated in recombinant *Escherichia coli* strains which form butyryl-CoA using the heterologous enzyme complex of clostridia or as a result of a reversal in the action of native enzymes of the fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway. It was revealed that when the basic pathways of acetic and lactic acid formation are inactivated due to deletions in the *ackA*, *pta*, *poxB*, and *ldhA* genes, the efficiency of butyryl-CoA biosynthesis and its reduced product, i.e., 1-butanol, by two types of recombinant strains is comparable. The limiting factor for 1-butanol production by the obtained strains is the low substrate specificity of the basic CoA-dependent alcohol/aldehyde AdhE dehydrogenase from *E. coli* to butyryl-CoA. It was concluded that, in order to construct an efficient 1-butanol producer based on a model strain synthesizing butyryl-CoA as a result of a reversal in fatty acid  $\beta$ -oxidation enzymes, it is necessary to provide intensive formation of acetyl-CoA and enhanced activity of alternative alcohol and aldehyde dehydrogenases in the cells of a strain.

UDC 576.8:577.150

## PUTATIVE DOWN-STREAM SIGNALING MOLECULE OF GTPase IN *Porphyromonas gingivalis*

© 2012 M.-J. Chun, K.-J. Park, S.-H. Ohk

Department of Oral Microbiology, 2nd Stage of Brain Korea 21 for School of Dentistry, Chonnam National University, Gwangju, 500-757, Korea e-mail: shohk@chonnam.ac.kr

Received August 26, 2011

*Porphyromonas gingivalis* is a strict anaerobic bacterium mainly responsible for periodontal disease in oral cavity. Putative GTPase gene (*pgp*) of this bacterium was cloned and its recombinant protein (rPGP) was produced in *Escherichia coli*. Based on the amino acid sequence of SGP that is a GTP-binding protein of *Streptococcus mutans*, putative GTPase amino acid sequence was deduced in the data base of genome sequences of *Porphyromonas gingivalis*. A 900-bp PCR fragment was amplified with *P. gingivalis* genomic DNA as a template and cloned into *E. coli* JM109. Then *pgp* was transferred into pQE-30 expression vector to make pQE-PGP for production of rPGR. This protein was produced and purified by Ni-NTA affinity column chromatography. Anti-PGP antibody was also produced in Sprague Dawley rats. Using Westernblot analysis with this antibody, it was confirmed that the rPGP produced in *E. coli* was identical to that of donor strain. Furthermore, by Southernblot analysis it was revealed that the *pgp* was originated from *P. gingivalis*. By immunoprecipitation with anti-PGP antibody and N-terminal amino acid sequence analysis it was found that PGP was able to bind to acetate kinase, which was reported to be a secondary signaling-molecule in anaerobic microorganisms. Therefore, these results imply that *P. gingivalis* produces putative GTPase and this protein might play a potential role in signaling pathway in oral biofilm formation.

*Porphyromonas gingivalis* is one of the most well-known bacteria that cause periodontal disease. It is often found in odontogenic abscess of periodontitis patients [1]. Infection of this organism often induces the activation of osteoclastic cells resulting bone resorption [2]. Controlling this organism in oral health is important because it is associated with not only in periodontal disease but also cardiovascular disease [3]. Furthermore, the formation of oral plaque usually does not arise with single organism. Oral plaque is a microbial biofilm formed by organisms tightly bound to each other and to the solid surface of teeth by means of an exopolymer matrix into which they are embedded [4]. Organisms in biofilm compose a unique ecosystem in human oral cavity where they can successfully coexist and thrive. Characteristics of this biofilm suggest that oral bacteria may have developed some sophisticated interspecies communication mechanisms [5]. Besides that, the most of bacterial species have developed their own signaling pathways to detect environmental conditions.

GTP-binding proteins (G-proteins) are considered as ubiquitous in signaling events not only eukaryotic but also prokaryotic cells [6]. Their genes are known as essential genes for survival since several attempts to mutate this gene have been unsuccessful [7]. Several types of G-proteins were also found in prokaryotes such as *Escherichia coli* [8] and *Streptococcus mutans* [9]. Since G-protein from *S. mutans* (SGP) showed significant sequence identity with the *E. coli* Ras-like protein (Era) [8], we have searched a

putative GTPase gene in *P. gingivalis* based on the amino acid homology between Era and SGP. This putative gene of *P. gingivalis* G-protein (PGP) was cloned and characteristics of the purified recombinant PGP (rPGP) were investigated in this report.

### MATERIALS AND METHODS

**Bacteria strains.** *Porphyromonas gingivalis* 381 was used as a donor strain (laboratory stock) for the cloning of GTPase gene. BHI (Brain Heart Infusion) broth (Becton Dickinson, USA) containing 0.1% vitamin K<sub>1</sub> (Sigma, USA) and 1% Hemin (Sigma, USA) was used for the cultivation of the bacterium. *P. gingivalis* was grown at 37°C in anaerobic chamber (Forma Scientific, USA) with 85% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, and 5% CO<sub>2</sub> mixed gas. *E. coli* JM109 (Promega Co., USA) was used for the cloning of the PGP gene and *E. coli* M15 (QIAGEN, USA) was used for the expression of fusion protein.

**Cloning *pgp* and expression of PGP.** Putative *pgp* gene was amplified using PCR technique with *P. gingivalis* genomic DNA as a template. A SGP homologous sequence of *P. gingivalis* W83 was identified by searching The Institute for Genomic Research database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) with the amino acid sequence of *S. mutans*. A pair of primers, PGP-F (5'-AAGGA TCC ATG CAA GTA GAG GAG TCC-3') and PGP-R (5'-GG AAG CTT CTA ATC CAA CTG ATA GCC-3'), were designed based upon the se-

quence of *pgp* gene of *P. gingivalis* and used for amplifying and cloning.

About 0.9 kbp of PCR fragment was digested with *Bam*HI and *Hind*III and ligated into the multi cloning site of pQE-30 expression vector (QIAGEN, USA) which was also digested with *Bam*HI and *Hind*III. The resulting 4.3 kbp plasmid vector was designated as pQE-PGP and transformed into *E. coli* M15 which harboring pREP4 vector.

For expression of PGP protein, 5 ml of the overnight culture of *E. coli* M15 (pQE-PGP) was inoculated into 200 ml of LB broth containing 0.1 mg/ml of ampicillin and 0.025 mg/ml of kanamycin. After 2 h of the incubation at 37°C with vigorous agitation OD<sub>660</sub> of the culture broth reached about 0.5. To induce the expression of PGP, 2 ml of 100 mM of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to make 1 mM of final concentration and incubated 4 h. The culture broth was then harvested and applied to SDS-PAGE analysis and further purification steps.

**Purification of recombinant PGP.** Purification of rPGP was carried out by the method of manufacturer's manual with slight modifications. Briefly, the bacterial cell pellet was suspended in 10 ml of lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) and disrupted with sonication (Vibra cell VCX-600, Sonics and Materials Inc., USA) for 5 min with a pulse (on: 5 s, off: 5 s) followed by centrifugation at 10000 g for 30 min at 4°C. Supernatant was saved for the following purification steps. It was loaded on 10 ml of Ni-NTA agarose resin was packed in a small column (14 × 50 mm) and the flow-through fractions were collected from the column. The column was washed with 40 ml of washing buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0) 3 times and the protein bound to the resin was eluted with 10 ml of elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0) 4 times. All the purification steps were carried out at 4°C.

**Preparation of anti-PGP polyclonal antibody.** Eight weeks-old female Sprague Dawley (SD) rats (180–200 g) were used for the preparation of anti-PGP polyclonal antibody. First, 0.3 mg of PGP mixed with same volume of complete Freund's adjuvant (Sigma, USA) injected in the abdominal cavity of the rats with 18-gauge needles. The same boost injection was carried out 2 weeks later. To confirm the formation of anti-PGP antibody, serum was collected from the tail of the rats and applied for the dot blot with nitrocellulose membrane (Pierce, USA). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (Pierce, USA) was used to confirm the production of antibody. After 25 days of the primary injection rats were sacrificed and serum was collected.

**Immunoprecipitation.** To prepare cell extract of *P. gingivalis*, bacterial culture was harvested by centrifugation at 10000 g for 5 min in the middle of logarithmic phase and disrupted by sonication for 5 min with

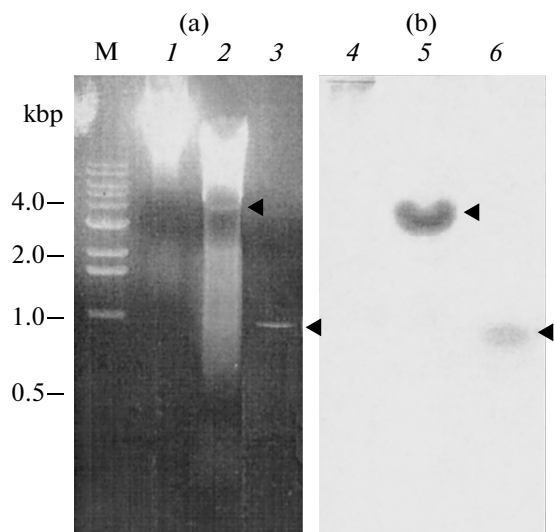
a pulse (on: 5 s, off: 5 s). After centrifugation at 10000 g for 30 min at 4°C, the supernatant was collected. For immunoprecipitation, 0.05 ml of anti-PGP antibody and 0.1 ml of protein A-agarose beads (Sigma, USA) were added to 0.15 ml of the cell extract. The protein mixture was incubated at 4°C for 1 h with brief shaking. After centrifugation of the mixture at 10000 g for 15 min, the pellet was collected and washed three times with 10 mM PBS (pH 7.4) and kept at 4°C until use.

**Southernblot analysis.** Partially digested chromosomal DNA with *Hind*III was applied to agarose gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membrane (Pierce, USA) by capillary transfer method [10]. About 0.9 kbp of *pgp* gene digested with *Bam*HI and *Hind*III from pQE-PGP was labeled with digoxigenin (Roche, Germany) to use as a probe. Probe was denatured at 95°C for 5 min, cooled rapidly on ice and hybridized to the membrane at 55°C for more than 20 h by method described above. After hybridization the membrane was washed with 2 × SSC (150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0) supplemented with 0.1% SDS twice and 0.5 × SSC with 0.1% SDS twice at 65°C (15 min for each wash). Anti-digoxigenin-AP conjugate (Roche, Germany) was diluted with 10 ml of blocking buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5 with 0.3% Tween 20 and 1% blocking reagent with 1.0 : 5,000 ratio and applied to the membrane for 30 min at room temperature. Development of the membrane was carried out with 200 μl of NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate) solution as a substrate.

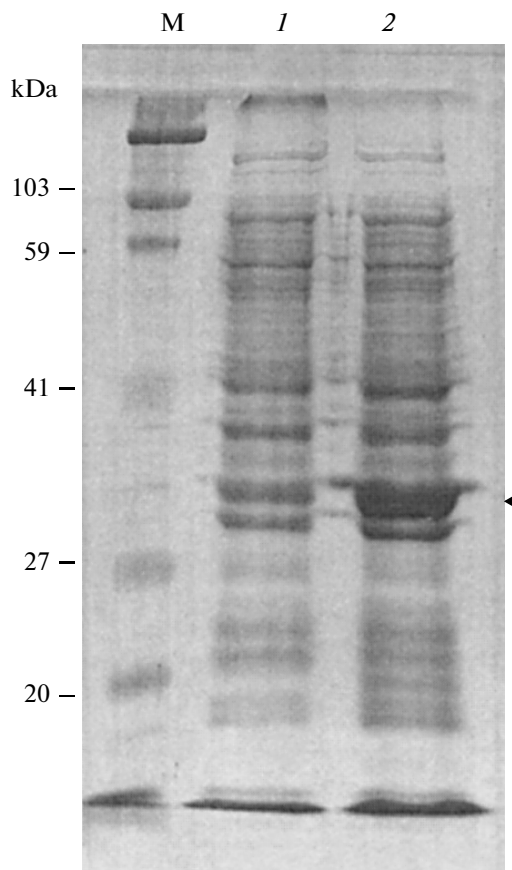
**Westernblot analysis.** Bacterial cell extracts and rPGP were applied to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Anti-PGP antibody was used a primary antibody with 1 : 100 ratio in a blocking buffer (0.2 M Tris-HCl pH 7.6 with 1.37 M NaCl, 0.1% Tween 20 and 2% non-fat dry milk). HRP (horseradish peroxidase)-conjugated goat anti-rat IgG (Pierce, USA) was used as a secondary antibody with 1 : 2,000 ratio in the blocking buffer. Development was carried out with 0.5 mg/ml of 4-chloro-1-naphthol (Sigma, USA) and 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## RESULTS

Based on the amino acid sequence of a GTP-binding protein of *S. mutans* (SGP) [7, 9–12] the putative GTPase amino acid sequence was deduced in the data base of genome sequences of *P. gingivalis*. About 900-bp PCR fragment was, first, amplified with the *P. gingivalis* genomic DNA as a template and cloned into *E. coli* JM109. The structural fragment of *pgp* was, then, cut out and ligated into pQE-30 expression vector to make pQE-PGP for production of rPGP. It was transformed into *E. coli* M15 which harboring pREP4 vector. By Southernblot analysis it was confirmed that the *pgp* was originated from *P. gingivalis* (Fig. 1).



**Fig. 1.** Southern hybridization analysis of the *P. gingivalis* chromosomal DNA with recombinant plasmid pQE-PGP. a – chromosomal DNA from *P. gingivalis* and pQE-PGP fragments separated on 1.0% agarose gel; b – Southern blot analysis. M – molecular weight markers; 1, 4 – chromosomal DNA digested with *EcoRI*; 2, 5 – pQE-PGP plasmid digested with *HindIII* and *BamHI*; 3, 6 – 0.9 kbp fragment of *pgp*. The position of the *pgp* is indicated by arrowheads.



**Fig. 2.** Expression of PGP in *E. coli* M15. SDS-PAGE with 10% of acrylamide gel was carried out with cell extract of *E. coli* M15 carrying pQE-PGP plasmid and stained with Coomassie brilliant blue R-250. M – molecular weight markers; 1 – cell extract of *E. coli* M15 carrying pQE-PGP plasmid without induction; 2 – cell extract of *E. coli* M15 carrying pQE-PGP plasmid induced with 1 mM IPTG. rPGP expressed in *E. coli* was indicated by an arrowhead.

rPGP was produced and purified by Ni-NTA affinity column chromatography. *E. coli* M15 that harboring pQE-PGP was inoculated and cultured in LB broth. After 1 h of cultivation, 1 mM IPTG was added to induce the production of PGP (Fig. 2). Bacteria were grown for 5 h after the induction. For the purification of rPGP, the bacterial pellet was harvested with centrifuge and disrupted with sonication. Disrupted cell suspension was then applied to Ni-NTA agarose resin. After elution with imidazole with the concentration from 10 to 500 mM, rPGP was eluted at a concentration of 250 mM of imidazole. According to SDS-PAGE molecular weight of rPGP was deduced as about 33 kDa (Figs. 2 and 3).

The purified rPGP was used as an antigen to make anti-PGP antibody. Anti-PGP antibody was also produced in SD-rats. Western blot analysis with this antibody confirmed that the rPGP produced in *E. coli* was identical to that of donor strain (Fig. 3).

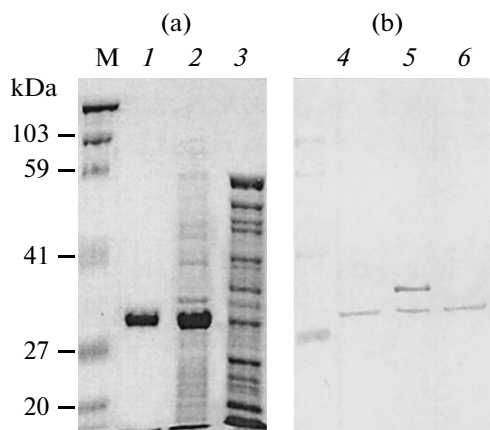
With the purified rPGP, immunoprecipitation was carried out to find a molecule that might bind to PGP. After incubation of rPGP with sonic extract of *P. gingivalis*, anti-PGP antibody and protein-A-modified agarose beads, precipitate was formed. It was applied to SDS-PAGE (Fig. 4). Then the proteins transferred to PVDF membrane and one distinct protein band was cut from the membrane for N-terminal amino acid sequencing. Amino terminal sequence of the protein

bound to the rPGP was turned out as acetate kinase that has a sequence of Ser-Lys-Val-Asn-Glu [3].

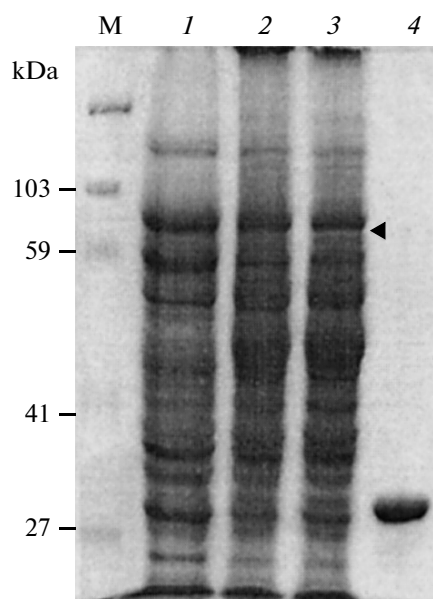
## DISCUSSION

Putative gene of the *P. gingivalis* G-protein (PGP) was cloned into pQE-30 expression vector to make recombinant protein. Amino acid sequence of rPGP showed 91.1% with SGP (data not shown). Era which is known as an essential signal transducing molecule in *E. coli* is a peripheral membrane protein which binds to the cytoplasmic surface of the inner membrane [13]. In previous report, we have reported that there is an extensive homology between SGP and other G-proteins in the GTP-binding domain near N terminus [11]. This was also valid for PGP and SGP.

Since Era was reported to form a dimer in crystalline form [14] and SGP has been reported to oligomerize [9], it was suggested that oligomerization of



**Fig. 3.** SDS-PAGE and immunoblot of the purified *ppg* from *E. coli* M15 (pREP4, pQE-PGP). a – purified proteins were run on SDS-PAGE with 10% of acrylamide gels and stained with Coomassie brilliant blue R-250. b – Western blot analysis. M – molecular weight markers; 1, 4 – the purified rPGP; 2, 5 – cell extract of *E. coli* M15 carrying pQE-PGP induced by IPTG; 3, 6 – *P. gingivalis* extract.



**Fig. 4.** Immunoprecipitation analysis of the PGP-binding protein in *P. gingivalis*. Protein extract from *P. gingivalis* was immunoprecipitated with the purified rPGP, anti-PGP polyclonal antibody and protein-A-modified agarose. M – molecular weight markers; 1 – *P. gingivalis* extract; 2 – cell extract of *P. gingivalis* immunoprecipitated with anti-PGP; 3 – cell extract of *P. gingivalis* immunoprecipitated with anti-PGP and rPGP; 4 – purified rPGP. Co-precipitated protein with anti-PGP and rPGP was indicated by an arrowhead.

G-proteins might be important for their activity. However, we could not able to find dimerized or oligomerized form of PGP in the native form. It might be due to inappropriate conditions of assay. Otherwise it

might be inferred that oligomerized form of G-protein is unstable so that easily cleaved to monomer.

By immunoprecipitation with anti-PGP antibody and N-terminal amino acid sequence analysis, it was found that acetate kinase was able to bind to PGP. Acetate kinase catalyzes the reversible transfer of the  $\gamma$ -phosphoryl group from ATP to the carboxylate group in acetate to form acetyl phosphate. It was reported to be a secondary signaling molecule in anaerobic microorganisms playing an essential role in carbon and energy metabolism in bacteria [15, 16]. Recent report revealed that it was essential for the growth of anaerobic bacteria and anaerobic growth of *E. coli* [17].

Oral infectious diseases such as dental caries and periodontitis are caused by a series of microbial biofilms in oral cavity [18]. The formation of oral biofilm makes microbial community to have resistance to antimicrobial agents, stress and the host defense system than planktonic culture [19, 20]. Therefore, it is important to clarify the communication mechanism of intra- or extra-communications within or between species. As a candidate participating in intra-cellular signaling pathway in *P. gingivalis*, PGP might play an important role in stress-response to extracellular environment. From the results described above, it might be inferred that *P. gingivalis* produces putative GTPase and this protein might play a potential role in signaling pathway in oral biofilm formation. Further studies about this protein may provide information about the peculiar behavior mechanisms in formation of biofilm and controlling periodontal diseases [21].

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by research fund of Chonnam National University (Korea) in 2003.

#### REFERENCES

1. van Winkelhoff, A.J., Carlee, A.W., and de Graaff, J., *Infect. Immun.*, 1985, vol. 49, no. 3, pp. 494–497.
2. Scheres, N., de Vries, T.J., Brunner, J., Crielaard, W., Laine, M.L., and Everts, V., *Microb. Pathog.*, 2011, vol. 51, pp. 149–155.
3. Demmer, R.T. and Desvarieux, M., *J. Am. Dent. Assoc.*, 2006, vol. 137, Suppl. 2, pp. 14S–20S.
4. Sbordone, L. and Bortolaia, C., *Clin. Oral. Investig.*, 2003, vol. 7, no. 4, pp. 181–188.
5. Shao, H. and Demuth, D.R., *Periodontol. 2000*, 2010, vol. 52, no. 1, pp. 53–67.
6. Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F., *Nature*, 1990, vol. 348, no. 6297, pp. 125–132.
7. Yamashita, Y., Takehara, T., and Kuramitsu, H.K., *J. Bacteriol.*, 1993, vol. 175, no. 19, pp. 6220–6228.
8. Ahnn, J., March, R.E., Takiff, H.E., and Inouye, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, no. 23, pp. 8849–8853.

9. Baev, D., Ohk, S.H., and Kuramitsu, H.K., *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, vol. 184, no. 2, pp. 149–153.
10. Sambrook, J. and Russell, D.W., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, vol. 1, 3rd ed., pp. 6.39–6.46
11. Ohk, S.H. and Kuramitsu, H.K., *J. Antimicrob. Chemother.*, 2000, vol. 46, no. 1, pp. 95–99.
12. Sato, T., Wu, J., and Kuramitsu, H., *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998, vol. 159, no. 2, pp. 241–245.
13. Lin, Y.P., Sharer, J.D., and March, P.E., *J. Bacteriol.*, 1994, vol. 176, no. 1, pp. 44–49.
14. Chen, X., Court, D.L., and Ji, X., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, no. 15, pp. 8396–8401.
15. Thauer, R.K., Moller-Zinkhan, D., and Spormann, A.M., *Annu. Rev. Microbiol.*, 1989, vol. 43, pp. 43–67.
16. Ferry, J.G., *J. Bacteriol.*, 1992, vol. 174, no. 17, pp. 5489–5495.
17. Hasona, A., Kim, Y., Healy, F.G., Ingram, L.O., and Shanmugam, K.T., *J. Bacteriol.*, 2004, vol. 186, no. 22, pp. 7593–7600.
18. Beikler, T. and Flemmig, T.F., *Periodontol. 2000*, 2011, vol. 55, no. 1, pp. 87–103.
19. Marsh, P.D., *J. Dent.*, 2010, vol. 38, Suppl. 1, pp. S11-15.
20. Socransky, S.S. and Haffajee, A.D., *Periodontol. 2000*, 2002, vol. 28, no. 1, pp. 12–55.
21. Nelson, K.E., et al., *J. Bacteriol.*, 2003, vol. 185, no. 18, pp. 5591–5601.

УДК 581.1:633.358:577.13

## РОЛЬ АЛЛЕЛОПАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В РЕГУЛЯЦИИ И ФОРМИРОВАНИИ БОБОВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА

© 2012 г. Л. Е. Макарова\*, В. И. Смирнов\*\*, Л. В. Клыба\*\*, И. Г. Петрова\*, Л. В. Дударева\*

\*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН

\*\*Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, Иркутск, 664033

e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 07.10.2011 г.

Показано, что соединения ароматического ряда, изолированные из корневых экссудатов трех видов бобовых растений (*Pisum sativum* L., *Vicia faba* L. var. *major* Hartz, *Glycine max* L. MERR), идентифицированные как N-фенил-2-нафтиламин, дибутиловый и диоктиловый эфиры орто-фталевой кислоты, известные как негативные аллелопатические вещества, участвуют в контроле формирования бобово-ризобияльного симбиоза после инокуляции корней ризобиями и в неблагоприятных для симбиоза условиях.

Важную роль в агрофитоценозах отводят бобовым растениям в связи с их уникальным свойством формировать на корнях клубеньки, в клетках которых поселяются азотфиксирующие бактерии семейства Rhizobiaceae. Наряду с ассимиляцией N<sub>2</sub> бобовые растения и их микросимбионты вносят в экосистемы большой вклад в улучшение и оздоровление почвы [1, 2]. Последнее определяется, во-первых, их способностью аккумулировать и катаболизировать многие накапливающиеся в почве пестициды и другие, вредные для живых организмов вещества и, во-вторых, воздействием на почвенную микрофлору аллелопатическими соединениями, выделяемыми их корнями.

В корневых экссудатах бобовых растений наряду с привлекающими микроорганизмы углеводами, аминокислотами и оксидикарбоновыми кислотами [3] выявлены фенольные соединения (ФС) [4], состав которых достаточно разнообразен [4–6]. Разнообразны и функции ФС, выделяемых этими растениями во внешнюю среду. Так, ряд ФС, из числа присутствующих в корневых экссудатах, может подвергаться катаболизму под действием микроорганизмов и служит для них трофическим материалом [7, 8]. ФС являются растительными сигнальными молекулами, индуцирующими у ризобий биосинтез Nod-факторов, инициирующих процессы инфицирования и нодуляции [9]. В корневых экссудатах бобовых растений выявлены фитоалексины изофлавоноидного происхождения, подавляющие почвенную микрофлору [2, 10–12], за исключением, по-видимому, бактерий *Rhizobium* [13, 14].

За экскрецию ФС, воздействующих на ризобии, ответственны определенные области корня [15, 16], по-видимому, включающие зоны преимущественного выделения фенольных индукто-

ров или ингибиторов экспрессии ризобияльных *nod*-генов [17].

Как показано рядом исследований, количество секретируемых фенольных соединений зависит от целого ряда обстоятельств [5, 6, 18–21]. Оно по мере роста и развития растения меняется альтернативно. Происходит усиление экссудации фенольных соединений в начале взаимодействия с симбиотическими микроорганизмами и ее снижение при неблагоприятных условиях среды. По-видимому, благодаря количественным и качественным изменениям в составе комплексов фенольных соединений корневых экссудатов осуществляется регуляция этими веществами процесса размножения ризобий и индукции у этих бактерий синтеза Nod-факторов [5, 6, 20, 21].

У растений гороха в неблагоприятных условиях замедление начальных этапов формирования симбиоза сопряжено не только с уменьшением экссудации корнями ФС, но и с понижением ростовой активности этих веществ в отношении ризобий [5, 6]. Все возникающие изменения в комплексах ФС корневых экссудатов, по-видимому, имеют отношение к механизмам авторегуляции, контролирующим периодичность инфицирования корней и образования на них клубеньков в ходе развития корневой системы растения-хозяина и лимитирующим число клубеньков на его корнях в неблагоприятных условиях.

Обнаруженные изменения ростовой активности изученных экстрактов из корневых экссудатов, по нашему предположению, обусловлены содержанием в этих экссудатах ряда ароматических компонентов с негативным аллелопатическим эффектом. В их числе идентифицированный нами N-фенил-2-нафтиламин, обозначенный при первом его обнаружении в экссудатах гороха как

вещество “Х” [5], и дибутиловый и диоктиловый эфиры орто-фталевой кислоты, представляемые в числе фенольных компонентов корневых экссудатов бобовых растений впервые в настоящей публикации. Все они отнесены к числу неблагоприятных для живых организмов аллелопатических веществ растительного происхождения [22–26].

Цель работы – получение доказательств участия аллелопатических соединений, присутствующих в корневых экссудатах бобовых растений, в контролировании численности ризобий в ризосфере в начальные периоды после инокуляции и в неблагоприятных для формирования бобово-ризобиального симбиоза условиях.

## МЕТОДИКА

**Объект исследования. Схема проведения эксперимента.** Исходным растительным материалом служили 2 сут этиолированные проростки гороха (сорт Ямальский), бобов (сорт Русские черные), сои (сортообразец № 15, получен в СИФИБР СО РАН, Иркутск), выросшие в термостате при 22°C без освещения. Эти проростки помещали в водную среду, содержащую необходимый для их роста минимальный набор микроэлементов, вносимых в водную среду по [5], которая ежедневно заменялась. Дальнейшее выращивание растений на водной среде проводили в термостате при 22°C без освещения или в камере фитотрона с температурой 20–22°C, влажностью воздуха около 60% и освещением (2.1 клк) с 13-часовым фотопериодом. При этом влияние освещения и инокуляции на состав фенольных соединений корневых экссудатов изучали только на растениях гороха.

**Инокуляция.** Инокулят, содержащий бактерии *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, штамма 1060 (2446) (эффективный, получен из ВНИИ с/х микробиологии, Пушкин, С.-Петербург), вносили в водную среду, на которую помещали проростки гороха, только в 1 сут эксперимента.

**Получение экстрактов ФС из корневых экссудатов.** ФС извлекали из водной среды в этилацетат после подкисления ее с помощью HCl до pH 3.0–4.0. После упаривания этилацетата в токе холодного воздуха остаток растворяли небольшим объемом 96%-ного этанола.

**Изолирование N-фенил-2-нафтиламина и сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты из экстрактов.** Изоляцию присутствующих в этанольных экстрактах фенольных соединений производили последовательно, применяя хроматографию на бумаге, на колонке с Sephadex LH-20 (“Pharmacia Fine Chemical AB Uppsala”, Швеция), ТСХ (Silufol UV-254, “Kavalier”, Чехословакия). С помощью бумажной хроматографии в 5%-ной уксусной кислоте отделяли неподвижные в указанном растворе компоненты, которые элюиро-

вали в 96%-ный этанол и затем наносили на колонку с Sephadex LH-20. Пропускаемый через колонку 96%-ный этанол, содержащий 0.002% HCl, делили на фракции объемом 1.0 или 3.5 мл. Исследуемые вещества отделяли от сопутствующих им компонентов в содержащих их фракциях методом ТСХ, применяя последовательно ряд систем (об./об.): толуол–1,4-диоксан–уксусная кислота (ТДУ, 90 : 25 : 4); хлороформ–бензол–уксусная кислота (ХБУ, 100 : 100 : 1); хлороформ–этанол (4 : 1); хлороформ–уксусная кислота (3 : 2); н-бутанол–уксусная кислота–вода (4 : 1 : 2); бензол–уксусная кислота–вода (125 : 72 : 3 или 6 : 7 : 3).

**Идентификация N-фенил-2-нафтиламина и сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты.** Доказательства химической структуры этих веществ, изолированных из экстрактов по описанной выше схеме, получили с применением методов УФ-, ИК-спектроскопии, ГХ-МС-анализа. Для полноты подтверждения идентичности структуры N-фенил-2-нафтиламина провели ЯМР-анализ.

УФ-спектры получены на спектрофотометре Specord S100 (“Analytik Jena”, Германия) и исследованы с внесением в растворы щелочных и комплексообразующих реагентов [27, 28]. ИК-спектры записаны с помощью однолучевого спектрофотометра “Spectrum One” (США), оснащенного детектором “MIR TGS” и программами библиотек спектров Nicolet/Aldrich и Pelibs (“Perkin Elmer”, США), предназначенных для идентификации функциональных групп ИК-спектров. Для получения ИК-спектров концентрированные растворы веществ в этилацетате наносили на пластинки “KRS-5” (“Макрооптика, ООО”, Россия).

Масс-спектры электронной (ЭИ, 70 эВ) и химической ионизации положительных ионов (газ-реагент – метан) получены на приборе GCMS-5975C inert XL EI/CI MSD фирмы “Agilent”, США (масс-анализатор квадрупольный, диапазон детектируемых масс 34–950 Да). Хроматографическое разделение проводили на капиллярной колонке (30 м × 250 мкм × 0.25 мкм) фаза марки HP-5ms, газ-носитель – гелий. Температура испарителя и источника ионов 250°C. Режим программирования – от 40 до 250°C со скоростью 5°C мин<sup>-1</sup>. Для интерпретации использовалась электронная библиотека – NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Ver. 2.0.2005.

Спектры ЯМР <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C регистрировали на мультядерном Фурье ЯМР спектрометре Bruker DPX-400 (“Bruker”, Германия), рабочая частота 400.1 (<sup>1</sup>H) и 100.4 (<sup>13</sup>C) МГц с внешним стандартом – гексаметилдисилаксаном.

**Анализ содержания N-фенил-2-нафтиламина и сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты методом ВЭЖХ.** Содержание изучаемых веществ в этанольных экстрактах из экссудатов осуществляли на хроматографе Shimadzu LC-10ATvp с УФ-



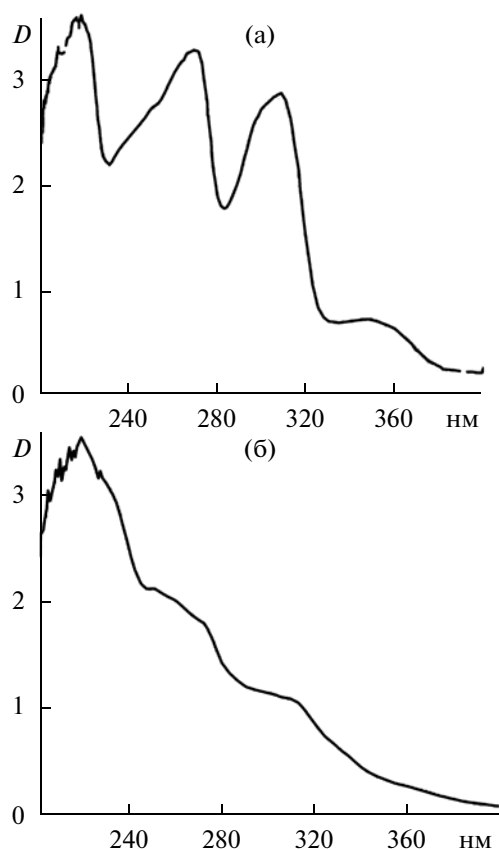


Рис. 1. Спектры поглощения в 96%-ном этаноле выделенных из корневых экссудатов растений гороха N-фенил-2-нафтиламина (а) и вещества "К" (б).

детектором ("Shimadzu", Япония). Разделение содержащихся в экстрактах фенольных компонентов проводили на колонке Seragon SGX C<sub>18</sub>, 5 мк (150 × 3 мм) в возрастающем градиенте концен-

трации А:Б от 30 до 90% в течение 60 мин. А — ацетонитрил, Б — 0.1 М перхлорат Li с 0.1% трифторуксусной кислоты, рН = 4.0. Количественные расчеты производились по адсорбционным профилям при 280 нм с использованием калибровочного графика, построенного для разных концентраций изучаемых веществ. Для N-фенил-2-нафтиламина и сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты показатели времени удерживания в адсорбционных профилях исследуемых экстрактов подтверждали УФ-спектрами, полученными для этих веществ в остановленном потоке элюента.

**Изучение влияния изолированных из экссудатов веществ на размножение *Rhizobium*.** Определение ростовой активности ФС в размножении бактерий *Rhizobium* осуществляли в жидкой минимальной среде в соответствии с принципами, изложенными в работе [29].

**Статистическая обработка.** Средние значения и их стандартные ошибки (рис. 6, 7) получены по данным из трех независимых экспериментов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В течение 3 сут в корневых экссудатах неинкулированных и инокулированных растений гороха (*Pisum sativum* L.), выращиваемых на свету или в темноте (соответственно, позитивный и негативный факторы), прослеживали изменения и различия после инокуляции ризобиями в содержании N-фенил-2-нафтиламина и вещества "К" (смеси сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты). Следует заметить, что перечисленные выше вещества нами были обнаружены не только в корневых экссудатах, но и в тканях корней гороха.

С целью выяснения универсальности значения в регуляции бобово-ризобиального симбиоза

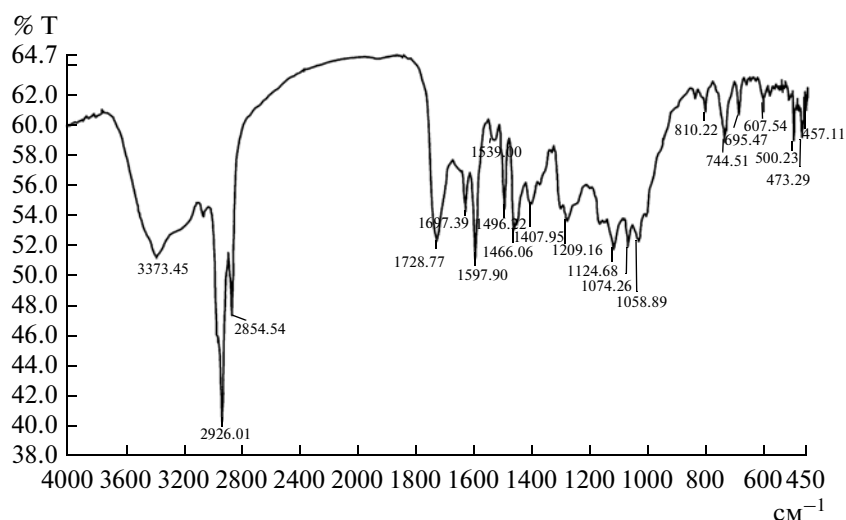
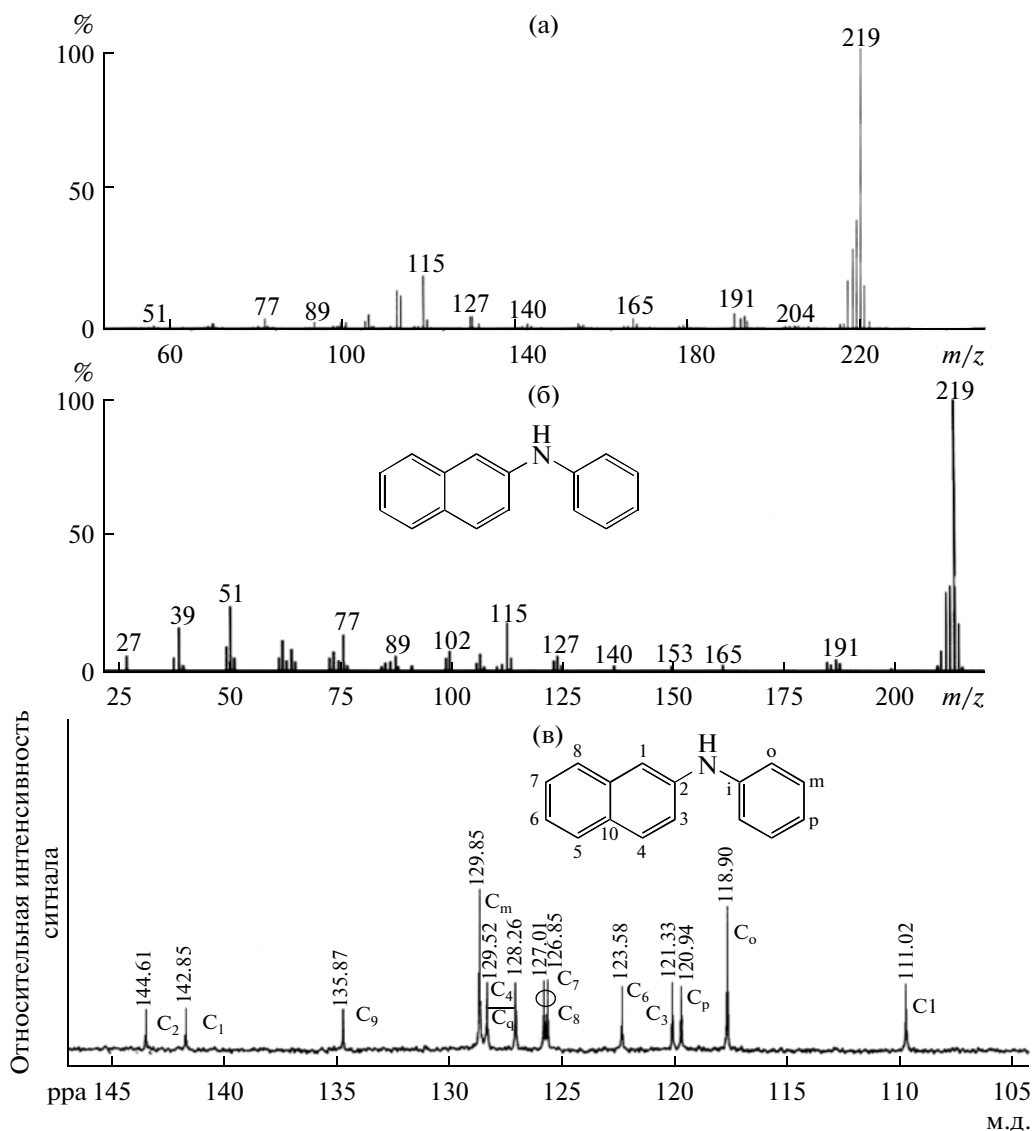


Рис. 2. ИК-спектр N-фенил-2-нафтиламина, выделенного из корневых экссудатов гороха.



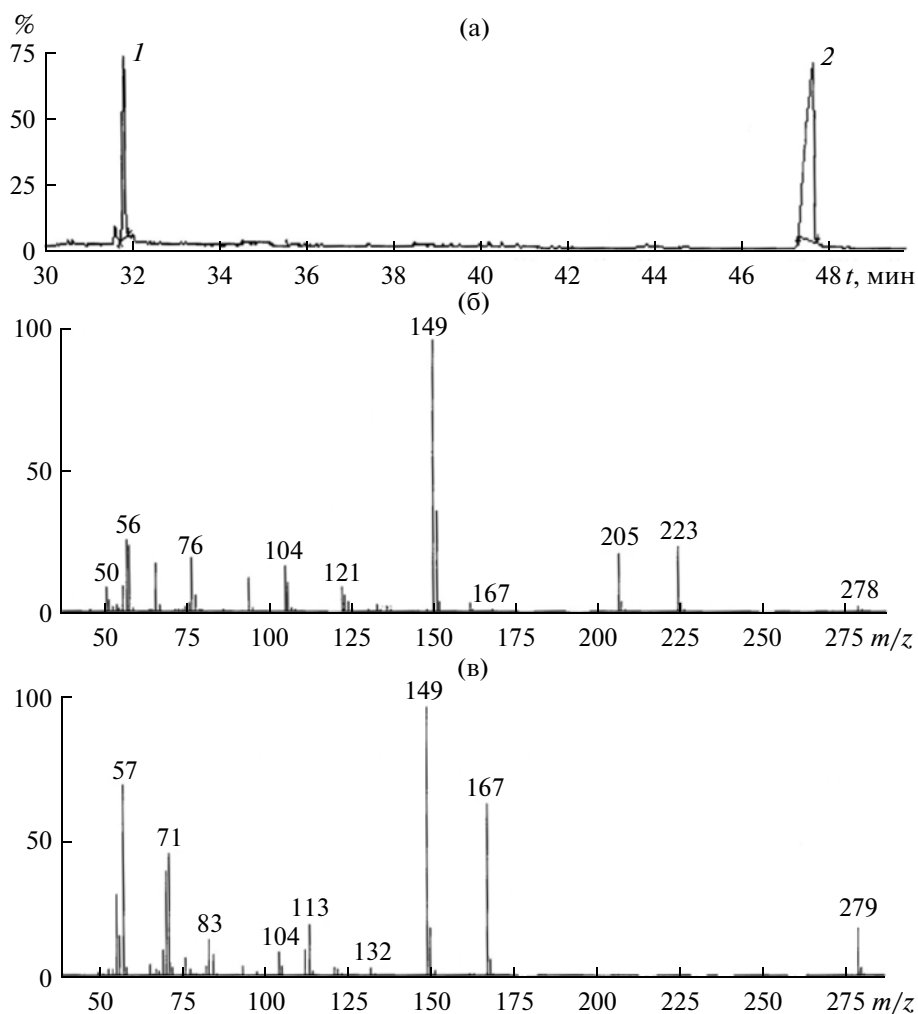
**Рис. 3.** Спектры, характеризующие структуру выделенного из корневых экссудатов растений гороха N-фенил-2-нафтиламина.

Масс-спектры образца, выделенного из корневых экссудатов растений гороха (а) и N-фенил-2-нафтиламина из электронной библиотеки (Mass Spectral Database) (б); ЯМР-спектр <sup>13</sup>Cmod N-фенил-2-нафтиламина, выделенного из корневых экссудатов растений гороха, в CDCl<sub>3</sub> (в). По оси абсцисс – величина химического сдвига (м.д.), по оси ординат – относительная интенсивность, %.

занимались изучением присутствия этих веществ в экссудатах двух других представителей бобовых растений – *Vicia faba* L. var. *major* Hartz и *Glycine max* L. MERR. Наличие в экстрактах из экссудатов перечисленных двух видов бобовых растений N-фенил-2-нафтиламина и сложноеэфирных соединений о-фталевой кислоты подтверждали по ряду тестовых показателей подвижности на хроматограммах и окраски с реагентами на фенольные соединения (часть их представлены в таблице) и УФ-спектрам (рис. 1), установленными нами ранее [5]. N-фенил-2-нафтиламин, дибутиловый и диоктиловый эфиры о-фталевой кислоты выяв-

лены нами в составе этилацетатных экстрактов из их корневых экссудатов у проростков бобов и сои, росших в течение 3 сут на водной среде без света.

Подтверждениями химической структуры N-фенил-2-нафтиламина, каковыми являются данные, представленные на рис. 1а, 2 и 3. В ИК-спектре (рис. 2) доказательством принадлежности данного вещества к ароматическим соединениям являются полосы в областях 3000–3100; 1575–1625; 1475–1530; 0660–0825 см<sup>-1</sup>. Полосы средней интенсивности при 3008 и 1635 см<sup>-1</sup> наиболее заметны среди них. Полосы в областях 3350–3500; 2850–2990; 1570–1620; 1418–1465; 0750–0950 см<sup>-1</sup>



**Рис. 4.** Характеристика компонентов, составляющих вещество “К”.

На ГХ-МС (а) пик 1 соответствует дибутиловому, пик 2 — диоктиловому эфирам орто-фталевой кислоты. Масс-спектры дибутилового (б) и диоктилового (в) эфиров о-фталевой кислоты.

указывают на присутствие аминогруппы. Наиболее выражены из них широкая полоса средней интенсивности при  $3374\text{ см}^{-1}$  и интенсивная полоса при  $2926\text{ см}^{-1}$ . Полоса при  $3373\text{ см}^{-1}$  свидетельствует о наличии в исследованной молекуле ассоциированной NH-группы [30].

Масс-спектры на рис. 3а и 3б свидетельствуют об идентичности выделенного нами соединения и N-фенил-2-нафтиламина из электронной библиотеки — NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Ver. 2.0.2005. В обоих масс-спектрах основным по интенсивности является пик молекулярного иона ( $M^+ 219$ ).

На рис. 3в представлен ЯМР-спектр  $^{13}\text{C}$ JMOD (спектр  $^{13}\text{C}$ J-модулированного спинового эхо JMOD) раствора в  $\text{CDCl}_3$  выделенного нами соединения, который показывает, что изучаемое соединение содержит 16 углеродных атомов и из них 10  $\text{CH}=\text{C}$ -углеродов и 3  $\text{C}_{\text{qu}}$  (четвертичных) в

ароматической области и 1 метиленовой группы ( $\text{CH}_2$  — несвязанная с кислородом), являющиеся подтверждениями структуры N-фенил-2-нафтиламина.

Еще один компонент эксудатов, которому уделялось внимание в исследованиях, было условно обозначено нами как вещество “К” (обозначение связано с красно-коричневым цветом окраски у вещества на ТСХ, появляющейся после воздействия УФ-света). Выше указанные сложноэфирные соединения о-фталевой кислоты, составляющие вещество “К”, элюировались с хроматограмм (при хроматографии на бумаге и методом ТСХ) в виде смеси, поскольку не получалось разделение их в использованных нами системах растворителей. Только результаты хромато-масс-спектрологии показали, что вещество “К” имеет 2 пика (рис. 4а), соответствующие сложноэфирным соединениям, имеющим одинаковое арома-

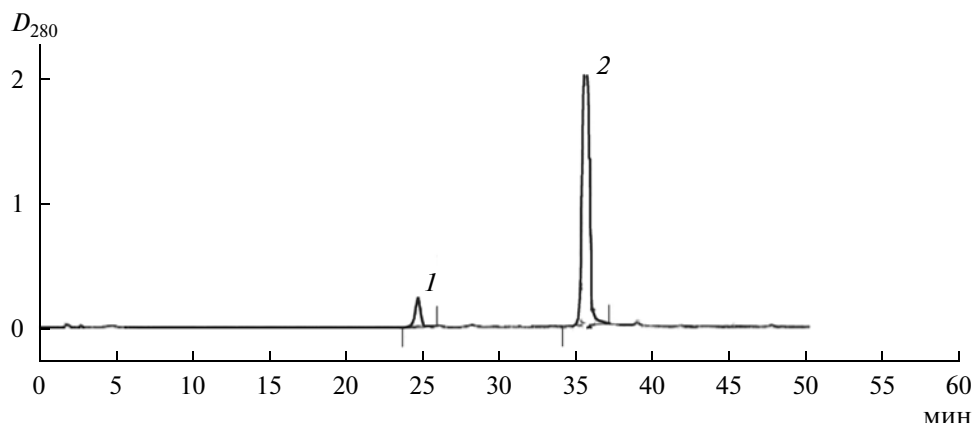


Рис. 5. ВЭЖХ изолированных из экстрактов корневых экссудатов гороха вещества “К” (1) и N-фенил-2-нафтиламина (2). По оси абсцисс – время удерживания; по оси ординат – поглощение при 280 нм.

тическое ядро: 1,2-бенздикарбоновая (орто-фталевая) кислота (рис. 4б, в). Согласно данным электронной библиотеки спектров “CAS WILEY 229 Library”, наиболее вероятно (коэффициент подобия 90%), что одно из них является дибутиловым ( $M^+ \cdot 278$  Да), второе – диоктиловым ( $M^+ \cdot 390$  Да) эфиром 1,2-бензолдикарбоновой кислоты. Об ароматической природе вещества “К” в его ИК-спектре свидетельствовали полосы в области  $3061 \text{ см}^{-1}$  и ряд полос в областях  $1565\text{--}1625$ ,  $1475\text{--}1530$ ,  $660\text{--}825 \text{ см}^{-1}$ , и на принадлежность данного соединения к ароматическим эфирам указывали полосы в областях  $1294$ ,  $1456$ ,  $1499 \text{ см}^{-1}$  (программа библиотек спектров Nicolet/Aldrich и Pelibs) [30; 31].

На рис. 5 приведены адсорбционные профили, полученные при разделении методом ВЭЖХ смеси вещества “К” и N-фенил-2-нафтиламина, изолированных из корневых экссудатов гороха.

Количественные показатели для этих веществ на рис. 6 в течение трехсуточного периода наших наблюдений свидетельствуют об изменении их содержания в экссудатах растений гороха под влиянием инокуляции и условий освещения. Больше этих веществ в экссудатах растений, росших в темноте.

Переходя к анализу особенностей секреции корнями гороха каждого из изучаемых соединений, следует отметить, что количество N-фенил-2-нафтиламина в расчете на 1 растение заметно выше в их экссудатах в условиях темноты, негативно влияющей на нодуляцию [35]. Примечательно, что из всех вариантов наших экспериментов наиболее низкие показатели содержания этого вещества можно отметить в 1 сут у неинокулированных растений, росших при освещении (рис. 6).

После инокуляции количество N-фенил-2-нафтиламина, выделяемое корнями, возрастало в 1 сут в экссудатах растений как при выращивании

их в темноте, так и на свету, хотя и в разной мере. Аналогичный эффект инокуляции обнаружен и на секрецию корнями гороха вещества “К”. Характерно, что во все периоды наблюдения суммарное количество сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты (вещества “К”) в экссудатах заметно меньше по сравнению с N-фенил-2-нафтиламином (рис. 6).

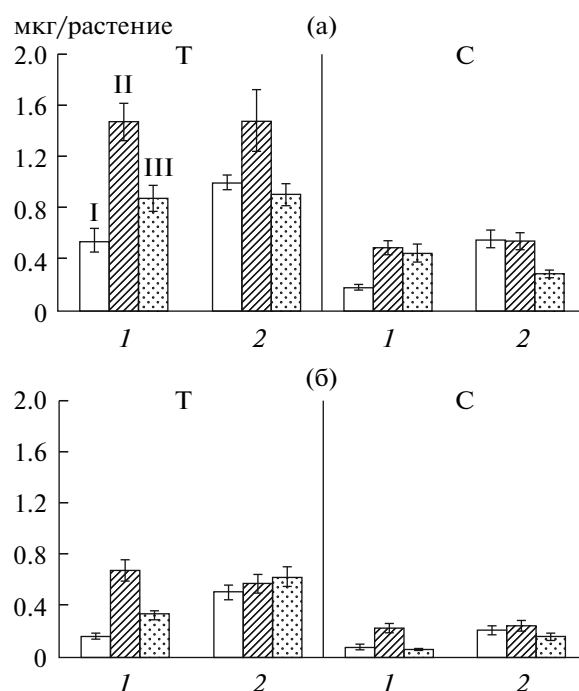


Рис. 6. Влияние условий освещения на количество N-фенил-2-нафтиламина (а) и вещества “К” (б), выделяемых за 1 сут корнями неинокулированных (1) и инокулированных (2) *Rhizobium* растений гороха в течение 3 сут наблюдений.

I, II, III – соответственно, 1, 2, 3 сут наблюдений. Т – темнота; С – свет.

Результаты хроматограмм фенольных соединений и основные показатели цветных реакций, характеризующих выделенные из корневых экссудатов соединения

Образец	Флуоресценция			Окраска с реагентами			$R_f$	
	УФ-свет	УФ-свет + $\text{NH}_3$	Видимый свет	ДПНА + $\text{Na}_2\text{CO}_3$	ДСК + $\text{Na}_2\text{CO}_3$	Ванилиновый реактив	ТДУ, 90 : 25 : 4	ХБУ, 100 : 100 : 1
N-фенил-2-нафтиламин	Ярко темно-фиолетовая	Усиливается	Слабо серая, на ярком свете до темно-красновато-сиреневой	Ярко сиреневая	Ярко вишневая	Окраски нет	0.82	0.88
Вещество "К"	Тускло коричневато-фиолетовая	Без изменений	Светло-красная	Яично-желтая	Розово-желтая	Окраски нет	0.74	0.39
Стильбен (?)	Синяя	Темно синяя	Голубоватая, меняющаяся на серовато-желтую	Желто-серая	Светло-желтая	Сиреневато-синяя	0.76	0.25

Общее содержание в экссудатах обсуждаемых аллелопатических соединений как у неинкулированных, так и у инокулированных растений максимально на 2 сут от начала эксперимента (рис. 6). Ранее [35] в этот же период развития у растений гороха нами отмечалось начало роста латеральных корней, более активно развивающихся у инокулированных ризобиями растений. Не исключено, что в указанный период наблюдений из-за затрат энергии и пластического материала, связанных с началом обозначенного выше морфологического процесса, усиление экссудации корнями в ризосферу негативных аллелопатических веществ может быть направлено на ограничение их инфицирования ризобиями.

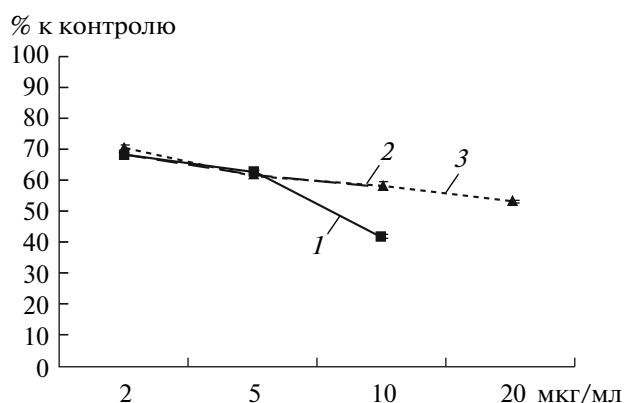


Рис. 7. Влияние разных концентраций ФС (мкг/мл среды), выделенных из корневых экссудатов гороха, на прирост бактерий *Rhizobium* за 24 ч в жидкой минимальной среде (% к контролю).

Контроль — среда без ФС, содержащая бактерии. 1 — стильбен; 2 — вещество "К"; 3 — N-фенил-2-нафтиламин.

Данные рис. 7 (1, 2) свидетельствуют о том, что N-фенил-2-нафтиламин и сложноэфирные соединения о-фталевой кислоты могут участвовать в подавлении размножения ризобий (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*). Присутствие этих веществ в фенольном комплексе корневых экссудатов в определенной мере должно сказываться на численности ризобий в ризосфере бобового растения. Вероятно, скорость размножения ризобий вблизи корня растения-хозяина зависит от доли в фенольном комплексе его корневых экссудатов негативных аллелопатических веществ. К ним может быть причислено и обнаруженное нами ранее в экссудатах растений гороха, росших в темноте соединение, предварительно отнесенное нами к стильбенам [5], которое также оказывало ингибирующее действие на размножение ризобий (рис. 7, 1). В таблице приведены некоторые тестовые показатели, характеризующие данное соединение, присутствие которого в экссудатах гороха в условиях освещения, а также в экссудатах сои и бобов нами пока не установлено.

Несмотря на общее высокое содержание в корневых экссудатах N-фенил-2-нафтиламина и сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты их негативный эффект на размножение ризобий, возможно, отчасти снимается благодаря присутствию в экссудатах компонентов, положительно влияющих на данный процесс. Таковыми могут быть изофлавоны [5] и другие соединения растительных экссудатов, метаболизируемые и используемые ризобиями в качестве трофического материала [7, 8]. Тенденции изменения количества секретируемых растениями гороха N-фенил-2-нафтиламина и сложноэфирных соединений о-фталевой кислоты (рис. 6) после инокуляции ризобиями, а также при росте в условиях темноты, вместе с доказательством негативного

влияния этих веществ на размножение ризобий (рис. 7) объясняют причины обнаруженных нами ранее [5, 6] снижений ростовой активности фенольных комплексов, полученных из экссудатов корней тех же растений. Все это согласуется с данными работ [23–27], свидетельствующими о том, что обсуждаемые вещества являются негативными аллелопатическими соединениями, подавляющими микрофлору. Но при этом в литературе имеется мало сообщений о выявлении N-фенил-2-афтиламина и сложнэфирных соединений о-фталевой кислоты в растительных организмах. Так N-фенил-2-нафтиламин найден в органах надземной части пяти видов высших растений [32–34], в клетках водорослей [24], в тканях водного растения и его экссудатах [26]. Еще меньше информации о выявлении у растительных организмов сложнэфирных соединений о-фталевой кислоты (1,2-бензолдикарбоновая кислота). В работе [22] имеются сведения об антимикробных свойствах дибутилового эфира о-фталевой кислоты, выделенного из зеленых водорослей *Enteromorpha linza*. Надо заметить, что высокая токсичность дибутилового и диоктилового эфиров орто-фталевой кислоты для живых организмов достаточно известна [www.Chemblink.com].

Обнаружение нами обсуждаемых веществ в фенольных комплексах у трех видов бобовых культур, по-видимому, является прямым свидетельством распространения их у бобовых растений. Присутствие изученных соединений в корневых экссудатах проростков гороха, сои и бобов подтверждает возможность их универсальной контролирующей функции при формировании бобово-ризобияльного симбиоза независимо от вида растения-хозяина.

Итак, из всего сказанного выше следует, что роль аллелопатических веществ в регуляции инфицирования бобовых растений ризобиями заключается в контроле концентрации этих бактерий в ризосфере. В частности, необходимость в регуляции численности бактерий в ризосфере корней растения-хозяина должна возникать в неблагоприятных условиях для формирования симбиоза, а также после инокуляции в связи с процессом развития его корневой системы. Очевидно, изученные нами соединения, отнесенные к негативным аллелопатическим веществам, посредством их влияния на скорость размножения *Rhizobium* имеют отношение к авторегуляции инфицирования корней бобового растения данными бактериями.

Авторы приносят благодарность сотрудникам института: Н.В. Дорофееву за предоставление семян сои, Н.Б. Митановой, Т.Е. Путилиной, А.М. Собенину за техническую помощь при проведении экспериментов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Peoples M.B., Craswell E.T. // Plant and Soil. 1992. V. 141. № 1–2. P. 13–39.
2. Makoi J.H.J.R., Ndakidemi P.A. // Afr. J. Biotechnol. 2007. V. 6. № 12. P. 1358–1368.
3. Gaworzewska E.T., Carlile M.J. // J. Gen. Microbiol. 1982. V. 128. № 6. P. 1179–1188.
4. D'Arcy-Lameta A. // Plant and Soil. 1986. V. 92. № 1. P. 113–123.
5. Макарова Л.Е., Латышева С.Е., Путилина Т.Е. // Прикл. биохимия и микробиол. 2007. Т. 43. № 4. С. 429–434.
6. Макарова Л.Е., Рудиковская Е.Г. // Агрохимия. 2003. № 8. С. 61–65.
7. Rynne F.G., Glenn A.R., Dilworth M.J. // Soil Biol. Biochem. 1994. V. 26. № 6. P. 703–710.
8. Brockwell J., Bottomley P.J., Thies J.E. // Plant and Soil. 1995. V. 174. № 1–2. P. 143–180.
9. Long S.R. // Plant Physiol. 2001. V. 125. № 1. P. 69–72.
10. Perrin D.R., Cruickshank I.A.M. // Phytochemistry. 1969. V. 8. № 6. P. 971–978.
11. D'Arcy-Lameta A. // Plant and Soil. 1987. V. 101. № 1. P. 267–272.
12. Parniske M., Schmidt P.E., Kosch K., Müller P. // Molecular Plant-Microbe Interactions. 1994. V. 7. № 6. P. 631–638.
13. Novak K. // Interrelationships between Microorganisms and Plants in Soil. Czechoslovakia, 1987 / Eds. V. Vančura, F. Kunc. Prague: Academia, 1989. P. 63–66.
14. Novak K., Kropáčová M., Havlíček V., Škrdleta V. // Folia Microbiol. 1995. V. 40. № 5. P. 535–540.
15. Redmond J.W., Batley M., Djordjevic M.A., Innes R.W., Kuempel P.L., Rolfe B.G. // Nature. 1986. V. 323. № 6089. P. 632–635.
16. Peters N., Long S.R. // Plant Physiol. 1988. V. 88. № 2. P. 396–400.
17. Djordjevic M.A., Redmond J.W., Batley M., Rolfe B.G. // EMBO J. 1987. V. 6. № 5. P. 1173–1179.
18. Dacora F.D., Joseph C.M., Phillips D.A. // Plant Physiol. 1993. V. 101. № 3. P. 819–824.
19. Novak K., Novak K., Škrdleta V., Nemcova M., Lisa L. // Folia Microbiologica. 1994. V. 39. № 3. P. 208–214.
20. Richardson A.E., Djordjevic M.A., Rolfe B.G., Simpson R.J. // Plant and Soil. 1988. V. 109. № 1. P. 37–47.
21. Lawson C.G.R., Rolfe B.G., Djordjevic M.A. // Austr. J. Plant Physiol. 1996. V. 23. № 1. P. 93–101.
22. Kim S.-J., Kim S.-I., Han Y.-S. // Corean J. Gerontol. 1997. V. 7. № 3. P. 70–76.
23. Brack W., Altenburger R., Ensenbach U., Möder M., Segner H., Schürmann G. // Arch. Environ. Contamination and Toxicol. 1999. V. 37. № 2. P. 164–174.
24. Shi D.Y., Han L.J., Sun J., Wang Y., Yang Y.C., Shi J.G., Fan X. // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2005. V. 30. № 5. P. 347–350.
25. Altenburger R., Brack W., Greco W.R., Grote M., Jung K., Ovari A., Riedl J., Schwab K., Küster E. // Environ. Sci. Technol. 2006. V. 40. № 19. P. 6163–6169.
26. Wu Z.B., Zhang S.H., Wu X.H., Cheng S.P., He F. // Allelopathy J. 2007. V. 20. № 2. P. 327–338.

27. *Jurd L.* The Chemistry of Flavonoid Compounds / Ed. T.A. Geissman. Oxford, L., N.Y., Paris: Pergamon Press, 1962. P. 107–155.
28. *Шрайнер Р., Фьюзон Р., Кёртин Д., Моррилл Т.* Идентификация органических соединений / Ред. Б.А. Руденко. М.: Мир, 1983. 703 с.
29. *Макарова Л.Е., Латышева С.Е., Екимова Е.Г.* // Физиология растений. 2003. Т. 50. № 2. С. 291–298.
30. *Наканица К.* Инфракрасные спектры и строение органических соединений / Ред. А.А. Мальцева. М.: Мир, 1965. 216 с.
31. *Беллами Л.* Инфракрасные спектры молекул. М.: ИЛ, 1957. 444 с.
32. *Евстратова Р.И., Запесочная Г.Г.* // Химия природных соединений. 1977. № 4. С. 582.
33. *Жанаева Т.А., Кривошекова О.Е., Семенов А.А., Минаяева В.Г.* // Химия природных соединений. 1989. Т. 25. № 3. С. 377.
34. *Султанходжаев М.Н., Таджибаев М.М.* // Химия природных соединений. 1976. Т. 12. № 3. С. 406.
35. *Макарова Л.Е., Соколова М.Г., Акимова Г.П., Лузова Г.Б., Нурминский В.Н.* // Агрехимия. 2004. № 12. С. 29–35.

## Role of Allelopathic Compositions in the Regulation and Development of Legume–Rhizobial Symbiosis

L. E. Makarova<sup>a</sup>, V. I. Smirnov<sup>b</sup>, L. V. Klyba<sup>b</sup>, I. G. Petrova<sup>a</sup>, and L. V. Dudareva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences

<sup>b</sup> Favorskii Research Institute of Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

e-mail: makarova@sibir.irk.ru

Received October 7, 2011

**Abstract**—It was discovered that aromatic compounds isolated from root exudates of three legume species (*Pisum sativum* L., *Vicia faba* L. var. *major* Hartz, and *Glycine max* L. MERR) and identified as *N*-phenyl-2-naphthyl amine, dibutyl, and dioctyl esters of orthophthalic acid, which are known to work as negative allelopathic substances, are involved in the regulation of legume–rhizobial symbiosis formation after the inoculation of roots with rhizobia under unfavorable conditions for symbiosis.

UDC 579.2:579.6

## BIOFILM, ICE RECRYSTALLIZATION INHIBITION AND FREEZE-THAW PROTECTION IN AN EPIPHYTE COMMUNITY

© 2012 Z. Wu\*, F. W. K. Kan\*\*, Y.-M. She\*\*\*, V. K. Walker\*, \*\*

\*Departments of Biology, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada K7L 3N6

\*\*Department of Biomedical and Molecular Sciences, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada K7L 3N6

\*\*\*Department of Chemistry, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada K7L 3N6

e-mail: walkervk@queensu.ca

Received December 6, 2011

Microbial communities found on the surface of overwintering plants may be exposed to low temperatures as well as multiple freeze-thaw events. To explore the adaptive mechanisms of these epiphytes, with the objective of identifying products for freeze-protection, enrichment libraries were made from frost-exposed leaves. Of 15 identified bacteria from 60 individual clones, approximately half had ice-association activities, with the great majority showing high freeze-thaw resistance. Isolates with ice nucleation activity and ice recrystallization inhibition activity were recovered. Of the latter, two (*Erwinia billingiae* J10, and *Sphingobacterium kitahiroshimense* Y2) showed culture and electron microscopic evidence of motility and/or biofilm production. Mass spectrometric characterization of the *E. billingiae* extracellular polymeric substance (EPS) identified the major proteins as 35 kDa outer membrane protein A and F, supporting its biofilm character. The addition of the EPS preparation increased the freeze-thaw survival of the more susceptible bacteria 1000–10000 times, and protection was at least partially dependent on the protein component.

Applied microbiologists have long appreciated the biochemical adaptations of microorganisms living under extreme conditions due to their specialized products that have found many applications [1]. However, the acquisition of freeze-thaw survival strategies and the utility of these associated products have received less attention. Depending on the species, bacteria can respond to low temperatures by altering their membrane lipid constitution to maintain fluidity, and the synthesis of cold-shock proteins, chaperones and cold-acclimation proteins, including well-adapted enzymes [2–5]. A few strains produce such highly specialized products as ice nucleation proteins that prevent the supercooling of water, allowing freezing at temperatures close to 0°C [6–7]. Other microbial species inhibit ice recrystallization (IR), which can be associated with the synthesis of antifreeze proteins [8–12] or the production of extracellular polymeric substance (EPS) [13–15]. EPS production has been associated with the enhanced survival of marine bacteria at low temperatures [16]. Together, EPS and microorganisms make up biofilms which are well known to confer resistance to a variety of stressful challenges including antibiotics, osmotic changes, nutrition limitations, phagocytes and radiation exposure [17–19].

Although previous studies are not extensive, bacteria exhibiting high freeze-thaw resistance and IR inhibition appear to facilitate the survival of more susceptible species, suggesting that the low temperature adaptations may not only benefit the host bacterium, but also could be useful for members of the consortium

[20]. In soil-derived communities, however, it is unknown if these commensurate bacteria are actually associated since sample collections were composited. The aim of the study is to assess the low temperature adaptations and biochemical properties of a community from frost-exposed perennial leaves, and to determine if their products could have utility for the low temperature protection of beneficial species or processes.

### MATERIALS AND METHODS

**Leaf samples and culture conditions.** Leaves of *Chrysanthemum indicum* (cultivar “Arizona Sun”) were collected in Kingston Ontario, in mid January, after 81 days of low temperatures (<0°C on a diurnal basis; [http://www.weatheroffice.gc.ca/canada\\_e.html](http://www.weatheroffice.gc.ca/canada_e.html)). After washing with sterilized water, the leaves were ground with a mortar and pestle in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and serially-diluted homogenates were cultured in 50 ml of 10% tryptic soy broth (TSB; Difco, USA) or on 10% TSB agar, at 22°C overnight. Liquid cultures were used to construct microbial community libraries (see below) and, as well, individual colonies were examined with those of distinct morphology streaked on 10% TSB agar to obtain single isolates. Control strains, *P. syringae* B728a and *E. coli* TG2, were provided by Dr. D. Guttman and Dr. G. Voordouw, respectively.

**Clone library construction and analysis.** DNA was isolated from both community liquid cultures and



from single isolates using a phenol-chloroform method [21]. The 16S rRNA gene sequence was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the purified genomic DNA with "universal" bacterial primers (8f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG and R1406: 5'-ACGGGCGGTGTGTAC; [22]). Amplification was performed at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 0.5 min, 55°C for 0.5 min and 72°C for 2 min, and finally 30 min at 72°C. After electrophoretic separation of the amplified products on 1% agarose gels, the sequences were purified using a nucleotide removal kit (Qiagen, ON, Canada), cloned into pGEMT vector system and subsequently transformed to generate the 16S rRNA gene libraries (Promega, CA, USA). Randomly-selected individual plasmids from the enrichment cultures (48 total) as well as those derived from single colonies (12) were PCR-amplified as above, sequenced and putatively identified by comparison to database sequences using BLAST (National Center for Biotechnology Information web site and the Genbank database; www.ncbi.nlm.nih.gov).

**Ice-association and resistance assays.** Ice nucleation activity (INA) assays were performed as previously described [23], using *Pseudomonas syringae* B728a as a positive control. Nucleation was assessed by measurement of the heat of crystallization (1 ml samples) and with crossed-polarized images (2 µl). IR inhibition assays were performed as previously described [20] by comparing ice crystal size immediately after freezing (-50°C) and after annealing overnight (-6°C) as indicated [24]. INA and IR inhibition assays were routinely repeated three or more times.

Stationary phase cultures (~10<sup>8</sup> cells/ml) were treated with multiple freeze-thaw cycles using a custom cryocycler [20]. Bacterial viability was assessed after 12 and 24 freeze-thaw cycles, with each cycle consisting of 1 h at -18°C and 1 h at 5°C. Numbers of viable bacteria were determined as colony forming units (CFU) on 10% TSB agar incubated at 22°C for 144 h and normalized to an initial count of 1 × 10<sup>8</sup> cells/ml. For testing the effect of EPS on isolate freeze-thaw viability, the EPS preparations (see below) were UV-sterilized for 30 min prior to addition to cultures (0.8 ml). Some EPS preparations (0.2 ml) were treated with proteinase K (1 mg/ml) or phospholipase C (40 U/ml) for 60 min at 37°C and subsequently heated (30 min at 65°C) to inactivate the added enzymes. Control experiments included EPS preparations without enzyme addition, medium alone, and *E. coli* TG2 cultures. Freeze-thaw viability was routinely assayed in triplicate, but experiments using purified preparations were done in duplicate.

**Adhesion, motility and electron microscopy.** Selected isolates and *E. coli* TG2 controls were assessed for their adhesion to polyvinyl chloride (PVC) as previously described [25, 26]. Stationary phase cultures were diluted (1%) with 10% TSB and cultured at 22°C for 48 h or 72 h. After adding crystal violet (0.5% final

concentration) and incubating for 15 min, the medium and any unattached bacteria were decanted and the wells were rinsed 5 times with distilled water. Adhering dye was then extracted from the wells in the PVC microtitre plates with 95% ethanol (200 µl) and the absorbance was determined spectrophotometrically at 595 nm.

Motility was assessed on a modified semi-solid *Azotobacter* medium (g/l): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0.2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0.8; MgSO<sub>4</sub> - 0.2; CaSO<sub>4</sub> - 0.1; yeast extract - 0.5; mannitol - 2, and a trace of Na<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub> and FeCl<sub>3</sub> in different agar or agarose concentrations, as indicated previously [26]. Swimming, swarming and twitching assays were conducted on 0.3% agarose, 0.5% and 1.5% agar, respectively. All motility assays were initiated by the transfer of colonies grown on 10% TSB agar to the appropriate *Azotobacter* medium with sterilized tooth picks and assessed as previously described [26].

Biofilms were examined by scanning electron microscopy (SEM). Selected isolates and control *E. coli* TG2 cultures were streaked on 10% TSB agar and incubated at 22°C for 48 h, prior to transfer to 4°C for 120 h. They were fixed overnight with 5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4), and washed three times for 5 min each with 0.01 M PBS (pH 7.4). Blocks (2 × 5 mm) were cut, post-fixed for 2 h at 22°C in 1% osmium tetroxide and washed three times (5 min each) with 0.01 M PBS. The samples were then dehydrated with a graded series of ethanol and dried in a critical-point drying apparatus, and subsequently mounted on stubs, coated with a thin layer of gold and then examined under a S-450 scanning electron microscope (Hitachi, Japan) operated at 20 kV. Images were examined and recorded at magnifications of 5000×, 10000× and 20000×.

Bacterial strains were examined under a transmission electron microscope (TEM) after negative staining with phosphotungstic acid (PTA). Briefly, overnight cultures of bacterial cells in 10% TSB (~1 × 10<sup>8</sup> cells/ml) were centrifuged at 10,000 g for 10 min. The pelleted cells were washed three times in 1 ml of 0.01 M PBS, with centrifugation as described above each time and then washed twice in 50 mM MgSO<sub>4</sub> (pH 7.4; 50 µl). The washed cells were negatively stained by mixing the cell suspension (10 µl) with 2% PTA (pH 7.0; 2 µl) for 1 min. After transfer of a drop of cell suspension to Formvar-coated nickel grids and absorbing excess liquid with a small piece of Whatman filter paper, the grids were air-dried at room temperature. The cells were viewed on H-7000 electron microscope (Hitachi, Japan) operated at 75 kV and representative photomicrographs captured (15,000× magnification).

**EPS preparation and analysis.** Single colonies of *E. billingiae* J10 were used to inoculate *Azotobacter* broth medium (10 ml) and after 24 h at 22°C, these cultures were used to inoculate the same medium in shake flasks (4 l). After 120 h at 22°C, the cultures were transferred to 4°C for 1 week, then they were centri-

fuged (8000 g for 60 min) and the resulting supernatants added to two volumes of 95% ethyl alcohol or, alternatively, 60% saturated ammonium sulfate. After precipitation overnight at 4°C and centrifugation (8000 g for 90 min), the pellets were resuspended in distilled water and dialyzed against 6 changes of distilled water over several days. The dialyzate was then lyophilized and resuspended in distilled water (2 ml). Proteins were separated on 12.5% SDS-PAGE gels and subsequently visualized by staining with Coomassie Blue G250 (Sigma, Canada). Protein concentration was determined using a bicinchoninic acid assay (BCA; Thermo Scientific, USA) with bovine serum albumin as the standard. Polysaccharide concentration was determined with the phenol-sulfuric acid assay using glucose as reference [14]. This preparation was used to investigate its susceptibility to proteinase K and phospholipase C as described in the ice-association and resistance assays above.

Further characterization of the EPS preparation was undertaken by excising and crushing the most prominent band (~35 kDa) from the SDS-PAGE gels. Gel pieces were destained (25 mM ammonium bicarbonate in 50% acetonitrile solution) and treated with 10 mM dithiothreitol in 100 mM ammonium bicarbonate at 56°C for 1 h. After subsequent incubation with 55 mM iodoacetamide at 24°C for 45 min, the gel particles were dried with a SpeedVac centrifuge and subjected to protease digestion in 25 mM ammonium bicarbonate containing 1 ng/μl sequencing grade trypsin (Roche, Canada), for 18 h at 37°C. Peptide fragments were sequentially extracted with 0.1% formic acid, followed by 60% acetonitrile/0.1% formic acid, and then pure (100%) acetonitrile, dried as described above, and desalted using C18 Zip Tips (Millipore, USA).

**MALDI QqTOF mass spectrometry.** Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) of the purified EPS protein samples was performed on an Applied Biosystems/MDS Sciex QStar XL Quadrupole Time-of-Flight (QqTOF) mass spectrometer equipped with a oMALDI II source and a nitrogen laser (337 nm). The samples were prepared at a ratio of 1 : 1 (v/v) of the peptide digest to matrix (i.e. 2,5-dihydroxybenzoic acid), and then deposited on a stainless steel MALDI plate. After MALDI MS mapping, peptide sequences were analyzed by tandem mass spectrometry (MS/MS) using argon as the collision gas. The resulting peptide masses were searched against the National Center for Biotechnology Information database using the MS-Fit program with ProteinProspector at the UCSF web site (<http://prospector.ucsf.edu>), and the sequences were identified by the Mascot search engine (Matrix-Science; <http://www.matrixscience.com>) based on the MS/MS ions on each spectrum. Search parameters were set to allow two missed trypsin cleavage sites, and the possible modifications of methionine oxidation, carbamidomethylation, deamidation of asparagine and glutamine, and N-terminal pyroglutamation.

Mass tolerance between calculated and observed masses in database search was considered in the range of ±100 ppm for the MS peaks and ±0.2 Da for the MS/MS fragment ions.

## RESULTS AND DISCUSSION

An overwintering epiphyte consortium could theoretically allow survival of different species by the sharing of extracellular macromolecules, even though individual bacteria may not be adapted for survival. Fifteen different identified sequences (with 16S rRNA sequence ≥97% identity to the strains in the data bases) were obtained from 60 recovered individual library clones and isolates and approximately half of them had ice-association activities (Table 1). The *P. syringae* J6 isolate had INA comparable to the nucleation activity (type I; mean freezing point ≤2°C) observed in the *P. syringae* B728a controls. IR inhibition, as evidenced by the retention of small size ice crystals after overnight annealing at -6°C, was observed in 6 isolates including *Rahnella* sp. W11, *Duganella zoogloeoides* Y11, *Erwinia billingiae* J10, *Sphingobacterium kitahiroshimense* Y2, *Chryseobacterium* sp. J3, and *Flavobacterium/Chryseobacterium* sp. Yin (Table 1). Revised classification places *Flavobacterium* in the genus *Chryseobacterium* and thus this isolate has been renamed to reflect this. It should be noted that ice-association phenotypes are relatively uncommon. When a portion of the isolates with ice-associating activities were investigated for freeze-thaw resistance, all showed higher levels of freeze-thaw survival than the *E. coli* controls, which lost 7 orders of viability after 12 freeze-thaw cycles, and with no living cells after 24 cycles (Fig. 1; Table 1). In contrast, three of the isolates with IR inhibition activity (*S. kitahiroshimense* Y2, *E. billingiae* J10 and *Flavobacterium/Chryseobacterium* sp. Yin) showed little loss in viability after 36 freeze-thaw cycles (Fig. 1), and less than a ~3 order of magnitude decline (CFU/mL) after 48 cycles (not shown). These observations are consistent with a report of a soil *Chryseobacterium* sp. C14 with IR inhibition that was remarkably freeze-thaw hardy [20]. Notwithstanding, one of the tested epiphytes, *P. syringae* J6, was more susceptible – it lost 7 orders of viability by 24 freeze-thaw cycles and was not viable after 36 cycles (Fig. 1).

We speculated that the *P. syringae* J6 isolate and other frost-susceptible bacteria might depend on affiliation with the epiphyte community for freeze-thaw survival. Three of the identified isolates (*S. kitahiroshimense*, *E. billingiae*, and *Chryseobacterium* sp.) grew well in culture, with the prospect of practical utility, and therefore these bacteria were selected for further characterization. Resistance to environmental stress can be associated with biofilms [19] and, therefore, these isolates were tested for properties often allied with biofilm production including adherence, motility and matrix affiliation. Motility and biofilm formation

**Table 1.** Fifteen isolates obtained from 60 sequences derived from enrichment cultures and single colonies from frost-exposed perennials, their closest matches and their ice association activities

Isolate	Closest BLAST Match	Identity, %	Ice-association activity*	Freeze-thaw activity**
<i>Pseudomonas syringae</i> J6	<a href="#">CP000075.1</a>	99	INA	+
<i>Erwinia billingiae</i> J10	<a href="#">Y13249.1</a>	98	IRI	+++
<i>Flavobacterium/Chryseobacterium</i> sp. Yin	<a href="#">AM177621.1</a>	99	IRI	+++
<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i> Y2	<a href="#">AB361248.1</a>	98	IRI	+++
<i>Chryseobacterium</i> sp. J3	<a href="#">DQ530158.1</a>	99	IRI	+++
<i>Rahnella</i> sp. W11	<a href="#">AB476622.1</a>	100	IRI	nt
<i>Duganella zoogloeoide</i> Y11	<a href="#">NR_025833.1</a>	99	IRI	nt
<i>Geobacterium</i> sp. J6	<a href="#">AM712156.1</a>	100	NA	nt
<i>Massilia aurea</i> J9	<a href="#">AM231588.2</a>	99	NA	nt
<i>Sphingomonas</i> sp. J2	<a href="#">AY661593.1</a>	100	NA	nt
<i>Janthinobacterium</i> sp. L1	<a href="#">GQ179711.1</a>	99	NA	nt
<i>Pseudomonas</i> sp. L14	<a href="#">GQ179727.1</a>	99	NA	nt
<i>P. fluorescens</i> L37	<a href="#">AM933520.1</a>	99	NA	nt
<i>P. trivialis</i> L48	<a href="#">FJ179366.1</a>	99	NA	nt
<i>P. veronii</i> L32	<a href="#">AY179328.1</a>	99	NA	nt

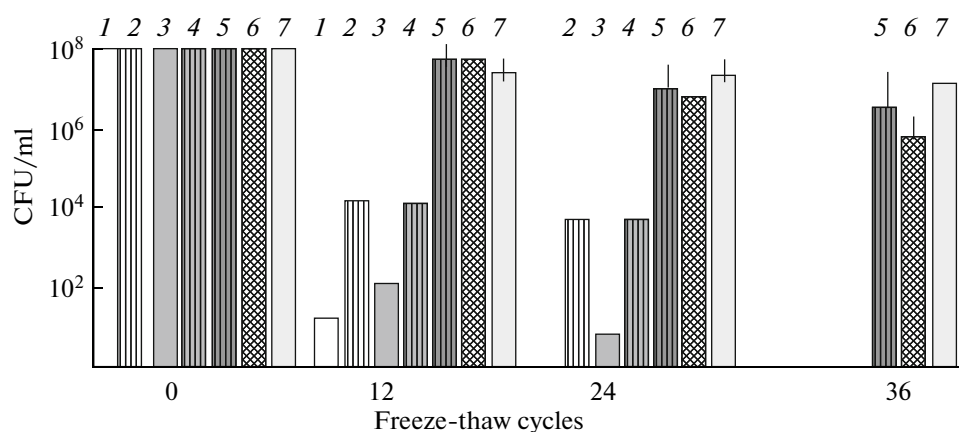
\* Ice-associating activity is classified as ice nucleating activity (INA), ice recrystallization inhibition (IRI), or not active in these assays (NA).

\*\* Freeze-thaw activity is classified as + for the presence of viable cells after 24 freeze-thaw cycles, ++ for the presence of viable cells after 48 cycles and +++ for cultures showing a decrease in one to three logs of viability after 48 cycles. Not tested cultures are indicated as nt.

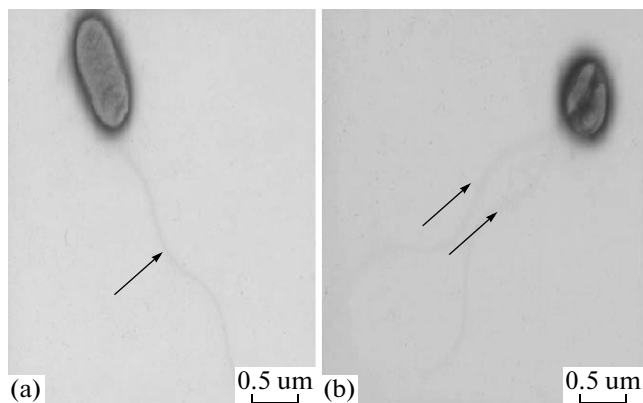
are characteristically found together in certain bacteria such as *E. carotovora* where it has been suggested that flagella-derived motility is important for biofilm establishment and morphology [27].

*E. coli* controls and *Chryseobacterium* sp. were the least adhesive of the isolates with the epiphyte showing

a 15% reduction in crystal violet staining ( $p < 0.05$  compared to the controls) and with no evidence of motility. In contrast, *E. billingiae* and *S. kitahiroshimense* showed adherence (with means of >44% crystal violet staining over controls;  $p < 0.05$ ). However, only the *E. billingiae* cells could be classified as highly mo-



**Fig. 1.** Freeze-thaw resistance of chosen isolates derived from frost-exposed perennial leaves. Control *E. coli* TG2 (1), *P. syringae* J6 (3), *E. billingiae* J10 (5), *Chryseobacterium* sp. Yin (6), and *S. kitahiroshimense* Y2 (7), were subjected to 12, 24 or 36 freeze-thaw cycles with viability (CFU/ml) normalized to the concentration at the stationary stage ( $1 \times 10^8$ ). Standard errors of means are shown only if the error bars are sufficiently large to be depicted. Viability of cultures with the addition of the *E. billingiae* J10 EPS preparation (20%) was shown as *E. coli* TG2 + EPS (2), and *P. syringae* J6 + EPS (4) for 12 and 24 freeze-thaw cycles, with the bars placed to the right of those representing cultures with no added EPS (1 vs 2 and 3 vs 4).



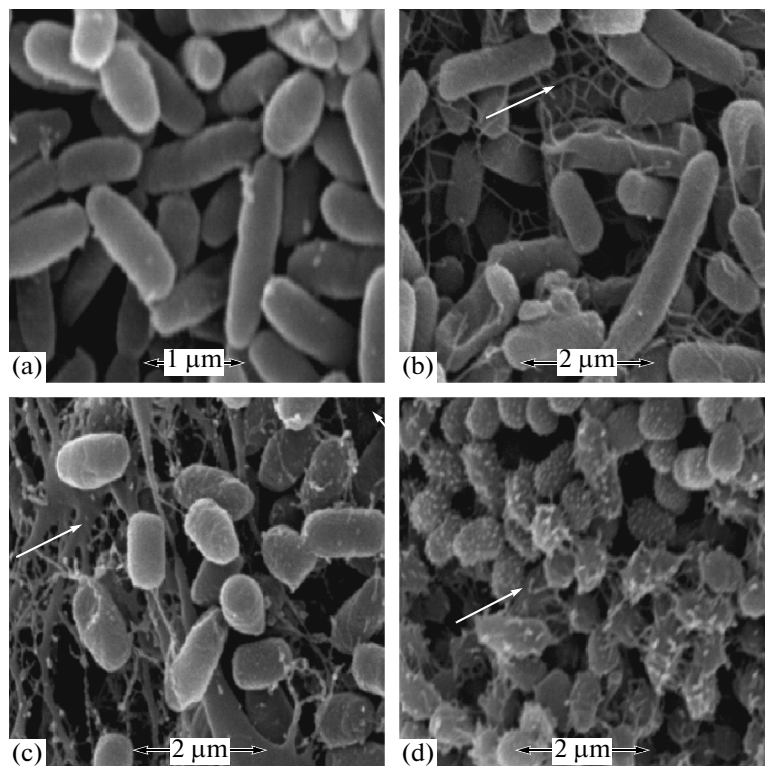
**Fig. 2.** Representative transmission electron micrographs of the *E. billingiae* J10 cultures stained with phosphotungstic acid. A monotrichous polar flagellum is marked with an arrow (a), and a dividing cell is shown on (b). Other isolates did not show flagella and thus are not shown.

tile on semi-solid medium, with characteristic swimming behavior and distinct swarming rings on appropriate media. Motility assays were verified with TEM observations of negatively stained preparations to confirm the presence or absence of flagella. No flagella were associated with either *Chryseobacterium* sp. or *S. kitahiroshimense* (not shown), but a flagellum was

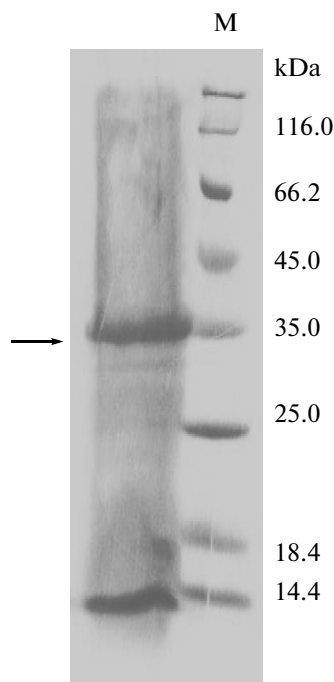
visualized on *E. billingiae*, with two flagella in dividing cells (Fig. 2).

To determine if the adhesive qualities of *E. billingiae* and *S. kitahiroshimense* were associated with biofilm formation, the specimens were examined by SEM. Control *E. coli* cells were similar to published images of this species [28], and there were no obvious extracellular structures associated with *Chryseobacterium* sp. (Fig. 3). *S. kitahiroshimense* showed a limited amount of filamentous material but more than the small amount of matrix seen with *E. coli*, consistent with a low level of biofilm formation. In contrast, SEM examination of *E. billingiae* showed complex extracellular formation that appeared to be composed of matrix material, void space and with 'slimy' structures adhering to the bacteria cells (Fig. 3). Thus, *E. billingiae* showed motility, had a flagellum and macro-colony morphology, and was also affiliated with a complex biofilm-like matrix. Together these adherence and motile phenotypes were similar to those described for other flagellated biofilm producers e.g. [29].

The observed evidence of biofilm formation in *E. billingiae* was further confirmed by biochemical characterization. Fractionation of the *E. billingiae* matrix (using either alcohol or salt precipitation as an initial purification step) resulted in EPS preparations that appeared to be typical of biofilm material, primarily composed of polysaccharides (at a mean concen-



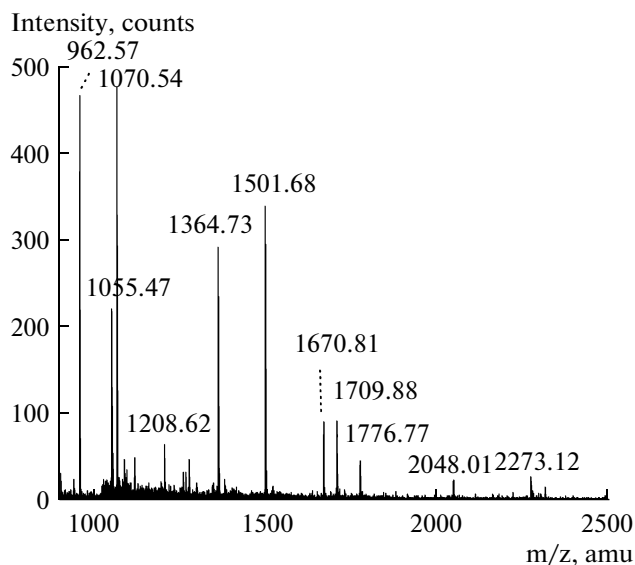
**Fig. 3.** Scanning electron micrographs of representative epiphytes including *Chryseobacterium* sp. Yin (a), *E. billingiae* J10 (c) and *S. kitahiroshimense* Y2 (d) as well as control *E. coli* TG2 (b). Arrows indicate representative extracellular matrix structures surrounding *E. billingiae* cells which are less obvious in *S. kitahiroshimense* and *E. coli*.



**Fig. 4.** SDS-PAGE of the partially purified EPS preparation from *E. billingiae* J10 stained for protein with Coomassie Blue. The arrow indicates a major protein band at 35 kDa; a size marker protein mixture was loaded in the lane marked M.

tration of 2.4 mg/ml) and proteins (at a mean concentration of 1.5 mg/ml). Denaturing gel electrophoresis resolved a major 35 kDa protein band and a less-consistent 14 kDa band (Fig. 4). Tryptic digestion and MALDI QqTOF mass spectrometric analysis of the 35 kDa band (Fig. 5) revealed 10 high abundance peptides (Table 2) that showed sequence identity to two *E. billingiae* protein species, corresponding to the outer membrane protein A (OmpA) and outer membrane protein F (OprF), as revealed by the genomic sequence [30]. Both OmpA [31] and OprF [29] are associated with biofilms. Indeed, strains with disrupted *OmpA* genes have thinner biofilms and are more sensitive to chemical stresses [32].

Having putatively identified the protein components of *Erwinia* biofilms in an isolate that was also characterized by high freeze-thaw survival and IR inhibition (Fig. 1 and Table 1), we investigated the possibility that it could increase the freeze-thaw survival of the other community members. The addition of the *E. billingiae* or *S. kitahiroshimense* cultures to isolates that were relatively freeze-thaw susceptible increased their recovery after 24 freeze-thaw cycles (not shown), but the nature of the conferred protection was difficult to attribute in these complex systems. Therefore, in order to more rigorously investigate any cross-species benefit, the *E. billingiae* EPS preparation was added to two isolates with little evidence of biofilm under the conditions studied, as well as a freeze-thaw susceptible



**Fig. 5.** MALDI QqTOF mass spectrometric analysis of trypsin-digested peptides from the *E. billingiae* J10 EPS preparations. The peptides were derived from the 35 kDa band (as in Fig. 4).

phenotype (Figs. 1 and 3). The viability of *P. syringae* J6 was increased almost three orders of magnitude (from  $\sim 10^1$  to  $\sim 10^4$  CFU/ml in 24 cycles) with the addition of the *E. billingiae* EPS preparation (Fig. 1). Likewise, the viability of *E. coli* was increased by the addition of the EPS preparation an estimated four orders of magnitude (from no viable cells to  $3.1 \times 10^4$  CFU/ml). Taken together, the viability of these two cultures increased by 1000–10000 times after 24 freeze-thaw cycles, suggesting that biofilm components could contribute to the overall freeze-thaw resistance of the epiphyte community. At least some of this protection appeared to be associated with protein since limited proteolysis of the EPS preparation resulted in a 10-fold reduction (to  $3.1 \times 10^3$  CFU/ml) in the recovery of the freeze-thaw susceptible *E. coli* culture after 24 cycles, compared to experiments using the untreated *E. billingiae* EPS. In contrast, phospholipase digestion only reduced the apparent protection about two-fold (to  $1.3 \times 10^4$  CFU/ml).

Certain epiphytes are associated with biofilm production [33], and as mentioned earlier, biofilms and EPS are often associated with stress resistance [19]. Nevertheless, the relationship between biofilm formation and freeze-thaw resistance is not as well known. It is possible, though, that biofilms act as hydrocolloid-like stabilizers to not only prevent the migration of forming ice crystals but also to reduce water mobility and thereby reduce the probability of IR [34]. Indeed, we speculate that the biofilm of *E. billingiae* could act similarly to the biofilm-associated xanthan gum of *Xanthomonas* sp., which is used by the food industry as a thickener and to inhibit IR [13]. Further support is

**Table 2.** MALDI QqTOF MS/MS analyses of the tryptic digest of the 35 kDa protein band purified from the extracellular polymeric substance of *E. billingiae* J10, showing correspondence (as indicated by the matches between the measured m/z of the 35 kDa peptides and the calculated masses of the protonated peptides in the data base) to peptides from two genes in the sequenced genome of *E. billingiae*, strain Eb 661 [30]

m/z*	[MH] <sup>+</sup> **	Delta, Da	Position	Peptide sequence
Outer membrane protein A (gi 299061956, <i>E. billingiae</i> , Eb661)				
1055.47	1055.47	-0.00	25–33	DNTWYTGAK
1070.54	1070.55	-0.01	230–238	SDVLFTFNK
1208.62	1208.65	-0.03	289–299	AQSVVDYLVS
1364.73	1364.75	-0.02	288–299	RAQSVVDYLVS
1670.81	1670.82	-0.01	109–122	LSYPITDDLDVYTR
Outer membrane protein F (gi 300716100, <i>E. billingiae</i> , Eb661)				
962.57	962.58	-0.01	101–109	TRLGFAGLK
1501.68	1501.69	-0.01	322–333	YFEVGATYYFNK
1709.88	1709.91	-0.03	352–368	LGIGSGDTVALGLVYQF
1776.77	1776.81	-0.04	241–256	YDANNVYLAASYAEGR
2048.01	2048.04	-0.03	261–281	ISGNIIDVNGASNAVSGFANK

\* The measured mass to charge ratio (m/z).

\*\* The calculated average mass for the protonated species.

provided by previous studies that have shown an association of bacterial EPS and ice [14], with links established between biofilms and resistance to cold and osmotic stress [13, 14, 34].

By themselves, the individual epiphytes in culture showed a range of freeze-thaw resistance (Fig. 1), but as a community, they had survived freeze-thaw stress conditions for months. Since biofilms can accommodate multiple bacteria on a substrate [33] and are associated with environmental stress resistance, it appears reasonable that at least some EPS-producing members could facilitate the persistence of other epiphyte community members. Our study highlights a number of mechanisms involved in the overwintering of an epiphyte community, even for that proportion of the consortium that is culturable, but it also emphasizes that the adaptive properties of a particular species may also serve to support the overall freeze-thaw resistance of microbes in the same niche. One of these, a component of the *Erwinia* EPS, has been partially characterized and the way is now clear to test it for its utility for the low temperature protection of beneficial species or other applied processes. The dramatic increase in the survival of *P. syringae* with EPS (Fig. 1) is of particular note since this species is an efficacious biological control agent with activity against pest fungi, plants and insects (35) but it is not intrinsically very freeze tolerant.

Despite the necessary limitations of the experimentally-dictated survey, this report underscores the wealth of low temperature adaptations including ice-association, freeze-thaw resistance and biofilm formation that all contribute to the complexity found in a single epiphyte community, as well as the potentially

useful products that can be identified from such consortia.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Dr. K. Jarrell and Ms. D. Nair are thanked for their advice on bacterial motility assays and the negative staining, Ms. X. Guo and Ms. W. Shao for technical help, Dr. L. Graham for peptide sequencing suggestions, and Drs. D. Guttman and G. Voordouw (Universities of Toronto and Calgary, respectively) for control bacterial strains. Financial support was from a Queen's University graduate stipend to Z. Wu, a Queen's University Research Chair to V. Walker, as well as a Natural Science and Engineering Research Council (Canada) grant to V. Walker.

#### REFERENCES

- Morozkina, E.V., Slutskaia, E.S., Fedorova, T.V., Tugay, T.I., Golubeva, L.I., and Koroleva, O.V., *Applied Biochem. Microbiol.*, 2010, vol. 46, no. 1, pp. 1–14.
- Cavicchioli, R., *Astrobiology*, 2002, vol. 2, no. 3, pp. 281–292.
- Cao-Hoang, L., Dumont, F., Marechal P.A., Le-Thanh, M., and Gervais, P., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol. 77, no. 6, pp. 1379–1387.
- Villeret, V., Beeumen, J.V., Chessa, J.P., and Gerday, C., *Protein Science*, 2008, vol. 6, no. 11, pp. 2462–2464.
- Huston, A.L., Methe, B., and Deming, J.W., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, vol. 70, no. 6, pp. 3321–3328.
- Lindow, S.E., Arny, D.C., and Upper, C.D., *Plant Physiol.*, 1982, vol. 70, no. 4, pp. 1084–1089.

7. Orser, C., Staskawicz, B.J., Panopoulos, N.J., Dahlbeck, D., and Lindow, S.E., *J. Bacteriol.*, 1985, vol. 164, no. 1, pp. 359–66.
8. Sun, X., Griffith, M., Pasternak, J.J., and Glick, B.R., *Can. J. Microbiol.*, 1995, vol. 41, no. 9, pp. 776–784.
9. Gilbert, J.A., Hill, P.J., Dodd, C.E., and Laybourn-Parry, J., *Microbiol.*, 2004, vol. 150, no. 1, pp. 171–180.
10. Muruyoi, N., Sato, M., Kaneko, S., Kawahara, H., Obata, H., Yaish, M.W.F., Griffith, M., and Glick, B.R., *J. Bacteriol.*, 2004, vol. 186, no. 17, pp. 5661–5671.
11. Kawahara, H., Iwanaka, Y., Higa, S., Muruyoi, N., Sato, M., Honda, M., Omura, H., and Obata, H., *Cryo Letters*, 2007, vol. 28, no. 1, pp. 39–49.
12. Garnham, C.P., Gilbert, J.A., Hartman, C.P., Campbell, R.L., Laybourn-Parry, J., and Davies, P.L., *Biochem. J.*, 2008, vol. 441, no. 1, pp. 171–180.
13. Regand, A. and Goff, H.D., *J. Dairy Sci.* 2002, vol. 85, no. 1, pp. 2722–2732.
14. Marx, J.G., Carpenter, S.D., and Deming, J.W., *Can. J. Microbiol.*, 2009, vol. 55, no. 1, pp. 63–72.
15. Krembs, C., Eicken, H., Junge, K., and Deming, J.W. *Deep-Sea Res.*, 2002, vol. 49, part 1, pp. 2163–2181.
16. Sullivan, C.W. and Palmisano, A.C., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1984, vol. 47, no. 4, pp. 788–795.
17. Sutherland, I.W., *Adv. Microbiol. Phys.*, 1982, vol. 23, pp. 79–150.
18. Gilbert, P., Das, J., and Foley, I., *Adv. Dent. Res.*, 1997, vol. 11, no. 1, pp. 160–167.
19. Smirnova, T.A., Didenko, L.V., Tiganova, I.G., Andreevskaya, S.G., Alekseeva, N.V., Stepanova, T.V., and Romanova, Yu.M., *Applied Biochem. Microbiol.*, 2010, vol. 46, no. 17, pp. 706–711.
20. Walker, V.K., Palmer, G.R., and Voordouw, G., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 3, pp. 1784–1792.
21. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> Ed., N.Y.: Cold Spring Harbor Press, 1989.
22. Telang, A.J., Ebert, S., Foght, J.M., Westlake, D.W.S., Jenneman, G.E., Gevertz, D., and Voordouw, G., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, vol. 63, no. 5, pp. 1785–1793.
23. Wu, Z., Qin, L., and Walker, V.K., *Microbiol.*, 2009, vol. 155, no. 4, pp. 1164–1169.
24. Knight, C.A. and DeVries, A.L., *Science*, 1989, vol. 245, no. 4917, pp. 505–507.
25. Balestrino, D., Ghigo, J.M., Charbonnel, N., Haagensen, J.A., and Forestier, C., *Environ. Microbiol.*, 2008, vol. 10, no. 3, pp. 685–701.
26. Rashid, M.H., Rumbaugh, K., Passador, L., Davies, D.G., Hamood, A.N., Iglewski, B.H., and Kornberg, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, vol. 97, no. 17, pp. 9636–9641.
27. Hossain, M.M. and Tsuyumu, S., *J. Gen. Plant Pathol.*, 2006, vol. 72, no. 1, pp. 34–39.
28. Chen, C., Liao, X., Jiang, H., Zhu, H., Yue, L., Li, S., Fang, B., and Liu, Y., *Environ. Toxicol. and Pharm.*, 2010, vol. 30, no. 1, pp. 5–10.
29. Allison, C. and Hughes, C., *Sci. Prog.*, 1991, vol. 75, no. 298, pp. 403–422.
30. Kube, M., Migdoll, A.M., Gehring, I., Heitmann, K., Mayer, Y., Kuhl, H., Knaust, F., Geider, K., and Reinhardt, R., *BMC Genomics*, 2010, vol. 11, pp. 393 (doi:10.1186/1471-2164-11393).
31. Orme, R., Douglas, C.W., Rimmer, S., and Webb, M., *Proteomics*, 2006, vol. 6, pp. 4269–4277.
32. Wexler, H.M., Tenorio, E., and Pumbwe, L., *Microbiol.*, 2009, vol. 155, no. 8, pp. 2694–2706.
33. Morris, C.E., Monier, J., and Jacques, M. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, vol. 63, no. 4, pp. 1570–1576.
34. Regand A. and Goff, H.D., *J. Dairy Sci.*, 2006, vol. 89, no. 1, pp. 49–57.
35. Zakharenko, V.A., Il'ichev, A.L., Integrated Plant Protection Management in Russia, Integrated Pest Management in the Global Arena / Eds. Maredia, K.M., Dakouo, D., and Mota-Sanchez, D. Wallingford, Oxon, UK.: CABI Publishing, 2003, pp. 357–370.

UDC 631.46

## MICROBIAL ACTIVITY IN THE LANDFILL SOIL

© 2012 M. Swiontek Brzezinska, A. Burkowska, M. Walczak

*Department of Environmental Microbiology and Biotechnology, Institute of Ecology and Environmental Protection, Nicolaus Copernicus University, Toruń, Poland*

*e-mail: swiontek@umk.pl*

Received November 30, 2011

The research objective was to determine the activity of microorganisms in the soil exposed to direct influence of a landfill, as well as in the soil beyond its influence. Fluorescein diacetate (FDA) hydrolytic activity and respiration in the soil were determined. The highest number of cultivated bacteria was recorded at the site located within the zone of direct influence exerted by the landfill, whereas the least amount was found at a distance of 1000 metres from the landfill. In contrast, the largest numbers of molds were observed in the soil at a distance of 1000 m from the headquarters of the landfill. The highest FDA hydrolytic activity and biological oxygen demand (BOD<sub>5</sub>) were recorded in the soil by the headquarters of the landfill, and the least parameters were revealed at a distance of 1000 m from the landfill. It was found a high correlation between the number of bacteria and FDA hydrolytic activity of soil and BOD<sub>5</sub> in the north-eastern of the landfill. However, in the same place, there is a low correlation between the number of molds, and FDA hydrolytic activity of soil and BOD<sub>5</sub>.

A landfill is a construction object located and arranged in accordance with the regulations, and allotted for organized deposition of wastes with identified properties. There are different types of landfills: landfills for hazardous, inert, as well as other than hazardous and inert (municipal) wastes [1]. In Poland, municipal wastes are deposited in unorganized, semi-organized and organized facilities. Unorganized landfills are located in natural depressions and do not require special arrangements. Consequently, among others, uncontrolled emission of gases into the atmosphere takes place in a landfill of this type, as well as contamination of surface waters, surrounding areas with particulates (dust) and wastes of light ends through dispersion. Semi-organized landfills have a geomembrane, which isolates deposited wastes from a substratum. In this case, also emission of liquid and gaseous substances occurs. Organized landfills have a special location in accordance with hydrogeological and geotechnical criteria, as well as meets valid technical requirements. The advantage of landfilling as a method of waste disposal is the simplicity of the process, as well as high, short-term economic efficiency with low unit costs [2]. Waste deposition on landfills contributes to the development of substances, which are troublesome, hazardous and constituting a threat to the natural environment. The last might be manifested through: air contamination (physical, chemical and microbiological contamination, fetor, contamination with biogas), soil contamination, noise pollution and inconvenience related to the presence of birds, rodents, insects [3]. Soil contaminants are among the most difficult to remove. The contamination ensues through penetration of harmful and haz-

ardous substances into the soil. It leads to contraindications for cultivation of deciduous plants within contaminated roadside zones, such as lettuce, beetroots or cabbage, due to accumulation of heavy metals in their leaves. Soil microorganisms are important as they may contribute to purification of the soil environment. The biological stability of solid waste is one of the main issues related to the evaluation of the long-term emission potential and the environmental impact of landfills [4]. The biological activity of soil in the landfill is an important element of landfill waste. Soil microorganisms play a fundamental role in eliminating pollution. Monitoring of their activity is the definition of indicator of the pace of the process of biodegradation of landfill pollution.

The aim of the study is to determine the activity of microorganisms in the soil to reveal direct influence of a landfill, as well as in the soil beyond its influence.

### MATERIALS AND METHODS

**Landfill sampling site.** The research was carried out within the area of the city landfill in Toruń, central Poland. In geomorphological respect, it is a fragment of a high terrace in the ice-marginal valley of the Vistula River. The relief of the area is basically flat and slightly inclined in the south-western direction. In the geological structure, one can distinguish quaternary Holocene and Pleistocene sediments. The Holocene is represented by a thin layer of soil and deposited materials of 0.3–0.8 m in thickness. Depositions consist of sands mixed with humus, debris, slag, garbage. Beneath the soil and depositions, there are sands of fluvial and glacial accumulation. In the vicinity of the



composting plant, they reach down to the depth of 9–10 m. Below that, down to the depth of 13 m, fluvial-glacial gravel is deposited, and beneath them – lacustrine and glacial clay. The landfill is classified as a disposal ground for wastes other than hazardous and inert, with a cell sectioned off for landfilling of hazardous wastes.

**Sampling.** The surface soil (10–15 cm) was collected from the north-eastern and south-western parts of the landfill site, at three locations (sites): 1 – within the direct impact, 2 – 500 m from the landfill and 3 – beyond the impact (1000 m from the headquarters of the landfill). Soil samples were collected between May and November 2008.

**Soil microorganisms.** The number of microorganisms in the soil was determined with Koch's plate technique by the surface inoculation on appropriate culture media [5]. The number of heterotrophic bacteria was defined using a plate count agar medium (Merck, Germany). Nystatin ( $0.1 \text{ g l}^{-1}$ ) was added to the medium in order to inhibit the growth of fungi. The plates were incubated for 7 days at  $22^\circ\text{C}$ . Molds were determined using the Rose Bengal medium (Merck, Germany). The plates were incubated for 14 days at  $25^\circ\text{C}$ .

**Soil hydrolytic activity.** Soil hydrolytic activity expressed as fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis was determined following the method of Adam and Duncan [6]. It is known that FDA is a general substrate for several hydrolytic enzymes including esterases, lipases and certain proteases [7]. FDA hydrolytic activity was detected with spectrofluorimeter HITACHI F-2500 (Japan) measuring the product of hydrolysis (fluorescein).  $100 \mu\text{l}$  of FDA ( $1 \text{ mg/ml}$ ) was added to the assay suspension of  $1.0 \text{ g}$  soil in  $20 \text{ ml}$  of phosphate buffer ( $\text{pH } 6.0$ ). The assay mixture was placed on a rotary shaker at  $100 \text{ rpm}$  and incubated at temperature *in situ* for  $60 \text{ min}$ . The assay was terminated by adding chloroform/methanol ( $2 : 1 \text{ v/v}$ ), followed by centrifugation at  $10000 \times g$  for  $10 \text{ min}$  at  $4^\circ\text{C}$ . In supernatant the released fluorescein was measured (excitation and emission wavelength  $480 \text{ nm}$  and  $505 \text{ nm}$ , respectively). All samples were analyzed in three replicates.

**Soil respiration measurement.** Biological oxygen demand (BOD) is a measure of the amount of oxygen used by microorganisms as they feed upon organic matter. BOD of soil was measured using the OxiTop® Control system [8]. It acts as a system of bottles hermetically closed by a manometric head which allows you to monitor the pressure inside the bottle. If microorganisms consume polymer, they use oxygen available in test bottles and release carbon dioxide, which is immediately trapped by the sodium hydroxide solution. Consequently, we record a pressure decrease in a test bottle. The BOD value was calculated automatically by the OxiTop® instrument. BOD measurements in the soil were carried out as described in the WTW instructions [9] with modifications. A  $100 \text{ g}$  of

the soil were weighed out and placed in a BOD OxiTop® MG 1.0 bottle. The carriers with absorber  $\text{CO}_2$  ( $0.4 \text{ g NaOH}$ ) were placed in a bottle. The measured values were recorded in the OC 110 control system, in "Pressure p" mode. Samples were incubated for 5 days at temperature *in situ* to get  $\text{BOD}_5$  – the amount of dissolved oxygen consumed in 5 days by microorganisms. All samples were analyzed in three replicates.

**Statistical analysis.** Results were analyzed in STATISTICA 6.0, StatSoft, USA. Analysis of variance (ANOVA) facilitated comparison of site and part of landfill on abundances microorganisms, FAD hydrolysis and  $\text{BOD}_5$ . In addition, we determined correlation between abundance of microorganisms and hydrolytic activity and  $\text{BOD}_5$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

**Soil microorganisms.** The number of microorganisms in the soil of the landfill is presented in Table 1. It is obvious that the number of cultivated bacteria decreased together with the increase of the distance from the landfill. The highest number of these microorganisms was recorded at the site situated within the zone of direct influence of the landfill and the lowest number of bacteria was revealed at a distance of  $1000 \text{ m}$  from the landfill. It was found that the number of bacteria was much higher in the south-western part. On the other hand, the highest number of molds in the soil was recorded at a distance of  $1000 \text{ m}$  from the headquarters of the landfill and they were revealed in the south-western part, similarly to bacteria.

In the study of the influence of a municipal landfill on the soil microflora Nowak et al. [10] found that heterotrophic bacteria occurred in the largest numbers, actinomycetes were slightly less, and molds were the least numerous. The analysis of variance performed by the authors revealed that the number of bacteria and actinomycetes significantly depended on the sample collection site. The largest numbers of these microorganisms were recorded by the authors in the vicinity of the waste disposal ground. Their number decreased as the distance from the landfill increased. In contrast, the number of molds was not influenced by the soil sample collection site. The number and the activity of microorganisms are conditioned by different factors. The main factor is the amount of available organic matter, which comes mainly from plant residues, root secretions and partially from the biomass of microflora and microfauna.

**Microbial activity in the soil.** Microbial activity in the soil was expressed as fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis and  $\text{BOD}_5$ . Values of the FDA hydrolysis revealed in the soil at landfill are presented in Fig. 1. The highest FDA hydrolytic activity was recorded in the soil at the headquarters of the landfill, and the least one was found in the soil at a distance of  $1000 \text{ m}$  from the landfill. In the north-eastern part of the landfill,

**Table 1.** The number of microorganisms in the soil at the landfill. The results are presented in CFU 10<sup>3</sup>/g of dry weight ( $\pm$  – standard deviation,  $n = 3$ )

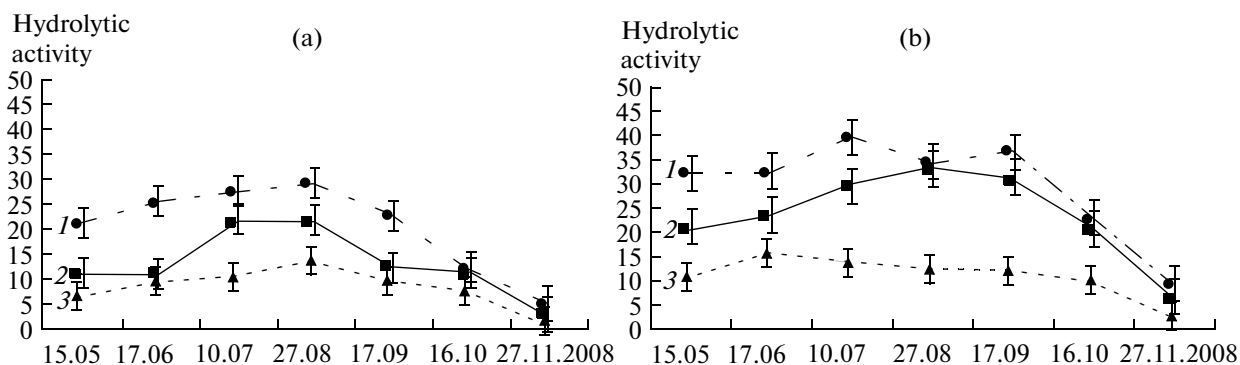
Date of sampling in 2008	Site*	The north-eastern part		The south-western part	
		cultivated bacteria	molds	cultivated bacteria	molds
15.05	1	4212 $\pm$ 1.1	12 $\pm$ 1.1	8512 $\pm$ 1.1	24 $\pm$ 2.2
	2	3523 $\pm$ 1.2	35 $\pm$ 2.2	5401 $\pm$ 1.5	65 $\pm$ 1.3
	3	2011 $\pm$ 1.1	45 $\pm$ 1.3	3200 $\pm$ 2.2	75 $\pm$ 1.1
17.06	1	5017 $\pm$ 1.3	4 $\pm$ 1.1	8121 $\pm$ 3.3	32 $\pm$ 1.3
	2	3211 $\pm$ 1.1	60 $\pm$ 1.2	6421 $\pm$ 1.5	70 $\pm$ 1.5
	3	2401 $\pm$ 1.2	35 $\pm$ 2.2	3511 $\pm$ 2.2	94 $\pm$ 3.3
10.07	1	6267 $\pm$ 2.2	19 $\pm$ 2.2	9312 $\pm$ 1.1	31 $\pm$ 2.3
	2	4121 $\pm$ 1.3	18 $\pm$ 1.1	6602 $\pm$ 1.3	81 $\pm$ 2.2
	3	3445 $\pm$ 1.2	19 $\pm$ 1.3	4311 $\pm$ 3.3	86 $\pm$ 1.1
27.08	1	6324 $\pm$ 1.2	9 $\pm$ 1.1	9814 $\pm$ 1.3	23 $\pm$ 1.2
	2	4621 $\pm$ 2.2	12 $\pm$ 2.2	7802 $\pm$ 2.2	33 $\pm$ 1.5
	3	3910 $\pm$ 1.1	27 $\pm$ 1.2	5232 $\pm$ 2.3	45 $\pm$ 2.2
17.09	1	5422 $\pm$ 1.3	14 $\pm$ 1.1	7511 $\pm$ 1.1	25 $\pm$ 3.3
	2	3021 $\pm$ 1.1	79 $\pm$ 1.1	4201 $\pm$ 3.3	41 $\pm$ 1.3
	3	2214 $\pm$ 1.2	12 $\pm$ 2.2	3325 $\pm$ 2.2	65 $\pm$ 1.1
16.10	1	3212 $\pm$ 2.2	5 $\pm$ 1.1	6311 $\pm$ 1.3	42 $\pm$ 1.3
	2	2714 $\pm$ 1.1	14 $\pm$ 1.3	3401 $\pm$ 1.5	35 $\pm$ 3.3
	3	1702 $\pm$ 1.2	17 $\pm$ 1.2	2547 $\pm$ 3.3	45 $\pm$ 1.5
27.11	1	2311 $\pm$ 2.2	3 $\pm$ 1.2	4311 $\pm$ 1.1	21 $\pm$ 2.2
	2	1201 $\pm$ 1.3	2 $\pm$ 2.2	2878 $\pm$ 2.3	12 $\pm$ 1.3
	3	931 $\pm$ 1.2	4 $\pm$ 1.1	1633 $\pm$ 2.2	31 $\pm$ 1.1

\* 1 – soil taken directly from at the headquarters of the landfill, 2 – soil taken 500 m from the landfill, 3 – soil taken 1000 m from the landfill.

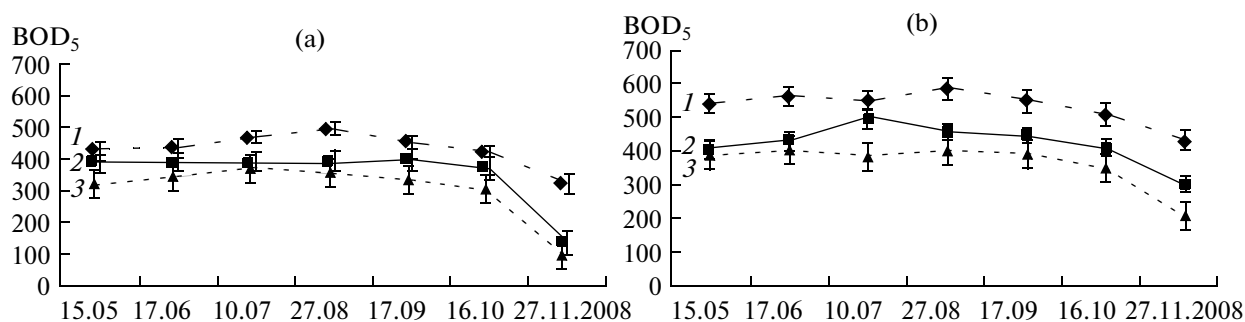
FDA hydrolytic activity ranged from 29.24  $\mu$ g of fluorescein per g of dry weight on site 1 to 1.35  $\mu$ g of fluorescein per g of dry weight on site III. However, in the south-western part of the landfill FDA hydrolytic activity changed from 39.85  $\mu$ g of fluorescein per g of dry

weight on site 1 to 2.61  $\mu$ g of fluorescein per g of dry weight on site 3.

BOD<sub>5</sub> in the soil depends on the site of sampling and analyzed part of the landfill (Fig. 2). In the north-eastern part of the landfill BOD<sub>5</sub> ranged from 494 mg

**Fig. 1.** FDA hydrolytic activity in the soil at a landfill in the north-eastern (a) and the south-western part (b).

1 – soil taken directly at the headquarters of the landfill, 2 – soil taken 500 m from the landfill, 3 – soil taken 1000 m from the landfill.



**Fig. 2.** BOD<sub>5</sub> in the soil at a landfill in the north-eastern (a) and the south-western part (b).

1 – soil taken directly at the headquarters of the landfill, 2 – soil taken 500 m from the landfill, 3 – soil taken 1000 m from the landfill.

of O<sub>2</sub> per kg of dry weight on site 1 to 102 mg of O<sub>2</sub> per kg of dry weight on site 3. However, in the south-western part of the landfill BOD<sub>5</sub> was higher, and changed from 587 mg of O<sub>2</sub> per kg of dry weight on site 1 to 207 mg O<sub>2</sub> per kg of dry weight on site 3.

Analysis of variance (Table 2) revealed statistically significant differences in the number of soil microorganisms and biological activity of the soil depending on the analyzed part of the landfill ( $p < 0.001$ ). It was found a high correlation between the number of bacteria, FDA hydrolytic activity and BOD<sub>5</sub> in the north-eastern of the landfill (correlation coefficient of 0.87–0.92). However, there is a low correlation between the number of molds, FDA hydrolytic activity of soil and BOD<sub>5</sub> (Table 3).

Microbiological activity is a good measure of organic matter management in natural habitats, because 90% of the energy flows through microbiological decomposers [11]. Relevant techniques for measuring the total microbiological activity must be uncompli-

cated and sensitive, and the incubation period should be as short as possible. Spectrophotometric determination of hydrolysis using FDA turned out to be a simple, sensitive and quick method for determination of microbiological activity in the soil and garbage [12]. FDA is hydrolysed by many different enzymes, such as: proteases, lipases, esterases [7, 13] and fluorescein is the product of its decomposition, which is determined with the spectrofluorimetric method [12]. The results of our research revealed that hydrolytic activity in the soil was different at particular sites. Both in the north-eastern and south-western parts, the activity of hydrolases and the number of soil microorganisms, were much bigger than at the main cell of the landfill. Most probably, pollutants of the landfill significantly influenced the increase of this activity. The research by Schnürer and Roswall [12] indicates some differences in the hydrolytic activity between soil layers, which could reflect smaller amounts of soil organic matter in deeper layers. In the investigation of the activity of acid phosphatase and the content of available phosphorus, Garbolińska and Borkowski [14] observed a higher enzymatic activity in the surface soil than in a deeper layer, both in samples collected from a meadow and in beech-fir forest. In the case of an ecotone, and, thus, a transitional zone between different biocenoses, they did not record any significant differences in the enzymatic activity between soil layers. The authors suggest that this fact is probably caused by a higher activity of microorganisms in the surface soil layer and increased number of small plant roots. They are responsible for the production of enzymes in the soil. Enzyme activity is generally higher in rhizosphere than in bulk soil as a result of greater microbial activity, sustained by root exudates or due to the release of enzyme from roots [15–17]. Lalke-Porczyk et al. [18] recorded that the activity of hydrolytic enzymes in the soil samples connected with willow roots was two times higher as compared to the soil beyond the range of roots' influence. The overall enzymatic activity of soils consists of intra- and extracellular activity of microorganisms. It depends on several factors and according to Pancholy and Rice [19] the type of added

**Table 2.** Two – way ANOVA test comparing the influence of the site (distance from landfills – 1) and part of the landfill site (north-eastern or south-western parts of the landfill – 2) on the numbers of soil microorganisms, FDA hydrolytic activity and BOD<sub>5</sub>

Source	Cultivated bacteria		Molds		FDA, hydrolytic activity		BOD <sub>5</sub>	
	F-ratio	P	F-ratio	P	F-ratio	P	F-ratio	P
Site 1	19.26	**	7.39	*	19.8	**	79.5	**
Part 2	19.57	**	22.57	*	17.3	**	58.5	**

\* Statistical differences at  $P < 0.01$ .

\*\* Statistical differences at  $P < 0.001$ .

F-ratio: among-groups variance to the within – group variance; site 1 – the statistical difference in the number of microorganisms and activity between the site 1, 2 and 3 (Table 1);

part 2 – the statistical difference in the number of microorganisms and activity between north-eastern and south-western parts of the landfill.

organic matter has the strongest influence. In the soil fertilized by liquid manure Kucharski and Władowska [20] found the highest activity of dehydrogenases in places fertilized with a lower dose of liquid manure rather than with a higher one, which is explained by the decreased fertility of soil fertilized with too high doses. The activity of hydrolytic enzymes is affected also by changes in the humidity and oxygenation of the soil.

The biological activity of microorganisms, apart from enzymatic activity, is a significant indicator that defines the intensity of organic matter transformations in water bodies. In our research, the OxiTop respirometric measuring system was applied, which permits to record the results at large time intervals. It is important when using sparingly decomposable compounds, which may occur in the landfill. A new generation of the OxiTop device for determination of the BOD enables to remember the measuring values from successive days, due to the electronic pressure-measuring system and memory. Vähäoja et al. [21] were looking for a detailed method for determining the biodegradation of various oils in subterranean waters. The method applied by the authors to determine the oxygen consumption with the use of OxiTop provided more accurate and more precise results as compared to traditional methods. Hufschmid et al. [22] had similar observations when investigating the contamination in liquid industrial wastes. The researches on the respiratory activity in the soil within the area of the landfill indicated that the activity was the highest within the zone of its direct influence. The BOD<sub>5</sub> decreased together with the increased distance from the headquarters of the landfill. Obviously, contaminants of the landfill had the influence on the increase in the respiratory activity of the soil. In the study of BOD<sub>5</sub> in the soil with the presence of shrimp wastes Swiontek Brzezinska et al. [23] found that BOD depended on temperature and incubation time, soil reaction, as well as shrimp wastes. The authors recorded the highest values of BOD<sub>5</sub> in the summer, when the presence of cephalic sections of shrimps was high and the main constituent of them was protein. In contrast, shells of shrimps were the least used by soil microorganisms, probably because they contained considerable amounts of a sparingly decomposable substance – chitin. When studying the soil respiration after addition of the sewage sludge, Quemada and Menacho [24] stated that the temperature and the water content influenced the soil respiration. Whereas according to Nadelhoffer et al. [25] soil respiration increased exponentially or linearly together with the temperature increase. Thus, the aforementioned environmental factors influenced the biological activity of the soil and diffusion of carbon dioxide [26]. The substances present in the soil are chemically instable and can be quickly oxygenated by soil microorganisms. Therefore, they affect the rate of microbiological soil respiration [27]. Soil respiration plays a critical role in determining a wide range of eco-

**Table 3.** Correlation between the number of microorganisms, FDA hydrolytic activity of soil and BOD<sub>5</sub>

Factor	Site	The north-eastern part		The south-western part	
		cultivated bacteria	molds	cultivated bacteria	molds
BOD <sub>5</sub>	1	0.82	0.83	0.76	0.62
	2	0.87	0.57	0.73	0.62
	3	0.91	0.20	0.83	0.63
FDA hydrolytic activity	1	0.85	0.91	0.66	0.80
	2	0.82	0.32	0.72	0.70
	3	0.92	0.12	0.61	0.84

logical phenomena, from the performance of individual plant to global atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations [28].

## REFERENCES

- Rosik-Dulewska, Cz., *Fundamentals of Waste Management*, Warsaw: Polish Scientific Publisher, 2002.
- Bilitewski, B., Hördtle, G., Marek, K., *Waste Management Handbook: Theory and Practice*, Warsaw: Publishing House Seidel-Przywecki, 2006.
- Leboda, R., and Oleszczuk, P., *Municipal Wastes and their Management*, Lublin: Publisher by the University of Maria Curie-Skłodowska University, 2002.
- Cossu, R. and Raga, R., *Waste Management*, 2008, vol. 28, no 2, pp. 381–388.
- Paul, E.A., Clark, F.E. *Soil Microbiology and Biochemistry*, Lublin: Publisher by the University of Maria Curie-Skłodowska University, 2000.
- Adam, G. and Dunkan H., *Soil Biol. Biochem.*, 2001, vol. 33, no. 7, pp. 943–951.
- Dick R.P., *Biological Indicators of Soil Health*. Oxford, UK: CAB International, 1997, pp. 121–156.
- WTW Applikationsbericht BSB 997 230; Respirometrische BSB<sub>5</sub> – Bestimmung von Häuslichem Abwasser mit dem OxiTop® Control – Order OxiTop® – Mass System*, Weilheim 1998.
- Platen, H. and Wirtz, A., *WTW/OxiTop®/ Appliance*, 1999.
- Nowak A., Przybulewska K., Litwińczuk M. // *Ecological Aspects of Soil Microbiology*. Poznan: Publisher University of Agriculture, 1998, pp. 233–241.
- Heal, O.W. and MacLean, S.F., *Unifying Concepts in Ecology*, Eds. Van Dobben W.H. and Lowe-McCannel, 1975, pp. 89–108.
- Schnürer, J. and Rosswall, T., *App. Environ. Microbiol.*, 1982, vol. 43, no. 6, 1256–1261.
- Rotman, B. and Papermaster, B.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1966, vol. 55, no. 1, pp. 134–141.
- Garbolińska, M. and Borkowski, A., *Acta Agr. Silv.*, 2006, vol. 49, pp. 203–211.
- George, T.S., Richardson, A.E., and Simpson, R.J., *Soil Biol. Biochem.*, 2005, vol. 37, no. 5, pp. 977–988.

16. Marschner, P., Grierson, P.F., and Rengel, Z., *App. Soil Ecol.*, 2005, vol. 28, no. 3, pp. 191–201.
17. Grierson, P.F. and Adams, M.A., *Soil Biol. Biochem.*, 2000, vol. 32, no. 13, pp. 1817–1827.
18. Lalke-Porczyk, E., Swiontek Brzezinska, M., Donderski, W., and Walczak, M., *Ecology and Technology*, 2008, vol. 16, no. 5, pp. 86–89.
19. Pancholy, S.K., Rice, E.L., *Soil Sci. Soci. Am. Proc.*, 1973, vol. 14, pp. 47–50.
20. Kucharski, J. and Władowska, E., *Acta Agr. Silv.*, 2004, vol. 42, pp. 265–270.
21. Vähöja, P., Kuokkanen, T., Välimäki, I., Vuoti, S., and Perämäki, P., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, vol. 381, pp. 445–450.
22. Hufschmid, A., Becker – Van Slooten, K., Strawczynski, A., Vioget, P., Parra, S., Péringer P., and Pulgarin, C., *Chemosphere*, 2003, vol. 50, no. 1, pp. 171–176.
23. Swiontek Brzezinska, M., Lalke-Porczyk, E., and Donderski, W., *Pol. J. Environ. Stud.*, 2010, vol. 19, no. 3, pp. 627–633.
24. Quemada, M. and Menacho, E., *Biol. Fertil. Soils*, 2001, vol. 33, pp. 344–346.
25. Nadelhoffer, K.J., Giblin, A.E., Shaver, G.R., and Linkins, A.E., *In: Arctic Ecosystems in a Changing Climate. An Ecophysiological Perspective*. Chapin III F.S., Jeffries R.L., Reynolds J.F., Shaver G.R., Svoboda J. (Eds.), San Diego: Academic Press, 1992, pp. 281–300.
26. Kelting, D.L., Burgerm, J.A., and Edward, G.S., *Soil Biol. Biochem.* 1998, vol. 30, no. 7, pp. 961–968.
27. Silora, L.J. and McCoy, J.L., *Biol. Fertil. Soils*, 1990, vol. 9, pp. 19–24.
28. Liu H.S., Li L.H., Han X.G, Huang J.H., Sun J.X., and Wang H.Y., *App. Soil Ecol.* 2006, vol, 32, pp. 284–292.

УДК 573.6:579.222:579.262:579.63

## ОБРАЗОВАНИЕ БИОГАЗА МИКРОБНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ ПРИ РАЗЛОЖЕНИИ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ПИЩЕВЫХ ОТХОДОВ

© 2012 г. Е. А. Цавкелова, М. А. Егорова, Е. В. Петрова, А. И. Нетрусов

Биологический факультет Московского государственного университета им М.В. Ломоносова, Москва, 119992  
e-mail: tsavkelova@mail.ru

Поступила в редакцию 24.05.2011 г.

Из 24 образцов, взятых из природных и антропогенных источников, выделено несколько активных анаэробных микробных сообществ, образующих биогаз при разложении целлюлозы и пищевых бытовых отходов (ПБО). При выращивании микробных сообществ на целлюлозе, офисной бумаге и картоне при 37°C без предобработки субстрата выход метана составил 190–260 мл  $\text{CH}_4/\text{г}$ . В мезофильных условиях биоконверсия использованного бумажного сырья завершалась образованием биогаза с содержанием метана от 47 до 63%, однако скорость образования биогаза была в 1.5–2.0 раза ниже, чем в термофильных условиях. При культивировании микробных сообществ на ПБО в термофильных условиях наиболее стабильные и эффективные из них образовывали 230–353 мл  $\text{CH}_4/\text{г}$  с содержанием метана 54–58%. Полученные результаты показали значимость проведенных исследований для разработки технологии биотрансформации бумажного сырья в биогаз и необходимость селекции микробных сообществ для повышения эффективности процесса.

Метаногенез является заключительной стадией процесса разложения органического вещества в анаэробных условиях. Различные группы микроорганизмов способны расщеплять органические соединения до субстратов, участвующих в метаногенезе: ацетата, углекислого газа и водорода, из которых затем может образовываться метан. В углеродном цикле благодаря деятельности микроорганизмов образуется около 1 млрд. т  $\text{CH}_4/\text{г}$  [1]. Метан, являясь парниковым газом, отражает тепловые лучи примерно в 25 раз интенсивнее, чем  $\text{CO}_2$  [2, 3]. Биогаз, в состав которого входит метан, является одним из основных источников возобновляемого топлива. Интерес к поиску альтернативных энергетических ресурсов объясняется не только постоянным увеличением спроса на энергоносители, но и небезопасностью их применения, неуклонно ухудшающейся экологией, сокращением мировых запасов традиционных видов топлива (нефть, природный газ, каменный уголь, древесина). При этом возобновляемая энергия на сегодняшний день составляет около 14% потребляемой первичной энергии в мире [4].

Биогаз состоит в основном из метана (55–70%  $\text{CH}_4$ ) и углекислого газа (30–45%  $\text{CO}_2$ ), в нем также могут встречаться следовые количества водорода, сероводорода, аммиака, азота, ароматических и галогено-ароматических углеводородов [5]. Биогаз имеет ряд преимуществ перед другими видами альтернативного топлива, в метане заключено примерно в 3 раза больше энергии, чем, например, в биоводородном топливе [6]. Кроме того, для получения биогаза нет необходимости выращивать сельскохозяйственные растения, как

это делается при производстве биодизеля и биоэтанола [4], так как в основном биогаз получают при разложении отходов животноводства (преимущественно навоз крупного рогатого скота) и очистке сточных вод, при которой на конечном этапе происходит образование биогаза в метантенках. Однако, несмотря на то, что анаэробная очистка муниципальных и сельскохозяйственных сточных вод издавна и широко используется, применение технологии получения биогаза из твердых бытовых отходов менее успешно [3]. Субстратом для получения биогаза может быть любая биомасса, а также органическая часть отходов, которую можно подвергнуть биодegradации. Помимо производства энергии и уменьшения загрязнения атмосферы парниковыми газами после процесса анаэробного разложения и образования биогаза оставшаяся масса может быть использована как высококачественное удобрение. Однако для полноценного и повсеместного применения технологий получения биогаза остаются нерешенными вопросы, касающиеся полноты утилизации субстратов, повышения качества и объема продукции биогаза, поддержание стабильности и функциональной активности сообщества микроорганизмов [3].

В образовании биогаза участвует целый комплекс микроорганизмов, принадлежащих нескольким различным группам. Основные процессы, осуществляемые микробным сообществом, — гидролиз полимерных субстратов, сбраживание сахаров и аминокислот, анаэробное окисление, ацетогенез, а также ацетокластический и гидрогеноτροφный метаногенез [7]. При этом состав микробного сообщества, а следовательно и эф-

фективность всего процесса образования биогаза, зависят от состава питательной среды, условий культивирования, температуры, pH и ряда других факторов [8]. Большое количество работ посвящено изучению образования биогаза из навоза сельскохозяйственных животных, осадочного ила сточных вод и разного рода органических отходов, но очень мало информации об использовании такого субстрата, как целлюлоза. При этом целлюлоза и гемицеллюлоза зачастую преобладают в твердых бытовых отходах (ТБО) [9]. В последнее время растет интерес к конверсии бумажного сырья в биогаз [10, 11]. Это связано как с раздельным сбором мусора, так и с тем, что бумага и картон являются наиболее подходящей для биодegradации фракцией ТБО [11, 12]. Однако современный подход к раздельной переработке отходов все еще не является типичным для отечественных производителей и муниципальных служб, поэтому остаются малоизученными микробиологические процессы превращения субстратов и биотехнологические возможности таких производств.

Ранее [13] из 24 различных образцов, взятых из природных и антропогенных экониш, было выделено несколько активных микробных сообществ, разлагающих целлюлозу с образованием биогаза при 55°C. Выделенные микробные сообщества проявляли стабильную функциональную активность на протяжении 5 пересевов в течение более 6 мес.

Цель работы – получение анаэробных микробных сообществ при их культивировании на целлюлозе, офисной бумаге и картоне, а также на пищевых бытовых отходах и сравнение их способности к образованию биогаза в анаэробных условиях при 37°C и 55°C.

## МЕТОДИКА

**Источники биомассы.** Образцы посевного материала отбирали из различных экологических природных и антропогенных ниш: образцы № 1, 2 – компостная куча (Московская обл.), образцы № 3, 4 – жом красного и белого винограда (Дагестан), образец № 5 – помет кролика (Московская обл.), образец № 6 – навоз крупного рогатого скота (КРС) № 1 (Московская обл.), образец № 7 – навоз КРС № 2 (Московская обл.), образцы № 8–13 – пробы из пресноводных термофильных водоемов Камчатки, образцы № 14–18 – иловые и донные отложения прудов и водоемов (Тверская обл.), образцы № 19–23 – навоз зебры, пони, антилопы гну, черной антилопы и слона, соответственно (Зоопарк, Москва), образец № 24 – копролиты дождевых червей (Ботанический сад, Москва).

**Культивирование.** Выращивание и селекцию активных микробных сообществ, образующих биогаз, проводили на среде следующего состава (г/л дистиллированной воды):  $K_2HPO_4$  – 1.0;

$KH_2PO_4$  – 1.0;  $NH_4Cl$  – 2.5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.5;  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  – 0.1;  $NaCl$  – 0.1;  $CaCO_3$  – 1.0;  $NaHCO_3$  – 5.0; дрожжевой экстракт – 2.0; пептон – 1.0; раствор микроэлементов – 1 мл; резазурин – 0.5 мг/л; pH 7.0–7.5. Раствор микроэлементов содержал (мг/л дистиллированной воды):  $ZnCl_2$  – 70.0;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  – 100.0;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  – 190.0;  $H_3BO_3$  – 6.0;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  – 36.0;  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  – 2.0;  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$  – 24.0;  $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$  – 15.0;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 1.0 г/л. Сульфат железа предварительно растворяли в 10 мл 25%-ной HCl. В качестве целлюлозосодержащих субстратов использовали: обеззоленные фильтры МРТУ 6-06-2411-65, офисную бумагу с черно-белой печатью и гофрированный картон в количестве 15 г/л среды, которые предварительно нарезали на кусочки 0.5 см<sup>2</sup>. При использовании пищевых бытовых отходов (ПБО), состоящих из различных растительных и животных компонентов, их предварительно высушивали, размешивали и растирали в ступке до получения кусочков не более 0.5 см<sup>2</sup>. Для определения массы сухого вещества навески субстратов (10 г) высушивали при 105°C.

Посевной материал (30% от общего объема среды) вносили в 30 мл питательной среды во флаконы на 100 мл, которые герметично закрывали резиновой пробкой, закатывали алюминиевым колпачком и замещали воздушную фазу на аргон. Культуры инкубировали в темноте при 55°C в термофильных условиях или при 37°C в мезофильных условиях в термостате, pH среды при необходимости доводили до 7.0 1н. HCl. Хранение культур осуществляли в 25%-ном глицерине в анаэробных условиях при –20°C. Активность микроорганизмов определяли по приросту количества метана в составе биогаза. Стабильность выбранных сообществ проверяли неоднократно пересевом на свежую питательную среду после достижения сообществом максимальной продукции биогаза.

**Хроматография.** Определение концентраций  $CH_4$ ,  $CO_2$  и  $H_2$  осуществляли методом газовой хроматографии на хроматографе Кристалл 2000 М (“Хроматэк”, Россия), оснащенном микрокапиллярной колонкой FFIP (15000 × 0.5 мм), газ-носитель – аргон, расход 15 мл/мин, температура детектора – 200°C, температурный градиент в термостате – от 70 до 160°C. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Chromatec Analytic 2.5 (“Хроматэк”, Россия).

Активность газообразования оценивали, измеряя избыточное давление в герметично закрытых флаконах с культивируемым сообществом. Концентрации газов в смеси и содержание метана определяли при нормальных условиях температуры и давления (1 атм). Все эксперименты проводили в 3–5 повторностях. Данные обрабатывали принятыми методами статистической обработки. Для данных, представленных на рисунках и в таб-

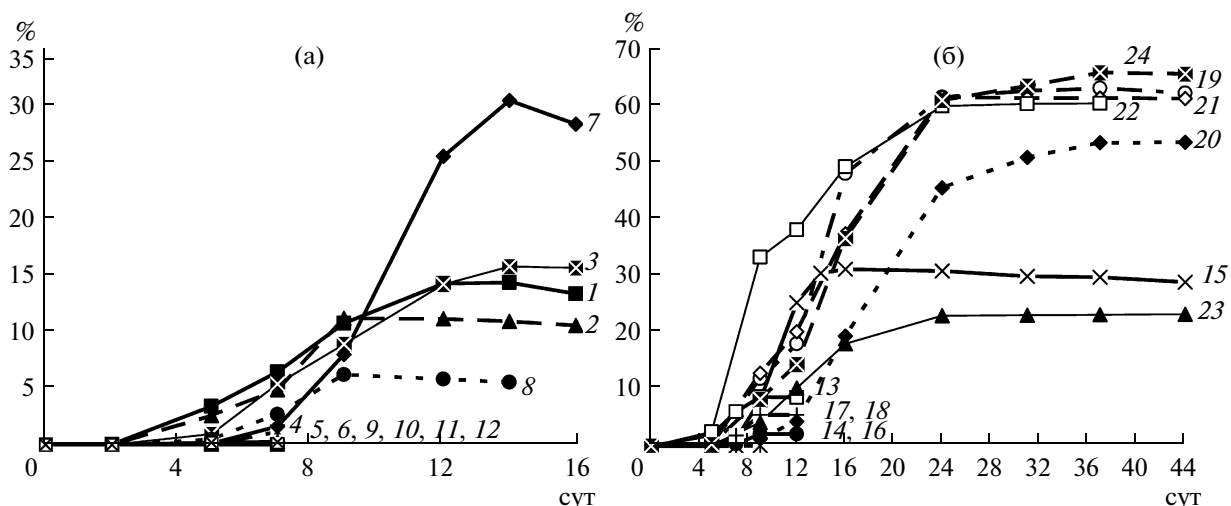


Рис. 1. Динамика образования метана (%) сообществами № 1–12 (а) и 13–24 (б), выращенными при 37°С (первый пассаж).

лицах, отклонение значений от средней величины не превышало 5–10%.

**Микроскопия.** Для наблюдения за составом микробных сообществ и изменениями, происходящими в процессе культивирования микроорганизмов, использовали оптический световой микроскоп Nikon Eclipse E100 (Япония). Препараты фиксировали, окрашивали водным раствором фуксина в течение 3 мин и рассматривали под иммерсионным маслом при увеличении ×900.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Образование биогаза микробными сообществами из целлюлозосодержащих материалов.** С целью отбора эффективных микробных сообществ, способных разлагать целлюлозу в мезофильных условиях (37°С) культивирования, были исследованы 24 пробы из тех же экониш, из которых ранее были выделены термофильные сообщества [13]. Однако большинство культур либо не образовывали биогаз в этих условиях (рис. 1), либо уменьшали продукцию метана при пересевах. Сообщества, выделенные при 55°С, как ранее было показано, (в основном, из навоза травоядных животных) отличались высокой эффективностью конверсии цел-

люлозы в метан: в среднем около 15 ммоль СН<sub>4</sub>/г исходного субстрата [13]. При выращивании сообществ в мезофильных условиях выход метана был значительно меньше – от 2–4 до 8–11 ммоль СН<sub>4</sub>/г целлюлозы. В ходе отбора только сообщества № 1 и № 21, выделенные из компостной кучи и навоза антилопы гну соответственно, сохранили способность к образованию биогаза на достаточно высоком уровне (табл. 1). Наиболее устойчивым оказалось сообщество № 21, образующее около 11.5 ммоль СН<sub>4</sub>/г (или 250–260 мл СН<sub>4</sub>/г) целлюлозы. Высокие значения выхода метана в первом пассаже могли быть связаны с высоким содержанием питательных и других биологически-активных веществ в исходном инокуляте (навоз антилопы гну).

Ранее [13], при культивировании пробы № 1 в термофильных условиях не было выделено активного микробного сообщества (кумулятивный выход метана не превышал 38.8%, а эффективность трансформации целлюлозы составила всего лишь 4.9 ммоль СН<sub>4</sub>/г целлюлозы), в то время как из пробы № 21 было получено сообщество микроорганизмов, разлагающее целлюлозу с образованием 15.6 ммоль СН<sub>4</sub>/г целлюлозы и содержанием метана 58%. Из отдельных образцов и в мезо-

Таблица 1. Накопление метана при выращивании на целлюлозе при 37°С сообществами № 1 и № 21

№ пробы	Показатели выхода метана	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж	4 пассаж	5 пассаж
1	СН <sub>4</sub> , %	45.87	63.98	47.07	58.25	57.96
	СН <sub>4</sub> , мл/г	36.49	347.15	202.22	250.20	266.73
	СН <sub>4</sub> , ммоль/г	1.63	15.49	9.03	11.17	11.91
21	СН <sub>4</sub> , %	61.40	50.48	63.33	60.78	62.46
	СН <sub>4</sub> , мл/г	395.51	256.51	246.67	258.17	260.20
	СН <sub>4</sub> , ммоль/г	17.67	11.45	11.02	11.53	11.62



**Таблица 2.** Скорость образования биогаза (СОБ) при разложении целлюлозы, офисной бумаги и картона в термофильных (Т) и мезофильных (М) условиях

№	Максимум СОБ, мл $\text{CH}_4$ /сут мл среды		Максимум СОБ, мл $\text{CH}_4$ /сут г*		Максимум СОБ, сут	
	Целлюлоза					
	I пассаж	V пассаж	I пассаж	V пассаж	I пассаж	V пассаж
3 Т	1.30	0.76/0.54	86.7	50.7/36.0	5	7/21
4 Т	0.66	0.72	44.0	48.0	7	7
6 Т	0.45/1.30	0.71	30.0/86.7	47.3	5/12	5
7 Т	0.64/0.50	0.48/0.47	42.7/33.3	32.0/31.3	5/14	14/21
17 Т	0.64/0.52	0.72/0.45	42.7/34.7	48.0/30.0	5/14	7/26
18 Т	0.59	0.64/0.48	39.3	42.7/32.0	5	7/21
19 Т	0.91/0.96	0.80	60.6/64.0	53.4	3/14	5
20 Т	1.00	0.82	66.7	54.7	21	5
21 Т	0.93	0.54/0.50	62.0	36.0/33.3	7	5/33
22 Т	1.36	0.90	90.7	60.0	11	12
1 М	0.40	0.46	26.7	30.7	7	8
21 М	0.40/0.35	0.43	26.7/23.3	28.7	8/24	8
	Офисная бумага	Картон	Офисная бумага	Картон	Офисная бумага	Картон
3 Т	0.60	0.66	40.0	44.0	6	7
6 Т	1.00	0.74	66.7	49.3	6	7
17 Т	0.68	0.76	45.3	50.7	3	7
18 Т	0.86	0.70	75.3	46.7	6	7
19 Т	1.00	0.80	66.7	53.3	6	7
20 Т	1.91	0.78	127.3	52.0	3	7
21 Т	0.86	0.82	75.3	54.7	6	7
22 Т	0.84	0.62	56.0	41.3	6	7
1 М	0.60	0.60	40.0	40.0	7	13
21 М	0.49	0.46	32.7	30.7	7	13

фильных, и термофильных условиях культивирования удавалось выделить активные микробные сообщества, способные эффективно использовать целлюлозу с выделением биогаза. В то же время в термофильных условиях было выделено значительно большее количество стабильных сообществ, образующих 55–60% биогаза. В этих условиях образование биогаза проходило эффективнее: ~16 ммоль  $\text{CH}_4$ /г целлюлозы (358.3 мл  $\text{CH}_4$ /г) образовывалось за 15–25 сут, в то время как в мезофильных условиях культурам № 1 и 21 понадобилось больше, чем 1.5 мес. для синтеза 260–267 мл  $\text{CH}_4$ /г.

Изменения скорости образования биогаза (СОБ) при разложении целлюлозы в термофильных и мезофильных условиях представлены в табл. 2. За время селекции изменение этой величины зависело от используемого сообщества, для некоторых она увеличивалась, для других значительно не изменилась. При этом в термофильных условиях СОБ была в 2 и более раз выше, чем в

мезофильных. Для ряда культур было показано наличие двух пиков образования биогаза, причем первый пик приходился у большинства культур на 5–7 сут. Известно, что при высоких температурах и присутствии ингибиторов, таких, как аммоний и летучие жирные кислоты, образование метана происходит в два этапа – ацетат сначала окисляется синтрофными ацетат-окисляющими бактериями до  $\text{H}_2$  и  $\text{CO}_2$ , а затем гидрогенотрофные метаногены переводят эти соединения в метан [14]. При этом ацетокластические метаногены в большей степени чувствительны к изменению (закислению) pH, в то время как гидрогенотрофы способны расти и при низких pH [15].

Бумага и картон, составляющие большую часть городских твердых отходов, являются хорошим материалом для биодegradации [11, 12]. Образование биогаза микробными сообществами, выделенными на целлюлозе, исследовали, выращивая культуры на офисной бумаге и упаковочном гофрированном картоне. При этом наиболее

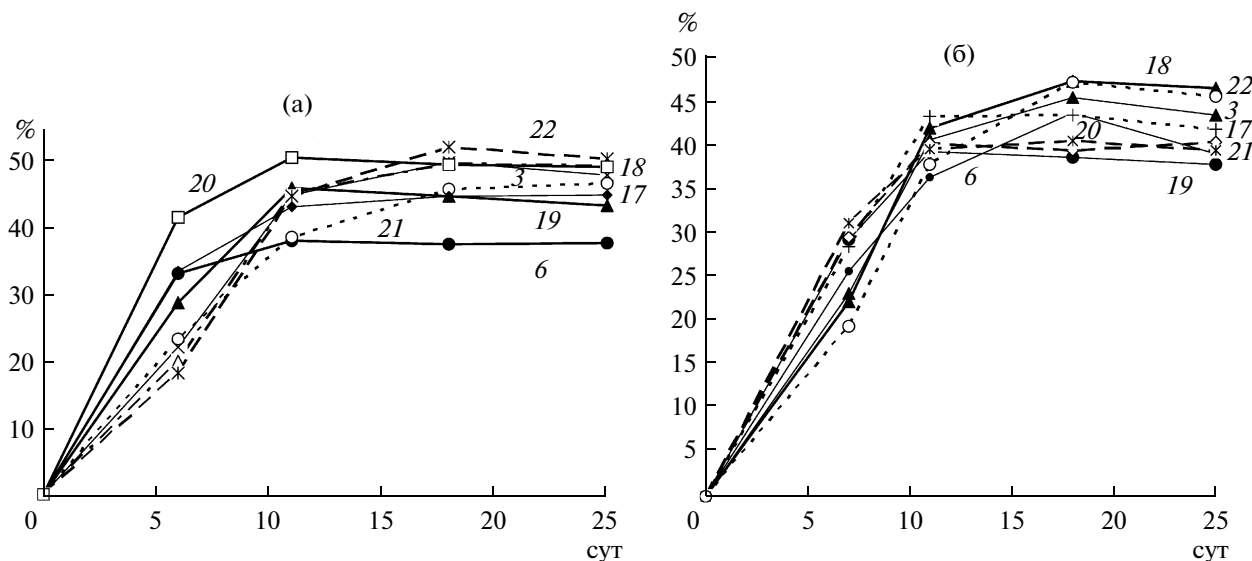


Рис. 2. Динамика образования метана (%) наиболее активными сообществами (№ 3, 6, 17–22) на офисной бумаге с черно-белой печатью (а) и упаковочном картоне (б) при 55°C.

активные сообщества были выделены из различных субстратов: жом красного винограда (№ 3), навоз травоядных животных (№ 6, 20–22) и донные иловые осадки (№ 17, № 18). Сообщества культивировали в термофильных и мезофильных условиях, результаты представлены на рис. 2 и в табл. 2, 3. Отобранные на целлюлозе сообщества оказались эффективными в отношении трансформации бумажного сырья в биогаз. В термофильных условиях при культивировании на офисной бумаге микробные сообщества № 3, 17–22 эффективно осуществляли конверсию субстрата с накоплением метана в биогазе около 50%. При выращивании на упаковочном гофрированном картоне при 55°C также происходил активный гидролиз субстрата с последующим образованием биогаза, хотя и менее эффективно (рис. 2, табл. 3). Из данных литературы известно, что при разложении различного типа бумажного сырья выход метана может составлять на офисной бумаге – 217.3, а на гофрированном картоне от 152.3 до 183.0 мл  $\text{CH}_4/\text{г}$  субстрата соответственно [11, 12].

При культивировании микробных сообществ № 1 и № 21 в мезофильных условиях культуры продуцировали 47.3 и 51.7% метана на офисной бумаге и 48.9 и 49.6% на картоне соответственно. Сообщество № 21 образовывало больше метана и осуществляло этот процесс эффективнее (табл. 3). В мезофильных условиях биоразложение картона проходило не менее активно, чем при 55°C, однако с меньшей скоростью. Тем не менее в мезофильных и термофильных условиях выбранные микробные сообщества сохраняли свою активность при разложении бумажного сырья и трансформации его в биогаз. Причем биodeградация исследуемых субстратов проходила без предварительной их обработки, т.е. кислотного или щелоч-

ного гидролиза, применяемого для разрушения лигнина, который с трудом подвергается деградации в анаэробных условиях и уменьшает доступность целлюлозы для гидролиза [11]. Содержание лигнина в таких субстратах колеблется от 2% в офисной бумаге до 24% в газетной [16].

Скорость образования биогаза сообществами микроорганизмов в термофильных условиях на офисной бумаге (~0.9–1.0 мл/сут мл среды) была выше, чем на целлюлозе за исключением сообществ № 3 и № 17. Наибольший выход биогаза (в культуре № 20) составил почти 2.0 мл/сут мл среды. Максимальная СОБ при разложении офисной бумаги и картона была отмечена в большинстве культур на 6–7 сут за исключением культур № 17 и 21, которые осуществляли биоконверсию за 3 сут. При разложении картона СОБ была несколько ниже (табл. 2). Несмотря на то, что в мезофильных условиях биоконверсия бумажного сырья протекала с образованием биогаза, СОБ была в 1.5–2 раза ниже, чем в термофильных условиях.

Исследование динамики образования биогаза показало, что первоначально возрастали концентрация и давление водорода, которые снижались по мере развития гидрогенотрофов. Затем снижение рН, вызванное образованием большого количества летучих жирных кислот (ЛЖК) в процессе гидролиза целлюлозы, ингибировало метаногенез. Увеличение рН способствовало образованию из уксусной кислоты метана и увеличению его концентрации и давления. Сходные процессы, протекающие при биоразложении целлюлозы и офисной бумаги в мезофильных условиях, описаны также в работе [10]. Таким образом, при проведении селекции микробных сообществ и адаптации их к субстрату удалось значительно увели-

чить выход метана в составе биогаза, причем одинаково эффективно как в термофильных, так и в мезофильных условиях культивирования.

**Образование биогаза микробными сообществами, разлагающими пищевые бытовые отходы.** Проведено сравнение образования биогаза выделенными сообществами при использовании в качестве субстрата ПБО. Микробные сообщества выделяли при 55°C, поскольку наиболее эффективная биоконверсия органического вещества происходила именно в термофильных условиях (первый пассаж), при этом большинство сообществ образовывало более 50% метана в составе газовой смеси (рис. 3). Отличительной чертой продукции биогаза на этом субстрате было то, что ряд сообществ, например № 15, № 21, № 23, выделял на первых этапах культивирования значительное количество водорода – 5.95; 4.24; 4.72% соответственно, который затем вовлекался в метаногенез. Было отобрано несколько активных микробных сообществ, которые эффективно перерабатывали органические отходы в биогаз (табл. 4) и не снижали эффективности биоконверсии в процессе пересевов. Максимальная скорость образования метана (7 сут культивирования) для сообществ № 2, № 3, № 19 и № 23 составила 0.60, 0.88, 0.43 и 0.44 мл/сут мл среды соответственно. Сообщества, выделенные из компостной кучи (№ 2) и жома красного винограда (№ 3), оказались наиболее активными в отношении разложения ПБО – 353 и 313 мл CH<sub>4</sub>/г соответственно, с содержанием метана в биогазе 58%. По данным Р. Джанга с соавт. [17], при анаэробной микробной деструкции (в течение 28 сут при 50°C) пищевых отходов предприятий общественного питания (рестораны) выделялось до 440 мл метана/г. Другие авторы [18], исследуя разложение различных видов пищевых отходов в мезофильных и термофильных условиях за то же время показали, что выход метана при этом не зависел от условий культивирования и выбранных разновидностей субстрата. Так, при конверсии в биогаз отходов от производства супов, отходов из кафетерия и кухни коммерческого заведения содержание метана в мезофильных условиях составило от 250 до 450 мл/г, а в термофильных – 240–470 мл/г. Наибольшее количество метана (более 500 мл CH<sub>4</sub>/г) образовывалось лишь при разложении отходов от рыбных производств и жиров из маслоотделительного сборника (жироловка). Тем не менее, из-за неоднородности таких субстратов следует учитывать, что показатели выхода метана могут изменяться в зависимости от типа органического субстрата и состава микробного сообщества. Все выделенные нами сообщества эффективно образовывали биогаз из целлюлозы и органических отходов, а селекция микробных сообществ позволила получить результаты, сравнимые или превышающие показатели выхода метана на аналогичных субстратах [11, 12, 17, 18].

**Таблица 3.** Накопление метана при культивировании микробных сообществ на офисной бумаге и картоне в термофильных (Т) и мезофильных (М) условиях

№ пробы	Показатели выхода метана	Офисная бумага	Картон
3 Т	CH <sub>4</sub> , %	51.25	50.13
	CH <sub>4</sub> , мл/г	247.95	223.44
	CH <sub>4</sub> , ммоль/г	11.07	9.97
6 Т	CH <sub>4</sub> , %	48.61	48.02
	CH <sub>4</sub> , мл/г	241.14	231.52
	CH <sub>4</sub> , ммоль/г	10.76	10.33
17 Т	CH <sub>4</sub> , %	48.61	51.02
	CH <sub>4</sub> , мл/г	246.60	252.43
	CH <sub>4</sub> , ммоль/г	11.00	11.27
18 Т	CH <sub>4</sub> , %	49.78	49.33
	CH <sub>4</sub> , мл/г	259.05	244.49
	CH <sub>4</sub> , ммоль/г	11.57	10.92
19 Т	CH <sub>4</sub> , %	49.09	47.91
	CH <sub>4</sub> , мл/г	270.88	234.26
	CH <sub>4</sub> , ммоль/г	12.09	10.43
20 Т	CH <sub>4</sub> , %	50.33	48.70
	CH <sub>4</sub> , мл/г	281.80	241.79
	CH <sub>4</sub> , ммоль/г	12.58	10.79
21 Т	CH <sub>4</sub> , %	48.77	50.12
	CH <sub>4</sub> , мл/г	255.84	240.28
	CH <sub>4</sub> , ммоль/г	11.42	10.72
22 Т	CH <sub>4</sub> , %	50.41	50.04
	CH <sub>4</sub> , мл/г	265.35	246.98
	CH <sub>4</sub> , ммоль/г	11.85	11.02
1 М	CH <sub>4</sub> , %	47.32	48.90
	CH <sub>4</sub> , мл/г	211.38	193.65
	CH <sub>4</sub> , ммоль/г	9.43	8.64
21 М	CH <sub>4</sub> , %	51.69	49.63
	CH <sub>4</sub> , мл/г	245.50	240.88
	CH <sub>4</sub> , ммоль/г	10.96	10.75

Известно, что метаногенное микробное сообщество объединяет различные виды бактерий и архей, тесные взаимоотношения между которыми базируются, прежде всего, на пищевых потребностях [19, 20]. При анализе как термофильных [13], так и мезофильных сообществ, разлагающих целлюлозу, нами были отмечены различия в составе культур, в том числе на начальных и конечных этапах (пассажи) их селекции. В сообществах обнаружены клетки различных морфотипов, а также большое количество споровых форм, что может указывать на присутствие клостридий, которые обычно широко представлены в анаэробных сообществах, участвующих в гидролизе целлюлозы [21]. Больше микробное разнообразие наблюдали в термофильных сообществах,

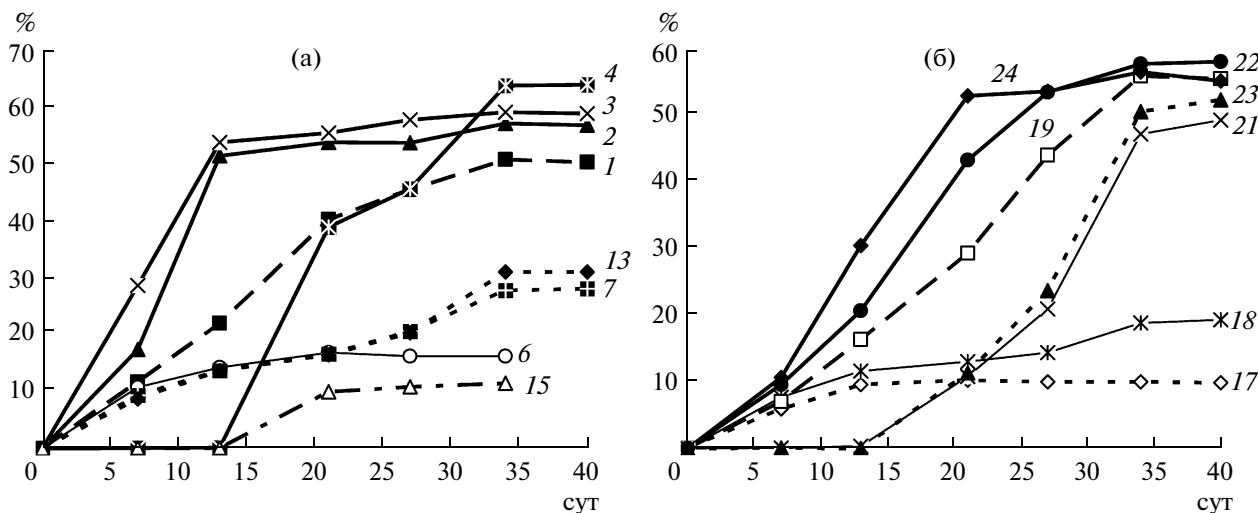


Рис. 3. Динамика образования метана (%) на ПБО при 55°C (первый пассаж) избранными микробными сообществами: № 1–4, 6, 7, 13, 15 (а) и № 17–19, 21–24 (б).

разлагающих ПБО, что определяется присутствием различного типа субстратов (белки, жиры, углеводы, целлюлозосодержащие компоненты). Было отмечено, что микробные клетки адгезировались на частицах субстрата и волокнах целлюлозы. Известно, что способность к адгезии является важной особенностью анаэробных гидролитиков (в том числе целлюлозолитиков). К. О’Саливан с сотр. [22] показал, что способность микробного сообщества к гидролизу органического вещества в большей степени определяется не гидролитической способностью отдельных, составляющих сообщество микроорганизмов, а именно активностью гидролитиков, способных адгезироваться на субстрате.

Изученные нами микробные сообщества способны обеспечить высокий выход метана в составе биогаза как в мезофильных, так и в термофильных [13] условиях культивирования. Несмотря на то, что пищевые отходы быстрее подвергались биоразложению, целлюлоза и ее производные

оказались не менее эффективными источниками получения биогаза. Кроме того, сообщества, выделенные на целлюлозе, проявляли большую стабильность при пересевах в течение нескольких мес. Необходимо отметить, что среда для культивирования не содержала дорогостоящих компонентов, а субстрат не подвергался предварительной обработке, что расширяет возможности использования целлюлозосодержащих субстратов. Известно, что термофильная анаэробная деструкция органических веществ проходит более эффективно и требует меньше времени [23–25]. Термофильные установки показывают более высокий выход биогаза, большую скорость его образования, больший коэффициент конверсии и могут быть загружены большим количеством субстрата [24, 26]. Кроме того, при высоких температурах подавляются патогенные микроорганизмы (например, *E. coli* и *Salmonella* spp.) и паразиты (яйца гельминтов) [27–29]. В то же время при мезофильном режиме получения биогаза меньше энергозатраты, а про-

Таблица 4. Накопление метана при культивировании микробных сообществ № 2, 3, 19, 23 на ПБО при 55°C

№ пробы	Показатели выхода метана	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж	4 пассаж	5 пассаж
2	CH <sub>4</sub> , %	58.88	45.34	62.00	61.20	58.08
	CH <sub>4</sub> , мл/г	350.17	188.08	303.86	261.85	352.91
	CH <sub>4</sub> , ммоль/г	15.63	8.40	13.57	11.70	15.76
3	CH <sub>4</sub> , %	60.88	52.18	62.96	63.56	57.73
	CH <sub>4</sub> , мл/г	486.92	247.02	323.86	333.38	313.28
	CH <sub>4</sub> , ммоль/г	21.74	11.03	14.46	14.88	14.00
19	CH <sub>4</sub> , %	54.50	47.47	60.88	56.55	54.60
	CH <sub>4</sub> , мл/г	252.03	197.12	223.34	182.31	230.75
	CH <sub>4</sub> , ммоль/г	11.25	8.80	9.97	8.14	10.30
23	CH <sub>4</sub> , %	52.71	47.22	62.92	56.64	54.5
	CH <sub>4</sub> , мл/г	227.41	212.12	224.36	182.57	250.11
	CH <sub>4</sub> , ммоль/г	10.15	9.47	10.02	8.15	11.16

цесс в меньшей степени ингибируется образованием аммиака и ЛЖК [24], поэтому в зависимости от требований необходимо подбирать оптимальное микробное сообщество, позволяющее с максимальной эффективностью перерабатывать органический субстрат в биогаз. Полученные нами данные необходимы для понимания и оценки различных стратегий, которые можно применять для утилизации и более эффективного использования твердых органических отходов, в том числе, содержащих целлюлозу.

Работа выполнена при поддержке гранта ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы; ГК № П2470.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thauer R.K.* // Microbiology. 1998. V. 144. № 9. P. 2377–2406.
2. *Rodhe H.* // Science. 1990. V. 248. № 8. P. 1217–1219.
3. *Bochiwal C., O'Malley C., Chong J.P.J.* Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Ed. K.N. Timmis. Berlin: Springer, 2009. P. 2810–2815.
4. *Antizar-Ladislao B., Turrión-Gómez J.L.* // Biofuels, Bioprod. Bioref. 2008. V. 2. P. 455–469.
5. *Паничева Е.С., Давиденко Е.В.* // Биотехнология. 1990. Т. 6. № 4. С. 49–53.
6. *Ferry J.G.* // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. V. 22. P. 351–357.
7. *Stams A.J.M.* // Antonie van Leeuwenhoek. 1994. V. 66. № 1–3. P. 271–294.
8. *Levén L., Eriksson A.R.B., Schnurer A.* // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 59. № 3. P. 683–693.
9. *Clarke W.P.* // Waste Manage. Res. 2000. V. 18. № 6. P. 510–524.
10. *Qu X., Vavilin V.A., Mazeas L., Lemunier M., Duquenois C., He P., Bouchez T.* // Waste Manag. 2009. V. 29. № 6. P. 1828–1837.
11. *Pommier S., Mañas L.A., Lefebvre X.* // Biores. Technol. 2010. V. 101. P. 463–468.
12. *Eleazer W.E., Odle W.S., Wang Y.S., Barlaz M.A.* // Environ. Sci. Technol. 1997. V. 31. № 3. P. 911–917.
13. *Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Петрова Е.В., Нетрусов А.И.* // Вестник МГУ. Сер. биол. 2012. № 4.
14. *Schnurer A., Svensson B., Schink B.* // FEMS Microbiol. Lett. 1997. V. 154. № 2. P. 331–336.
15. *Kim I., Hwang M., Jang N., Hyun S., Lee S.* // Int. J. Hydrogen Energy. 2004. V. 29. № 11. P. 1133–1140.
16. *Barlaz M., Ham R.K., Shaefer D.M.* // CRC Crit. Rev. Environ. Control. 1990. V. 19. № 6. P. 557–584.
17. *Zhang R., El-Mashad H.M., Hartman K., Wang F., Liu G., Choate C., Gamble P.* // Bioresour. Technol. 2007. V. 98. № 4. P. 929–935.
18. *Chen X., Romano R., Zhang R.* // Int. J. Agric. Biol. Eng. 2010. V. 3. № 4. P. 51–62.
19. *Stams A.J.M.* // Antonie van Leeuwenhoek. 1994. V. 66. P. 271–294.
20. *Заварзин Г.А.* // Микробиология. 1997. Т. 66. № 4. С. 669–673.
21. *Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2002. V. 66. № 3. P. 506–577.
22. *O'Sullivan C.O., Burrell P.C., Clarke W.P.* // Biores. Technol. 2008. V. 99. № 11. P. 4723–4731.
23. *Dugba P.N., Zhang R.* // Biores. Technol. 1999. V. 68. № 3. P. 225–233.
24. *Sanchez E., Borja R., Weiland P., Travieso L., Martin A. E.* // Bioprocess Eng. 2000. V. 22. № 3. P. 247–252.
25. *Zabranska J., Stepova J., Wachtl R., Jenicek P., Dohanyos M.* // Water Sci. Technol. 2000. V. 42. № 9. P. 49–56.
26. *Ahn J.H., Forster C.F.* // Proc Biochem. 2000. V. 36. № 1–2. P. 19–23.
27. *Cheunbarn T., Pagilla K.R.* // J. Environ. Eng. 2000. V. 126. № 9. P. 796–801.
28. *Cabirol N., Rojas Oropeza M., Noyola A.* // Water Science Technol. 2002. V. 45. № 10. P. 269–274.
29. *Sahlström L.* // Biores. Technol. 2003. V. 87. № 2. P. 161–166.

## Biogas Production by Microbial Communities via Decomposition of Cellulose and Food Waste

E. A. Tsavkelova, M. A. Egorova, E. V. Petrova, and A. I. Netrusov

Department of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

e-mail: tsavkelova@mail.ru

Received May 24, 2011

**Abstract**—Several active microbial communities that form biogas via decomposition of cellulose and domestic food waste were identified among 24 samples isolated from different natural and anthropogenic sources. The methane yield was 90–260 ml CH<sub>4</sub>/g from microbial communities grown on cellulose substrates, office paper, and cardboard at 37°C without preprocessing. Under mesophilic conditions, bioconversion of paper waste yields biogas with a methane content from 47 to 63%; however, the rate of biogas production was 1.5–2.0 times lower than under thermophilic conditions. When microbial communities were grown on DFW under thermophilic conditions, the most stable and effective of them produced 230–353 ml CH<sub>4</sub>/g, and the methane content in biogas was 54–58%. These results demonstrated the significance of our studies for the development of a technology for the biotransformation of paper waste into biogas and for the need of selection of microbial communities to improve the efficiency of the process.

УДК 628.35

## УДАЛЕНИЕ ИЗ ВОЗДУХА ЛЕТУЧИХ ВЕЩЕСТВ ТАБАЧНЫХ ЛИСТЬЕВ МЕТОДОМ БИОФИЛЬТРАЦИИ

© 2012 г. Н. А. Загустина\*, Т. А. Мишарина\*\*, А. А. Веприцкий\*\*\*, В. Г. Жуков\*,  
А. О. Ружицкий\*, М. Б. Теренина\*\*, Н. И. Крикунова\*\*, А. К. Куликова\*, В. О. Попов\*

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

\*\*Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля РАН, Москва

\*\*\*ООО “Инновационные биотехнологии”, Москва, 119071

e-mail: zagust@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 15.10.2011

Исследован состав летучих веществ различных сортов ферментированных табачных листьев и их смесей — сырья для производства табачных изделий. Показаны различия в содержании в них никотина, соланона, тетраметилгексадецениола, мегастигматриенонов и других веществ, определяющих специфические ароматические свойства табака. В лабораторном реакторе, работающем по принципу биофильтра с орошаемым слоем, в результате длительной адаптации на носителе сформировано сообщество микроорганизмов, способное осуществлять дезодорацию смоделированной воздушной смеси и деструкцию никотина. На биофильтре происходило удаление из воздуха, как 90% основного токсичного вещества никотина, так и веществ, определяющих запах. Эффективность биофильтрации не изменялась при использовании табака, с различными концентрациями летучих веществ, а также в присутствии посторонних примесей. Основные штаммы, участвующие в деструкции никотина, выделенные из сообщества микроорганизмов на биокатализаторе, принадлежали к родам *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*. Исследование орошающей жидкости показало полную деструкцию никотина и летучих органических веществ, определяющих запах. Присутствующие в орошающей жидкости вещества не обладали запахом и не были токсичны. Полученные результаты позволили осуществить масштабирование процесса биофильтрации для удаления запаха вентиляционных выбросов табачного производства.

Производство табачных изделий — один из источников неприятного запаха в черте города, ощущаемого жителями в прилегающих к предприятиям районах. Для формирования комфортной и экологически чистой городской среды крайне важно использование городскими предприятиями пищевой, фармацевтической и некоторых других видов промышленности, в вентиляционных выбросах которых содержатся пахнущие вещества, эффективных и экологически чистых систем фильтрации вентиляционных выбросов. Метод биофильтрации зарекомендовал себя как способ удаления летучих органических веществ в пределах низких и средних концентраций, а также дезодорации вентиляционных выбросов различного состава, со сравнительно невысокими капитальными и эксплуатационными затратами [1–3]. Этот метод также существенно отличается от других способов фильтрации тем, что не вызывает вторичного загрязнения окружающей среды.

В процессах переработки табачного сырья: паротермической обработки, разрыхлении, резки, сушки, и др. видов обработки в аспирационные и пневмотранспортные системы попадают летучие органические вещества ферментированных та-

бачных листьев, в том числе и никотин. Никотин — основной алкалоид табачных листьев, ядовит, хорошо всасывается в организме человека и может вызывать тяжелые расстройства. Дезодорация таких многокомпонентных вентиляционных выбросов имеет свои специфические особенности, что связано с присутствием в выбросах широкого спектра соединений в низких концентрациях и полностью часто не идентифицированных. Несмотря на низкие концентрации органических веществ в таких выбросах, они могут достаточно сильно воздействовать на рецепторы человека, вызывая как психоэмоциональные, так и аллергические реакции.

Количественная оценка эффективности дезодорации может быть произведена при полной характеристике состава, что не исключает использования субъективной органолептической оценки эффективности удаления запаха.

Анализ патентной и научно-технической литературы показал, что практически отсутствует информация об использовании аппаратных систем биофильтрации для дезодорации вентиляционных выбросов табачных предприятий. На сайтах некоторых фирм Германии и США имеется ограниченная информация об использовании

системы биоскруберов и насыпных фильтров для удаления табачного запаха [4]. В России была разработана технология биофильтрации с орошаемым слоем, защищенная патентами РФ, отличающаяся от известных в мире [5–8]. Настоящая работа является дальнейшим развитием технологии биофильтрации с орошаемым слоем, которая расширяет возможности использования технологии для дезодорации многокомпонентных вентиляционных выбросов большого объема с низким содержанием органических веществ, характерных для предприятий пищевой промышленности.

Цель работы – исследование состава летучих веществ различных сортов табачных листьев, его влияния на степень удаления органических веществ и запаха из воздушной смеси в лабораторных биореакторах, работающих по принципу биофильтра с орошаемым слоем.

## МЕТОДИКА

**Выделение летучих веществ из ферментированных табачных листьев.** Для объективной характеристики летучие соединения ферментированных табачных листьев, определяющих запах табака и подлежащие очистке на биофильтре, выделяли методом содистилляции с водой и диэтиловым эфиром [9, 10]. Для исследования брали как смеси различных сортов, наиболее часто используемые при производстве табачных изделий, так и отдельные сорта ферментированного табака. Исследован состав летучих веществ следующих образцов табака: табак тепловой сушки (Индонезия, IDA/C9, 12507118); табак ориентальный (Болгария, BGX/3K, 12506758); Вирджиния (UITFCG, 12596506); Вирджиния, (TNV/L9, 2507202); Тайланд, Берней, (ТНВ/Х8, 12507163).

Для выделения летучих веществ измельченные ферментированные табачные листья различных сортов (по 30 г) помещали в колбу, добавляли 300 мл дистиллированной воды, 50 мл свежеперегнанного диэтилового эфира, тщательно перемешивали, закрывали герметично пробкой и оставляли при комнатной температуре на 16 ч для экстракции летучих веществ. Затем водно-эфирный слой декантировали, оставшуюся смесь разделяли центрифугированием, водно-эфирные экстракты объединяли. В экстракт добавляли 30 мл диэтилового эфира, 1 мг н-додекана в качестве внутреннего стандарта, перемешивали встряхиванием в течение 2 мин и выделяли летучие вещества содистилляцией с эфиром и водой, как описано в работах [8–10]. Эфирный слой дистиллята отделяли, высушивали с 1 г безводного сульфата натрия и концентрировали до объема около 200 мкл отгонкой эфира при 40°C.

**Исследование состава летучих веществ ферментированных табачных листьев.** Для определения

количественного содержания летучих веществ в качестве внутреннего стандарта добавляли н-тридекан. Газовую хроматографию (ГХ) и анализы ГХ с масс-спектрометрической детекцией проводили на капиллярной кварцевой колонке с неполярной полиметилсилоновой стационарной фазой в режиме программирования температуры. Для определения качества запаха хроматографических зон элюата использовали методику сиффинг-анализа, когда используется делитель потока, с помощью которого половину элюата направляли на детектор, а другую для оценки запаха соответствующих компонентов. Описание запаха зон проводили три тренированных профессиональных дегустатора.

ГХ-анализ проводили на капиллярном газовом хроматографе HP 5730A (“Hewlett Packard”, США) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой SPB-1 (50 м × 0.25 мм, слой фазы 0.3 мкм) при программировании температуры колонки от 60°C до 250°C со скоростью 8°C/мин. Температура инжектора и детектора составляла 250°C. Скорость газа-носителя гелия через колонку составляла 1.5 мл/мин. Анализировали по 2 мкл эфирных экстрактов. Хроматограммы регистрировали с помощью системы сбора и обработки хроматографических данных Экохром (Россия). В аликвоту концентратов летучих веществ добавили 1 мкл смеси н-алканов с числом атомов углерода 6–22 и анализировали в тех же условиях. По временам удерживания компонентов анализировали смеси и нормальных алканов рассчитывали величины индексов удерживания (ИУ). Из площадей пиков веществ и площади пика внутреннего стандарта на хроматограммах образцов методом простой нормировки рассчитывали относительное содержание каждого компонента в изученных образцах и выражали в мкг на 100 г сухих табачных листьев.

**Условия работы лабораторного реактора.** Для создания процесса биологической дезодорации использовали серию изготовленных из стекла лабораторных микрореакторов размером 200–250 × 30 мм. Стекланный реактор заполняли носителем из полиамидного волокна. На полиамидное волокно наносили суспензию клеток предварительно селекционированного сообщества микроорганизмов-деструкторов. При постоянном орошении носителя циркулирующей суспензией происходила иммобилизация клеток, образование биопленки на носителе и формирование биокатализатора – основного элемента биофильтра (рис. 1).

Бактерии для иммобилизации собирали с эффективных биокатализаторов, а также выделяли из накопительных культур, полученных на среде Эванса с экстрактивными веществами табачных листьев. Дальнейшую селекцию сообщества про-

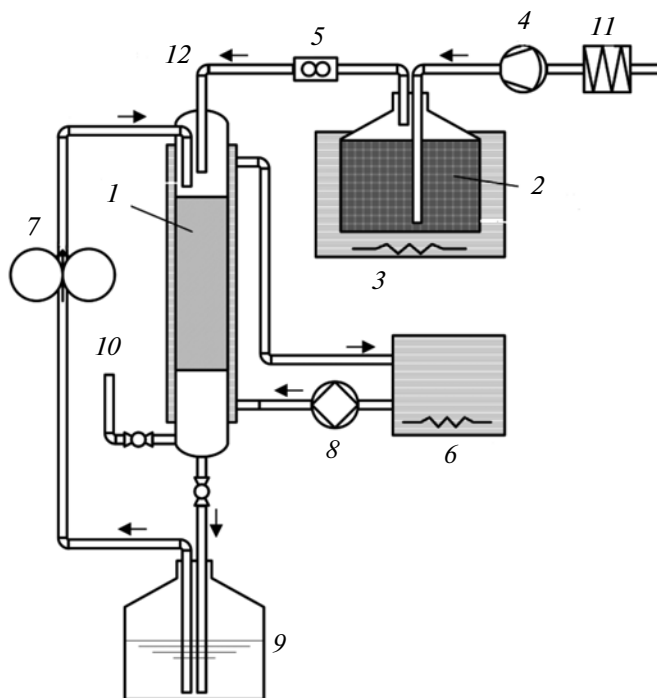


Рис. 1. Принципиальная схема лабораторного биореактора:

1 – иммобилизованные клетки сообщества на носителе (биокатализатор) в стеклянном корпусе с рубашкой для термостатирования; 2 – измельченные табачные листья; 3 – термостат на 60°C; 4 – микрокомпрессор; 5 – ротаметр; 6 – термостат; 7, 8 – перистальтический насос; 9 – емкость с орошающей жидкостью; 10 – выход (отбор пробы); 11 – воздушный фильтр; 12 – вход (отбор пробы); стрелками обозначены направления воздушного потока и орошающей жидкости.

водили в микрореакторах. Активное сообщество бактерий создавали с использованием микроорганизмов, выделенных из проб, взятых на табачном предприятии, а также бактерий-деструкторов летучих органических соединений из коллекции Института биохимии РАН, принадлежащих родам *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Micrococcus*. Суспензия смеси культур готовилась на основе модифицированной минеральной среды Эванаса, которая в дальнейшем использовалась также в качестве орошающей биокатализатор жидкости. Модифицированная минеральная среда Эванса, имела следующий состав (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2.1;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 3.4;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 1.0,  $\text{MgSO}_4$  – 0.04; микроэлементы (мг/л):  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  – 4.0;  $\text{CuSO}_4$  – 0.15;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0.35;  $\text{CaCl}_2$  – 0.026;  $\text{ZnSO}_4$  – 1.5;  $\text{MnCl}_2$  – 1.0;  $\text{FeSO}_4$  – 2.4. Скорость подачи орошающей жидкости составляла 40 мл/ч.

Через 1–3 нед. после формирования эффективной биопленки работа реактора характеризовалась следующими оптимальными для процесса параметрами: скорость орошения биокатализатора составляла 40 мл/ч; скорость подачи воздушной смеси 36 л/ч, температура поступающего воздуха 20–30°C; время контакта 2–8 с; влажность поступающего воздуха до 100%, направление по-

тока сверху вниз; объем биокатализатора около 25 см<sup>3</sup>; режим работы установки непрерывный.

**Моделирование воздушной смеси.** Воздушную смесь для очистки моделировали, пропуская воздух через прогретые табачные листья. Измельченные ферментированные листья различных сортов табака, а также смеси табаков по 200 г помещали в колбу на 1.0 л и постоянно поддерживали на водяной бане при температуре 60°C, меняя их через каждые 3 сут, а в некоторых случаях каждые сутки, так как при использовании некоторых партий табачных листьев концентрация летучих веществ быстро снижалась. Воздух с помощью компрессора подавали в колбу с прогретыми листьями, а затем в реактор на биокатализатор.

**Анализ летучих веществ в моделируемой воздушной смеси.** Созданную искусственно воздушную смесь, содержащую летучие вещества табачных листьев и никотин, анализировали на хроматографе с масс селективным детектором Shimadzu QP2010 (Япония). Для анализа использовали капиллярную кварцевую колонку MDN-1 длиной 30 м диаметром 0.32 мм с нейтральным носителем метилсиликоном фирмы “Supelco” (США). Температура термостата от 50 до 250°C программировалась в следующем режиме: 50°C – 0 мин, 2°C/мин до 56°C; 4°C/мин до 60°C; 10°C/мин до



100°C; 15°C/мин до 130°C; 20°C/мин до 190°C; 30°C/мин до 250°C; изотерма – 250°C 2 мин. Детекцию производили в диапазоне от 41 до 250 m/Z, температура источника ионов 200°C, температура интерфейса 210°C. Газ-носитель – гелий хроматографической чистоты, скорость потока 6 мл/мин с делением (коэффициент 2). Для идентификации веществ использовали библиотеку масс-спектров.

Степень конверсии органических веществ рассчитывали по соотношению площадей пиков веществ на хроматограмме на входе и выходе из реактора. В качестве реперного вещества для оценки полноты деструкции органических веществ использовали содержание наиболее токсичного компонента – никотина. Концентрацию никотина рассчитывали по предварительно построенной калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой использовали никотин фирмы “Sigma-Aldrich” (США).

Для оценки степени удаления пахнущих соединений анализ органических веществ, содержащихся в воздушной смеси на входе и выходе из реактора, проводили также после концентрирования на хроматографическом адсорбенте Chromosorb 106 (“Markes Ltd.”, Великобритания) в течении 3 сут с последующей элюцией адсорбированных соединений диэтиловым эфиром как описано ранее [7] и идентификацией на ГХ-МС.

**Определение органических веществ в орошающей жидкости.** Орошающий раствор анализировали через 5–6 месяцев работы биореактора. Жидкость (100 мл) пропускали через Chromosorb 106, затем высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , проводили элюцию диэтиловым эфиром. Элюат анализировали на газовом хроматографе с масс-селективным детектором Shimadzu QP2010 (Япония) в тех же условиях, как описано выше.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее был разработан лабораторный биореактор, работающий по принципу биофильтра с орошаемым слоем, для удаления летучих веществ табачных листьев [8]. Было показано, что лабораторный биофильтр с иммобилизованными на носителе клетками подобранного сообщества микроорганизмов-деструкторов способен удалять летучие вещества табачных листьев и никотин из смоделированной воздушной смеси. В дальнейшем серия таких лабораторных реакторов исследовалась более полутора лет. Схема лабораторной установки, использованная в работе, представлена на рис. 1. Длительное поддержание работы биофильтра позволило сформировать устойчивое сообщество микроорганизмов, эффективно удаляющее из воздушной смеси никотин и летучие вещества, обладающие запахом. В

результате длительной адаптации и обогащения сообщества на носителе эффективными микроорганизмами-деструкторами удаление органических веществ в биореакторе практически не зависело от колебаний их содержания в воздушной смеси при использовании различных партий табака с различным содержанием летучих веществ.

Для изучения возможности масштабирования процесса биофильтрации необходимо было приблизить исследуемую воздушную смесь для очистки в лабораторных биореакторах к имеющейся на производстве. Воздушная смесь моделировалась на основе ферментированных табачных листьев различных сортов и их смесей. Листья измельчали, помещали в колбу, укрепленную в термостате на 60°C. Через измельченные листья пропускать с помощью компрессора воздух, который затем поступал в реактор на биокатализатор (рис. 1).

При производстве табачных изделий колебания состава летучих соединений достаточно велики, потому создаваемый биофильтр должен работать в режиме постоянно меняющихся концентраций компонентов воздушной смеси, которые тем не менее должны быть удалены, причем это, в первую очередь, никотин и вещества, обладающие запахом. Состав летучих веществ табачных листьев различных сортов и их смесей исследовался методом газовой хроматографии (ГХ) с масс-спектрометрической (МС) детекцией.

Летучие вещества, синтезируемые в табачных листьях в процессе роста и развития растения, а также образующиеся в процессе их ферментации, изучены и подробно описаны в книге Родгмана А. и Перфетти Т.А. [11]. Однако партии табака могут иметь существенные различия в составе и содержании летучих органических веществ, зависящие не только от сортовых особенностей, но и от очень многих факторов: климатической зоны произрастания растений, времени сбора, температуры обработки табака, условий хранения и др. Нами был исследован состав нескольких сортов, наиболее часто используемых на табачных предприятиях в качестве сырья, а также две смеси табачных листьев. Результаты представлены в табл. 1 и 2. Как видно из табл. 1, различные сорта табачных листьев близки по составу летучих веществ, но сильно различаются по их содержанию, что и определяет специфические особенности аромата табака различных сортов. В результате проведенного анализа идентифицировано более 200 соединений, принадлежащих к различным классам [8]. В табл. 2 представлено описание запаха основных идентифицированных компонентов, обладающих запахом, проведенное методом сниффинг-анализа тремя аттестованными дегустаторами.

Среди летучих веществ табака были обнаружены следующие классы соединений: кислоты с

Таблица 1. Состав и содержание летучих веществ в листьях 5 различных сортов табака и их смесей

№*	ИУ	Соединение	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7
1	721	Ацеталь	192	118	141	368	106	137	108
2	757	Пентанол	38	47	15	42	34	45	45
3	776	Гексаналь	19	809	142	597	361	452	602
4	—	Октан	—	—	6	4	34	7	11
5	804	Фурфурол	40	39	8	2	361	8	12
6	—	Амилформиат	—	—	4	—	18	6	—
7	825	Фурфуриловый спирт	69	49	24	6	21	6	—
7*	832	2-Гексеналь	33	4	25	5	—	—	—
7'	834	Изовалериановая к-та	33	2	—	—	—	—	—
8	838	Циклопента-2-ен-1,4-дион	41	51	8	—	8	4	—
9	852	2-Метилмасляная кислота	22	16	9	—	19	2	—
10	854	2,3-Диметилпиридин	12	1	2	4	2	2	—
11	859	4-Метилгексанон-2	12	18	5	9	4	12	13
12	873	Гептаналь	19	14	4	16	8	15	17
14	925	5-Метилфурфурол + бензальдегид	91	9	20	—	120	—	—
15	932	2-Гептеналь	91	11	29	60	—	14	48
16	941	3-Метилпентановая к-та	172	3	31	16	—	9	11
17	949	1-Октен-3-ол	120	26	24	50	36	48	58
18	958	2-Пентилфуран	12	45	33	36	22	54	31
19	964	Октаналь	70	9	7	19	9	—	11
20	971	Гексановая кислота	79	2	106	—	30	+	—
21	1011	Фенилацетальдегид	137	61	104	51	155	107	23
22	1019	3-Октен-2-он	27	15	23	49	36	43	54
23	—	Триметилсилилкапроат	—	—	31	12	9	12	—
24	1022	2-Ацетилпиррол	26	92	16	—	5	14	—
25	1047	Фуранеол	42	—	23	—	—	9	16
26	1064	N-Изопропиланилин	73	19	20	21	19	16	26
27	1071	Гептановая к-та ТМС	22	8	36	—	—	12	—
28	1080	Фенилэтанол	175	36	147	55	58	170	38
29	1118	23-Дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пир-ан-4-он	10	16	24	—	23	2	2
30	1127	2-Ноненаль*	18	—	5	15	15	16	20
34	1211	Кумарин	5	14	13	19	13	33	26
36	1236	2-Деценаль	35	109	25	21	43	41	55
37	1249	Индолицин (пирроколин)	14	—	14	51	14	12	11
39	1257	Нонановая к-та ТМС	53	29	30	31	31	18	23
40	—	Не идентифицировано	—	—	32	52	41	42	58
41	1262	2,4-Декадиеналь	17	13	19	80	24	44	83
43	—	Бензоуксусная к-та	—	—	15	23	15	—	9
44	1284	4-Винилгваякол	23	45	6	—	16	—	67
45	—	2,4-Декадиеналь	—	—	45	191	94	86	185
46	1300	Тридекан	3300	3300	3300	3300	3300	3300	3300
47	1326	Никотин	25	9	563	14282	3492	6332	1096
48	1346	Соланон	1506	380	1372	241	455	586	178
49	1357	2-Бутил2-октеналь	19	123	126	188	183	185	261

Таблица 1. Окончание

№*	ИУ	Соединение	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7
50	1362	бета-Дамасценон	35	6	45	34	37	46	30
51	1368	Изотуйол	132	78	31	51	86	106	51
52	1374	$\alpha$ -Ионон	16	5	13	—	16	30	—
54	1426	Цис-геранилацетон	31	21	21	19	17	16	19
56	1450	1,3,7,7-Тетраметил-9-оксо-2-оксабицикло[4.4.0]-дец-5-ен	67	52	14	39	18	19	35
57	—	1,3,7,7-Тетраметил-9-оксо-2-оксабицикло[4.4.0]-дец-5-ен	—	—	21	21	16	24	15
58	1486	5,6,7,7а-Тетрагидро-4,4,7а-триметил-2(4Н)-бензофуранон	15	11	121	122	93	66	95
59	1501	Мегастигматриенон	61	6	85	38	69	66	47
60	1545	3-Гидрокси-бета-дамаскон	21	4	18	18	26	18	20
61	1559	Мегастигматриенон	111	96	95	35	84	64	32
62	1620	3-Оксо-а-ионол	54	4	60	51	95	81	20
63	1664	Триметилсилилдодеканоат	22	5	32			21	20
64	—	3-Оксо-7,8-дигидро-а-ионол	—	—	19	18		15	12
65	—	Гексагидрофарнезилацетон	—	—	39	23	18		18
66	1854	3,7,11,15-Тетраметил-2-гексадецен-1-ол ***	950	680	800	222	844	370	184
67	1886	Триметилсилилтридеканоат	14	2	209	56	63	63	45
68	1890	6-Метил-8-(2,6,6-триметил-1-циклогесен-1-ил)-5-октен-2-он	17	5	28	—	—	—	—
69	1919	Фарнезилацетон	49	4	19	—	—	—	—
70	1966	Гексадекановая к-та	491	1	385	21	531	576	221
71	2000	Триметилсилилгексадеканоат	12	7	1363	947	840	844	685
74	2164	Октадекановая кислота	162	586	458	2398	532	621	299
75	—	Моноглицерид гексадекановой кислоты	—	—	7818	7633	11831	11539	6574

\* — Не идентифицировано или не найдено;

№ 1, 2 смеси табаков, № 3 — табак тепловой сушки, Индонезия; № 4 - табак ориентальный, Болгария; № 5 — Вирджиния (UITFCG); № 6 — Вирджиния, (TNV/L9, 4); № 7 — Тайланд, Берней.

числом углеродных атомов от 4 до 20, большое количество разветвленных и нормальных углеводов, алифатические и ароматические альдегиды и кетоны, спирты. В наибольшей степени аромат табака формировали такие соединения как соланон, изомерные мегастигматриеноны (табаноны), присутствующие в наибольшем количестве. Большой вклад в аромат вносили также ароматические альдегиды и кетоны: геранилацетон, тетраметилгексадеценон, франезен, ледол, дамасценон и ионон. В формировании аромата участвовали также соединения, относящиеся к замещенным циклопентанам, циклогексанам и пиранам, содержащим спиртовые, кето- или альдегидные группы. Во всех образцах табачных листьев в наибольшем количестве, присутствовали никотин, а из веществ, обладающих характерным запахом, 3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ол, соланон, ацеталь, гексаналь, мегастигматриеноны, фенилацетальдегид, фенилэтанол. Содержание этих лету-

чих веществ в различных образцах ферментированных табачных листьев различалось от 2 до 10 раз. Все эти вещества принадлежат к различным классам соединений и при удалении их на биокатализаторе должны подвергаться деструкции отобраным сообществом микроорганизмов. Многие из идентифицированных летучих веществ табачных листьев могут использоваться микроорганизмами. Из литературных источников известно, что алканы с числом атомов углерода 5–9 тормозят рост многих микроорганизмов, но некоторыми из них могут утилизироваться. Алканы C10–C22 обычно легко метаболизируются, изоалканы утилизируются труднее, в особенности при наличии нескольких метильных групп. Алкены являются наихудшими ростовыми субстратами. Ароматические углеводороды расщепляются различными микроорганизмами в небольших количествах. Для некоторых сложных соединений, входящих в состав летучих веществ табачных листьев, не най-

**Таблица 2.** Идентифицированные методом снифинг-анализа вещества табачных листьев, обладающие запахом

№ пика	Относительное содержание (мкг/100 г)	Соединения, ГХ и ГХ-МС идентификация	Запах
7	87	Изомасляная к-та	Сернистый
9	38	Масляная к-та	Слабый табачный
10	19	Гексаналь	Зелени
11	40	Фурфурол	Острый
14	69	Фурфуриловый спирт	Бензольный
17	41	Циклопента-2-ен-1,4-дион	Неприятный сернистый
22	31	2-Ацетилфуран	Свежий, травы
23	19	2-Метилциклопента-2-ен-2-он	Табачный сильный
24	32	2,6-Диметилпиразин	Семечек, пищевой
33	73	Фенол	Кислотный
34	120	1-Октен-3-ол	Сырых грибов
36	70	6-Метил-5-гептен-2-он	Зелени
40	14	н-Декан	Табачный
42	102	4-Метилбензальдегид	Пиразиновый
43	137	Фенилацетальдегид	Цветочный
47	72	Лимонен	Цветочный
49	23	Метилфенилкетон	Жареный, горелый
53	73	Гваякол	Трубочный табак
55	22	Гептановая к-та	Свежий, табачный
56	175	Фенилэтанол	Горелый
58	15	Этилгексаноат	Химический
60	10	23-Дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-он	Семечек
62	18	2-Ноненаль	Арбуза
64	10	3-Метилацетофенон	Зелени
65	10	Индолизин (пирроколин)	Огурца
66	9	Крезол	Химический
67	4	Октановая кислота	Плохого табака
68	15	Вербенон	Табачного листа
69	7	н-Додекан	Жареный тон, ореховый
70	5	4,5,6,7-Тетрагидро-3Н-циклопентапиран-2-он	Ореховый
71	11	Индол	Фруктовый приятный
82	23	4- Винилгваякол	Едкий
87	1506	Соланон	Табачно-медовый
91	35	бета-Дамасценон	Сладкого яблока
98	31	Цис-геранилацетон	Дыма, табака
99	41	Фарнезен	Сухофруктов
110	61	Мегастигматриенон	Сухих яблок
122	117	Мегастигматриенон (табанон)	Сухофруктов, трубочной смолы
129	22	Пентадеканаль	Горячей древесины
137	525	Тетрадекановая кислота	Бальзамического ладана
145	950	3,7,11,15-Тетраметил-2-гексадецен-1-ол	Медовых сот, воска
183	540	Ледол	Хорошего табака, меда

дено информации об использовании их микроорганизмами в качестве источников углерода. Наиболее активными деструкторами перечисленных соединений, являются представители родов *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus* и некоторые другие.

Основной алкалоид табака — никотин наиболее опасен для человека [12, 13]. Кроме того его содержание в табачном листе (6% от сухой массы листа и выше), намного превышает содержание других летучих веществ, он наиболее токсичен и поэтому служил в качестве реперного соединения для оценки эффективности процесса очистки воздушной смеси в биореакторе. Есть сведения также, что от содержания никотина зависит общий характерный для табачных листьев запах [14]. Никотин попадает в вентиляционные системы предприятий, поэтому сформированное микробное сообщество должно включать штаммы, способные эффективно осуществлять его деструкцию в процессе биофильтрации.

Исследование деструкции никотина бактериями проводилось довольно давно [15–18]. В настоящее время известны несколько путей его превращения, однако до сих пор некоторые промежуточные продукты деградации этого вещества являются гипотетическими [18]. Деструкцию никотина могут осуществлять различные виды микроорганизмов, принадлежащие к родам *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Ochrobactrum*, *Sphingomonas*, *Agrobacterium* sp. и др. [18–20]. Окислительная деградация молекулы никотина бактериальными ферментами осуществляется последовательно, причем различают два пути метаболической деструкции этого вещества [21]. Известно, что грамположительные бактерии осуществляют деструкцию никотина по пирролидиновому пути. Например *Arthrobacter nicotinovorans*, трансформирует никотин в 6-гидроксиникотин до раскрытия пирролидинового кольца, а после его разрыва и удаления боковой цепи образуется 2,6-дигидроксипиридин [16]. Грамотрицательные штаммы, осуществляющие деструкцию никотина по пиридиновому пути, например *Pseudomonas putida*, из никотина образуют 6,N-метилмиосмин до разрыва пирролидинового кольца. После разрыва кольца и удаления боковой цепи через ряд превращений образуется 2,5-дигидроксипиридин и сукцинат [20–22].

Исследовано много штаммов, принадлежащих к перечисленным выше родам, способных к деструкции никотина, перспективных для использования с целью удаления никотина из отходов табачной промышленности, в том числе при их компостировании [20–23].

Степень удаления никотина из воздушной смеси на биокатализаторе, включающем адапти-

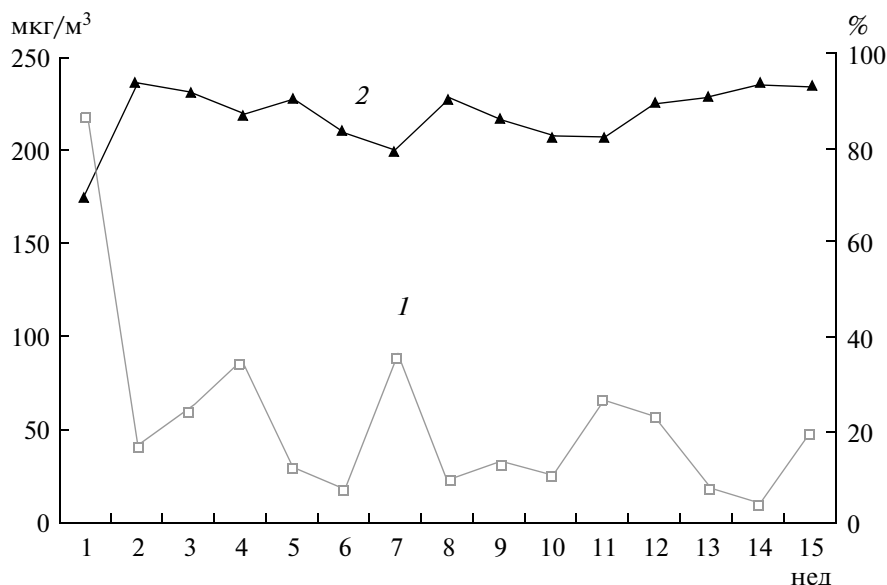
рованные в течение длительного времени клетки микроорганизмов (рис. 2) была близка к 90% в течение года и практически не зависела от изменения его концентрации на входе в реактор. Эффективность работы реакторов оценивали при использовании 5 различных сортов табака и их смесей, имеющих различное содержание никотина и веществ, определяющих запах. Изменение содержания никотина и колебания концентраций других веществ, входящих в состав летучих соединений табачных листьев, в воздушной смеси, поступающей в биореактор, не отражалось на степени его конверсии и дезодорации. Степень дезодорации воздушной смеси оценивали дегустационным методом. Степень удаления никотина из воздушной смеси рассчитывалась на основании определения его содержания во входящем и выходящем воздушном потоке из реактора по предварительно построенным калибровочным кривым. На рис. 2 представлен график зависимости степени удаления никотина от колебания его содержания в воздушной смеси на входе в реактор. Показано, что в пределах испытанных концентраций его конверсия на биокатализаторе не опускалась ниже  $80 \pm 5\%$ . Исследование орошающей жидкости, которая в течение 6 мес. могла не заменяться при использовании адаптированного в течение длительного времени сообщества, показало отсутствие в ней каких-либо производных пиридина или промежуточных продуктов деструкции никотина. В составе орошающей жидкости были идентифицированы органические кислоты, углеводороды, некоторые альдегиды, эфиры, ароматические углеводороды, утилизация которых сообществом микроорганизмов на биокатализаторе, по-видимому, была затруднена, либо они являлись конечными продуктами трансформации более сложных соединений, имеющих в составе летучих веществ табачных листьев [8]. ГХ-МС-анализ соединений в жидкой циркулирующей фазе, которая при масштабировании процесса будет попадать в стоки, показал отсутствие никотина, соланона, а также каких-либо токсичных соединений — промежуточных продуктов деструкции, присутствующих в табачных листьях.

Штаммы микроорганизмов-деструкторов, входящие в состав сообщества на биокатализаторе были способны полностью разрушать никотин. Для выделения и идентификации штаммов, способных разрушать никотин биомассу из биокатализатора высевали на поверхность агаризованной среды Эванса, содержащей 1.0 г/л никотина. В результате были выделены три чистые культуры, которые по предварительным данным на основании определения последовательности 16S РНК и физиолого-биохимических признаков были отнесены к родам *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacil-*

**Таблица 3.** Характеристика пиков летучих веществ на хроматограмме на входе и выходе из биофильтра (ГХ-МС-анализ проводили после концентрирования веществ на хромосорбе)\*

№ пика на входе/на выходе	Название вещества	Время удерживания, на входе/на выходе	Площадь пика на входе/на выходе	Площадь пика, % на входе/на выходе	Удаление вещества, %
1/1	Никотин	8.093/8.067	995011268/4748827	55.98/24.93	95.2
2	Пропиловый эфир октадекановой кислоты	10.242	1325879	0.75	100
3/2	2,2,4-триметил-3-карбоксиизопропил изобутиловый эфир пентановой кислоты	11.284/11.278	2477914/4094229	1.39/21.49	—/**
4	9-Октадеценамид	12.466	20075921	1.13	100
5	N-бутил-октадеканамид	12.821	825337	1.03	100
6/3	3, 7, 11, 15-Тетра-метил-2-гексадецен-1-ол	13.158/13.146	19523736/1407326	10.98/7.39	92.8
7	Пентадециловый эфир пальмитиновой кислоты	13.611	2054409	1.16	100
8/4	Пальмитиновая кислота	13.738/13.722	7765177/2646573	4.37/13.89	66.0
9	Дигидроксипропиловый эфир гексадекановой кислоты	14.159	18584670	10.46	100
10/5	Олеиновая кислота	14.632/14.608	17275186/934152	9.72/4.90	94.6
11/6	Стеариновая кислота	14.744/14.723	5403356/5217791	3.04/27.39	3.5

\* В таблице в числителе — данные, полученные на входе, в знаменателе — на выходе. \*\* Площадь пика вещества на выходе больше, чем на входе.



**Рис. 2.** Зависимость степени удаления никотина от его концентрации на входе в биофильтр. 1 — содержание никотина на входе в реактор, мкг/м<sup>3</sup>; 2 — удаление никотина из воздушной смеси, %.

*lus*, т.е. родам, представители которых способны активно осуществлять деструкцию никотина.

ГХ-МС-анализ воздушной смеси на входе в биофильтр показал, что такая модельная воздушная смесь по составу мало отличалась от реальных вентиляционных выбросов. Основное отличие состояло в присутствии в вентиляционных выбросах веществ, используемых для ароматизации табака, а также веществ, попадающих в вентиляционные системы в процессе подготовки табака к резке, умягчению табачного листа и др. обработок, а именно глицерина, этанола, легко метаболизируемых микроорганизмами. Для изучения влияния этих соединений воздушную смесь, полученную как описано в методике, пропускали через дополнительную емкость, в которой находились исследуемые соединения или их смесь. Воздушная смесь на входе и выходе из реактора анализировалась методом ГХ-МС. Было показано, что присутствие посторонних веществ, иногда обнаруживаемых в составе вентиляционных выбросов на предприятии, не оказывало влияния на конверсию никотина и эффективность дезодорации воздушной смеси на биофильтре.

Лабораторные реакторы с иммобилизованными на носителе клетками работали в течение года при стабильном уровне удаления никотина, более 90%, при температуре 20–30°C с удельной производительностью 1000 ч<sup>-1</sup> и временем удерживания в пределах 2–6 с. Время выхода реактора на режим при использовании селекционированного сообщества микроорганизмов существенно сократилось с 1 мес. до 1 нед.

Модельная воздушная смесь, создаваемая в результате пропускания воздуха через разогретые табачные листья, характеризовалась достаточно низким содержанием соединений, определяющих запах табака, что не позволяло определять минорные компоненты в пробах, взятых непосредственно из воздушной смеси. Для более полной оценки степени удаления пахнущих соединений анализ органических веществ проводили на входе и выходе из лабораторного реактора после их концентрирования в течение 3 сут на колонке с хроматографическим сорбентом Chromosorb 106. Сорбированные из воздушной смеси вещества (на входе и выходе из реактора) элюировали диэтиловым эфиром и анализировали методом ГХ-МС. Анализ полученных эфирных фракций показал, что в биофильтре происходит удаление никотина на 95.2% вещества, определяющего запах, — 3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ола на 92.8%, значительное удаление пальмитиновой и олеиновой кислот на 66 и 94.6% соответственно. На рис. 3 представлены хроматограммы основных летучих веществ на входе и выходе из реактора, полученные после концентрирования на сорбенте, в табл. 3 — результаты их обработки на одной из партий табачных листьев. Степень удаления органических веществ и никотина рассчитывали по соотношению площадей пиков веществ на хроматограмме на входе и выходе из реактора. Некоторые соединения в процессе очистки исчезали совсем, однако появлялись некоторые новые соединения — продукты трансформации, не являющиеся опасными веществами и не имеющие запаха.

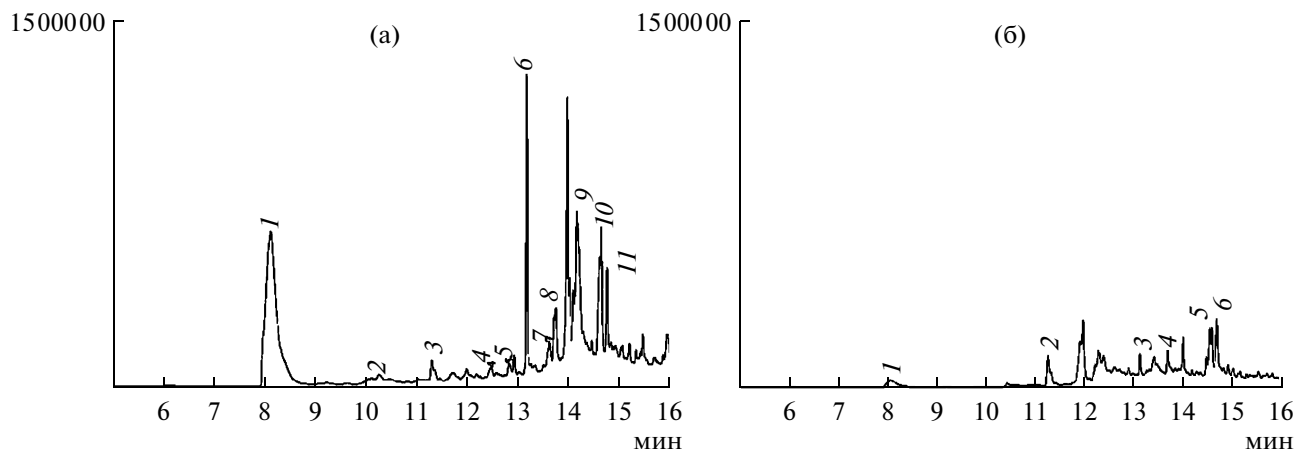


Рис. 3. ГХ-МС-анализ летучих веществ табачных листьев на входе (а) и выходе (б) из реактора после концентрирования на хроматографическом сорбенте.

Для создания процесса биологической очистки и дезодорации воздуха от пахнущих органических примесей использовали лабораторные реакторы, работающие по принципу биофильтров с орошаемым слоем. Работа лабораторных реакторов изучалась в течение длительного времени. Результаты показали, что сообщество микроорганизмов, адаптированное в течение длительного времени к использованию летучих веществ ферментированных табачных листьев, может обеспечить стабильное удаление из воздушной смеси веществ, определяющих запах табака, а также более, чем 90%-ное удаление никотина. Выделенные из сообщества на среде с никотином бактерии принадлежали к родам *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, известным деструкторам токсиканта.

Исследован состав летучих веществ листьев табака. Показано, что существенные колебания в концентрации никотина в воздушной смеси, а также посторонних примесей не влияли на эффективность удаления этих веществ и дезодорацию в лабораторном биофилт্রে.

ГХ-МС-анализ соединений в составе жидкой циркулирующей фазы, которая при масштабировании процесса будет попадать в стоки, показал отсутствие никотина, а также каких-либо токсичных веществ — промежуточных продуктов деструкции, присутствующих в табачных листьях органических соединений. Разрабатываемая технология выгодно отличается от альтернативных отсутствием вторичного загрязнения окружающей среды.

Полученные результаты послужили основанием для проведения испытаний работы биореактора в масштабах пилотной установки в условиях производства.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта № 16.512.11.2025 в рамках ФЦП «Исследования и разработки по при-

оритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2013 годы».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McNevin D., Barford J. // J. Biochem. Ingenin. 2000. V. 5. P. 231–242.
2. Nikiema J., Dastous P.A., Heitz M. // Rev. Environ. Helth. 2007. V. 22. P. 273–294.
3. Popov V.O., Zhukov V.G. Biotechnology for Odor and Air Pollution Control / Ed. Z. Shareefdeen, A. Singh. Berlin, Heidelberg: Springer, 2005. P. 305–325.
4. Briški F., Horgas N., Vuković M., Gomzi Z. // Clean Techn. Environ. Policy. 2003. V. 5. P. 295–301.
5. Безбородов, А.М., Жуков В.Г., Попов В.О., Рогожин И.С. Патент РФ. 1997. № 2090246.
6. Zhukov V.G., Rogozhin I.S., Ushakova N.A., Zagustina N.A., Popov V.O., and Bezborodov A.M. // Appl. Biochem. Microbiol. 1998. V. 34. № 4. P. 370–376.
7. Хоменков В.Г., Шевелев А.Б., Жуков В.Г., Курлович А.Е., Загустина Н.А., Попов В.О. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 2. С. 176–185.
8. Zagustina N.A., Krikunova A.K., Romanov M.E., Ruzhitsky A.O., Zhukov V.G., Popov V.O., Krikunova N.I., Misharina T.A., Terenina M.B., Vepriky A.A., Zhukov V.G. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2010. V. 85. № 3. P. 320–327.
9. Мишарина Т.А., Головня Р.В. // Журн. аналитической химии. 1992. Т. 47. № 4. С. 650–659.
10. Golovnya R.V., Misharina T.A. // Trends in Flavour Research / Eds. H. Maarse, D.G. van der Veij. Amsterdam: Elsevier Sci. B.V., 1994. P. 117–120.
11. Rodgman A., Perfetti T.A. The Chemical Components of Tobacco and Tobacco smoke. Boca Raton: CRC Press, 2009. 1210 p.
12. Gorrod J.W., Wahren J. Nicotine and Related Alkaloids. London, UK: Chapman and Hall, 1993. 299 p.
13. Shi H.-Z., Di.-H., Zhao X.-D., Liu G.-Sh., Ma Y.-J. et al. // Acta Agron. Sin. 2009. V. 35. № 7. P. 1299–1305.



14. Djordjevic M.V., Sigountos C.W., Hoffmann D., Brunne-  
mann K.D., Kagan M.R., Bush L.P., Safaev R.D., Bel-  
itsky G.A., Zaridze D. // *Int. J. Cancer*. 1991. V. 47.  
P. 348–351.
15. Civilini M., Venuti F., De Bertoldi M., Lonigro L., Dam-  
ante G. // *Ann. Microbiol.* 2002. V. 52. P. 307–315
16. Brandsch R. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006.  
V. 69. № 5. P. 493–498.
17. Meng X.J., Lu L.L., Gu G.F., Xiao M. // *Research Mi-  
crobiol.* 2010. V. 161. P. 626–633.
18. Yuan Y.J., Lu Z.X., Huang L.J., Li Y., Lu F.X.,  
Bie X.M., Teng Y.Q., Lin Q. // *J. Ind. Microbiol. Bio-  
technol.* 2007. V. 34. P. 567–570.
19. Wang S.N., Xu P., Tang H.Z., Meng J., Liu X.L.,  
Huang J. // *Biotechnol. Lett.* 2004. V. 26. P. 1493–1496.
20. Ruan A., Ming D.H., Peng X.H., Huang Z. // *Res. Mi-  
crobiol.* 2005. V. 156. P. 700–706.
21. Li H., Duan Y., Ma G., Lei L., Zang K.-Q., Yang J. //  
*Afr. J. Microbiol. Res.* 2011. V. 5. № 11. P. 1335–1341.
22. Civilini M., Domenis C., Sebastianutto N., de Bertoldi M. //  
*Waste Manag. Res.* 1997. V. 15. P. 349–358.
23. Novotny T.E., Zhao F. // *Tob. Control.* 1999. V. 8.  
P. 75–80.

## Elimination of Volatile Compounds of Leaf Tobacco from Air Emissions Using Biofiltration

N. A. Zagustina<sup>a</sup>, T. A. Misharina<sup>b</sup>, A. A. Vepriiskii<sup>c</sup>, V. G. Zhukov<sup>a</sup>, A. O. Ruzhitskii<sup>a</sup>, M. B. Terenina<sup>b</sup>,  
N. I. Krikunova<sup>b</sup>, A. K. Kulikova<sup>a</sup>, and V. O. Popov<sup>a</sup>

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

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

<sup>b</sup> *Emmanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

<sup>c</sup> *Innovative Biotechnologies Ltd., Moscow, 119071 Russia*

Received October 15, 2011

**Abstract**—The composition of the volatile organic compounds (VOCs) of various leaf tobacco brands and their blends has been studied. The differences in the content of nicotine, solanone, tetramethyl hexadecenol, megastigmatrienones, and other compounds, determining the specific tobacco smell, have been revealed. A microbial consortium, which is able to deodorize simulated tobacco emissions and decompose nicotine, has been formed by long-term adaptation to the VOCs of tobacco leaves in a laboratory reactor, functioning as a trickle-bed biofilter. Such a biofilter eliminates 90% of the basic toxic compound (nicotine) and odor-active compounds; the filtration efficiency does not change for tobacco brands with different VOC concentrations or in the presence of foreign substances. The main strains, isolated from the formed consortium and participating in the nicotine decomposition process, belong to the genera *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Rhodococcus*. An examination of the biofilter trickling fluid has shown full decomposition of nicotine and odor-active VOCs. The compounds, revealed in the trickling fluid, did not have any odor and were nontoxic. The obtained results make it possible to conduct scaling of the biofiltration process to eliminate odor from air emissions in the tobacco industry.

УДК 579.841

## ДЕГРАДАЦИЯ ЭДТА ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ НА БИОФИЛЬТРЕ КЛЕТКАМИ *Chelativorans oligotrophicus*

© 2012 г. Е. Н. Капаруллина, Н. В. Доронина, В. А. Ежов, Ю. А. Троценко

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

Поступила в редакцию 01.07.2011 г.

Получен биофильтр на основе керамзита и клеток облигатного деструктора этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4. Культура стабильно поддерживала высокую активность ЭДТА-монооксигеназы в течение трех месяцев на уровне 180–200 нмоль мин/мг белка. На биофильтре объемом 2 дм<sup>3</sup> при скорости протока 20 мл/ч достигнута полная конверсия ЭДТА при его концентрации 0.5–0.7 г/л и 80%-ная конверсия при исходной концентрации 2.0 г/л.

В настоящее время комплексообразующие агенты, такие, как аминокислоты (АПК), к которым относится ЭДТА, находятся под пристальным вниманием экологов [1]. Высокая персистентность ЭДТА приводит к накоплению его в окружающей среде и активизирует транспорт тяжелых и токсичных металлов, включая радионуклиды. ЭДТА широко применяется в целлюлозно-бумажной, пищевой, косметической и фармацевтической промышленности, производстве моющих средств, для промывки теплоэнергетического оборудования и во многих других областях [2, 3].

Уровни продаж ЭДТА в Европе достигают 200000 т ежегодно [1]. Появление в водоемах таких АПК, как ЭДТА и нитрилотриацетат (НТА), происходит, прежде всего, вследствие сбрасывания в водоемы сточных вод с предприятий бумажной промышленности. Часто фиксируемое количество ЭДТА и НТА в сточных и поверхностных водах находится в пределах 10–35 мг/л [1] и 10–500 мкг/л [4]. Поскольку производство бумаги, при котором не используются соединения хлора, растет, то ежегодное ожидаемое использование ЭДТА в бумажной промышленности составляет 65 тыс. т [4].

Согласно данным сайта [www.chemeurope.com](http://www.chemeurope.com) концентрация ЭДТА в реках Европы достигает 100 мг/л, в озерах — 10 мг/л, тогда как концентрация этого поллютанта в грунтовых водах США — 1–72 мг/л. Содержание ЭДТА в образцах морской воды составляет 0.3–3 мкг/л [5].

Загрязнение почв металлами широко распространено по всему миру. Токсичные металлы могут включаться в экологические циклы и вызывать хронические заболевания вследствие биоаккумуляции. Свойство ЭДТА активно связывать ионы металлов в комплексы широко применяется в ремедиации почв. ЭДТА не адсорбируется на

почвенных частицах и комплексы с металлами (свинец, кадмий, цинк) переходят в раствор [6]. Ремедиация почв с использованием до 60 мМ хелатов приводит к образованию большого количества отмывочных растворов с высокой концентрацией самих хелатов, которые нуждаются в более тщательной и эффективной обработке перед сбросом в окружающую среду [6].

АПК используются для обработки ядерных реакторов, поэтому присутствуют в загрязненных радионуклидами местах. Показано также, что ЭДТА увеличивает миграцию кобальта, тория, плутония и урана [7].

Комплексы ЭДТА с металлами характеризуются токсическим эффектом по отношению к водным организмам [8]. ЭДТА нарушает деление клеток, синтез хлорофилла и накопление биомассы водорослей. Масштабное применение ЭДТА или НТА (оба содержат азот) может увеличить эвтрофикацию водоемов [9].

Показано летальное воздействие ЭДТА в низких концентрациях (<100 мкМ) на клетки почечных крыс [8], подавлялся синтез белка из-за образования комплексов цинка и марганца в клетках печени после введения Ca<sup>2+</sup>ЭДТА. ЭДТА оказывал неблагоприятное воздействие на размножение и развитие млекопитающих, но безопасен при наружном применении, поэтому активно используется в косметической промышленности [10]. По данным ВОЗ, ежедневное потребление ЭДТА в концентрации 2.5 мг/кг не оказывает токсического действия на людей. Тем не менее, в ряде Западно-европейских стран и в Австралии запрещено использование ЭДТА в моющих средствах.

В целом, накопление заметных количеств ЭДТА и других комплексонов в окружающей среде создает серьезные экологические проблемы, поэтому актуален поиск эффективных штаммов —

деструкторов ЭДТА для разработки современных технологий биоремедиации экосистем и очистки промышленных стоков.

Микробный способ деструкции ЭДТА является наиболее перспективным, однако спектр бактерий, использующих ЭДТА в качестве источника углерода и энергии, весьма ограничен [11–14]. Особый интерес представляет облигатный деструктор ЭДТА *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4 [14, 15] для создания биофильтра и локальной очистки стоков от этого поллютанта.

Цель работы – создание и испытание проточно-го биофильтра на основе иммобилизованных клеток *C. oligotrophicus* LPM-4 для деградации ЭДТА.

## МЕТОДИКА

**Объекты и условия культивирования.** В работе использовали чистую культуру *C. oligotrophicus* LPM-4 (=ВКМ В-2395) [14].

Для выращивания бактерий и последующей сорбции клеток на биофильтре использовали среду следующего состава (г/л):  $\text{Na}_4\text{ЭДТА}$  – 1.0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1.0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.26;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.4;  $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – 0.84, pH 7.0, в которую добавляли 2 мл раствора микроэлементов (мг/л):  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 1.5;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0.06;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0.1;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.12;  $\text{ZnCl}_2$  – 0.07;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.025;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.015;  $\text{Na}_2\text{MoCl}_4$  – 0.025 и 0.025 мг/л биотина. Бактерий культивировали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл с 200 мл среды в течение 4 сут на роторной качалке (120 об/мин) при 29°C.

Биофильтр для деструкции ЭДТА объемом 2 дм<sup>3</sup> представлял собой стеклянный сосуд, заполненный промытым и высушенным керамзитом (1.7 кг сухого керамзита) с проложенным снизу и сверху слоем стекловолокна для равномерного распределения жидкости при подаче. Биофильтр стерилизовали при 1 атм 1 ч. Подачу минеральной среды осуществляли снизу с помощью перистальтических насосов LKB Bromma 1200 Varioprepex (“LKB”, Швеция) со скоростью 20–40 мл/ч, воздуха со скоростью 100 мл/ч компрессором Mison LP-1-1A Pump. Подаваемый воздух проходил через ротаметр и стерилизующий фильтр и далее поступал на биофильтр. Отработанный воздух и жидкость после прохождения через биофильтр накапливались в сборнике отработанной среды.

Клетки сорбировали на керамзите при комнатной температуре (21–23°C) при циркуляции суспензии бактерий со скоростью 100 мл/ч с исходной концентрацией, соответствующей 1.0 г высушенной биомассы/л. Сорбцию проводили в течение 14 сут, поддерживая концентрацию ЭДТА 1.0 г/л и pH, равный 7.0 (5.0%-ной  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), при скорости пропускания воздуха 3 л/мин. Величину

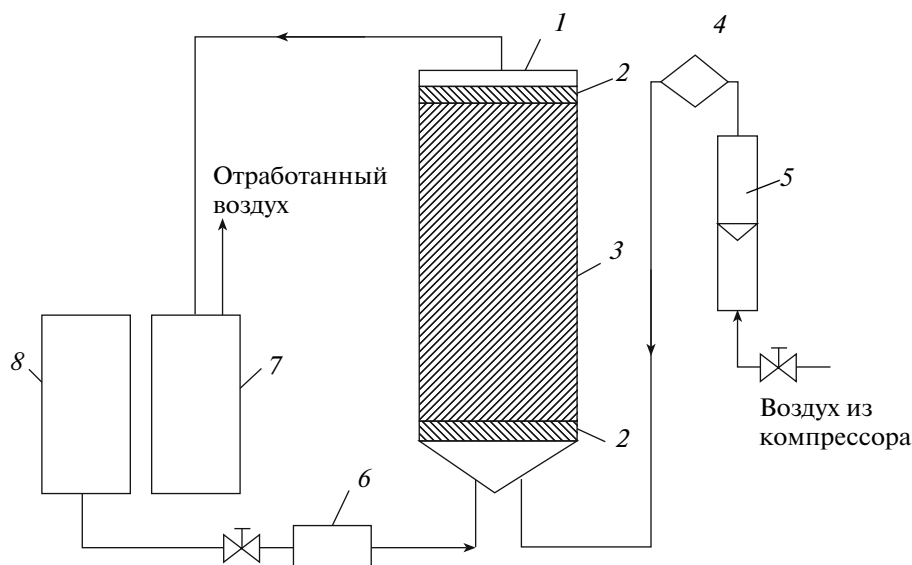
клеточной нагрузки носителя измеряли, смывая биомассу с носителя и определяя ее массу после высушивания.

При циркуляции суспензии клеток в среде через биофильтр наблюдали обрастание частиц керамзита бактериями. Через 14 сут сорбция биомассы на керамзите стабилизировалась и достигала 19 г высушенной биомассы/дм<sup>3</sup> керамзита. Далее через биофильтр пропускали свежую среду, постепенно изменяя концентрацию ЭДТА (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 г/л) и скорость подачи среды.

Количественный анализ содержания ЭДТА и промежуточных продуктов его биодеградации в стоке с биофильтра проводили с использованием колонки Separon Six C18 (“Tessek”, Чехия) и системы ВЭЖХ 2150 (“LKB”, Швеция) при 195 нм. Для анализа в колонку вводили 50 мкл образца. Скорость потока элюента (вода) составляла 0.4 мл/мин. В качестве метчика для построения калибровочной кривой использовали этилендиаминтетрауксусную кислоту (“Sigma”, США). Время удержания ЭДТА составляло 2.3–2.4 мин.

Эффективность биофильтра в отношении деградации ЭДТА на основе иммобилизованных клеток определяли по степени деструкции хелатона в жидкости.

В ходе эксперимента для определения активности монооксигеназы ЭДТА из биофильтра отбирали около 300 мг клеток. Клетки осаждали центрифугированием при 6000 g 15 мин, отмывали 0.05M трис-НСI буфером, pH 7.4, ресуспендировали в том же буфере и обрабатывали ультразвуком на аппарате Misonix S-4000 (США) мощностью 150 Вт при 20 кГц (6 × 30 с) при 4°C. Не разрушенные клетки и их фрагменты осаждали центрифугированием (10000 g, 40 мин), супернатант использовали в качестве бесклеточного экстракта для определения активности фермента в термостатированной кювете (1 см) при 30°C на регистрирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1700 (“Shimadzu”, Япония). Активность ЭДТА-монооксигеназы в экстрактах клеток определяли по окислению НАДН<sub>2</sub> [16]. Реакционная смесь (2 мл) содержала (мкмоль): трис-НСI буфер, pH 8.0–5.0, флавиномононуклеотид (ФМН) – 0.5;  $\text{Mg}^{2+}$ ЭДТА – 40; НАДН<sub>2</sub> – 0.5; бесклеточный экстракт 50 мкл. Реакцию начинали добавлением  $\text{Mg}^{2+}$ ЭДТА. Удельную активность ЭДТА-монооксигеназы выражали, как количество наномолей окисленного НАДН<sub>2</sub> на 1 мг белка в мин. Содержание белка в бесклеточных экстрактах определяли модифицированным методом Лоури [17]. В работе использовали реактивы фирмы “Sigma” (США). В таблицах представлены средние результаты трех независимых анализов, ошибка не превышала 5%.



**Рис. 1.** Схема биофильтра для деградации ЭДТА.

1 – биофильтр, 2 – слой стекловолокна, 3 – слой керамзита, 4 – стерилизующий воздушный фильтр, 5 – ротаметр, 6 – перистальтический насос, 7 – сборник очищенного раствора, 8 – сосуд для среды с ЭДТА.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аэробный облигатный деструктор ЭДТА *S. oligotrophicus* LPM-4, отвечает требованиям, предъявляемым к современным технологиям процесса биофильтрации: культура непатогенна, сохраняет высокую степень жизнеспособности после лиофилизации, а также в 25–45%-ном глицерине при  $-70^{\circ}\text{C}$  в течение пяти лет. Лيوфилизованную культуру *S. oligotrophicus* LPM-4 высевали на агаризованную среду, а затем переносили в жидкую среду, содержащую 1.0 г/л ЭДТА, и инкубировали в оптимальных условиях. Клетки отделяли от среды центрифугированием, ресуспендировали в свежей среде, и аseptически иммобилизовали на биофильтре (рис. 1).

В первой серии опытов после 14 сут сорбции клеток на керамзите устанавливали непрерывный проток среды, содержащей 0.7 г/л ЭДТА, со скоростью 10 мл/ч. Через 5 сут скорость протока увеличивали до 20 мл/ч, а через 6 сут – до 40 мл/ч. Динамика содержания ЭДТА в жидкости на входе и выходе из биофильтра представлена в табл. 1. Показано, что при концентрации ЭДТА 0.7 г/л и скоростях протока 10–20 мл/ч на выходе из биофильтра ЭДТА в пробах отсутствовал, т.е. биоконверсия хелатона составляла 100%. При увеличении скорости протока до 40 мл/ч на выходе биофильтра оставалось 0.24 г/л ЭДТА, т.е. утилизировалось только 65%.

Во второй серии опытов, после наращивания культуры на биофильтре среду пропускали со скоростью 20 мл/ч, меняя концентрацию с ЭДТА от 0.5 до 2 г/л. Результаты представлены в табл. 2. Через 4 сут после подачи 0.5 г/л ЭДТА наблюдали

его полное потребление. При увеличении концентрации ЭДТА в подаваемой среде до 1.0 г/л через тот же промежуток времени в элюате оставалось 0.09 г/л ЭДТА, что соответствовало 91% потребления ЭДТА. При увеличении концентрации до 1.5 г/л ЭДТА через 3 сут в элюате было обнаружено 0.24 г/л ЭДТА, биоконверсия составила 84%.

На рис. 2 представлены хроматограммы (ВЭЖХ) промежуточных продуктов деградации ЭДТА – этилендиаминдиацетата (ЭДА) и иминодиацетата (ИДА), а также элюатов с биофильтра при потреблении ЭДТА. Обнаружено, что при циркуляции среды с концентрацией ЭДТА 1.0 г/л со скоростью 20 мл/ч в пробах элюата накопления промежуточных продуктов метаболизма не происходило, что свидетельствовало о полном его разложении клетками деструктора в биофильтре.

Ранее нами было показано, что штамм *S. oligotrophicus* LPM-4 окисляет ЭДТА с помощью фермента монооксигеназы, активной с НАДН<sub>2</sub> и стимулируемой ФМН и ИДА-оксидазой, участвующей в заключительном этапе разложения ЭДТА

**Таблица 1.** Потребление ЭДТА иммобилизованными клетками *S. oligotrophicus* LPM-4 в зависимости от скорости протока среды в биофильтре

Концентрация ЭДТА, г/л	Скорость протока, мл/ч			
	10	20	30	40
На входе	0.7	0.7	0.7	0.7
На выходе	0	0	0.13	0.24
Потребление, %	100	100	81	65

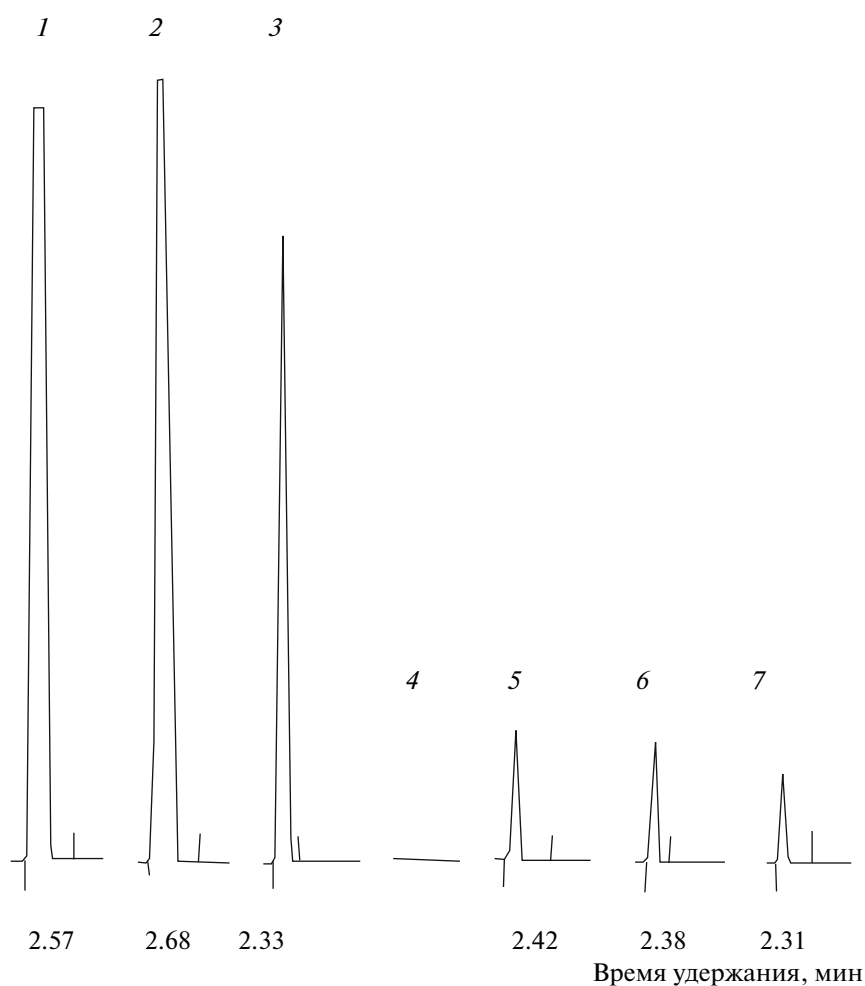
**Таблица 2.** Потребление ЭДТА иммобилизованными клетками *C. oligotrophicus* LPM-4 в зависимости от его концентрации при скорости протока среды через биофильтр 20 мл/ч

Концентрация ЭДТА, г/л		Потребление ЭДТА, %
исходная	конечная	
0.5	0	100
1.0	0.09	91
1.5	0.24	84
2.0	0.38	81

[18–19]. В ходе работы из биофильтра отбирали пробы, делали смыв клеток с керамзита и определяли активность ЭДТА-монооксигеназы, которая в среднем составляла 180–200 нмоль/мин мг белка, как в начале, так и в конце эксперимента. Это свидетельствует об активной регенерации клеток на биофильтре, что обеспечивает их достаточно высокую метаболическую активность.

При периодическом культивировании *C. oligotrophicus* LPM-4 на среде с 2.35 г/л ЭДТА Дедюхина с соавт. [20] наблюдали длительную (5 сут) лаг-фазу в динамике роста культуры. Методом обратных величин была рассчитана константа ингибирования, которая составила 2.2 г/л ЭДТА (8.05 мМ) [20]. В наших экспериментах при подаче на биофильтр среды с концентрацией ЭДТА 2.0 г/л лаг-фаза отсутствовала, но через 1 сут уровень остаточного ЭДТА составил 0.21 г/л, тогда как через 3 сут его концентрация в элюате увеличивалась до 0.38 г/л, а количество потребленного ЭДТА достигало 81%.

Следует отметить, что уровень ЭДТА в сточных водах и на очистных сооружениях обычно значительно ниже исследуемых нами модельных концентраций (от нескольких десятков мкг/л до 1 г/л) [2, 3]. В ходе проведенных испытаний биофильтр перерабатывал до 3.24 г ЭДТА за 4 сут при концентрации ЭДТА на входе 2.0 г/л и скорости протока 20 мл/ч, что соответствует производи-



**Рис. 2.** ВЭЖХ элюата из биофильтра при концентрации ЭДТА на входе 1.0 г/л и скорости протока 20 мл/ч.

1 – ЭДТА, 1.0 г/л; 2 – ИДА, 1.0 г/л; 3 – ЭДТА, 1.0 г/л; 4 – минеральная среда без ЭДТА, 5–7 – элюат на 4, 5 и 6 сут.

тельности биофилтра по продукту 1.26 г ЭДТА/г высушенной биомассы сут или по объему 0.24 м<sup>3</sup>/м<sup>3</sup> сут. Биофилтр стабильно функционировал в течение 3 месяцев. При периодическом культивировании оптимальной концентрацией для роста культуры *C. oligotrophicus* LPM-4 и потребления субстрата была концентрация 1.0 г/л ЭДТА, при иммобилизации культура эффективно разлагала значительно более высокие концентрации хелатона.

Таким образом, созданный лабораторный биофилтр с иммобилизованными клетками *C. oligotrophicus* LPM-4 может быть использован для последующего масштабирования процесса очистки стоков, содержащих ЭДТА.

Работа выполнялась в рамках ГК 02.740.11.0296.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sillanpaa M.E.T., Kurniawan T.A. Lo W.-H. // Chemosphere. 2011. V. 83. № 11. P. 1443–1460.
2. Bucheli-Witschel M., Egli T. // FEMS Microbiol. Rev. 2001. V. 25. № 1. P. 69–106.
3. Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 5. С. 508–522.
4. Pirkanniemi K., Metsarinne S., Sillanpaa M.E.T. // J. Hazard. Mater. 2007. V. 147. № 1. P. 556–561.
5. Kemmei T., Kodama S., Fujishima H., Yamamoto A. Inoue Y., Hayakawa K. // Analyt. Chim. Acta. 2012. V. 709. P. 54–58.
6. Pociacha M., Kastelec D., Lestan D. // J. Hazard. Materials. 2011. V. 192. № 2. P. 714–721.
7. Reinoso-Maset E., Worsfold P.J., Keith-Roach M. // Env. Pollution. 2012. V. 162. № 1. P. 399–405.
8. Hugenschmidt S., Planas-Bohne F., Taylor D. // Arch. Toxicol. 1993. V. 67. № 1. P. 76–78.
9. Wolf K., Gilbert P.A., Hutzinger O. // The Handbook of Environmental Chemistry. Berlin: Springer, 1992. V. 3. P. 241–259.
10. Lanigan R.S., Yamarik T.A. // Int. J. Toxicol. 2002. V. 21. № 2. P. 95–142.
11. Lauff J.J., Steele D.B., Coogan L.A., Breifeller J.M. // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. № 11. P. 3346–3353.
12. Noertemann B. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 2. P. 671–676.
13. Chistyakova T.I., Belikova V.L., Satroutdinov A.D., Deduykhina E.G., Eroshin V.K. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 19. № 6. P. 977–980.
14. Doronina N.V., Kaparullina E.N., Trotsenko Y.A., Noertemann B., Bucheli-Witschel M., Weilenmann H.-U., Egli T. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. № 5. P. 1044–1051.
15. Самрутдинов А.Д., Чистякова Т.И., Дедюхина Э.Г., Капаруллина Е.Н., Ерошин В.К. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 5. С. 535–540.
16. Witschel M., Nagel S., Egli T. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 22. P. 6937–6943.
17. Schacterle L.B., Pollack R.L. // Anal. Biochem. 1973. V. 51. № 2. P. 654–655.
18. Доронина Н.В., Капаруллина Е.Н., Вайнштейн М.Б., Троценко Ю.А. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 3. С. 420–423.
19. Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А., Алферов В.А. // Известия Тульского гос. университета. Естественные науки. 2010. № 2. С. 271–278.
20. Дедюхина Э.Г., Салмов Н.Н., Чистякова Т.И., Минкевич И.Г., Вайнштейн М.Б. // Вода: химия и экология. 2008. № 2. С. 31–34.

## EDTA Degradation by Cells of *Chelativorans oligotrophicus* Immobilized on a Biofilter

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

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

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Received July 1, 2011

**Abstract**—A biofilter based on light expanded clay aggregate (LECA) and cells of the obligate ethylenediamine tetraacetate (EDTA) destructor *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4 has been developed. The culture steadily maintained a high level of EDTA monoxygenase activity of 180–200 nmol/min/mg of protein during three months. EDTA was converted completely or by 80% at initial concentrations of 0.5–0.7 or 2.0 g/l, respectively, in a 2-dm<sup>2</sup> biofilter at a flow rate of 20 ml/h.

УДК 577.152.321\*52

## ВНЕКЛЕТОЧНАЯ $\beta$ -D-ГЛЮКОЗИДАЗА МОРСКОГО ГРИБА *Penicillium canescens*

© 2012 г. Ю. В. Дубровская, В. В. Сова, Н. Н. Слинкина, С. Д. Анастюк,  
М. В. Пивкин, Т. Н. Звягинцева

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток 690022, e-mail: sova@piboc.dvo.ru

Поступила в редакцию 25.10.2011 г.

Из морского гриба *Penicillium canescens* в гомогенном состоянии выделена внеклеточная  $\beta$ -D-глюкозидаза. Согласно данным ДДС-Na-электрофореза молекулярная масса фермента составляла 64 кДа, максимальная активность наблюдалась при pH 5.2 и 70°C. Глюкозидаза катализировала гидролиз  $\beta$ -гликозидных связей как в гликозидах, так и дисахаридах глюкозы и обладала трансгликозилирующей активностью. Фермент может быть использован для дегликозилирования природных гликозидов и в ферментативном синтезе новых углеводсодержащих соединений.

Ферменты  $\beta$ -D-глюкозидазы (КФ 3.2.1.21) гидролизуют O-гликозидные связи между остатком глюкозы и арильным или алкильным агликоном, либо  $\beta$ -D-глюкоолигосахариды. Эта группа ферментов играет важную роль в углеводном метаболизме и является ключевой в образовании глюкозы при использовании ее различными организмами как источника энергии и углерода. Глюкозидазы найдены в растениях, животных, грибах и бактериях [1].

Глюкозидазы применяются в различных биотехнологических процессах. Например, для ферментации соевого молока используют глюкозидазы бифидобактерий. Известно, что изофлавоны сои предупреждают онкологические заболевания и атеросклероз, снимают симптомы менопаузы. Агликоны являются фармакологически активной частью гликозидов. Один из путей увеличения количества функциональных компонентов в сое – это ферментативное превращение изофлавонов из бионепригодной в биопригодную форму, т.е. гликозидов в агликоны [2].

Добавление  $\beta$ -D-глюкозидазы к препаратам целлюлазы для гидролиза целлюлозных или лигноцеллюлозных субстратов приводит к ускорению превращения целлобиозы в глюкозу. Обычно в коммерческих препаратах целлюлазы не хватает этого фермента, и накопление в продуктах конверсии целлобиозы приводит к ингибированию процесса [3].

Глюкозидазы обладают высокой трансгликозилирующей активностью и применяются для ферментативного синтеза. Например, для гликозилирования первичных и вторичных спиртов и др. соединений [4].

Глюкозидазы обладают специфичностью к типу связи, структуре агликона и углеводной компоненты гликозидов. Показано, что даже глико-

зидазы, найденные в одном источнике, имеют значительные отличия в субстратной специфичности. В грибах найдены глюкозидазы с широкой специфичностью, которые действуют одинаково хорошо и на олигосахариды, и на арильные или алкильные гликозиды. Поэтому грибные глюкозидазы более пригодны для использования как многоцелевые катализаторы, а исследования каталитических свойств грибных глюкозидаз весьма актуальны [5]. Работы последних лет показали, что грибы из морских мест обитания являются продуцентами высоко активных, устойчивых к различным факторам ферментов, столь необходимых современной промышленности [6].

Цель работы – выделение и характеристика индивидуальной  $\beta$ -D-глюкозидазы, входящей в комплекс внеклеточных O-гликозилгидролаз морского гриба *Penicillium canescens* Sopp.

### МЕТОДИКА

**Микроорганизмы.** Штамм морского гриба *Penicillium canescens* взят из коллекции морских микроорганизмов Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН (КММ ТИБОХ) и культивирован на модифицированной среде Тубаки, содержащей (г/л морской воды): ламинаран – 3.0, пептон – 1.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.0, дрожжевой экстракт – 0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.5,  $\text{FeSO}_4$  – 0.02, pH 7.0.

**Реагенты.** Ламинаран из бурой водоросли *Saccharina cichorioides* и фукоидан из *Fucus evanescens* были выделены, согласно ранее описанному методу [7]. Пустулан, амилопектин, альгинат натрия, п-нитрофенил- $\beta$ -D-ламинаритриозид, метил- $\beta$ -D-глюкопиранозид, метил- $\alpha$ -D-глюко- и галактопиранозиды, ламинариолигосахариды – из коллекции лаборатории химии ферментов ТИБОХ. Халистанол сульфат из тропической губки

сем. Halihondriidae любезно предоставлен Т.Н. Макарьевой (ТИБОХ ДВО РАН). Коммерческие препараты: п-нитрофенильные производные сахаров, гентиобиоза, целлобиоза, мелибиоза – фирмы “Serva” (Германия), группоспецифические реагенты, носители для хроматографии, ПАВ и органические растворители – фирмы “Sigma” (США).

**Аналитические методы.** Концентрацию белка в растворах определяли методом Лоури [8], при хроматографии – по поглощению при 280 нм. Содержание восстанавливающих сахаров устанавливали методом Нельсона [9].

ДДС- $\text{Na}$ -электрофорез проводили в 9–20%-ном полиакриламидном геле по методу Лэммли [10]. В качестве стандартных маркеров использовали рекомбинантные белки фирмы “Fermentas Ruler” (Европейский союз). Гель сканировали на денситометре GS-800, “Bio-Rad” (США).

Анализ продуктов ферментативного гидролиза (моно- и олигосахаридов) проводили с использованием колонки Zorbax- $\text{NH}_2$  (4.6 мм  $\times$  250 мм, Германия) на хроматографе Agilent 1100 Series (США). Элюировали смесью ацетонитрил – вода 60 : 20. Детектирование осуществляли с помощью рефрактометра.

Продукты, содержащие п-нитрофенильный радикал (**НФ**), анализировали на колонке Zorbax SB-C<sub>8</sub> (4.6 мм  $\times$  150 мм, Германия) с обращенной фазой. Элюирование вели в градиенте ацетонитрил – вода от 0 до 80% ацетонитрила со скоростью 1 мл/мин. Обнаружение продуктов проводили с помощью УФ-детектора фирмы “Agilent Technologies” (США) при длине волны 302 нм.

Масс-спектры продуктов реакции трансгликозилирования записывали на времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex-III (“Bruker”, Германия) с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ). В качестве МАЛДИ матрицы использовали 1 М раствор 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в системе ацетонитрил-вода (1 : 1). Раствор исследуемых образцов (~1 мг/мл) в объеме 1 мкл наносили на мишень, предварительно покрытую матрицей, и высушивали в потоке воздуха. Спектры были получены в режиме рефлектора.

**Определение активности ферментов.** Для определения активности гликаназ стандартная реакционная смесь содержала 50 мкл раствора фермента и 450 мкл раствора полисахарида (1 мг/мл) в 0.05 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.2. Время инкубации от 15 до 60 мин при 37°C. Активность фермента определяли по возрастанию количества восстанавливающих сахаров методом Нельсона [9]. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует образование 1 нмоль моносахарида (глюкоза как стандарт) за 1 мин в условиях определения.

Активность  $\beta$ -D-глюкозидазы и N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы определяли с использованием в качестве субстратов п-нитрофенильных производных соответствующих сахаров [11]. Реакционная смесь содержала 50 мкл раствора фермента и 100 мкл раствора субстрата (1 мг/мл) в 0.05 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.2. Время инкубации от 15 до 60 мин при 37°C, реакцию останавливали добавлением 150 мкл 1 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Оптическую плотность измеряли при 420 нм на микропланшетном спектрофотометре BioTek, “Biotek Instruments, INC” (США). За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует образование 1 нмоль п-нитрофенола за 1 мин в условиях определения.

**Выделение и очистка  $\beta$ -D-глюкозидазы из культуральной жидкости *P. canescens*.** Культуральную жидкость морского мицелиального гриба *P. canescens* отделяли от мицелия центрифугированием при 10.400 g в течение 10 мин. Культуральный фильтрат концентрировали методом ультрафильтрации на мембране PM-10 фирмы “Amicon” (Голландия). Фильтрат наносили на колонку с Sephacryl S-300 (фирма “GE Health Care”, США), уравновешенную 0.05 М натрий-ацетатным буфером, pH 5.2 (рабочий буфер). Элюирование проводили тем же буфером со скоростью 0.4 мл/мин. Объем фракций составлял 3.5 мл. Фракции, содержащие  $\beta$ -D-глюкозидазу, объединяли и концентрировали методом ультрафильтрации. Препарат наносили на Econo-Pac Q картридж (ДЭАЭ-целлюлоза) фирмы “Bio-Rad” (США), уравновешенный рабочим буфером, и подключенный к прибору АКТА FPLC, “Amersham pharmacia biotech” (Швеция). Элюирование проводили в линейном градиенте концентрации  $\text{NaCl}$  в рабочем буфере (0–0.4 М, общий объем 180 мл) со скоростью 2 мл/мин. Фракции (объем 1 мл), проявившие активность, объединяли, концентрировали ультрафильтрацией, диализовали против рабочего буфера и наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой Macro Prep Support (2.0  $\times$  18.5 см), уравновешенную рабочим буфером. Элюирование проводили в линейном градиенте концентрации  $\text{NaCl}$  в рабочем буфере (0–0.3 М, общий объем 400 мл) со скоростью 0.25 мл/мин. Фракции (объем 2 мл), в которых обнаружилась активность  $\beta$ -D-глюкозидазы, объединяли и концентрировали ультрафильтрацией.

Далее препарат хроматографировали с помощью системы FPLC на колонке с Superose 12HR 10/30 (1.0 см  $\times$  30 см) (фирма “GE Health Care”, США), уравновешенной рабочим буфером, содержащим 0.15 М  $\text{NaCl}$ . Фракции (объем 0.5 мл), в которых обнаружилась активность  $\beta$ -D-глюкозидазы, объединяли и концентрировали до 5 мл ультрафильтрацией.



**Оптимальный pH.** Реакционную смесь, содержащую 25 мкл раствора  $\beta$ -D-глюкозидазы ( $2 \times 10^{-2}$  ед.), 50 мкл 0.1 М цитрат-фосфатного буфера с различными значениями pH (от 3.4 до 7.2) и 75 мкл раствора п-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозида (1 мг/мл в воде), инкубировали в течение 15 мин при 37°C и определяли активность по образованию п-нитрофенола, как описано выше.

**Стабильность pH.** К 25 мкл раствора фермента ( $2 \times 10^{-2}$  ед.) добавляли 50 мкл 0.1 М цитрат-фосфатного буфера с различными значениями pH (от 3.4 до 7.0). Растворы выдерживали при комнатной температуре 30 мин и добавляли 75 мкл раствора субстрата (1 мг/мл), растворенного в 0.2 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.2, инкубировали в течение 10 мин при 37°C и определяли в пробах остаточную активность.

**Температурный оптимум.** Реакционную смесь, содержащую 25 мкл раствора фермента ( $2 \times 10^{-2}$  ед.) и 125 мкл раствора субстрата (1 мг/мл) в 0.05 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.2, инкубировали в течение 15 мин при различной температуре (от 5 до 70°C) и определяли активность по образованию п-нитрофенола.

**Термостабильность.** Пробы, содержащие по 25 мкл раствора фермента ( $2 \times 10^{-2}$  ед.), выдерживали в течение 15 мин при различной температуре (от 5 до 70°C). В охлажденные пробы затем добавляли 125 мкл раствора субстрата (1 мг/мл) в 0.05 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.2, инкубировали в течение 15 мин при 37°C и определяли в пробах остаточную активность.

**Влияние различных химических веществ.** К 25 мкл фермента ( $2 \times 10^{-2}$  ед.) добавляли 50 мкл раствора химических веществ (соли, природные ингибиторы, группоспецифические реагенты, моносахариды) необходимой концентрации. Смесь выдерживали 10 мин при комнатной температуре, добавляли 75 мкл раствора субстрата (1 мг/мл) в 0.05 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.2, инкубировали 15 мин при 37°C и определяли в пробах остаточную активность.

**Определение константы Михаэлиса.** Константа Михаэлиса ( $K_M$ ) для гидролиза п-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозида была рассчитана по методу Лайнуивера и Берка [12]. Измеряли начальные скорости гидролиза субстрата  $\beta$ -D-глюкозидазой, как описано выше.

**Определение молекулярной массы методом гель-фильтрации.** Молекулярную массу (ММ) ферментов определяли методом гель-фильтрации на колонке Superose 12HR 10/30 (1.0 см  $\times$  30 см) (фирма "GE Health Care", США). Для калибровки были использованы стандартные белки (кДа): витамин B<sub>12</sub> – 1.35, миоглобин – 17, яичный альбумин – 44, БСА – 68,  $\gamma$ -глобулин – 158, тирроглобулин – 670. Выход стандартных белков фиксировали по

поглощению при 280 нм,  $\beta$ -D-глюкозидазы из *P. canescens* – по ферментативной активности.

**Трансгликозилирование.** К 50 мкл раствора п-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозида или целлобиозы (1 мг/мл) добавляли 25 мкл фермента ( $2 \times 10^{-2}$  ед.) и 25 мкл глицерина (конечная концентрация 5%). Инкубировали при 37°C. Через определенные промежутки времени (1, 3, 5, 10 мин) отбирали по 25 мкл и анализировали продукты методом МАЛДИ масс-спектрометрии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что уровень продуцирования ферментов микроорганизмами в значительной степени зависит от источника углерода в питательной среде [13, 14]. Глюкоза и некоторые легко усвояемые источники углерода могут быть причиной торможения синтеза гидролаз, а трудно усвояемые источники питания являются эффективными индукторами биосинтеза. Ранее для культивирования 8 штаммов морских грибов, в том числе и *P. canescens*, в качестве источника углерода нами были использованы различные полисахариды водорослей: агар, фукоидан, ламинаран [15]. Нейтральный глюкан ламинаран оказался наилучшим индуктором биосинтеза внеклеточных О-гликозилгидролаз для всех штаммов. При культивировании *P. canescens* на питательной среде с ламинараном в культуральной жидкости были обнаружены следующие О-гликозилгидролазы: 1,3- $\beta$ -D-глюканаза (2.33 ед./мл), амилаза (2.63 ед./мл), пстуланаза (0.41 ед./мл), альгиназа (1.86 ед./мл), фукоидан-гидролаза (0.9 ед./мл), N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидаза (3.35 ед./мл),  $\beta$ -D-глюкозидаза (1.86 ед./мл).

Разработана схема выделения индивидуальной  $\beta$ -D-глюкозидазы из культуральной жидкости морского гриба *P. canescens*, которая включала комбинацию методов ультрафильтрации, гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Высокоочищенная  $\beta$ -D-глюкозидаза была получена со степенью очистки в 121 раз и выходом 4% (табл. 1). Согласно данным ДДС-Na-электрофореза, молекулярная масса  $\beta$ -D-глюкозидазы соответствовала 64 кДа. Молекулы  $\beta$ -D-глюкозидазы, вероятно, в растворе склонны к агрегированию, так как значение молекулярной массы, полученное методом гель-фильтрации, составляло около 178 кДа (рис. 1).

Максимальная активность  $\beta$ -D-глюкозидазы наблюдалась при pH 5.2 и 70°C. Такое же высокое значение температурного оптимума определено у  $\beta$ -глюкозидазы из базидиомицета *Fomitopsis palustris* [16];  $\beta$ -D-глюкозидаза из *P. canescens* была стабильна в интервале pH от 5.0 до 7.0 и до температуры 50°C (рис. 2).  $K_M$  для гидролиза п-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозида была рассчитана по

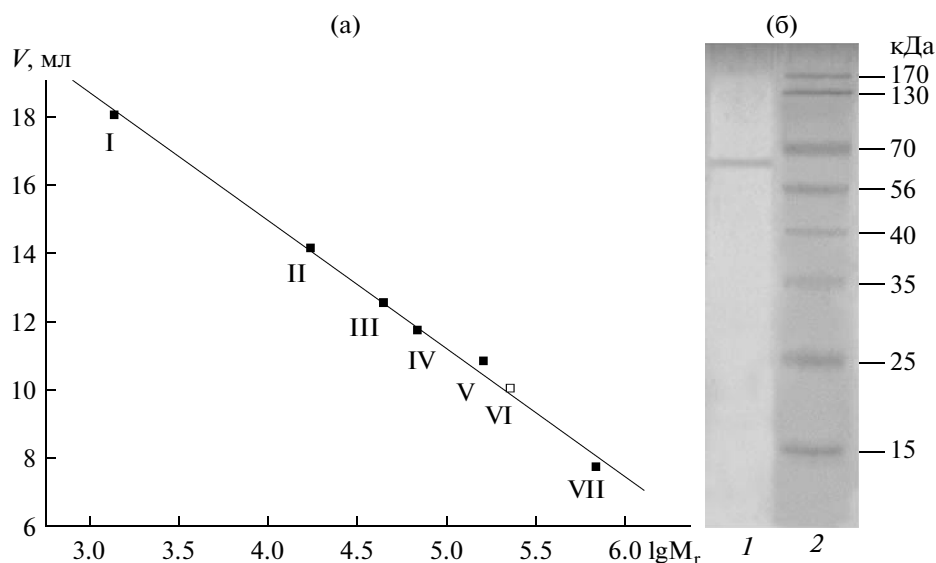
**Таблица 1.** Очистка  $\beta$ -D-глюкозидазы из *P. canescens*

Стадия очистки	Общее содержание белка, мг	Общее количество единиц активности	Выход, %	Удельная активность, ед./мг белка	Степень очистки, раз
Культуральная жидкость	950	1055	100	1.1	1
Ультрафильтрация	60	400	38	6.7	6
Гель-фильтрация на Sepharyl S-300	13.7	230	22	16.8	15
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе Econo-Pac Q картридж	2.7	110	10	40.7	37
Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе Macro Prep Support	0.8	60	6	75	68
Гель-фильтрация на Superose 12HR	0.3	40	4	133.3	121

методу Лайнуивера и Берка и имела значение 0.11 мМ, что является характерной величиной для ряда  $\beta$ -D-глюкозидаз из различных источников. Показано, что глюкоза, которая является продуктом реакции гидролиза, ингибирует активность  $\beta$ -D-глюкозидазы (на 50% при концентрации моносахарида 5 мМ).

Исследования субстратной специфичности  $\beta$ -D-глюкозидазы из *P. canescens* методом ВЭЖХ показали, что фермент катализирует гидролиз

$\beta$ -гликозидных связей как в гликозидах (п-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозид, метил- $\beta$ -D-глюкопиранозид), так и дисахаридах глюкозы (гентиобиоза, целлобиоза);  $\beta$ -D-глюкозидаза не гидролизовала п-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозид, метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид, метил- $\alpha$ -D-галактопиранозид и мелибиозу – дисахарид, содержащий остатки глюкозы и галактозы, связанные  $\alpha$ -1  $\rightarrow$  6-связями. Следовательно,  $\beta$ -D-глюкозидаза из *P. canescens* обладает абсолютной



**Рис. 1.** Определение молекулярной массы  $\beta$ -D-глюкозидазы из *P. canescens* гель-фильтрацией на колонке с Superose 12 HR (кДа): I – витамин B<sub>12</sub> 1.35, II – миоглобин 17, III – яичный альбумин 44, IV – БСА 68, V –  $\gamma$ -глобулин 158, VI –  $\beta$ -D-глюкозидаза 178, VII – тиреоглобулин 670 (а), и ДДС-Na-электрофорезом: 1 –  $\beta$ -D-глюкозидаза, 2 – маркеры (б).

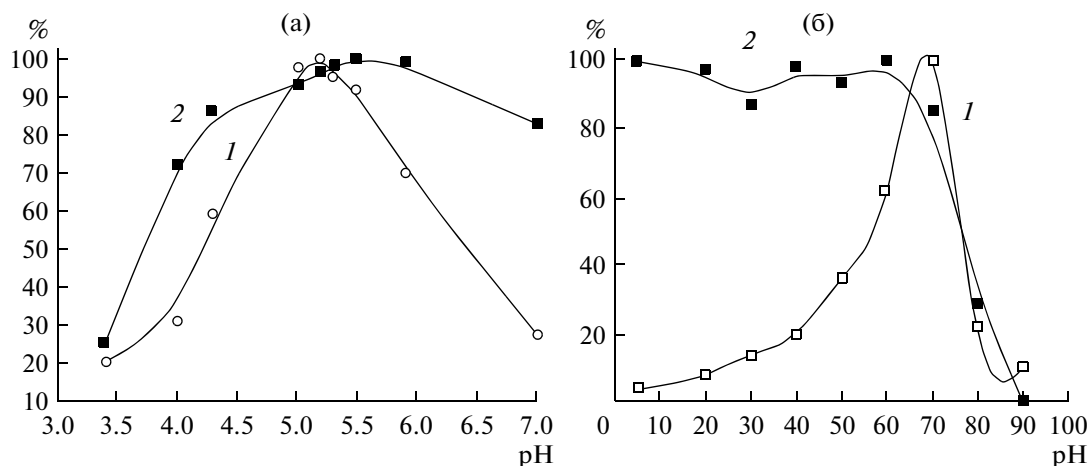


Рис. 2. Влияние pH (а) и температуры (б) на активность (%)  $\beta$ -D-глюкозидазы из *P. canescens*: 1 – оптимум, 2 – стабильность.

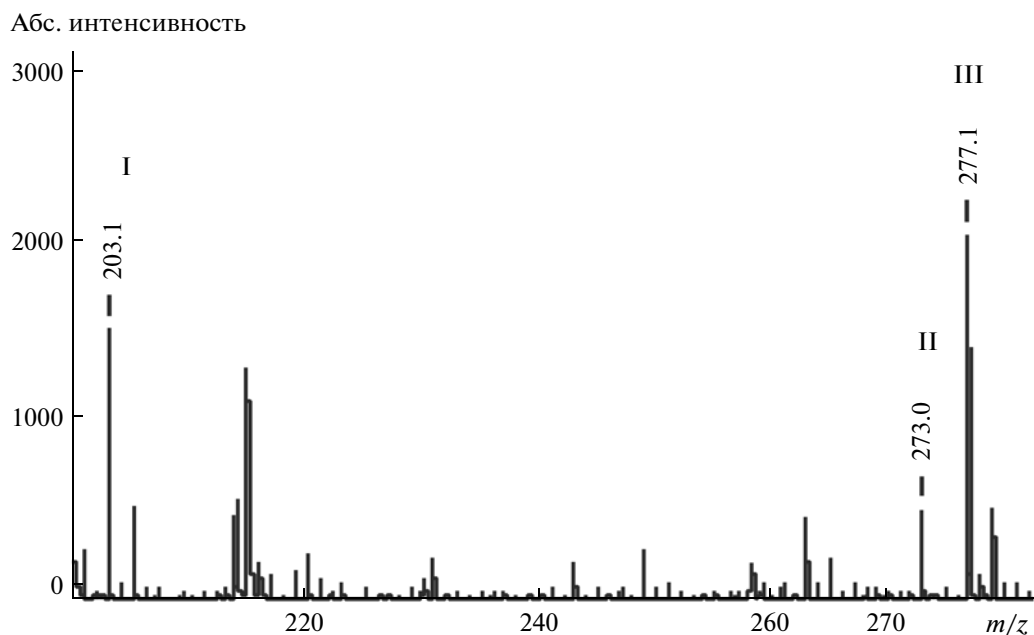
специфичностью к моносахаридному остатку (глюкоза) и конфигурации расщепляемой связи ( $\beta$ -конфигурация). Подобной специфичностью обладала  $\beta$ -D-глюкозидаза из морской термофильной бактерии *Thermotoga neapolitana* [17]. Исследуемая нами  $\beta$ -D-глюкозидаза проявляла характерное для ферментов этого класса предпочтение к более коротким субстратам. Ламинариолигосахариды с высокой степенью полимеризации (табл. 2) не являлись субстратами для  $\beta$ -D-глюкозидазы из *P. canescens*, лишь небольшие количества п-нитрофенола были обнаружены при действии фермента на п-нитрофенильное производное ламинаритрисахарида. Изучаемая  $\beta$ -D-глюкозидаза обладала широкой специфичностью

к структуре агликона в гликозидах, что позволило успешно использовать ее для дегликозилирования суммарной фракции изофлавоноидов, полученной из клеточной культуры лекарственного растения *Maackia amurensis*. Большую часть этих изофлавоноидов составляли глюкозиды и малонилглюкозиды изофлавонов [18].

Важным свойством некоторых  $\beta$ -D-глюкозидаз является способность катализировать реакцию трансгликозилирования, которая используется в ферментативном синтезе для гликозилирования первичных и вторичных спиртов и других соединений. При изучении способности  $\beta$ -D-глюкозидазы из *P. canescens* к трансгликозилированию применялась двухкомпонентная смесь, со-

Таблица 2. Специфичность  $\beta$ -D-глюкозидазы из *P. canescens*

Субстрат	Продукты реакции, идентифицированные ВЭЖХ	Способ обнаружения
п-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозид	п-нитрофенол	УФ-детектор, 302 нм
п-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозид	Не обнаружены	УФ-детектор, 302 нм
Метил- $\beta$ -D-глюкопиранозид	Глюкоза	Рефрактометр
Метил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид	Не обнаружены	»
Метил- $\alpha$ -D-галактопиранозид	Не обнаружены	»
п-нитрофенил- $\beta$ -D-ламинаритриозид	Следовые количества п-нитрофенола	УФ-детектор, 302 нм
Целлобиоза	Глюкоза	Рефрактометр
Гентиобиоза	Глюкоза	»
Мелибиоза	Не обнаружены	»
Ламинариолигосахариды ( $2 \leq n \leq 4$ )	»	»
Ламинариолигосахариды ( $5 \leq n \leq 10$ )	»	»



**Рис. 3.** МАЛДИ масс-спектр продуктов реакции трансгликозилирования  $\beta$ -D-глюкозидазой из *P. canescens*. Время реакции 1 мин. I – глюкоза ( $m/z$  203.1), II – 2,5-дигидроксibenзойная кислота (матрица,  $m/z$  273.0), III – продукт реакции трансгликозилирования – глицерилглюкозид ( $m/z$  277.1).

стоящая из п-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозида или целлобиозы в качестве доноров углеводов и глицерина как акцептора. Анализ продуктов реакции проводили методом МАЛДИ масс-спек-

трометрии. Фермент обладал высокой трансгликозилирующей активностью. При использовании в качестве донора п-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозида с первых минут присутствовал продукт

**Таблица 3.** Влияние группспецифических реагентов и ионов металлов на активность  $\beta$ -D-глюкозидазы из *P. canescens*

Реагент	Группа (остаток)	Концентрация, М	Остаточная активность, %
п-хлормеркурибензоат натрия	–SH	$10^{-2}$	104
N-этилмалеимид	–SH	$10^{-2}$	103
Ацетилимидазол	Тир, Гис	$10^{-2}$	79
Диэтилпирокарбонат	Гис	$10^{-2}$	93
N-бромсукцинимид	Три	$10^{-3}$	0
N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид	–COOH	$10^{-2}$	65
N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид и бутиламин	–COOH	$10^{-2}$	5
Бутиламин (контрольный опыт)		$10^{-2}$	78
ЭДТА	Ионы металлов	$10^{-2}$	99
Азид натрия	Ионы металлов	$10^{-2}$	100
CaCl <sub>2</sub>	–	$10^{-3}$	98
MnCl <sub>2</sub>	–	$10^{-3}$	93
MgCl <sub>2</sub>	–	$10^{-3}$	84
CuSO <sub>4</sub>	–	$10^{-3}$	10
SnCl <sub>2</sub>	–	$10^{-3}$	6
AgNO <sub>3</sub>	–	$10^{-3}$	0

реакции трансгликозилирования – глицерилглюкозид с  $m/z$  277.1 (рис. 3). С целлобиозой продукты трансгликозилирования обнаружены не были. Ранее было показано, что в реакции алкилгликозидного синтеза, катализируемой  $\beta$ -D-глюкозидазой из маниоки, в качестве донора может быть использован только *p*-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозид. Моно- и дисахариды в роли донора углеводной составляющей оказались непригодны [19].

Роль отдельных функциональных групп для каталитической активности  $\beta$ -D-глюкозидазы мы оценили методом ингибиторного анализа (табл. 3). Показано, что избирательные реагенты на сульфгидрильную группу (*p*-хлормеркурибензоат и *N*-этилмалеимид) не оказывали влияния на активность  $\beta$ -D-глюкозидазы. Ацетилимидазол, взаимодействующий с остатками тирозина и гистидина, вызывал ингибирование фермента на 21%. Вероятно, это связано с модификацией остатка тирозина, так как более специфичный реагент на гистидин – диэтилпирокарбонат практически не влиял на активность фермента. *N*-бромсукцинимид, избирательно окисляющий остатки триптофана в слабо кислой среде, полностью инактивировал фермент. Этот факт позволяет предположить важную роль остатков триптофана для каталитической активности  $\beta$ -D-глюкозидазы. Показано, что у некоторых *O*-гликозилгидролаз остатки триптофана расположены в центре связывания субстрата [20]. Карбоксильные группы дикарбоновых кислот, по-видимому, так же существенны для активности  $\beta$ -D-глюкозидазы. Карбодиимид на 45% понижал активность этого фермента, а его действие в присутствии нуклеофильного агента (бутиламин) приводило практически к полной потере активности. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  не влияли на активность фермента, ионы  $\text{Mg}^{2+}$  незначительно ее понижали, а ионы  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$  и  $\text{Ag}^{+}$  эффективно ингибировали ферментативную активность. По-видимому, металлы не входят в активный центр  $\beta$ -D-глюкозидазы из *P. canescens*, так как ЭДТА и азид натрия, ингибирующие металлозависимые ферменты, не изменяли активность  $\beta$ -D-глюкозидазы. Таким образом, можно предположить, что остатки триптофана и дикарбоновых кислот важны для активности  $\beta$ -D-глюкозидазы.

Известно, что ферменты морских грибов обладают повышенной устойчивостью к различным воздействиям. По-видимому, это связано с условиями обитания морских организмов и влиянием на их ферментные системы таких специфических факторов, как высокая концентрация солей, гидростатическое давление, рН среды, колебания температуры, относительная гипоксия и др. В растворах NaCl  $\beta$ -D-глюкозидаза из *P. canescens* сохраняла активность до концентрации соли 3 М. Не изменялась активность фермента в 50%-ных

растворах ПАВ (полиэтиленгликоль монолаурат 500 и полиэтиленгликоль 15 000). Только на 50% инактивировалась  $\beta$ -D-глюкозидаза в 40%-ном растворе этанола. Было проверено влияние на активность  $\beta$ -D-глюкозидазы известных природных ингибиторов *O*-гликозилгидролаз. Халистанол сульфат – полиоксистероид из тропической губки сем. Halihondriidae, необратимый ингибитор эндо-1,3- $\beta$ -D-глюканаз [21], в концентрации  $3 \times 10^{-2}$  М понижал активность  $\beta$ -D-глюкозидазы из *P. canescens* на 25%. Практически полное ингибирование исследуемой  $\beta$ -D-глюкозидазы (остаточная активность 4% при концентрации ингибитора  $10^{-10}$  М) наблюдалось лишь при действии природного алкалоида кастаноспермина, известного, как высоко специфичный ингибитор гликозидаз [22].

Таким образом, из морского гриба *P. canescens* в гомогенном состоянии выделена устойчивая к денатурации  $\beta$ -D-глюкозидаза, которая катализирует гидролиз  $\beta$ -гликозидных связей как в гликозидах, так и дисахаридах глюкозы и обладает трансгликозилирующей активностью. Фермент может быть использован для дегликозилирования природных гликозидов и в ферментативном синтезе новых углеводсодержащих соединений.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ №11-04-98514, № 11-04-00772 и № 09-04-00761, ДВО РАН, Программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scigelova M., Singh S., Crout D.H.G. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 1999. V. 6. № 5. P. 483–494.
2. Yang S.Q., Wang L.J., Yan Q.J., Jiang Z.Q., Li L.T. // Food Chemistry. 2009. V. 115. № 4. P. 1247–1252.
3. Tu M.B., Zhang X., Kurabi A., Gilkes N., Mabee W., Saddler J. // Biotechnol. Lett. 2006. V.28. № 3. P. 151–156.
4. Wang R.J., Yang X.Y., Gao R.J., Yang Y., Wang X.J., Cao S.G. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2009. V. 56. № 2–3. P. 131–135.
5. Woodward J., Wiseman A. // Enzyme Microbial. Technol. 1982. V. 4. № 2. P. 73–79.
6. Пивкин М.В., Кузнецова Т.А., Сова В.В. Морские грибы и их метаболиты. Владивосток: Дальнаука, 2006. 248 с.
7. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Popivnich I.B., Isakov V.V., Scobun A.S., Sundukova E.V., Elyakova L.A. // Carbohydr. Res. 1999. V. 322. № 1–2. P. 32–39.
8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
9. Nelson N. // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. № 1. P. 375–381.
10. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 257. P. 680–685.
11. Ait N., Creuzt N., Cattaneo J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979. V. 90. № 2. P. 537–546.

12. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982. Т. 3. 906 с.
13. Pitson S.M., Seviour R.J., Mcdougall B.M. // Can. J. Microbiol. 1997. V. 43. № 5. P. 432–439.
14. Noronha E.F., Kipnis A., Junqueira-Kipnis A.P., Ullhoa C.J. // FEMS Microbiol. Lett. 2000. V. 188. № 1. P. 19–22.
15. Бурцева Ю.В., Сова В.В., Пивкин М.В., Анастюк С.Д., Горбач В.И., Звягинцева Т.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 700–708.
16. Yoon J.J., Kim K.Y., Cha C.J. // J. Microbiol. 2008. V. 46. № 1. P. 51–55.
17. Park T.H., Choi K.W., Park C.S., Lee S.B., Kang H.Y., Shon K.J., Park J.S., Cha J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 69. № 4. P. 411–422.
18. Кусайкин М.И., Захаренко А.М., Ермакова С.П., Веселова М.В., Григорук Е.В., Федореев С.А., Звягинцева Т.Н. // Химия природ. соедин. 2011. № 2. С. 182–185.
19. Svasti J., Phongsak T., Sarnthima R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. V. 305. № 3. P. 470–475.
20. Ding S.-J., Ge W., Buswell J.A. // Eur. J. Biochem. 2001. V. 268. № 22. P. 5687–5695.
21. Бакунина И.Ю., Сова В.В., Елякова Л.А., Макарьева Т.Н., Стоник В.А., Пермяков Е.А., Емельяненко В.И. // Биохимия. 1991. Т. 56. № 8. С. 1397–1405.
22. Gravier-Pelletier C., Maton W., Bertho G., Merrer Y.L. // Tetrahedron. 2003. V. 59. P. 8721–8730.

## Extracellular $\beta$ -D-Glucosidase of the *Penicillium canescens* Marine Fungus

Yu. V. Dubrovskaya, V. V. Sova, N. N. Slinkina, S. D. Anastyuk,  
M. V. Pivkin, and T. N. Zvyagintseva

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Far Eastern Branch,  
Vladivostok, 690022 Russia*

*e-mail: sova@piboc.dvo.ru*

Received October 25, 2011

**Abstract**—Extracellular  $\beta$ -D-glucosidase was isolated in a homogeneous state from the *Penicillium canescens* marine fungus. According to SDS-electrophoresis, the molecular weight of the enzyme was 64 kDa and the maximal activity was observed at pH 5.2 and 70°C. Glucosidase catalyzed the hydrolysis of  $\beta$ -glycosidic bonds both in glycosides and in glucose disaccharides and had transglycosylation activity. The enzyme can be used for the deglycosylation of natural glycosides and in enzymatic synthesis of new carbon-containing compounds.

UDC 577.154.36

## FUSANT *Trichoderma* HF9 WITH ENHANCED EXTRACELLULAR CHITINASE AND PROTEIN CONTENT

© 2012 N. Balasubramanian\*, V. Thamil Priya\*\*, S. Gomathinayagam\*, D. Lalithakumari\*

\*Centre for Advanced Studies in Botany, University of Madras, Guindy campus, Chennai-600 025, India,

\*\*Department of Chemistry, A.V.V.M. Sri Pushpam College, Poondi- 613503, Thanjavur, Tamil Nadu, India

e-mail: yenbala2007@gmail.com

Received September 27, 2011

Strain improvement was carried out to obtain higher chitinase and protein by inter-specific protoplast fusion between *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride*. Fusant HF9 and parental strains of *Trichoderma* were compared for chitinase and protein production. 1% of glucose, sucrose and fungal cell wall (*Rhizoctonia solani*), were used as carbon source for cultivation of *Trichoderma* and fungal cell wall was the best to induce chitinase and protein. Usage of 0.5% colloidal chitin for the fungal growth under aerated conditions at pH 6.5 and 28°C led to higher chitinase and protein production. In these conditions fusant *Trichoderma* HF9 in comparison with parent strains had 3-, 2.5- and 1.5-fold increase of total chitinase, specific chitinase and protein, respectively. SDS-PAGE analysis revealed that it had 9 major protein bands with up-regulation compared to parent strains. Amino acid analysis showed that protein of culture filtrate of *T. harzianum*, *T. viride* and fusant *Trichoderma* HF9 had 8, 6 and 10 amino acids, respectively. The results obtained suggested that fusant HF9 could be an integration of *T. harzianum* and *T. viride* through protoplast fusion.

Chitin, an insoluble linear  $\beta$ -1,4-linked polymer of N-acetyl glucosamine (GlcNAc), is one of the most abundant polysaccharides found in nature and the most important constituent of insects, exoskeletons, shells of crustaceans and fungal cell walls. Chito-oligomers produced by enzymatic hydrolysis of chitin and chitosan have been of interest in the past few decades due to their broad range of medical, agricultural and industrial applications [1]. Chitinases have received increasing attention from the last decade due to the potential action in biological control program. This can be achieved by either using the chitinase producing microorganism or indirectly, using purified protein or chitinase encoding genes [2]. In addition, chitinase producing organisms along with  $\beta$ -glucanases or cellulases are effective biocontrol agents against phytopathogenic and soil borne fungi [3]. Chitinases from bacteria and fungi are extremely important for maintaining a balance between the large amount of carbon and nitrogen trapped in the biomass as insoluble chitin in nature [4] and also they are needed for fungi to disrupt existing cell walls when normal cells divide [5].

Recent research has been focused on chitinases owing to its multifarious usage in different fields, where they degrade chitin into its monomer of GlcNAc, used for preparation of protoplasts from fungi and are indirectly involved through protoplast fusion for improvement and development of new strains which are economically viable [6, 7]. Furthermore, chitinases and chito-oligomers produced by enzymatic hydrolysis of chitin can also be used as chito-hexaose and chito-heptaose for antitumor activity in human

health [8], to hydrolyze chitinous material in industries, in single cell protein production for yeast *Pichia kudriavzevii* [9], in decomposing chitinous wastes from shellfish [10] and in genomic and genetic studies like chitinase gene transformation to plants [11].

Chitinase could also be involved in the penetration of a host by mycoparasites or entomopathogenic fungi. However, extracellular enzymes are important for both pathogenic and saprophytic fungi to utilize organic and inorganic materials to overcome resistance in the environment. *Trichoderma* is one of the potential species that excretes hydrolytic enzymes such as chitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases and cellulases into the medium when supplemented with chitin, laminarin and cellulose, respectively [12]. This filamentous fungus has long been recognized as a source of industrial enzymes and has the ability to produce several enzymes in culture.

Strain improvements are generally concentrated to obtain higher yields of specific product of interest. Increased antibiotic production in *Penicillium* sp. [13], enhanced cellulase production than the parental strain of *Trichoderma* sp. [14], interspecific hybrids with high cellulolytic activity [15], increased citric acid [16] and antagonistic potential with antibiotic production [17], following protoplast fusion were reported. Protoplast fusant of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* was characterized by higher production of pectinase with increased growth rates and efficient substrate colonization [18]. The aim of study was to use parent strains of *T. harzianum* and *T. viride* and their fusant strain HF9 for maximum chitinase and protein produc-

tion under different conditions to drawing a protocol for chitinase production by *T. harzianum* and *T. viride*.

## MATERIALS AND METHODS

**Culture maintenance and inoculum preparation.** *T. harzianum*, *T. viride* and fusant *Trichoderma HF9* were used from CAS102 lab Collection Center, Chennai, India. They were maintained on PDA medium (g/l): potato – 200; dextrose – 20 and agar – 20, pH 6.5. The inoculum was prepared by adding 5 ml of sterile distilled water to 5-days old scrapped slant culture. The suspension was transferred into 100 ml of molten PDA, mixed thoroughly, poured into sterile Petri plates and incubated at room temperature (28°C). Mycelial discs of 9 mm were cut randomly from 5 days old cultures with sterile cork borer and used throughout the investigation and were subcultured at regular intervals to prepare conidial suspension.

**Preparation of cell free culture filtrates.** Basal medium containing (g/l):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2.8, urea – 0.6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 4.0,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.6, glucose – 40,  $\text{MgSO}_4$  – 0.2,  $\text{FeSO}_4$  – 0.01,  $\text{ZnSO}_4$  – 0.028,  $\text{MnSO}_4$  – 0.032,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.04 g and colloidal chitin – 5 (pH 6.5) was used. Conidial suspension ( $10^6$  conidia/ml) served as inoculum. The fungus was grown at 200 rpm and 28°C. The culture medium was collected by passing it through 0.22  $\mu\text{m}$  filter paper (Millipore, USA) and its pH was monitored using pH meter (Orion Research, USA) at 28°C. The culture filtrate was used as an enzyme source.

**Preparation of fungal cell wall.** *Rhizoctonia solani* cell wall was prepared according to the procedure of Sivan and Chet [19]. *R. solani* culture was grown at 200 rpm and 28°C for 6 days in 200 ml PDB (g/l): potato – 200, and dextrose – 20, pH 6.5. The mycelia were collected, thoroughly washed with sterile distilled water and homogenized using a homogenizer (Braun, Germany) for 5 min with maximum speed. Mycelial suspension was centrifuged at 1600 g (Sigma, USA) for 20 min at 4°C. The pellet was resuspended in distilled water and sonicated on ice (30 s  $\times$  3 cycles) using a sonicator (Braun, Germany) at maximum amplitude. The suspension was centrifuged again at 200 g (Sigma, USA) for 10 min at 4°C to precipitate the coarse debris. The pellet was frozen and lyophilized until powder (Virtex Company Inc., USA) sealed and stored at 4°C until use.

**Plate assay for lytic activity.** Five days old cultures of *T. harzianum*, *T. viride* and fusant HF9 on 1.0% colloidal chitin media with 2% agar were flooded with an aqueous solution of 1.0% Congo red in water followed by 1 N NaCl with intermittent shaking at 50 rpm for 15 min. The fungal growth was stopped by flooding the chitin agar plates with 1 N HCl which changed the dye colour (blue to violet) and the enzymatic activity further was inhibited with 1 N NaOH which slightly changed the dye colour (brown to red colour). Lytic

activity was revealed by the size of clear zone near mycelium on plate with colloidal chitin.

**Effect of carbon source on chitinase and protein production.** The basal medium with different carbon source of 1% glucose, sucrose, fungal cell wall, 0.5, 1.0 and 1.5% of colloidal chitin were used as a substrate for the production of chitinase and protein under shaken conditions at 200 rpm for 10 days.

**Effect of pH, temperature and incubation period on chitinase and protein production.** Colloidal chitin medium with *Trichoderma* strains at different pH of 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 and temperature of 24, 28, 32, 36°C and incubation at 200 rpm for 10 days was used to observe the chitinase and protein production periodically.

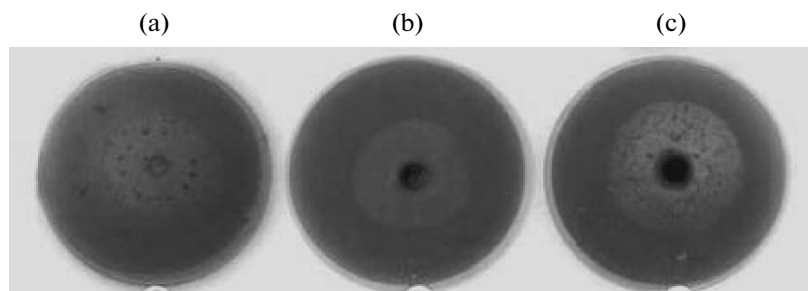
**Chitinase assay.** Colorimetric assay of chitinase was followed by Reissing et al. [20]. Briefly, the reaction mixture contained 1 ml of 0.1% colloidal chitin in 0.05 M sodium acetate buffer, pH 5.2, and 1 ml of culture filtrate (enzyme) incubated at 37°C for 2 h. Respective substrate and enzyme blanks were included. Heat denaturated enzyme was also used as control. The reaction was terminated by adding 0.1 ml of 0.08 M potassium tetraborate, pH 9.2, to 0.5 ml of reaction mixture and boiling in a water bath for 3 min. Obtained GlcNAc was determined spectrophotometrically at 585 nm. Specific activity of chitinase was expressed as amount of GlcNAc per mg of protein per h (U).

**Protein estimation.** Protein concentration in the culture filtrate was estimated by the dye binding method of Bradford [21] using bovine serum albumin as standard protein. One ml of culture filtrate was used with 5 ml of dye binding reagent (Thermo Scientific, USA) and mixed well. The absorbance was read at 595 nm after 30 min incubation.

**SDS-PAGE.** SDS-PAGE analysis was performed with the Bio-Rad System (USA) using 12% slab gels according to Laemmli [22]. Proteins of culture filtrate were precipitated by 30% trichloroacetic acid in acetone at –20°C for overnight and centrifuged at 13,000 g (Sigma, USA) for 10 min. The pellet was washed twice with ice-cold acetone, air dried until acetone evaporated, and then resuspended in 20  $\mu\text{l}$  of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. Equal volume of 2x sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.002% bromophenol blue in 125 mM Tris-HCl buffer, pH 6.8) was added and proteins were denatured for 3 min in boiling water bath. The gels were subjected to electrophoresis at 120 V for 2 h and stained with Coomassie blue (R250) to visualize protein bands. Medium range protein markers were used (Bio-Rad, USA).

**Amino acids analysis from extra cellular protein using HPLC.** The total amino acid content of the protein in cultivation filtrate was analyzed in parental strains of *Trichoderma* as well as fusant HF9 strain. The parent and fusant extracellular proteins (70  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were hydrolysed with the addition of 5 ml of 6 N HCl. After hydrolysis HCl was removed in a rotary evaporator and the residue dissolved in water. It was made up to a known





**Fig. 1.** Plate assay for lytic activity of chitin revealed by staining with Congo red for *T. harzianum* (a), *T. viride* (b) and fusant HF9 (c) grown on 1% colloidal chitin medium.

volume and used for amino acid analysis. The HPLC (Shimadzu, Japan) and column C18 (4.6 × 250 mm) with 5 μm packing size was used. Individual amino acids were separated by gradient 0.1 M acetate buffer, pH 6.8 (mobile phase A) and 3% tetrahydrofuran in methanol (mobile phase B) at a flow rate of 1.5 ml/min. Resolution of amino acid derivatives were monitored through fluorescence detector with excitation and emission set at 330 and 450 nm, respectively.

**Peak identification and quantification.** Amino acids were detected based on the retention time established for the individual amino acid under defined experimental conditions. Linearity of the peak areas for different concentrations from 20 to 200 pM, of individual amino acids was determined. Calculation was based on the area under peak established for a definite acid of known concentration. NIST amino acid mixture (USA) was used as a control.

## RESULTS

**Plate assay for lytic activity.** Lysis of colloidal chitin in the growth medium was revealed by staining with Congo red and determined as the clear zone around the mycelium. It differed distinctly between the parent strains (*T. harzianum* and *T. viride*) and the fusant HF9 and was prominent and larger in interfusant HF9 than the parent strains (Fig. 1). The fusant HF9 larger clear zone indicated enhanced production of chitinase

and it could be directly related to strain improvement in *Trichoderma*.

**Effect of glucose, sucrose and fungal cell wall on chitinase and protein production by parental strains of *Trichoderma*.** 1.0% glucose, sucrose and fungal cell wall were added in growth medium of *Trichoderma* as a carbon source. The results obtained revealed decrease of chitinase and protein production in the presence of glucose and sucrose in comparison with usage of the *R. solani* cell wall. It could be explained by the fact that the *R. solani* cell wall containing chitin and it could induce secretion of more chitinase and protein (Table 1).

**Effect of chitin concentration on chitinase and protein production by parental strains of *Trichoderma*.** Significant chitinase activity was observed when the fungus was grown in basal medium containing chitin. *T. harzianum* and *T. viride* were tested in different concentrations of colloidal chitin (0.5, 1.0 and 1.5%) for their ability to produce chitinase and protein under shaken conditions. Increased concentrations of substrate more than 5 mg/ml, decreased the enzyme and protein activity. Maximum total chitinase (Fig. 2a), specific chitinase (Fig. 2b) and protein content (Fig. 2c) recorded on 0.5% colloidal chitin amended medium under shaken conditions was obtained after 6 days of fungal growth. Total chitinase activity was estimated as the amount of enzyme required to produce 1 μmole of GlcNAc in 1 ml of reaction mixture under standard

**Table 1.** Effect of adding glucose, sucrose, and fungal cell wall in growth medium on chitinase and protein production by parental strains of *Trichoderma*

Organism	Carbon source	Total chitinase, U/ml	Specific chitinase, U/mg	Protein, μg/ml
<i>T. harzianum</i>	Glucose	3.86 ± 1.09*	1.02 ± 0.56**	3.6 ± 1.07*
	Sucrose	5.11 ± 1.95*	1.21 ± 0.93**	5.8 ± 1.86*
	Fungal cell wall	7.25 ± 0.87**	1.97 ± 0.17**	7.8 ± 1.65*
<i>T. viride</i>	Glucose	3.21 ± 0.94**	0.69 ± 0.64**	3.5 ± 1.84*
	Sucrose	4.90 ± 1.28*	0.82 ± 0.82**	4.8 ± 1.95*
	Fungal cell wall	6.86 ± 1.95*	1.48 ± 0.55**	6.5 ± 2.13*

\*  $P < 0.05$  is significant; \*\*  $P < 0.01$  is highly significant. Values are mean of triplicates with ± standard error.

assay conditions. Specific chitinase activity was estimated as the units of enzyme/mg protein.

**Effect of pH, temperature and incubation on chitinase and protein production by parental strains of *Trichoderma*.** The optimum parameters for maximum chitinase and protein production by *T. harzianum* and *T. viride* were revealed at pH 6.5 (Table 2), temperature of 28°C (Table 3) and incubation for 6 days (Fig. 2). The aerated conditions were optimum for higher growth of fungi produced more enzyme and protein.

**Chitinase and protein production by fusant *Trichoderma HF9*.** After standardization of parent strains we used fusant *Trichoderma HF9* in growth medium supplemented with 0.5% colloidal chitin, at pH 6.5 and temperature of 28°C under shaken conditions for the chitinase and protein production. In these conditions fusant *Trichoderma HF9* in comparison with parent strains had 3-, 2.5- and 1.5-fold increase of total chitinase, specific chitinase and protein, respectively (Fig. 2).

**SDS-PAGE.** The denatured SDS-PAGE analysis showed different protein patterns for culture filtrate of *T. harzianum* and *T. viride* and their fusant HF9 (Fig. 3). Among these three stains, the fusant HF9 clearly showed additional protein bands appeared in comparison with the both parent strains. Nine major protein bands with up regulation were identified in the fusant strain HF9, suggesting the recombination of two parental strains after protoplast fusion.

**Amino acids analysis from extracellular protein.** The total amino acids of protein secreted by *T. harzianum* and *T. viride* and their fusant HF9 were identified and quantified based on the standard amino acids peak detection (mentioned in materials and methods). Eight, six and ten amino acids were identified for *T. harzianum* and *T. viride* and fusant HF9 respectively (Table 4). Interestingly, we observed that 3 amino acids were additionally appeared in fusant *Trichoderma HF9* protein in comparison with the parent strains. These results indicated that genetic recombination might have taken place during protoplast fusion of parental strains, which could give additional amino acids found in fusant *Trichoderma HF9*.

## DISCUSSION

Chitin degradation depends on many environmental factors. pH, temperature, chitin concentration in the medium and incubation time with fungus degrading chitin seem to be the most important of them. In the present study, different carbon source like glucose, sucrose, *R. solani* cell wall and colloidal chitin in cultivation medium, were tested for chitinase and protein production by *T. harzianum* and *T. viride* and their fusant HF9. Colloidal chitin showed maximum chitinase and protein production. High chitinase production using colloidal chitin has been reported for

**Table 2.** Effect of pH on extra cellular chitinase production by *T. harzianum* and *T. viride* under shaken conditions

Organism	pH	Total chitinase, U/ml	Specific chitinase, U/mg	Protein, µg/ml
<i>T. harzianum</i>	5.5	132 ± 1.98*	4.8 ± 0.53**	14.2 ± 1.12*
	6.5	195.4 ± 2.07*	7.5 ± 0.85**	24.5 ± 1.26*
	7.5	187.5 ± 1.55*	6.1 ± 0.65**	21.7 ± 1.74*
	8.5	163.2 ± 1.75*	5.0 ± 0.23**	17.4 ± 1.27*
<i>T. viride</i>	5.5	98.7 ± 1.07*	3.6 ± 0.73**	11.2 ± 1.86*
	6.5	162.7 ± 1.87*	6.8 ± 0.82**	17.4 ± 1.92*
	7.5	146.2 ± 1.56*	5.2 ± 0.65**	14.1 ± 1.55*
	8.5	132.7 ± 1.93*	4.5 ± 0.73**	13.3 ± 1.42*

\*  $P < 0.05$  is significant; \*\*  $P < 0.01$  is highly significant. Values are mean of triplicates with ± standard error.

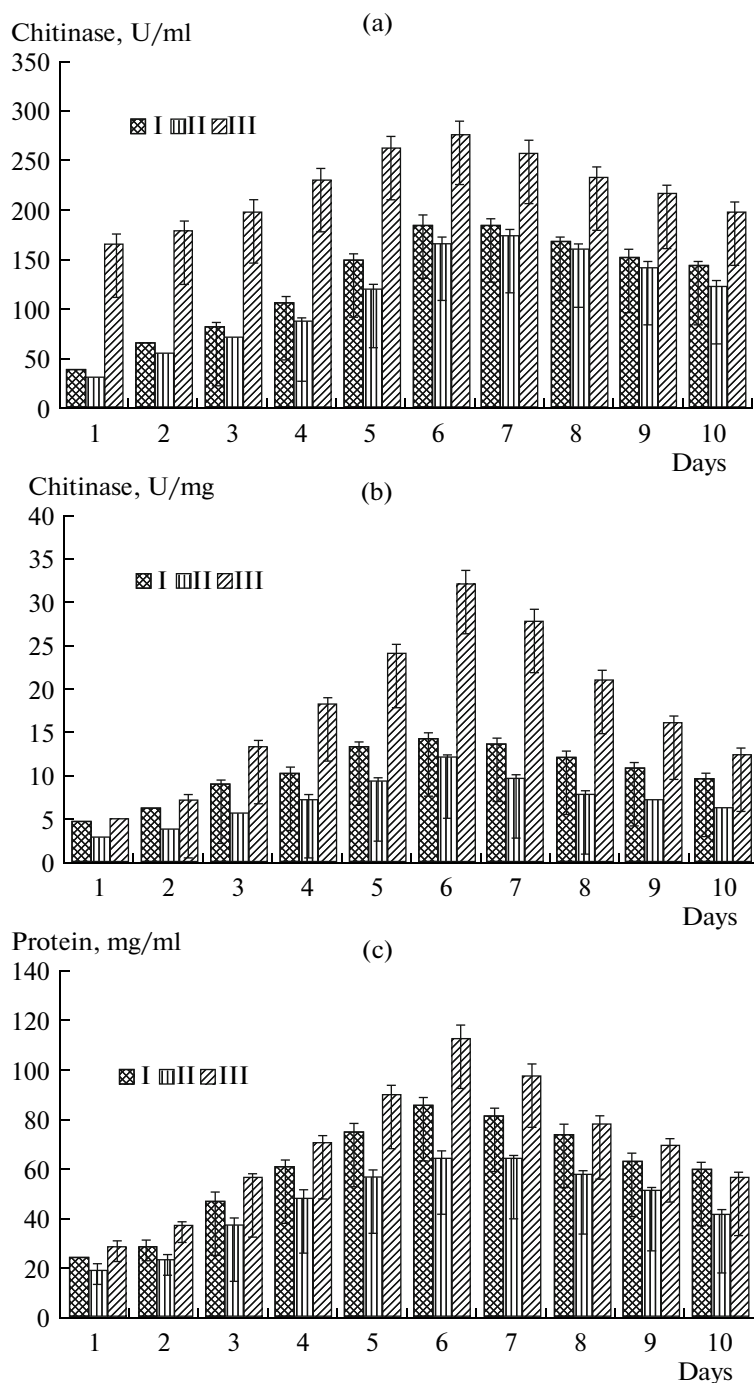
**Table 3.** Effect of temperature on extra cellular chitinase production by *T. harzianum* and *T. viride* under shaken conditions

Organism	Temperature, °C	Total chitinase, U/ml	Specific chitinase, U/mg	Protein, µg/ml
<i>T. harzianum</i>	24	172.2 ± 1.08*	5.4 ± 0.76**	21.4 ± 1.45*
	28	194.2 ± 1.36*	7.9 ± 0.56**	26.0 ± 1.66*
	32	174.5 ± 1.35*	6.0 ± 0.70**	23.2 ± 1.54*
	36	162.5 ± 1.74*	5.2 ± 0.65**	21.1 ± 1.90*
<i>T. viride</i>	24	132.6 ± 1.54*	3.7 ± 0.47**	20.2 ± 1.72*
	28	161.5 ± 1.75*	5.8 ± 0.60**	23.5 ± 1.55*
	32	145.7 ± 1.08*	4.8 ± 0.72**	19.4 ± 1.40*
	36	132.8 ± 1.82*	4.0 ± 0.55**	17.2 ± 1.43*

Values are mean of triplicates with ± standard error. \*  $P < 0.05$  is significant; \*\*  $P < 0.01$  is highly significant.

*Fusarium solani* [23] and *Trichoderma pseudokoningii* [24]. It was shown that chitin or its oligomers induce the secretion of chitinase by *T. harzianum* [25].

Similarly, chitinase, 1,3-β-D-glucanase and extracellular proteins were involved in the degradation of *R. solani* cell walls thereby found to induce chitinase production [26]. We found that optimal conditions for the production of enzyme and protein by *Trichoderma* parent strains were at 0.5% concentration of colloidal chitin at 28°C, pH 6.5 and 6 days of incubation time. This result is supported by Prabavathy et al. [27] who described that 0.5% colloidal chitin with pH 6.5 at 28°C under aerated conditions were optimum for chitinase production by *T. harzianum*. On the other hand, the chitinase could be excreted by *T. harzianum* at pH 5.0, however, the enzyme was stable at pH 7.0–9.0 [6]. Chitinase excretion by *T. harzianum* with chitin occurred at 28°C in pH 5.0, but 45 and 65%



**Fig. 2.** Total (a) and specific chitinase (b) and protein content (c) of the cultivation filtrate for *T. harzianum* (I), *T. viride* (II) and their fusant (III) grown medium containing 0.5% colloidal chitin medium.

chitinase activity was lost at 40 and 60°C, respectively [28].

We observed that the production of chitinase and protein by *Trichoderma* parent strains was started after 24 h and reached the maximum on the 6-th day of incubation in medium containing colloidal chitin and gradually declined with further incubation. Similar

findings were reported by Mathivanan et al. [29] for *T. viride*. On the other hand, Katragadda and Murugesan [24] have described release of chitinase by *T. harzianum* on the second day of incubation, with maximum production on the 8-th day and subsequent decline thereafter. It is important to note that chitin is a hard-decomposable compound and organisms need a longer time to adapt with this substrate in comparison

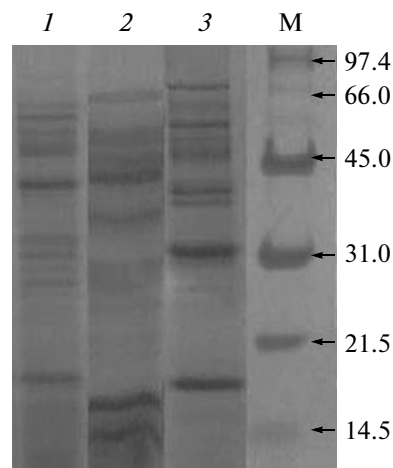
with the other high-molecular compounds to start the production of necessary enzymes [30].

*T. harzianum* produced more chitinase and protein when compared to *T. viride*, in the presence of glucose, sucrose, fungal cell wall and colloidal chitin in cultivation media. Furthermore, fusant *Trichoderma HF9* produced more chitinase and protein than *T. harzianum*. However, self-fusant of *T. harzianum* had increased 2-fold chitinase activity with 0.5% chitin in medium in comparison with parent strain of *T. harzianum* [27]. Similarly, the fusant (R1) from *Geotrichum candidum* and *Phanerochaete chrysosporium* increased protein from 48 to 67 g/kg in corn stover [31]. Seven fusants exhibited higher extracellular glucose oxidase activities than their parent strain of *A. niger* [32]. Interestingly, 3 fusant strains AT 11-2-3, AT 11-2-10, and AT 11-2-14 produce 19.2, 6.1, and 10.5 g/l citric acid, respectively, compared with non-fusant strains *A. niger* and *T. viride* in semisolid culture containing cellulose [33]. Furthermore, the fusant MMFu3 showed increase in the production of protease (1.90 U/ml), peroxidase (1100 U/ml) and lactase (200 U/ml) when compared to the two mutant strains *Mucor mucedo* [34]. The enhanced production of extracellular chitinase and protein found in our study could be directly related to improved strains of *Trichoderma*.

It is interesting to note that the plate bioassay for chitinase produced by parent strains of *Trichoderma* and their fusant HF9 revealed that the fusant always secreted more enzyme that was evident from lysis of chitin around the colonies. These results clearly suggested that the superior performance of the improved strains by over production of both the parent strains.

We could observe protein variations among the parent strains of *Trichoderma* and their fusant HF9 by SDS-PAGE analysis. Fusant *Trichoderma HF9* clearly showed 9 major protein bands with up regulation than both parent strains. Following protein analysis, we used proteins of cultivation filtrate for amino acids analysis. Fusant strain showed mix of amino acids observed in either of parents. His, Cys and Tyr were present in the protein produced by *T. harzianum* and fusant while Ser and Gly were found in the *T. viride* and fusant. Besides, Asp and Pro were common to both parental strains and fusants. Phe, Glu and Asn were additional amino acids recorded in fusant *Trichoderma HF9* and, thus, the above results further confirmed that it was a hybrid of *T. harzianum* and *T. viride*. Interestingly, additional amino acids and their increased quantity observed in fusant HF9 strain. The alteration in extra cellular chitinase and protein followed by additional amino acids with their increased content in fusant *Trichoderma HF9* added weight to the more probability of enhanced chitinase and protein production.

Enhanced antibiotic or enzyme production in hybrid strains of microorganisms by protoplast fusants



**Fig. 3.** Protein profile after SDS-PAGE of culture filtrate for *T. harzianum* (1), *T. viride* (2) and their fusant HF9 (3). M – protein markers.

alter the genetics of strains [35]. Increased chitinase, protein and amino acid contents produced by fusant *Trichoderma HF9* demonstrated integration of both parental strains. Eventually, this fungus could be used for chitinase and protein production in large scale.

**Table 4.** Amino acid analysis of protein secreted by parental strains of *Trichoderma* and their fusant

Organism	Amino acid	Concentration, mM/70 µg protein
<i>T. harzianum</i>	Asp	78.0
	Glu	405
	Thr	127
	Pro	2952.5
	Lys	1082.5
	His	335.0
	Cys	87.7
	Tyr	14.1
	<i>T. viride</i>	Asp
Thr		1102.5
Pro		827.5
Gly		855.0
Ser		194.5
Ala		275.0
Interfusant HF9		Asp
	Pro	1899.5
	Gly	186.5
	His	517.5
	Ser	552.5
	Cys	302.5
	Tyr	132.5
	Glu	26.2
	Asn	183.5
	Phe	42.5

## ACKNOWLEDGMENTS

N. Balasubramanian was supported by a senior research fellowship from the Department of Ocean Development and Department of Biotechnology, Government of India, New Delhi which is gratefully acknowledged.

## REFERENCES

1. Waghmare, S.R. and Ghosh, J.S., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, vol. 86, no. 6, pp. 1849–1856.
2. Ordentlich, A., Elad, Y., and Chet, I., *Soil Biol. Biochem.*, 1987, vol. 19, pp. 747–551.
3. Irene, G., Jose, M.L., De la Cruz, J., Tahia, B., Antonio, L., Jose, A., and Pintor, T., *Curr. Genet.*, 1994, vol. 27, pp. 83–89.
4. Li, D.C., *Mycopathol.*, 2006, vol. 161, pp. 345–360.
5. Li, H. and Greene, L.H., *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 1, pp. e8654.
6. Ramaguera, A., Tschech, A., Bender, S.H., Plattner, J., and Diekmann, H., *Enzym. Microbiol. Technol.*, 1993, vol. 15, no. 5, pp. 412–417.
7. Balasubramanian, N., Annie Juliet, G., Srikalaivani, P., and Lalithakumari, D., *Can. J. Microbiol.*, 2003, vol. 49, pp. 263–268.
8. Murao, S., Kawada, T., Itoh, H., Oyama, H., and Shin, T., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1992, vol. 56, pp. 368–369.
9. Revah-Moiseev, S. and Carroad, P.A., *Biotech. Bioeng.*, 1981, vol. 23, no. 5, pp. 1067–1078.
10. Cosio, I.G., Fisher, R.A., and Carroad, P.A., *J. Food Sci.*, 1982, vol. 47, no. 3, pp. 901–905.
11. Ann, P.J. and Ko, W.H., *Can. J. Bot.*, 1990, vol. 68, no.1, pp. 139–143.
12. Balasubramanian, N., Thamil Priya, V., Gomathinayagam, S., Shanmugaiah, V., Jashnie, J., and Lalithakumari, D., *Aust. J. Basic. Appl. Sci.*, 2010, vol. 4, no. 10, pp. 4701–4709.
13. Sotnikova, I.V., Egorov, A.A., Lebed, E.S., Dmitrieva, S.V., and Zhukov, V.G., *Antibiot. Khimioter.*, 1988, vol. 33, no. 3, pp. 211–217.
14. Balasubramanian, N. and Lalithakumari, D., *Afr. J. Biotechnol.*, 2008, vol. 7, no. 18, pp. 3235–3243.
15. Kim, J.H., Chang, S.Y., and Choi, Y.K., *Kor. J. Mycol.*, 1987, vol.15, no.2, pp. 80–86.
16. Kirimura, K., Lee, S.P., Nakajima, I., Kawabe, S.M., and Usami, S., *J. Ferment. Technol.*, 1988, vol. 66, no. 4, pp. 375–382.
17. Chet, I., Barak, Z., and Oppenheim, A., *Biotechnological Prospects of Plant Disease Control*, Ed., Chet, I. New York: Wiley Liss. 1993, pp. 211–235.
18. Kavitha, R. and Umesh-Kumar, S., *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, vol. 67, no. 1, pp. 121–125.
19. Sivan, A. and Chet, I., *Phytopathology*, 1989, vol. 79, no. 2, pp. 198–203.
20. Reissing, J.K.J., Stromiger, J.K., and Leloir, L.F., *J. Biol. Chem.*, 1955, vol. 217, pp. 959–966.
21. Bradford, M.M., *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248–254.
22. Laemmli, U.K., *Nature.*, 1970, vol. 227, pp. 680–685.
23. Mathivanan, N., Kabilan, V., and Murugesan, K., *Can. J. Microbiol.*, 1998, vol. 44, no.7, pp. 646–51.
24. Katragadda, H. and Murugesan, K., *Ind. J. Microbiol.*, 1996, vol. 36, pp. 145–148.
25. Typas, M.A. and Heale, J.B., *Mol. Gen. Genet.*, 1976, vol. 146, no. 1, pp. 17–26.
26. Ridout, C.J., Coleysmith, J.R., and Lynch, J.M., *J. Gen. Microbiol.*, 1986, vol. 132, pp. 2345–2352.
27. Prabavathy, V.R., Mathivanan, N., Sagadevan, E., Murugesan, K., and Lalithakumari, D., *Biores. Technol.*, 2006, vol. 97, no. 18, pp. 2330–2334.
28. Ulhoa, C.J. and Peberdy, J.F., *J. Gen. Microbiol.*, 1991, vol. 137, pp. 2163–2169.
29. Mathivanan, N., Srinivasan, K., and Chellian, D.S., *J. Plant Dis. Protect.*, 2000, vol. 107, no. 3, pp. 235–244.
30. Donderski, W. and Trzebiatowska, M., *Pol. J. Environ. Stud.*, 2000, vol. 9, no. 2, pp. 77–82.
31. Zhang, Y., Lin, S.M., Zhu, Y.J., Liu, C.J., Dong, Y., Li, F.F., Wu, G.F., Wang, H.Y., and Zhang, J.H., *Biotech. Lett.*, 2006, vol. 28, no. 17, pp. 1351–1359.
32. Khattab, A. and Bazarraa, W.A., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, vol. 32, no. 7, pp. 289–294.
33. Watanapokasin, R., Sawasjirakij, N., Usami, S., and Kirimura, K., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2007, vol. 143, no. 2, pp. 176–86.
34. Bhargavi Moturi and Singara Charya, M.A., *Afr. J. Biotechnol.*, 2009, vol. 8, no. 24, pp. 6908–6912.
35. Vournakis, J.N. and Elander, R.P., *Science*, 1983, vol. 219, no. 4585, pp. 703–709.

УДК 573.6.086.83:577.21]:[615.373.3+615.277]

## ОЧИСТКА ХИМЕРНОГО БЕЛКА АЛЬБУРОНА16 ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ ДРОЖЖЕЙ *Pichia pastoris*

© 2012 г. А. В. Карабельский, М. В. Падкина

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034

e-mail: karabelsky@gmail.com

Поступила в редакцию 10.10.2011 г.

Разработаны условия выделения химерного белка Альбурона16 (альбумин-интерферон-альфа 16 человека) из культуральной среды дрожжей *Pichia pastoris*, при которых не происходит агрегации белка и сохраняется его биологическая активность. Предложенная схема может быть использована для выделения и очистки химерного белка в лабораторных условиях. Полученные результаты могут быть полезны для усовершенствования способов очистки различных рекомбинантных белков, синтезируемых и секретируемых дрожжами *P. pastoris*.

Быстрое развитие биотехнологии способствовало созданию множества систем гетерологичной экспрессии, позволяющих получать различные эукариотические белки с заданными свойствами в количествах, достаточных для их успешного применения как в научной работе, так и в медицинской практике [1, 2]. Поскольку большую часть биотехнологических лекарственных средств представляют белковые молекулы, то необходимым условием их применения является сохранение биологической активности и максимально возможная очистка препарата от примесных белков, которые могут вызвать нежелательные побочные эффекты.

Использование продуцентов, секретирующих рекомбинантные белки, существенно упрощает их очистку. Ранее в лаборатории биохимической генетики кафедры генетики и селекции СПбГУ был получен штамм дрожжей *P. pastoris*, секретирующий в культуральную среду биологически активный гибридный рекомбинантный белок Альбурон16 (86 кДа), состоящий из альбумина человека и лейкоцитарного интерферона- $\alpha$ 16 [3].

Цель исследования – разработка методов, позволяющих получать биологически активный препарат Альбурона16 из культуральной среды дрожжей, как в лабораторных, так и в промышленных масштабах.

### МЕТОДИКА

Штамм дрожжей *Pichia pastoris* GS115AbN16 [4] был создан на основе штамма дрожжей *Pichia pastoris* GS115 (“Invitrogen”, США). Фенотип штамма: His<sup>+</sup>Mut<sup>s</sup>, His<sup>-</sup>, His<sup>+</sup> – ауксотрофность и прототрофность по гистидину, Mut<sup>s</sup> – замедленная скорость роста на среде с метанолом по сравнению со штаммом дикого типа – Mut<sup>+</sup>.

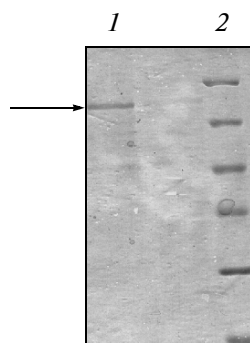
**Условия культивирования штаммов.** Для выращивания дрожжей *P. pastoris* штамма GS115AbN16 использовали жидкие среды VMG и VMG2, содержащие (г/л дистиллированной воды): дрожжевой экстракт – 10.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 3.75, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O – 12.0, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0.5, CaSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 0.4, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 3.0; (мг/л): FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 16.25, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O – 1.5, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0.5, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O – 0.75; биотин – 50.0; глицерин – 10 мл; пептон – 20.0 г (только в среде VMG).

Для индукции экспрессии гена, находящегося под контролем промотора гена *AOX1*, дрожжевые клетки переносили в среду BMM или BMM2, которые, в отличие от сред VMG и VMG2 соответственно, содержали в качестве источника углерода метанол в концентрации 0.5%.

Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [5].

Электрофорез белков в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (Na-ДДС) проводили по методу Лэммли [6]. Для определения молекулярной массы исследуемых белков в одну из лунок геля наносили пробу с маркерными белками (“Unstained molecular weight marker”, “Fermentas”, Литва):  $\beta$ -галактозидаза – 116.0 кДа; бычий сывороточный альбумин – 66.2 кДа; овальбумин – 45.0 кДа; лактатдегидрогеназа – 35.0 кДа; эндонуклеаза рестрикции Bsp98I – 25.0 кДа;  $\beta$ -лактоглобулин – 18.4 кДа; лизоцим – 14.4 кДа.

Для подтверждения того, что секретируемый белок размером 86 кДа является химерным белком Альбуроном16, проводили иммуноблоттинг с антителами к ИФН- $\alpha$ 2 и HSA по стандартной методике. Для анализа электрофореграмм использовали компьютерную программу “ImageJ1.32” (URL: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).



**Рис. 1.** Электрофореграмма белков после хроматографии на голубой сефарозе. 1 – элюция 1 М KSCN; 2 – маркеры молекулярной массы. Стрелкой отмечен химерный белок Альбурон16.

Гель-фильтрацию на Sephacryl S-200 (“GE Healthcare”, США) проводили в 20 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5.5 и 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7.0. Гель-фильтрацию на BioRad P-300 (“BioRad”, США) проводили в 20 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5.5; в отдельных экспериментах буфер дополнительно содержал 0.05% твин-20 или 0.05% ДДС. Гель-фильтрацию на сефадексе G-25 проводили в 50 мМ буфере трис-НСl, pH 7.5; фосфатном буфере, pH 6.5, и 50 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5.5. Хроматографию на голубой сефарозе Cibacron F3GA (“Polysciences”, Германия) проводили в 20 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5.5; белки элюировали последовательно 200 и 500 мМ KSCN в стартовом буфере и 50 мМ трис-НСl, pH 8.5.

Ионообменную хроматографию (ИОХ) на ДЭАЭЦ проводили в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7.0; элюцию химерного белка осуществляли 0.35 М NaCl в стартовом буфере. Хроматографию на фенол-сефарозе CL-4В проводили в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7.0, с добавлением сульфата аммония до конечной концентрации 1.5 М, после чего проводили ступенчатую элюцию белков 1.0 затем 0.5 М сульфатом аммония в стартовом буфере, стартовым буфером и 30%-ным изопропиловым спиртом (ИПС). Раствор с химерным белком после элюции с фенол-сефарозы диализовали против 20 мМ натрий-аце-

татного буфера, pH 5.5. Разделение белков на Sephacryl S-200 и BioRad P-300 проводили на колонках Spectra/Chrom® (2.5 см × 60 см). Объем пробы составлял 1/40–1/50 объема колонки, скорость потока 20 см/ч. Гель-фильтрацию на сефадексе G-25 проводили на колонке Spectra/Chrom® (1.5 см × 20 см), объем пробы составлял 1/5–1/6 объема колонки, скорость потока – 30 см/ч.

Хроматографию на голубой сефарозе проводили на колонке Spectra/Chrom® (0.6 × 15 см), скорость потока – 5 см/ч. Хроматографию на фенол-сефарозе CL-4В проводили на колонке Spectra/Chrom® (0.6 × 15 см), скорость потока – 30 см/ч. ИОХ проводили на колонке Spectra/Chrom (5 × 30 см), скорость потока – 20 см/ч. Биологическую активность Альбурона16 определяли по подавлению цитопатической активности вируса ветряночного стоматита в первичной культуре L-41 кожно-мышечной ткани эмбрионов человека, чувствительной к ИНФ α-типа [7]. В качестве стандарта использовали человеческий лейкоцитарный интерферон СОС 42-28-90-87 (ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Москва).

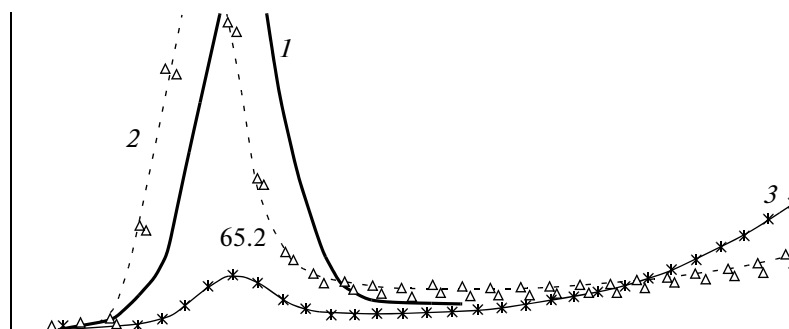
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из предполагаемых свойств гибридного белка, которые, как мы полагали, будут главным образом определяться свойствами альбумина, мы разработали схему очистки Альбурона16 из культуральной среды ВММ, которая позволила нам получить препарат рекомбинантного химерного белка, свободного от основной массы примесных белков (рис. 1): ультрафильтрация → осаждение → гель-фильтрация на Sephacryl S-200 → хроматография на голубой сефарозе → гель-фильтрация на сефадексе G-25.

Несмотря на 90% очистку белка от примесей и хороший выход (~75%), удельная биологическая активность Альбурона16 сильно уменьшалась (табл. 1). Известно, что рекомбинантные ИФН-α и сшитые с альбумином белки образуют агрегаты, в основном, за счет гидрофобных взаимодействий. Для предотвращения агрегации химерного белка Альбутропина (альбумин-гормон роста человека) в процессе культивирования использова-

**Таблица 1.** Очистка Альбурона16 из культуральной среды ВММ

Стадии очистки	Объем, мл	Суммарный белок, мг	Биологическая активность, МЕ/мл	Удельная биологическая активность, МЕ/мг белка
Культуральная среда ВММ	1000	90.0	2000	22200
Ультрафильтрация и осаждение 75% сульфата аммония	20	33.0	317000	576000
Гель-фильтрация на Sephacryl S-200	80	9.8	15000	101000
Хроматография на Cibacron F3GA	10	3.5	7000	65000



**Рис. 2.** Профиль элюции Альбурина16 при гель-фильтрации на BioRad P-300 с добавлением и без добавления детергентов.

1 – 20 мМ натрий-ацетатный буфер, рН 5.5; 2 – твин-20 0.05%; 3 – ДДС 0.05%.

ли твин-20 и твин-80 [8–10]. Мы предположили, что агрегация может быть основной причиной снижения биологической активности химерного белка Альбурина16. Для проверки этого предположения провели фракционирование Альбурина16 на биогеле BioRad P-300 в присутствии различных детергентов. Фракционирование в присутствии ионного детергента (ДДС) приводило к уменьшению первого пика, соответствующего агрегированным молекулам белка, что свидетельствовало о разобщении белковых агрегатов. Добавление неионного детергента (твин-20) в стартовый буфер способствовало еще большей агрегации белка, о чем свидетельствовало уменьшение объема элюции Альбурина16 (рис. 2).

Разное поведение химерного белка было обусловлено свойствами использованных детергентов. Известно, что неионные детергенты, такие как тритон X-100 и твин-20, являются детергентами мягкого типа [11]. Напротив, ионные детергенты обладают сильной растворяющей способностью. В присутствии ДДС возрастала биологическая активность химерного белка. При этом активность была максимальной при рН 5.5 (табл. 2), что согласовалось с данными о влиянии состава буфера на стабильность и биологическую активность рекомбинантного ИФН- $\alpha$ 16 [12]. Полученные результаты подтвердили предположение о том, что агрегация химерного белка, обусловленная гидрофобными взаимодействиями, приводит к снижению биологической активности.

Возможно, использование высоких концентраций сульфата аммония для высаливания химерного белка Альбурина16 могло способствовать обнажению “отдаленных” гидрофобных участков белка, их взаимодействию друг с другом и агрегации, поэтому для предотвращения агрегации рекомбинантного химерного белка и сохранения его активности мы использовали другой метод осаждения. Известно, что ИФН- $\alpha$ / $\beta$  хоро-

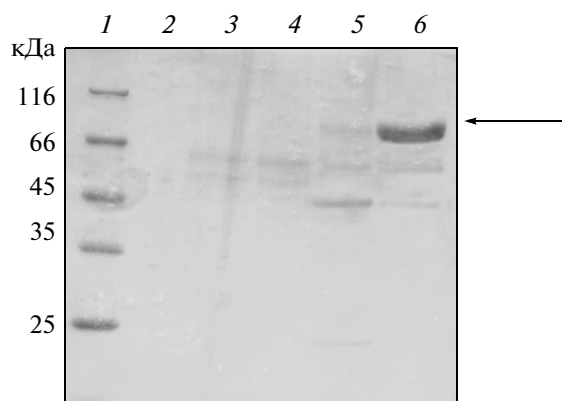
шо осаждаются ПЭГ 3350. Основным эффектом, приводящим к осаждению белков органическими растворителями (этиловый спирт, ацетон) и органическими полимерами (ПЭГ), является уменьшение способности воды к сольватации гидрофильных участков белка, в результате чего белки могут взаимодействовать друг с другом своими заряженными группами. Напротив, при осаждении белков нейтральными солями (сульфатом аммония) происходит сольватация ионов соли и освобождение гидрофобных участков белковой молекулы, которые взаимодействуют друг с другом [11]. Поскольку интерфероны хорошо осаждаются органическими полимерами, мы концентрировали Альбурина16 с помощью ПЭГ и обнаружили, что после осаждения ПЭГ химерный белок не агрегирует и легко солюбилизируется. При этом его биологическая активность оказалась в 2 раза выше, чем после осаждения сульфатом аммония (~200000 МЕ/мг белка при осаждении ПЭГ, 101000 МЕ/мг белка при осаждении сульфатом аммония).

Предложенная нами схема подходила для выделения и очистки химерного белка в лабораторных условиях и изучения его свойств, а также для анализа уровня синтеза Альбурина16, его биологической активности в зависимости от условий выращивания штамма *Pichia pastoris* GS115AbN16.

**Таблица 2.** Зависимость биологической активности химерного белка от рН и состава буфера

Буферные растворы	Биологическая активность, МЕ/мл	
	без ДДС	0.05% ДДС
50 мМ трис-НСI, рН 7.5	8000	40000
PBS, рН 6.5	29000	200000
50 мМ натрий-ацетат, рН 5.5	320000	400000





**Рис. 3.** Электрофореграмма фракций белков после разделения на фенил-сефарозе. 1 – маркеры молекулярной массы; 2 – белки, не сорбированные на колонке; 3 – элюция 1.0 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 4 – элюция 0.5 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 5 – элюция 50 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7,0; 6 – элюция 30%-ным изопропиловым спиртом. Стрелкой отмечен химерный белок Альбурон16.

На основе полученных данных мы разработали следующую схему очистки химерного белка из культуральной среды ВММ2, которая позволила нам получить очищенный на 85% препарат Альбурона16 с конечным выходом 80%.

Ультрафильтрация → обработка тетраборатом натрия → ИОХ на ДЭАЭЦ → осаждение ПЭГ → гель-фильтрация на Sephacryl S-200 → обращенно-фазовая хроматография на фенил-сефарозе.

На первой стадии очистки белок концентрировали из культуральной среды ВММ2 методом ультрафильтрации, используя мембрану AP-0.3-50ПС, которая позволяла отсекал вещества с молекулярной массой меньше 50 кДа. На этой стадии исходную культуральную жидкость концентрировали в 10 раз и удаляли низкомолекулярные примеси. Одним из способов “осветления” культуральной среды и ее очистки от углеводных компонентов (в том числе и гликопротеинов) является обработка раствора тетраборатом натрия. Тетраборат натрия (бура) используется как в биотехнологии в процессе очистки белков, так и в пищевой промышленности для концентрирования и кристаллизации различных углеводов [13–15].

Культуральную жидкость после концентрирования обрабатывали 0.05 М тетраборатом натрия в течение ночи, центрифугировали и наносили супернатант на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенную 50 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7.0. Колонку промывали 5 объемами 0.1 М NaCl и проводили элюцию белков линейным градиентом 0.1–1.0 М NaCl в стартовом буфере. Мы установили, что Альбурон16 элюировался с ДЭАЭЦ при промывании колонки 0.35 М NaCl, поэтому в дальнейших экспериментах ис-

пользовали ступенчатую элюцию химерного белка 0.35 М NaCl. Альбурон16, элюированный 0.35 М NaCl с ионообменника, осаждали 25% ПЭГ в течение ночи и наносили на колонку с Sephacryl S-200.

Гель-фильтрация на Sephacryl S-200 позволила нам избавиться от значительного количества примесных белков, в основном являющихся продуктами протеолиза Альбурона16 [3].

Известно, что рекомбинантный альбумин человека эффективно очищают на колонках с фенил-сефарозой [15]. Фенил-сефароза CL-4В обладает высокой емкостью, а метод обращенно-фазовой хроматографии отличается простотой в использовании, экономичностью и легко поддается масштабированию. В предварительных экспериментах мы подобрали условия сорбции–десорбции Альбурона16 на фенил-сефарозе, и установили, что сульфат аммония не способствует агрегации химерного белка при концентрации менее 50% насыщения.

Фракции белков после гель-фильтрации на Sephacryl S-200, в которых по результатам электрофореза содержался Альбурон16, объединяли, добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1.5 М (~35% насыщения), сорбировали на колонке с фенил-сефарозой, промывали и проводили ступенчатую элюцию белков. Результаты эксперимента представлены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, Альбурон16 элюируется с колонки изопропанолом. Анализ электрофореграмм и денситограмм полученного препарата показал, что содержание примесей (продуктов протеолиза) не превышал 15%. Раствор с Альбурон16 после элюции с фенил-сефарозы диализовали против 20 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 5.5 и определяли биологическую активность.

В приведенной выше схеме очистки Альбурона16 мы использовали широко распространенные методы выделения белков (в том числе альбуминов и интерферонов) с помощью ионообменной и обращенно-фазовой хроматографии, очистку культуральной жидкости от углеводных компонентов и гликопротеинов с помощью буры, а также более мягкие условия концентрирования и осаждения белков с помощью ПЭГ. Применение этих методов способствовало увеличению удельной биологической активности Альбурона16 в процессе очистки (табл. 3). Следует отметить, что в данном случае в ходе выращивания клеток и очистки химерного белка не используются пептон и KSCN, которые могут служить препятствием для дальнейшего внедрения разработанной нами схемы. При переходе на крупномасштабное производство данная схема может быть легко модифицирована с помощью широко распространенного в последнее время метода адсорбционной хроматографии в расширенном слое (АРС).

Таблица 3. Очистка Альбуруна16 из культуральной среды ВММ2

Стадии очистки	Объем, мл	Суммарный белок, мг	Альбурун16, мг	Биологическая активность, МЕ/мл	Удельная биологическая активность, МЕ/мг
Культуральная среда ВММ2	1000	40.0	3.2	640	16000
Ультрафильтрация и хроматография на ДЭАЭЦ	20	9.0	3.0	52000	116000
Осаждение ПЭГ и гель-фильтрация на Sephacryl S-200	30	6.6	2.7	35000	165000
Хроматография на фенол-сефарозе	4	3.0	2.6	286000	375000

Использование метода APC позволяет объединить этапы осветления, концентрирования и первоначальной очистки в один операционный блок. Благодаря этому повышается экономичность процесса, сокращается количества этапов, увеличивается выход продукта и уменьшается время процесса. “Pharmacia Biotech AB” (Швеция) производят новые типы хроматографических адсорбентов и колонок для APC под названием STREAMLINE™, которые позволяют формировать устойчивые расширенные слои при высоких скоростях потока буфера [16, 17].

Метод APC (STREAMLINE™) является универсальным инструментом, который применим для начальной очистки целевого продукта из всех обычно используемых сырьевых источников: гомогенатов, лизатов, культуральных сред, молока, экстрактов и т.д. [18]. Например, при выделении рекомбинантного альбумина человека из культуральной среды дрожжей *P. pastoris* на колонках STREAMLINE™ удалось увеличить выход белка на 45% и ускорить стадию очистки [19]. APC при помощи адсорбентов и колонок STREAMLINE™ — легко масштабируемый метод, который используется в производственных цехах фармацевтических заводов.

Приведенный выше метод концентрирования и очистки Альбуруна16 из культуральной среды ВММ2 дрожжей *P. pastoris*, может быть легко масштабирован и усовершенствован с помощью колонок STREAMLINE™ DEAE, что упростит процесс очистки и будет способствовать скорейшему внедрению в производство технологии получения нового лекарственного препарата на основе рекомбинантного химерного белка Альбуруна16.

Данная работа выполнена в рамках проведения фундаментальных исследований по приоритетным направлениям программы развития СПбГУ (1.37.115.2011), тематического плана фундаментальных НИР (1.0.131.2010), ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы” (ГК № 16.512.11.2038 “2011-1.2-512-049-044”) и ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной Рос-

сии” на 2009–2013 годы (Мероприятия 1.1, 1.5, 2.1, ГК № 02.740.11.0768, “2010-1.1-202-059”).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muller D., Bayer K., Mattanovich D. // Microbial Cell Factories. 2006. V. 5. P. 61.
2. Steinberg F.M., Raso J. // J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 1998. V. 1. P. 48–59.
3. Карабельский А.В., Зиновьева Ю.Г., Смирнов М.Н., Падкина М.В. // Вестник СПбГУ. 2009. сер. 3. № 2. С. 52–62.
4. Патент РФ. 2009. № 2373286.
5. Bradford M.A. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
6. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
7. Liu P.T., Ta T.V., Villarete L.H. // Protein Expr. Purif. 2001. V. 22. P. 381–387.
8. Ruiz L., Reyes N., Duany L., Franco A., Aroche K., Hardy Rando E. // Int. J. Pharm. 2003. V. 264. P. 57–72.
9. Chou D.K., Krishnamurthy R., Randolph T.W., Carpenter J.F., Manning M.C. // J. Pharm. Sci. 2005. V. 94. P. 1368–1381.
10. Hawe A., Friess W. // J. Pharm. Sci. 2007. V. 96. P. 2987–2999.
11. Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Мир, 1985. 360 с.
12. Патент РФ. 2007. № 2380405.
13. Honda S. // J. Chromatogr. A. 1996. V. 720. P. 337–351.
14. Храпцов А.Г., Евдокимов И.А., Рябцева С.А., Серов А.В., Лодыгин Д.Н., Полищук Д.О., Харитонов Д.В., Самойлов В.А., Нестеренко П.Г., Журба Л.Н. // Вестник СевКавГТУ. Сер. “Продовольствие”. 2003. № 1. [http://www.ncstu.info/content/\\_docs/pdf/\\_trudi/\\_food/6/21.pdf](http://www.ncstu.info/content/_docs/pdf/_trudi/_food/6/21.pdf)
15. Bobik T.V., Vorob'ev I.I., Ponomarenko N.A., Gabibov A.G., Miroshnikov A.I. // Bioorg. Khim. 2008. V. 34 P. 56–62.
16. McCormick D.K. // Biotechnology (N Y). 1993. V. 11. P. 1059.
17. Hjorth R., Kämpe S., Carlsson M. // Bioseparation. 1995. V. 5. P. 217–223.
18. Волков Г.Л., Андрианов С.И., Горошникова Т. В., Гаврилюк Е.С. // Укр. биохим. журн. 2002. Т. 74. № 6. С. 5–16.
19. Sumi A., Okuyama K., Kobayashi K., Ohtani W., Ohmura T., Yokoyama K. // Bioseparation. 1999. V. 8. P. 195–200.

## Purification of the Chimeric Protein Alburon16 from a Culture Medium of the Yeast *Pichia pastoris*

A. V. Karabel'skii and M. V. Padkina

*St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia*

*e-mail: karabelsky@gmail.com*

Received October 10, 2011

**Abstract**—Conditions have been created for the isolation of the chimeric protein Alburon16 (human albumin-interferon- $\alpha$ 16) from a culture medium of the yeast *Pichia pastoris*, under which there is no aggregation of the protein and its biological activity is maintained. The proposed scheme can be used for the isolation and purification of a chimeric protein in laboratory conditions. The obtained results may be useful for improving the purification methods of various recombinant proteins synthesized and secreted by the yeast *P. pastoris*.

## РЕЦЕНЗИЯ НА МОНОГРАФИЮ Ю.А. ТРОЦЕНКО, М.Л. ТОРГОНСКОЙ “МЕТИЛОТРОФНЫЕ ДРОЖЖИ”, МОСКВА: “ТР-ПРИНТ”, 2011. 313 с.

Вышла в свет книга Ю.А. Троценко и М.Л. Торгонской “Метилотрофные дрожжи”. В последние десятилетия эти “неконвенционные” дрожжи стали весьма популярным и распространенным эукариотическим объектом-хозяином для получения практически важных белков. Ежегодно публикуются многочисленные статьи и патенты, посвященные использованию дрожжей-метилотрофов для биосинтеза широкого спектра целевых рекомбинантных белков как для фундаментальных исследований, так и с целью получения коммерческих препаратов биофармацевтиков. Недавние успехи в создании “гуманизированных” штаммов *Pichia pastoris* и *Hansenula polymorpha* открыли новые возможности получения с помощью этих дрожжей многих белков человека с “правильными” пост-трансляционными модификациями. Соответственно, такие штаммы-суперпродуценты могут в обозримом будущем заменить дорогостоящие “биофабрики” на основе клеток млекопитающих. Авторы справедливо отмечают поистине революционный характер этих разработок. В книге подробно освещены различные аспекты структурно-функциональной организации и перспективы использования в биотехнологии этой уникальной группы дрожжей, использующих метанол в качестве источника углерода и энергии.

Метилотрофные дрожжи стали известны сравнительно недавно, тем не менее, история их изучения насчитывает уже почти полвека. Поэтому вполне логично, что первая глава “Экофизиология и филогения метилотрофных дрожжей” начинается историей открытия метилотрофных эукариот (раздел 1.1). Далее следуют разделы, описывающие особенности углеродного метаболизма метанола, пектина и метилированных аминов у дрожжей. Принципиально важно, что вторая глава посвящена полифункциональным органеллам метилотрофных дрожжей: биогенезу, пролиферации и деградации пероксисом, а также ключевой роли пероксисомных белков-пероксинов и антиоксидантных систем (разделы 2.1–2.3).

В главе 3 обстоятельно изложены молекулярные основы  $C_1$ -метаболизма метилотрофных дрожжей. Авторы делают особый акцент на свойства ферментов, участвующих в первичном окислении и ассимиляции углерода метанола. В главе 4 “Генетика и регуляция  $C_1$ -метаболизма метилотроф-

ных дрожжей” даны подробные сведения, характеризующие геном *H. polymorpha*, в частности, в сравнении с геномом хорошо изученных пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Отмечены различия в (Г + Ц) составе ДНК этих видов, а также в размере их геномов и числе генов тРНК, приводится функциональная классификация генов *H. polymorpha* и хромосомная локализация некоторых генов. В этой же главе подробно охарактеризована геномика *P. pastoris*, справедливо названной авторами “еще одной популярной системой гетерологичной экспрессии чужеродных белков”.

Глава 5 “Биотехнологический потенциал метилотрофных дрожжей” изобилует примерами используемых в экспериментальной работе генетических конструкций и получаемых на их основе продуктов, что представляет специальный интерес для биотехнологов.

В разделе 5.1 детально проанализированы возможности и ограничения экспрессионных платформ *P. pastoris*, *H. polymorpha*, *P. metanolica* и *C. boidinii*. Удачно расположен раздел 5.2 “Продукты и процессы на основе метилотрофных дрожжей”. Приводятся примеры биоконверсии метанола в кормовой и пищевой белок, этанол, формальдегид, диоксиацетон, глицерин, органические кислоты (формиат, лактат, пируват и цитрат) с использованием интактных и пермеабилizованных клеток метилотрофных дрожжей и других биоактивных соединений (ФАД, глутатион, АТФ, пенициллин и др.), ферментов (алкогольоксидаз, формальдегид- и формиатдегидрогеназ) в том числе термостабильных. Рассмотрены возможности оптимизации стратегий ферментации, а также способы повышения эффективности продукции гетерологичных белков за счет изменения их фолдинга в экспрессионных системах метилотрофных дрожжей. В этом контексте весьма полезны подробные таблицы, в которых суммированы примеры продукции рекомбинантных белков промышленного значения и биофармацевтиков экспрессионными системами метилотрофных дрожжей.

Завершает книгу раздел 5.3, в котором описано еще одно перспективное направление применения клеток и ферментов метилотрофных дрожжей в биоаналитике. В частности, приведены примеры их использования в технологии ферментного анализа концентрации спиртов и фор-

мальдегида, а также в технологиях биосенсоров. Рассмотрены работы, в которых продемонстрировано, что метилотрофные дрожжи важны не только для мониторинга и контроля уровня загрязнения (например, метанолом и формальдегидом) окружающей среды, но и эффективны для удаления этих токсичных компонентов из воды, почвы и воздуха, т.е. биоремедиации.

В книге процитировано более 900 литературных источников, охватывающих основной массив информации, полученной за время исследования метилотрофных дрожжей, с акцентом на работы последних десятилетий. Таким образом,

поставленная авторами основная задача — проанализировать и обобщить современное состояние исследований по биологии и биотехнологии метилотрофных дрожжей, успешно выполнена. Можно с уверенностью утверждать, что эта профессионально написанная и хорошо оформленная монография займет достойное место в отечественной специализированной литературе в качестве источника актуальной научной информации для широкого круга микробиологов и биотехнологов.

*Т.С. Калебина, М.А. Эльдаров*



## Национальная Академия Микологии ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

### ТРЕТИЙ СЪЕЗД МИКОЛОГОВ РОССИИ

Москва, 10–12 октября 2012 г.

Это крупное международное научно-практическое мероприятие, созываемое Национальной академией микологии один раз в 5 лет.

#### Основные программные вопросы Съезда:

- Систематика и эволюция грибов
- Морфология и онтогенез грибов
- Физиология и биохимия грибов
- Биология дрожжей
- Экология грибов
- Грибы экстремальных местообитаний
- Коллекции и гербарии грибов
- Флора и охрана грибов
- Грибы и экология человека
- Симбиоз грибов с растениями
- Лихенизированные и лихенофильные грибы
- Фитопатогенные грибы
- Грибные биотехнологии
- Культивирование макромицетов
- Лекарства из грибов
- Микотоксикозы
- Фунгициды и биопестициды
- Ветеринарная микология
- Грибковые инфекции человека
- Грибы — агенты биоповреждений

В рамках 3 Съезда запланированы пленарные и секционные заседания, симпозиумы, круглые столы и мастер-классы, школы для молодых специалистов, заседания проблемных комиссий, мемориальный Вавиловский симпозиум, будет работать специализированная выставка. Планируется обсудить вопросы развития и поддержки отечественных исследований, публикаций и преподавания микологии на 2013–2016 гг.

Тезисы и заявки на доклады принимаются до 15 июня 2012 г. на адрес [2012@mycology.ru](mailto:2012@mycology.ru). Электронная регистрация участников бесплатная на сайте Съезда по адресу: <http://www.mycology.ru/congress>).

**Оргкомитет Съезда: 123104 Москва, Малая Бронная ул., д. 20, стр. 1**

Телефон: 8 499 685 1167 E-mail: [2012@mycology.ru](mailto:2012@mycology.ru) Интернет: <http://www.mycology.ru/congress>