

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	ПОЛУЧЕНИЕ БИОГАЗА ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ (ОБЗОР) Цавкелова Е.А., Нетрусов А.И.	469	5
<input type="checkbox"/>	КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НИТРИЛГИДРАТАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА АКТИВИРОВАННОМ ХИТОЗАНЕ Максимова Ю.Г., Рогожникова Т.А., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю., Демаков В.А.	484	3
<input type="checkbox"/>	PRODUCTION OF CELLULASE BY IMMOBILIZED WHOLE CELLS OF HALOARCUA Ogan A., Danis O., Gozuacik A., Cakmar E., Birbir M.	490	0
<input type="checkbox"/>	FRUCTOSE 6-PHOSPHATE PHOSPHOKETOLASE ACTIVITY IN WILD-TYPE STRAINS OF LACTOBACILLUS, ISOLATED FROM THE INTESTINAL TRACT OF PIGS Bolado-Martínez E., Acedo-Félix E., Peregrino-Uriarte A.B., Yepíz-Plascencia G.	494	0
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА АДГЕЗИВНУЮ АКТИВНОСТЬ РОДОКОККОВ В ОТНОШЕНИИ Н-ГЕКСАДЕКАНА Рубцова Е.В., Куюкина М.С., Ившина И.Б.	501	7
<input type="checkbox"/>	DEGRADATION OF NICOSULFURON BY BACILLUS SUBTILIS YB1 AND ASPERGILLUS NIGER YF1 Lu X.H., Kang Z.H., Tao B., Wang Y.N., Dong J.G., Zhang J.L.	510	0
<input type="checkbox"/>	ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМНОГО ФРАГМЕНТА, УЧАСТВУЮЩЕГО В АЭРОБНОЙ ДЕГРАДАЦИИ ДИХЛОРМЕТАНА METHYLOBACTERIUM DICHLOROMETHANICUM ДМ4 Фирсова Ю.Е., Фёдоров Д.Н., Троценко Ю.А.	516	0
<input type="checkbox"/>	CLONING AND BIOINFORMATIC ANALYSIS OF AN ACIDOPHILIC β-MANNANASE GENE, ANMAN5A, FROM ASPERGILLUS NIGER LW-1 Zhao S.G., Wu M.C., Tang C.D., Gao S.J., Zhang H.M., Li J.F.	522	0
<input type="checkbox"/>	PRODUCTION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) DEPOLYMERASE FROM ASPERGILLUS SP. NA-25 Nadman A., Hasan F., Shah Z., Hameed A., Shah A.A.	531	0
<input type="checkbox"/>	МИКРОМИЦЕТЫ ASPERGILLUS OCHRACEUS ПРОДУЦЕНТЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ АКТИВАТОРОВ ПРОТЕИНА С ПЛАЗМЫ КРОВИ Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С.	537	8
<input type="checkbox"/>	СОЗДАНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПЕКТИНАЗ И ЦЕЛЛЮЛАЗ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА Бушина Е.В., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Сатрудинов А.Д., Беккаревич А.О., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Синецын А.П.	543	7
<input type="checkbox"/>	ИНДУКЦИЯ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ КОЛЕОПТИЛЕЙ ПШЕНИЦЫ САЛИЦИЛОВОЙ И ЯНТАРНОЙ КИСЛОТАМИ: СВЯЗЬ ЭФФЕКТОВ С ОБРАЗОВАНИЕМ И ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Швиденко Н.В., Карпец Ю.В.	550	5
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ АДСОРБЦИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ НА АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ Тараканова Ю.Н., Дмитриев Д.А., Массино Ю.С., Смирнова М.Б., Сегал О.Л., Фартушная О.В., Яковлева Д.А., Коляскина Г.И., Лавров В.Ф., Дмитриев А.Д.	557	1
<input type="checkbox"/>	СРАВНЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИОНОЛА, КОМПОНЕНТОВ СВЕЖЕГО ИМБИРЯ И ЕГО ЭКСТРАКТОВ Алинкина Е.С., Мишарина Т.А., Фаткуллина Л.Д., Бурлакова Е.Б.	564	1
<input type="checkbox"/>	ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЦЕПТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ БИОСЕНСОРОВ ПРИ ДВУХ СПОСОБАХ ИММОБИЛИЗАЦИИ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ Зайцев М.Г., Арляпов В.А., Алфёров В.А., Решетиллов А.Н.	570	2

УДК 573.6:579.222:579.262:579.63 579.85

ПОЛУЧЕНИЕ БИОГАЗА ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ (ОБЗОР)

© 2012 г. Е. А. Цавкелова, А. И. Нетрусов

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

Поступила в редакцию 20.12.2011 г.

Анаэробная микробная трансформация органических субстратов, приводящая к получению различных видов биотоплива, в настоящее время занимает одно из ведущих мест среди исследований, посвященных поиску и использованию альтернативных источников энергии. Получение биогаза имеет ряд преимуществ перед другими технологиями, так как метаногенные сообщества способны потреблять различные виды органических субстратов, а сам процесс трансформации приводит к утилизации отходов, сокращению эмиссии парниковых газов и получению высококачественных удобрений. Целлюлозосодержащие материалы являются одними из наиболее перспективных субстратов, однако для их полноценного использования существует ряд нерешенных вопросов, касающихся полноты их утилизации, улучшения качества и объема продукции биогаза, а также сохранения стабильности и повышения функциональной активности микробных сообществ. В обзоре представлена информация о микроорганизмах, входящих в состав целлюлозоразрушающих метаногенных сообществ, ферментных комплексах, необходимых анаэробам для гидролиза волокон целлюлозы, о способах предобработки сырья, доступность для биоразложения которого значительно снижается в присутствии лигнина. На примерах образования биогаза из различного типа растительной и бумажной продукции (офисная бумага, картон) рассмотрены способы повышения продуктивности используемых микроорганизмов при оптимизации условий их культивирования.

Сокращение запасов традиционных видов топлива (нефть, каменный уголь, природный газ, горючие сланцы и древесина), способы их добычи, транспортировки и использования, приводящие к глобальным нарушениям в экосистеме и неуклонно ухудшающейся экологии, определили современные тенденции в разработке биотехнологических процессов получения и использования альтернативных возобновляемых источников энергии [1–6]. При этом возобновляемая энергия в настоящее время уже составляет около 14% от потребляемой в мире [7]. Помимо таких природных ресурсов, как солнечный свет, ветер, дождь, приливы-отливы и геотрёмальные источники, значительную роль среди альтернативных источников энергии может играть биоэнергетика, что подразумевает использование топлива, полученного на основе микробиологической трансформации ряда органических субстратов биологического происхождения: специально выращиваемые растения, продукция и отходы лесопользования и лесопереработки, отходы сельского хозяйства и животноводства, различных виды органических бытовых и промышленных отходов [3, 6–10, 11]. Преимущество технологий, основанных на природных процессах и механизмах конверсии органических веществ с помощью ферментов или микробных культур, заключается в том, что отходы и побочные продукты процессов также могут

служить дополнительными источниками сырья, что позволяет создать полностью безотходные технологии [3]. Одним из самых энергетически эффективных способов производства биотоплива является получение биогаза (биометан) посредством анаэробной микробной переработки органических субстратов различного происхождения. Биогаз состоит, в основном, из метана (55–75% CH₄) и двуокиси углерода (25–45% CO₂) со следовыми количествами азота, водорода, сероводорода, кислорода. Кроме того, в зависимости от используемого сырья, среди продуктов обнаруживается незначительное количество аммиака, алканов, ароматических и галогено-ароматических углеводородов, окисленных соединений, например диоксида серы [12–18]. Биогаз относится к экологически чистым видам топлива, хотя его сжигание с загрязняющими примесями может сопровождаться токсичными выбросами. В природе метанотрофные микроорганизмы – представители родов *Methylosinus*, *Methylocystis*, а также неметанотрофные *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Janthinobacterium* и *Rubrivivax*, зачастую развивающиеся совместно с метаногенами, способны к соокислению бензола, толуола, ксилола и нафталина без накопления токсичных продуктов [19]. Было показано, что разложение толуола может осуществляться метаногенным сообществом, в котором доминировали *Methanosaeta*, *Methano-*

spirillum, *Desulfotomaculum* и неизвестные ранее бактериальные штаммы [20].

Биогаз с содержанием метана не менее 60% чаще всего сжигают, а образующееся тепло используют для обогрева помещений и различных технологических целей, однако для получения чистого топлива, идентичного по составу природному газу, необходима его дополнительная очистка. При разделении исходной газовой смеси на специализированных газоочистительных установках и мембранных модулях концентрация метана повышается до 95% и выше, в результате чего биометан может быть использован для получения электроэнергии, а также в двигателях внутреннего сгорания [17, 21, 22]. В зависимости от содержания метана теплотворная способность биогаза составляет 4700–6000 ккал/м³ [23, 24]. Биогаз имеет ряд преимуществ перед другими видами альтернативного топлива. Биометан образует значительно меньше вредных выхлопов, чем бензин или дизель [17]. Энергия, заключенная в метане примерно в 3 раза больше, чем у водородного топлива, а условия хранения и транспортировки метана также более эффективны [25]. Кроме того, при образовании биогаза из биомассы нет необходимости в специальном выращивании сельскохозяйственных растений, как это делается при получении биодизеля и биоэтанола [22].

В основном, биогаз получают при разложении органических отходов животноводства (преимущественно навоз крупного рогатого скота, **КРС**), пищевой и сельскохозяйственной промышленности, очистке сточных вод, когда на конечном этапе происходит образование биогаза в метантенках. Несмотря на то что анаэробная очистка сточных вод издавна и широко используется, применение этой технологии в промышленных масштабах при обработке твердых органических отходов без их захоронения на свалках менее успешно [17]. В ряде стран значительное количество биогаза получают при переработке так называемых “энергетических” растений, выращиваемых исключительно с целью дальнейшей переработки в биотопливо [7, 26].

Получение биогаза из органического сырья на сегодняшний день широко востребовано во всем мире. Помимо производства высокоэффективной энергии и уменьшения загрязнения атмосферы парниковыми газами, оставшаяся после процесса анаэробного разложения масса представляет собой высококачественное биоудобрение, содержащее азотные и фосфорные соединения; кроме того, при высоких температурах уничтожаются патогенные микроорганизмы (например, *E. coli*, *Salmonella* spp.) и паразиты (яйца гельминтов) [17, 27–30]. Примечательно, что ферментеры для получения биогаза можно использовать не только в промышленных масштабах (метантен-

ки), где условиями их функционирования являются высокая скорость и объемы полученного биометана, а также низкая себестоимость процесса, но и локально для энергообеспечения животноводческих и аграрных комплексов, жилых домов. Например, к концу 2008 г. только в одной Германии функционировало около 4000 сельскохозяйственных установок по получению биогаза [6].

Однако, несмотря на то что реализация метановой энергетики приобретает все больший интерес и важность, потенциал таких производств не используется достаточно широко [31]. Для полноценного и повсеместного применения технологий производства биогаза остаются нерешенными многие вопросы, касающиеся полноты утилизации субстратов, повышения качества и объема продукции биогаза, очистки биогаза от примесей, а также сохранения стабильности и функциональной активности микробных сообществ [17, 32]. Использование имеющихся на настоящий момент инженерных конструкций промышленного масштаба распространяется на крайне небольшой набор субстратов, а по мнению некоторых исследователей [31, 32] технологическая сторона получения биогаза в современном виде вообще представлена чисто эмпирически. В редких случаях эффективность процесса соответствует его оптимальным значениям. Кроме того, не существует математических моделей, способных описать все процессы и учесть все факторы, происходящие при микробной трансформации органического вещества в биогаз.

МЕТАНОГЕННЫЕ СООБЩЕСТВА

Основной особенностью анаэробного разложения органических субстратов, в том числе и целлюлозы, является сложная структура участвующих в таких превращениях микробных сообществ, составляющих своеобразную “пищевую цепь” [25]. Микробные популяции, преобразующие целлюлозу в биогаз, таксономически разнообразны, но различаются, например, в психрофильных, мезофильных и термофильных условиях, осуществляя сходные типовые реакции [33–35]. Состав и стабильность микробного сообщества, следовательно, и эффективность всего процесса образования биогаза, зависят от состава питательной среды, условий культивирования (температура, pH), состава и структуры органического субстрата, скорости загрузки органического вещества в ферментер, времени удержания твердого вещества и ряда других факторов [36–39].

Микробное сообщество может включать в себя до 60 различных видов бактерий и архей, развивающихся в анаэробных условиях [40]. Взаимодействие этих микроорганизмов обусловлено их тро-

фической взаимосвязью, обменом факторами роста, воздействием физиологически активных веществ [41, 42]. Тесные взаимоотношения внутри микробного сообщества базируются, прежде всего, на пищевых потребностях, складывающихся внутри цепи, когда продукты одних процессов становятся субстратами для других без значительного накопления промежуточных соединений. Метанообразующие микроорганизмы (метаногены) — это строгие анаэробы, представляющие доминирующую группу архей (Archaea) из филума Euryarchaeota, включенных в пять порядков Methanobacteriales, Methanococcales, Methanosarcinales, Methanomicrobiales и Methanopyrales [43–46]. Эта классификация принята на основе анализа си-квенсов генов 16S рРНК и большого числа морфологических и физиолого-биохимических свойств. Однако также используются и альтернативные классификации и номенклатуры (сужение до 2–3 классов/групп), основанные на различного рода филогенетических исследованиях [46–48]. Метаногены чрезвычайно разнообразны, что обусловлено различием их морфологии (от простых палочек, кокков и сарцин до спиральных форм и нерегулярных коккоидов), структурой клеточных стенок, их метаболическими и физиологическими свойствами [49]. В качестве источников углерода многие из них могут использовать такие одноуглеродные соединения, как метанол, формиат и метилированные амины. Метанол, например, играет важную роль в качестве субстрата метаногенеза, когда он образуется при гидролизе пектина, широко представленного в целлюлозосодержащих субстратах [50, 51]. При этом последние исследования выявляют все больше количество ранее неидентифицированных штаммов и филогенетических групп метаногенов [46].

Метаногены повсеместно распространены и занимают различные анаэробные экониши: морские и пресноводные донные осадки, затопляемые почвы, желудочно-кишечный тракт человека и животных, геотермальные системы, а также разного рода свалки органических отходов и анаэробные системы с использованием ферментеров [46]. Одной из особенностей этих микроорганизмов является присутствие необходимых для метаногенеза уникальных ферментных комплексов и необычных коферментов. Метаногенез является заключительной стадией при разложении органического вещества в анаэробных условиях, которой предшествуют другие метаболические процессы, такие, как, например, гидролиз органического сырья, сбраживание сахаров и аминокислот, анаэробное окисление и образование уксусной кислоты — ацетогенез [42, 52]. По некоторым данным, в глобальном цикле углерода благодаря микроорганизмам образуется около 1 млрд т метана/г [53]. Причем метан, образующийся в биосфере, происходит из двух источни-

ков: две трети поступает при ацетокластическом метаногенезе (восстановление метильной группы ацетата) и одна треть — при восстановлении CO_2 ; в качестве доноров для его восстановления выступают водород или формиат [25]. Меньшее, но не менее значимое количество метана образуется при восстановлении метильной группы метанола, метиламинов и диметилсульфида. Необходимо учитывать, что метан является парниковым газом и поглощает тепловые лучи примерно в 25 раз активнее, чем CO_2 [17, 45, 54].

Деградация органических веществ осуществляется как многоступенчатый процесс, в котором необходимо участие, по меньшей мере, трех-четырёх групп микроорганизмов (рис. 1): первичные анаэробы (гидролитики и диссипотрофы), синтрофы, ацетогены и метаногены [11, 25]. Изначально первичные анаэробы-бройльщики используют легкодоступные углеводы и белки, поступающие с отмершими частями растений и животных. Гидролитики, начинающие разложение биомассы, представлены группами бактерий, специализирующимися на различных типах полимеров (полисахариды, белки, липиды, нуклеиновые кислоты и др.). Среди анаэробных микроорганизмов, гидролизующих, например, целлюлозу, часто в микробных сообществах встречаются бактерии рода *Clostridium*, а также виды следующих родов: *Acetivibrio*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, *Fibrobacter*, *Cellobacterium* [55–59]. Крахмал подвергается биодеградации благодаря участию, в частности, *Ruminobacter*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Clostridium*, *Succinimonas*, *Butirivibrio*, *Streptococcus*, *Thermoanaerobacterium* [60–64], ксилан и пектин — *Bacteroides*, *Butirivibrio*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Lachnospira* [65–68], а белки и аминокислоты — *Bacteroides*, *Clostridium*, *Acidaminococcus*, *Peptostreptococcus*, *Selenomonas*, *Syntrophomonas*, *Fusobacterium* и др. [69–74]. Это далеко не полный список микроорганизмов, разлагающих полимерные соединения, а представители одного и того же рода зачастую способны к расщеплению различных по своей природе высокомолекулярных веществ.

Образовавшиеся после биодеградации полимеры олиго- и мономеры (сахара, аминокислоты, пурины, пиримидины, жирные кислоты, глицерол) затем разлагаются первичными анаэробами (гидролитики и диссипотрофы) с образованием органических спиртов (метанол, этанол, пропанол, бутанол), ароматических соединений, органических кислот (ацетат, пропионат, бутират, сукцинат, лактат, пируват), а также водорода, углекислого газа и других одноуглеродных соединений [42, 52]. При разложении целлюлозы после действия гидролитиков и бройльщиков среди основных продуктов также обнаруживают-

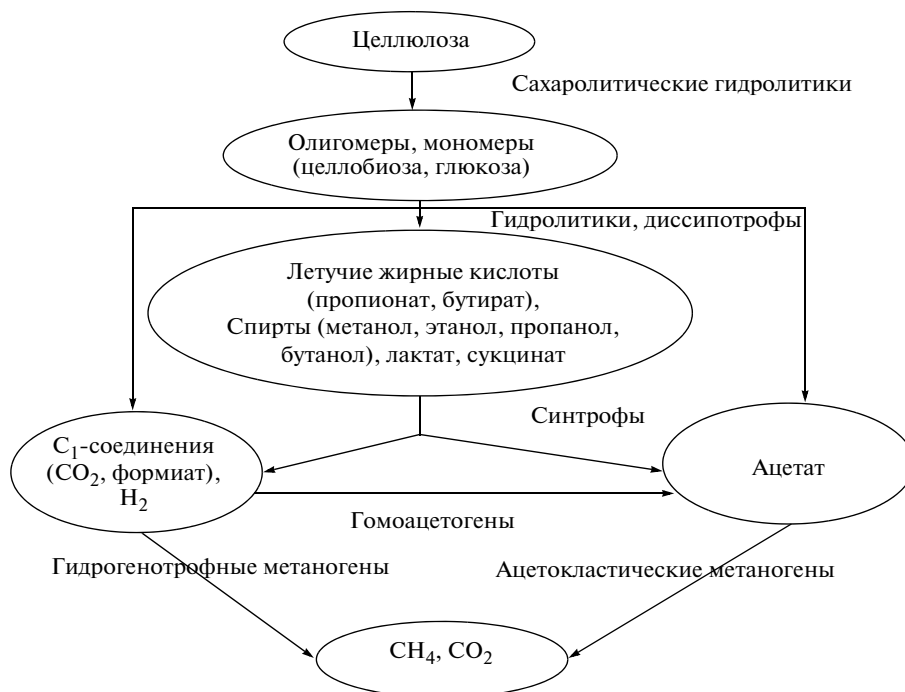


Рис. 1. Разложение целлюлозы с образованием метана в анаэробном микробном сообществе (с изменениями по [52, 154]). В условиях высокой температуры, низких концентраций ацетата и высоких концентраций ЛЖК и аммония, ацетокластический метаногенез неактивен; происходит окисление ацетата с образованием C1-соединений и водорода, которые преобразуются в метан с помощью гидрогенотрофных метаногенов [52, 150].

ся летучие жирные кислоты (ЛЖК), спирты, водород и углекислый газ.

Метаногенное сообщество – это типичный пример синтрофных взаимодействий, когда для нормального и стабильного функционирования анаэробной пищевой цепи необходим межвидовой перенос водорода от одного микроорганизма к другому [11]. Подробно синтрофные отношения в метаногенном сообществе описаны в обзорах Шинка [52] и Зибера с соавт. [75]. Синтрофию определяют, как вид симбиотической кооперации между двумя разными по метаболизму типами бактерий, которые нуждаются друг в друге для разложения определенного субстрата и, более того, такую взаимную зависимость невозможно преодолеть простым добавлением ко-субстрата или иным другим питательным соединением [52, 75].

Вторичные анаэробы (синтрофы) осуществляют окислительно-восстановительные реакции с участием внешних неорганических акцепторов электронов и также превращают спирты, пропионат и другие короткоцепочечные ЛЖК, некоторые аминокислоты и ароматические соединения в ацетат, CO_2 и H_2 , из которых, в свою очередь, в результате ацетокластического или гидрогенотрофного метаногенеза формируется метан [75]. Отличительной чертой синтрофов является их возможность осуществлять метаболические реакции при изменениях свободной энергии, очень

близких к минимальному приросту энергии, необходимой для синтеза АТФ, а также обязательность осуществления обратного транспорта электронов. При этом синтрофные микроорганизмы, такие, например, как *Syntrophomonas* и *Syntrophobacter*, могут развиваться только при условии удаления молекулярного водорода из среды гидрогенотрофными метаногенами, ацетогенами, а также сульфат- и сероредукторами. Однако гидрогенотрофные метаногены – единственные участники системы, способные эффективно удалять водород для восстановления CO_2 в метан. Синтрофный метаболизм, основанный на переносе водорода, показан, в частности, для *Syntrophotulus glycolicus* и *Syntrophococcus sucromutans* [75]. В метаногенном сообществе, помимо водорода, внешним переносчиком электрона также выступает формиат [43, 76]. Например, синтрофное потребление пропианата *Syntrophobacter fumaroxidans* и бутирата *Syntrophomonas bryantii* происходило только при участии метаногена, который одинаково использовал и водород, и формиат, но не с метаногеном, который потреблял исключительно водород [75]. Недавно была показана возможность прямого электронного переноса между партнерами с помощью электропроводящих пилей или нанопроводов [75, 77].

Среди синтрофных микроорганизмов известны такие, как *Thermacetogenium phaeum*, которые

образуют ацетат при росте в чистой культуре и начинают окислять его при совместном росте с метаногенами [78]. Другими соединениями, подвергающимися деградации в процессе синтрофных взаимодействий, являются пропионат, бутират и бензоат, а среди синтрофов в этом отношении известны представители родов *Syntrophobacter*, *Desulfotomaculum*, *Pelotomaculum* и *Smithella* (метаболизм пропионата), *Syntrophomonas*, *Thermosyntrophia* и *Syntrophothermus* (метаболизм бутирата), *Syntrophus*, *Sporotomaculum*, *Pelotomaculum*, а также *Thauera* (метаболизм бензоата) [75]. В любом случае внеклеточный перенос электронов в анаэробном микробном сообществе необходим для полного разложения органического вещества. Метаногены и синтрофы являются ключевыми игроками, поскольку поддерживают концентрации водорода, формиата и (или) ацетата на термодинамически выгодном для бродильщиков и ацетогенов уровне, что и позволяет сообществу микроорганизмов целиком перерабатывать исходный субстрат [25].

Микробное сообщество потребляет крайне широкий круг органических субстратов: поли- и моносахариды, белки, аминокислоты, органические кислоты и спирты, ароматические соединения и другие вещества [12, 79]. По данным З. Дэвиса [80], из одной молекулы глюкозы, например, получается следующее количество конечных продуктов:

$$1.0 \text{ г } C_6H_{12}O_6 \rightarrow 0.25 \text{ г } CH_4 + 0.69 \text{ г } CO_2 + 0.06 \text{ г клеточной массы} + 632 \text{ кДж энергии,}$$

или из 1 моля глюкозы можно получить 2.8 моля CH_4 и 2.6 моля CO_2 .

В свою очередь, метаногены являются “узкими специалистами”, так как могут использовать лишь ограниченный набор субстратов, образующихся за счет активности других членов микробного сообщества. Так, основными субстратами метаногенеза являются углекислый газ и водород (гидрогенотрофный метаногенез), ацетат (ацетокластический метаногенез), формиат, метанол и метиламины. Наиболее энергетически выгодным процессом является реакция образования метана и воды:

$$4H_2 + CO_2 \text{ с выходом свободной энергии } -135.6 \text{ кДж/моль [81, 82].}$$

Гомоацетогенные бактерии, в случае если метаногенез подавлен, синтезируют из водорода и углекислого газа ацетат, который, в свою очередь, также затем может быть использован ацетокластическими метаногенами для образования метана [52]. Представители родов *Methanosarcina* и *Methanosaeta* (*Methanothrix*) способны активно потреблять ацетат [83]. Род *Methanosarcina* включает в себя виды, способные также расти на H_2/CO_2 , метаноле, метиламинах и ацетате, в то

время как представители *Methanosaeta* могут использовать лишь ацетат в качестве источника энергии. Известно, что при высоких концентрациях ацетата в сообществе преобладают представители *Methanosarcina* [84]. Так, *M. barkeri* играет главную роль в быстром увеличении содержания метана, потребляя накопленный ацетат, а *Methanosaeta* доминирует в случае длительного периода сброса, когда уровень ацетата становится ниже 100 мг/л.

Изменения в значениях pH могут быть критическими для функционирования метаногенного сообщества. Оптимальными для развития метаногенов являются нейтральные pH, а pH ниже 5.0 подавляют их активность. В то же время Ким с соавт. [85] показали, что при культивировании мезофильного метаногенного сообщества в полупрерывном режиме ферментера с глюкозой в качестве субстрата и временем гидравлического удержания в течение 9 сут низкий pH (4.5) не оказывал ингибирующего влияния на процесс гидрогенотрофного метаногенеза. Однако другие авторы [86] считают, что внутри ферментера существуют ниши с нейтральным pH – своеобразные центры инициирования метаногенеза. Наличие различий в значениях pH, влажности и концентрации ЛЖК способствуют проявлению микробной активности при низких pH. При отсутствии таких ниш начало метаногенеза может быть связано с проявлением активности толерантной к низким pH *M. barkeri*. Как только pH достигает нейтральных значений, активность метаногенеза сообщества увеличивается в несколько раз.

ВОЗОБНОВЛЯЕМЫЕ СУБСТРАТЫ МЕТАНОГЕНЕЗА

Для получения биогаза могут быть использованы различные виды органических субстратов, однако основным сырьем для его производства на промышленно-коммерческих предприятиях остаются навоз сельскохозяйственных животных и помет птиц, а также органическая часть бытовых и промышленных отходов в виде сточных вод [11, 17]. Проводятся исследования по получению биогаза из таких труднообрабатываемых субстратов, как торф и уголь [25, 87]. Показано, что намного выгоднее как с экономической, так и с экологической точек зрения сбрасывать не “чистые” отходы, а дополнять их ко-субстратами, например, из “энергетических” растений, к которым относят специально выращиваемые травянистые культуры (сахарный тростник, кукуруза, просо, подсолнечник, мискантус, рапс и некоторые другие), а также древесный подрост [7, 26, 32]. Растительные отходы, получаемые при лесопереработке, ведении сельского хозяйства и животноводства также могут значительно повысить выход

биогаза, кроме того, они не требуют затрат на их выращивание, сбор и обработку, как в случае с “энергетическими” растениями [7]. Так, по данным Василова [88], выход биогаза при использовании травы, картофельной ботвы, кукурузных стеблей, шелухи подсолнечника и пшеничной соломы составляет 630, 420, 420, 300, 340 л CH_4 /кг соответственно, в то время как при сбраживании, например, только навоза КРС образуется 250 л/кг. По другим данным [26], выход биогаза при использовании различных субстратов составляет при сбраживании навоза КРС, свиней и содержащего загонов для животных – 25, 30 и 60 л биогаза/кг влажной биомассы соответственно, в то время как при сбраживании свекловичных листьев, кормовой свеклы, суданской травы (*Sorghum vulgare*), травяного и кукурузного силосов и остатков зерна образуется 60, 90, 130, 160, 230 и 550 л биогаза/кг влажной биомассы соответственно. В Германии кукурузный и травяной силос наиболее часто используют в качестве ко-субстратов в ферментерах [26].

Биомассу фототрофных микроорганизмов также рассматривают, как перспективный субстрат для получения биогаза, так как они характеризуются высокими скоростями роста, лучшим по сравнению с наземными растениями усвоением солнечной энергии, большим содержанием запасных веществ и включений, которые повышают их энергетический потенциал [89]. Кроме того, их культивирование относительно недорого. Среди наиболее изученных в этом плане микроорганизмов – представители цианобактерий и микроводорослей [21, 90, 91]. Так, при анаэробном разложении фототрофной биомассы было получено 500, 450, 300 и 350 мл биогаза/г биомассы *Spirulina platensis*, *Anabaena variabilis*, *Chlorella* sp. [21] и *Spirulina maxima* [90] соответственно. Продуктивность разложения биомассы водорослей сравнима с предыдущими показателями и составляет 500 мл/г [91].

Основным полисахаридным компонентом высших растений является целлюлоза, содержание которой может составлять около 35–50% от сухой массы растительных волокон [57, 92]. Вторым по содержанию растительным полисахаридом является гемицеллюлоза, которая составляет 25–35% от лигноцеллюлозной биомассы и представлена, в основном, замещенными ксиланами (преобладают в твердой древесине), глюканами, маннанами, арабинанами или галактанами (содержание глюкоманнанов повышено в мягкой древесине) [92–94]. В состав клеточной стенки растений входят также и другие биополимеры – пектины (полисахариды, содержащие, в основном, остатки галактоуроносовой кислоты), полифенолы (лигнины, составляющие от 5 до 30% от сухой массы растений, а также танины) и, в

меньшей степени, структурные белки, крахмал [57]. Считается, что в настоящее время используется лишь 2% биомассы клеточных стенок растений [94]. При высоком содержании лигнина (древесина, солома, отруби) любая обработка растительного сырья становится затруднительной и зачастую необходимо проводить предварительный гидролиз сырья [95].

АНАЭРОБНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Способностью к анаэробному разложению целлюлозы обладают различные физиологические группы микроорганизмов. Наиболее полные сведения об этом представлены в обзорах [57, 93, 97]. Поскольку волокна целлюлозы плотно связаны с другими полимерами, такими, как гемицеллюлоза и лигнин – это делает целлюлозосодержащие материалы крайне устойчивыми к разрушению. Гидролиз целлюлозы бактериями обычно осуществляется медленно, однако микробный консорциум рубца жвачных способен гидролизовать 60–65% целлюлозы за 48 ч [96]. Способность к разложению целлюлозы обнаружена у аэробов – представителей родов *Acidothermus*, *Bacillus*, *Caldibacillus*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Cytophaga*, *Dyella*, *Erwinia*, *Microbacterium*, *Micromonospora*, *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Sporocytophaga*, *Rhodothermus*, *Streptomyces*, *Thermobifida* [57, 92, 98–104]. Среди анаэробных микроорганизмов целлюлозолитики обнаружены у представителей родов *Acetivibrio*, *Anaerocellum*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Caldicellulosiruptor*, *Clostridium*, *Desulfurococcus*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Fibrobacter*, *Halocella*, *Ruminococcus*, *Spirochaeta*, *Thermotoga* [33, 55, 56, 57–59, 92, 96, 101, 105, 106]. Важной особенностью анаэробных целлюлозолитиков является их способность к адгезии на субстрате (рис. 2), что осуществляется за счет бактериального внеклеточного матрикса, который не только позволяет микроорганизмам прикрепляться к гидролизному субстрату, но и выполняет структурообразующую роль и предоставляет защиту для микробных клеток от разного рода физико-химических факторов [57, 107–109].

Анаэробные термофильные целлюлозолитические микроорганизмы большей частью высоко специализированы и часто не способны расти на моно-, олиго- и полисахаридах, содержащих в своем составе отличные от глюкозы звенья. Они достаточно быстро гидролизуют такие целлюлозосодержащие материалы, как фильтровальная бумага, вата, волокна хлопка и льна, льняные и хлопчатобумажные ткани, картон [57, 92]. В отличие от аэробов, которые разрушают целлюлозу с помощью внеклеточного комплекса ферментов, анаэробные бактерии гидролизуют ее с участием мультиферментных целлюлазных систем – цел-

люлосом [96, 110, 111]. *C. thermocellum* наравне с заякоренными на клеточной поверхности целлюлосомы выделяет и внеклеточные целлюлазы, тогда как многие анаэробы имеют только комплексы целлюлосом и не образуют какого-либо значительного количества растворимых целлюлаз [57]. Целлюлосомы представителей родов *Clostridium* и *Ruminococcus* изучены достаточно подробно. У *C. thermocellum* гидролиз целлюлозы происходит с помощью специальных органелл – полицеллюлосом, молекулярная масса которых достигает 100 МДа [57, 96]. Строение, разнообразие и механизм действия этих целлюлосом рассмотрены в обзорах В. Шварца [96], Л. Линда [57] и Е. Байера [112].

Целлюлосомы *C. thermocellum* представляют стабильный внеклеточный ферментный комплекс с молекулярной массой около 3 МДа, жестко связанный с бактериальной клеточной стенкой. Этот комплекс состоит из некаталитического полипептида, получившего название интегрирующего целлюлосому белка А (CipA) – скаффолдина и от 15 до 25 различных гидролитических ферментов – белков-модулей [57, 96, 113, 114]. В состав мультифункциональных целлюлазных комплексов кластридий, помимо целлюлаз, эндо- и экзоглюканазы могут входить также манназазы, ксиланазы, хитиназы и лихеназы. Благодаря целлюлосомам (рис. 3) расстояние между субстратом и клеткой становится минимальным, что значительно сокращает потери продуктов гидролиза целлюлозы. Целлюлосомы представляют собой сложные белки с каталитическими центрами и субстратсвязывающими доменами [96]. Все составляющие комплекс ферменты также имеют модули, называемые докеринными (докерины I), которые специфически связываются с комплементарными им когезиновыми модулями (когезины I) скаффолдина [96, 113]. Подобные когезин-докериновые взаимодействия формируют структуру целлюлосомы и удерживают вместе весь комплекс [57, 112, 114]. Среди других модулей, входящих в состав целлюлосомы, обнаружены углеводсвязывающие (целлюлозосвязывающие) модули (УСМ), иммуноглобулинподобные модули, модули типа фибронектин III-связывающих доменов, обозначаемые, как X-модули [96, 114]. Прикрепление целлюлосомы к кристаллической структуре субстрата, главным образом, обусловлено взаимодействием УСМ семейства III скаффолдина [96]. При этом субъединица скаффолдина содержит один УСМ, но с большим количеством когезиновых модулей [112].

Скаффолдин *C. thermocellum* (197 кДа) состоит из 9 когезиновых доменов типа I. К настоящему моменту у этого микроорганизма идентифицировано более 20 генов, ответственных за биосинтез компонентов целлюлосомы: среди них 4 кодируют экзоглюканазы (целлюбиогидролазы), 9 – эн-

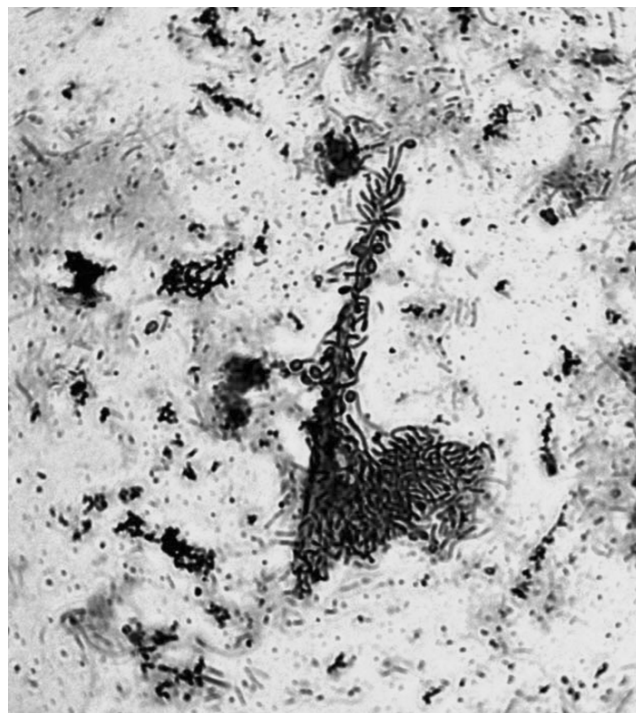


Рис. 2. Фрагмент анаэробного мезофильного сообщества микроорганизмов, разлагающих целлюлозу с образованием метана. Микробные клетки, в том числе с терминальными спорами, объединяются (адгезия) вокруг волокна целлюлозы [146]. Световая микроскопия, увеличение X900.

доглюканазы, 5 – ксиланазы, гидролизующие гемицеллюлозу, по одному – хитиназу, маннаназу и лихеназу (β -1,3–1,4-эндоглюканазу) [57, 96]. Кроме того, скаффолдины несут УСМ семейства III, X-домены и модифицированные докерины II типа. Комплементарные им когезины типа II содержатся в белках предположительно принадлежащих S-слою бактериальной клетки, так как все они содержат специфические для S-слоя SLH домены (surface-layer homologous module) [96, 113]. Строение и состав целлюлосом, а также локализация генов отличаются не только между родами микроорганизмов, но и у видов, принадлежащих к одному роду. В то же время среди анаэробных грибов из родов *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Orpinomyces*, заселяющих желудочно-кишечный тракт травоядных животных (в основном, рубец и слепую кишку) и активно гидролизующих целлюлозу, также обнаружены сходные целлюлосомо-подобные белковые комплексы [114].

Эффективность и преимущества бактериальных целлюлосом связаны с высокой активностью целлюлозосвязывающего домена, обеспечивающего прикрепление к субстрату, синергизмом действия и оптимальным соотношением между всеми компонентами, входящими в состав этого мультиферментного комплекса, а также про-

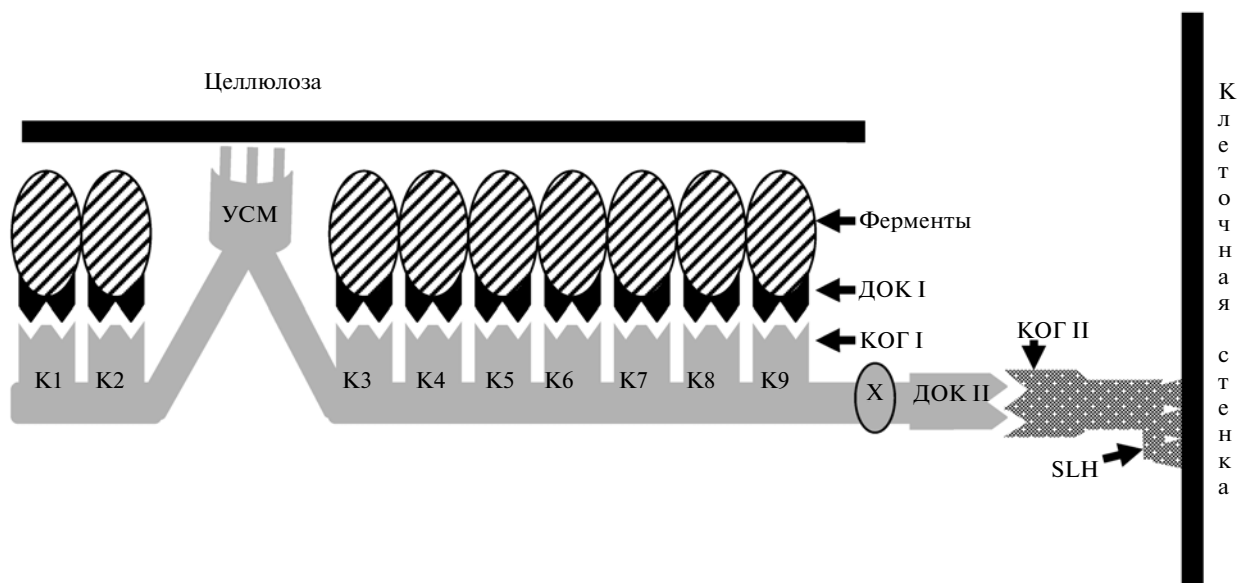


Рис. 3. Схематичное представление структуры целлюлосомы на примере *C. thermocellum* (с изменениями по [57, 96]). Обозначения: модульная структура скаффолдина отмечена серым цветом, ферментные компоненты – темным цветом. УСМ – углеводсвязывающий (целлюлозосвязывающий) модуль, X – X-модуль, K1–K9 – когезины, КОГ I, II – когезиновые модули I и II типов, ДОК I, II – докерининовые модули I и II типов, SLH – “surface-layer homologous” модуль, связывающий комплекс с бактериальной клеточной стенкой.

пространственной организацией, определяющей порядок действия ферментов [96]. В последнее время многие исследования посвящены генетическому конструированию искусственных целлюлосом с заданными свойствами, что позволяет объединить несколько нужных ферментов вместе и добиться их скоординированного действия внутри созданной целлюлосомы [57, 112]. Более того, плазмиды с генами, ответственными за синтез подобных структур, можно вводить в менее требовательный к условиям культивирования микроорганизм, например штаммы – представители рода *Bacillus* [112]. Подобный подход позволит значительно снизить затраты по предобработке целлюлозосодержащего сырья (см. ниже) и его конверсии в биотопливо.

В процессе гидролиза целлюлозы образуются глюкоза, целлобиоза и целлодекстрины различной длины, которые сбраживаются до продуктов, среди которых присутствует значительное количество ацетата и углекислого газа. В результате конверсии промежуточных продуктов, например пирувата, разные виды бактерий образуют лактат, этанол, формиат, сукцинат и другие органические кислоты, в том числе ацетат, а также водород и углекислый газ [92]. В природных условиях разрушение целлюлозы происходит, в основном, в результате активности сообщества микроорганизмов, состоящего из нескольких (многих) целлюлозолитических и нецеллюлозолитических видов [33, 52, 57, 104, 115–117]. Микроорганизмы, составляющие такие сообщества, помимо

катаболических взаимодействий, обеспечивают своих партнеров связанным азотом, витаминами и другими факторами роста, в которых нуждаются, но не могут синтезировать некоторые из их участников [41, 42, 52].

ПЕРЕРАБОТКА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ В МЕТАН

Большинство фундаментальных и биотехнологических работ посвящено изучению образования биогаза из навоза животных, осадочного ила сточных вод и разного рода органических отходов, что достаточно широко отражено в литературе [3, 23, 37, 118–121]. Значительно меньше информации представлено о таком субстрате, как целлюлоза. При этом именно целлюлоза и гемицеллюлоза зачастую преобладают в твердых органических бытовых отходах (ТБО) [122–124]. В последнее время интерес к конверсии бумажного сырья в биогаз возобновился, что связано, в частности, с активным внедрением во многих странах технологий раздельного сбора мусора. Кроме того, бумага и картон являются наиболее доступной для биodeградации фракцией ТБО [7, 124, 125], а сточные воды, образуемые при анаэробном разложении целлюлозосодержащих материалов нетоксичны [125].

Известно, что энергия, содержащаяся в органическом сырье, может переходить на 85% в метан (расчет произведен по конверсии целлюлозы), который является основным компонентом биогаза [126]. На скорость и полноту биоразложе-

ния целлюлозосодержащего материала влияет присутствие лигнина. В различных видах целлюлозосодержащих субстратов его содержание может составлять (%): 18–35 – древесина, 30–40 – скорлупа орехов, 10–30 – трава, 0–15 – различного типа бумага, 15 – пшеничная солома, 0 – листья, 18–30 – газета, 2.7–5.7 – твердый навоз крупного рогатого скота [97]. Несмотря на то что существует прямая зависимость между повышением концентрации метана в среде культивирования при увеличении содержания целлюлозы и гемицеллюлозы в субстрате, наличие лигнина может значительно ингибировать образование биогаза [125].

Стадия гидролиза целлюлозы вообще является скоростьюлимитирующим этапом при анаэробном расщеплении субстратов, содержащих целлюлозу, что, в основном, связано именно с присутствием лигнина [57]. Кристаллическая структура и размеры частиц мультикомпонентной и гетерогенной по составу лигноцеллюлозной биомассы и недоступность β -гликозидных связей для целлюлаз значительно затрудняют усвояемость целлюлозы и гемицеллюлозы [57, 127].

В связи с этим зачастую применяют различные и не всегда дешевые способы предобработки целлюлозосодержащего сырья, которые могут включать механическое измельчение и перемалывание, пиролиз при температурах выше 300°C, использование гамма- и сверхвысокочастотных (микроволновые) излучений [128, 129]. В деревообрабатывающей промышленности используют обработку горячим паром – высокотемпературный автогидролиз и гидротермолиз – нередко с добавлением дополнительных агентов в виде неорганических кислот, паров углекислого газа, аммиака [93, 97, 130]. Химические способы предобработки целлюлозосодержащих материалов включают озонлиз, щелочной гидролиз и гидролиз с помощью концентрированных и разбавленных кислот, а также окисление оксидом водорода во влажной атмосфере [57, 93, 131, 132] и так называемый органосоль – процесс, при котором, наряду с неорганическими кислотами, используются метанол, этанол, ацетон, этиленгликоль, тетрагидрофуран и некоторые другие органические растворители [57, 93, 97, 133]. Все больше внимания уделяют изучению и улучшению технологий биологической предобработки с использованием культур микроорганизмов, в основном грибов и ферментов, выделенных из них. Так, высокую активность при разложении лигнина проявляют базидиомицеты, вызывающие белую гниль, из рода *Phanerochaeta*. Не менее активны представители родов *Pleurotus*, *Sporotrichum*, *Cyathus* и *Ceriporiopsis* [97, 134]. Есть данные [135] об эффективном использовании микромицета *Trichoderma reesei* в двухстадийном процессе предобработки отходов высоколигнифицированных

листьев агавы (сизаль). При дальнейшем сбраживании обработанного таким образом сырья выход метана составил 292 мл/г массы сухой массы, что было на 101% выше по сравнению с необработанным контролем.

Для получения ферментов (целлюлаз) используют различные микроорганизмы, причем грибам отдается предпочтение, поскольку они не требуют специфических условий для роста, как, например, анаэробные или термофильные бактерии, а количество образуемых ферментов в несколько раз превышает микробный бактериальный биосинтез. При этом среди бактериальных культур наиболее изучены в этом отношении представители родов *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Ruminococcus*, *Thermomonospora*, *Erwinia*, *Bacteriodes*, *Acetovibrio*, *Microbispora* [57, 96, 97, 135]. Среди микромицетов основными продуцентами целлюлаз являются виды родов *Phanerochaeta*, *Sclerotium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* и *Schizophyllum* [97].

Необходимо отметить, что любые способы предобработки значительно увеличивают стоимость всего процесса, зачастую являются неэкологичными и требуют последующей очистки от использованных реактивов. Поиск микробных сообществ, способных эффективно осуществлять все стадии анаэробного разложения целлюлозосодержащих субстратов без предобработки, остается одной из актуальных и первостепенных задач для получения биогаза микробиологическим путем.

При исследовании переработки ряда органических субстратов: трава, листья, ветки, пищевые отходы, мелованная бумага, старые газеты, старый гофрированный оберточный картон, офисная бумага – выход биогаза составил 144.4, 30.6, 62.6, 300.7, 84.4, 74.3, 152.3 и 217.3 мл CH_4 /г сухой массы соответственно [124]. Наилучшие показатели, не считая полученных при биоразложении пищевых отходов (300.7), получены при разложении картона и офисной бумаги, в которых содержание лигнина минимально. По некоторым данным [124, 136], содержание лигнина колеблется от 2% в офисной до 24% в газетной бумаге. При этом авторы отмечают длительный период образования одинаковых количеств метана при разложении офисной бумаги, что связано с ее постоянным составом (в основном, целлюлоза и гемицеллюлоза, лигнин практически отсутствует). Другие исследователи [137] указывают на то, что офисная бумага по скоростям разложения и количеству образуемого кумулятивного метана практически сходна с чистой целлюлозой, взятой в качестве контроля, в то время как картон (как гофрированный, так и оберточный), содержащий в своем составе до 5% лигнина, гидролизуетсся менее активно, а древесина практически устойчива к мик-

робному разложению. При анаэробном разложении травы, смешанных растительных отходов, белой (офисной) бумаги, гофрированного картона, журналов и газет авторы получили выход метана 210, 140, 370, 280, 20 и 8 мл/г сухого вещества соответственно. Таким образом, офисная бумага и картон являются наиболее эффективно гидролизуемыми субстратами.

Данные последних исследований [123] свидетельствуют о том, что измельчение субстрата (бумага и картон) не способствует повышению доступности целлюлозосодержащего материала микробным ферментам и не облегчает адгезию на нем микроорганизмов. В экспериментах, проведенных в мезофильных условиях, авторы показали, что измельчение не влияло ни на выход метана, ни на скорость его образования. Скорость гидролиза целлюлозы в большой степени зависит от активности микроорганизмов, входящих в состав микробного сообщества. Так, по сравнению с чистыми мезофильными культурами, *Clostridium cellulolyticum* или *Ruminococcus albus*, микробные сообщества, состоящие из нескольких (многих) микроорганизмов, оказываются более эффективными [122, 138, 139]. При этом особое значение имеет источник выделения микробного сообщества и количество внесенного инокулята, от чего зависит плотность колонизации и адгезия микроорганизмов на волокнах целлюлозы [122]. О'Салливан с соавт. [140] показали, что именно от адгезии на субстрате в большей степени, чем от гидролитической активности отдельных видов зависит способность микробного сообщества к гидролизу целлюлозы. Различия в составе микробного сообщества, а также используемой питательной среде и других факторах имели меньшее влияние на скорость гидролиза по сравнению с количеством активных клеток, способных к адгезии и гидролизу субстрата. Авторы предполагают, что если в ферментерах увеличить плотность клеток до концентрации, сопоставимой с содержанием бактерий в рубце жвачных, то и скорость гидролиза целлюлозосодержащих материалов может значительно возрасти.

Среди факторов, определяющих, по мнению ряда исследователей, высокие показатели скорости гидролиза целлюлозы в мезофильных условиях (34–38°C), можно выделить использование фильтрата рубца жвачных животных в качестве инокулята [141–143], концентраций посевного материала, равных 15–25% об/об [141, 142] и постоянное поддержание нейтральных значений pH среды, а также культивирование микробных сообществ в режиме полунепрерывной ферментации [122, 144, 145]. Процесс биodeградации целлюлозы в таких условиях проходит эффективнее из-за отсутствия лаг-фазы [122]. В термофильных условиях (60°C) в режиме хемостата при культивировании чистой культуры *Clostridium thermocel-*

lum [144] ее продуктивность значительно превышала показатели, полученные в мезофильных условиях культивирования. Так, например, константа скорости гидролиза первого порядка в термофильных условиях составила 5.6/сут по сравнению с 0.5–2.5/сут в мезофильных. В мезофильном сообществе, выделенном из сточных вод и обогащенном на среде с целлюлозой, выход метана достиг 314 мл метана/л сут, а содержание CH₄ в составе биогаза составило 57–62% [122].

При сравнении различных источников инокулята (навоз травоядных животных, компостные кучи, иловые отложения различных водоемов, отходы переработки винограда – жом), взятого для биотрансформации целлюлозы микробными сообществами в термофильных (55°C) условиях, наиболее активными и стабильными оказались сообщества, выделенные из навоза травоядных (копытных) животных [146, 147]. Состав функционального микробного сообщества различается не только в зависимости от источника инокулята, но и используемого субстрата, а также условий культивирования (например, температуры). Данные исследований, проведенных с использованием современных молекулярных методов, позволили более точно отследить различия и идентифицировать микроорганизмы, входящие в сообщество, образующие биогаз при разложении органических веществ. Так, по данным Левен с соавт. [36], при разложении органических отходов, в том числе целлюлозосодержащих, анализ микробных сообществ, выращенных при 37 и 55°C, показал, что представители Bacteroidetes (34% от общего числа клонов) и Chloroflexi (27%) доминировали в мезофильных условиях, в то время как в термофильных условиях преобладали *Thermotogae* (61%). Основными представителями архей были *Methanospirillum* и *Methanosarcina* в мезофильных и термофильных условиях соответственно. В метаногенных сообществах, выделенных на рисовых полях и обогащенных на среде с целлюлозой в течение 5 пересевов, были идентифицированы виды семейств Methanosarcinaceae и Methanosaetaceae, доминирующие при 30 и 15°C соответственно [148, 149]. В обоих сообществах также присутствовали штаммы рода *Methanobacterium* (5–25%). Авторы отмечают различие в составе микроорганизмов в исходной культуре и на конечном этапе культивирования [148]. Если в начале разложения целлюлозы количество архей составляло 4 и 10%, то к концу культивирования их число увеличилось до 50 и 30% при 30 и 15°C соответственно [149].

В наших работах с помощью методов микроскопии были выявлены различия в микробных сообществах, выращиваемых в мезофильных и термофильных условиях [146, 147], причем состав микроорганизмов отличался при использовании различных инокулятов для засева, а также в дина-

мике развития сообществ при пересевах. Несмотря на то что в мезофильных условиях биоконверсия использованного бумажного сырья успешно завершалась образованием биогаза с содержанием метана от 47 до 63%, этот процесс происходил медленнее и скорость образования биогаза (СОБ) была в 2 и более раза меньше, чем при 55°C (0.7–0.9 мл/сут мл среды) [146, 147]. В условиях периодического культивирования (37°C) наиболее активные сообщества образовывали около 12 ммоль СН₄/г целлюлозы. Однако для большинства мезофильных культур выход метана был значительно меньше (от 2–4 до 8–11 ммоль СН₄/г), чем при 55°C (16 ммоль СН₄/г с содержанием метана в составе биогаза 60%).

В модельных экспериментах по изучению биодegradации офисной бумаги и картона было показано, что в мезофильных условиях (35°C) происходит временное ингибирование ацетокластических метаногенов летучими жирными кислотами и низким рН. Это приводит к тому, что сначала метан образуется преимущественно из Н₂/Н₂СО₃, а затем из ацетата [150]. Известно, что ацетокластический метаногенез происходит предпочтительней при высоких концентрациях ацетата в среде. В термофильных условиях (55–60°C) при низких концентрациях ацетата и наличии ингибиторов (аммоний, ЛЖК) доминирующим механизмом образования метана становится двухступенчатый процесс, в котором ацетат сначала окисляется синтрофными ацетатооксилирующими бактериями до водорода и СО₂, а затем гидротрофные метаногены переводят эти соединения в метан [52, 150, 151].

В исследованиях Г. Эрига [152], К. Харриеса с соавт. [153] и С. Помье с соавт. [123] при биоразложении в мезофильных условиях некоторых целлюлозосодержащих субстратов биологический потенциал метана (БПМ, мл СН₄/г) составил 72 и 96 для газет, 60–135 для журнальной бумаги и 209 для оберточного картона. При сбраживании смеси из бумаги и картона были получены сходные результаты по БПМ и проценту биодegradации субстрата, которые практически не отличались при использовании частиц субстрата разного размера (10 см, 2 см, менее 1 мм) и составили 141–143 мл СН₄/г и 43% соответственно [123]. Известно, что измельчение биомассы повышает эффективность ее биодegradации, однако авторы указывают, что для бумажной продукции не размер частиц, а именно содержание лигнина в сырье скорее является определяющим фактором при его обработке.

При выращивании других микробных сообществ на офисной бумаге с черно-белой печатью и упаковочном гофрированном картоне (55°C) выход метана составил около 48–51%, что в среднем соответствовало 240–280 мл СН₄/г при культивировании на офисной бумаге и 223–252 мл СН₄/г на картоне [147]. В мезофильных условиях и скорость образования биогаза, и объемы выхода метана в составе образующегося биогаза были на этих субстратах ниже (211–245 и 193–240 мл СН₄/г соответственно). Примечательно, что в процессе селекции микробных сообществ (пересевы на среду, содержащую целлюлозу, в течение нескольких пассажей) общей тенденции в изменении скорости образования биогаза и накопления метана в биогазе выявлено не было: для некоторых сообществ происходило увеличение продуктивности и СОБ, в то время как для других первоначальные показатели либо не изменились, либо уменьшились [146, 147] (таблица).

Скорость образования биогаза (СОБ) при разложении целлюлозы, офисной бумаги и картона наиболее активными микробными сообществами, выращенными в термофильных (Т) и мезофильных (М) условиях культивирования

№	Максимум СОБ, мл СН ₄ /сут мл среды		Максимум СОБ, мл СН ₄ /сут г	
	Целлюлоза, пассаж			
	1	5	1	5
3 Т	1.30	0.76	86.7	50.7
4 Т	0.66	0.72	44.0	48.0
6 Т	1.30	0.71	30.0	47.3
7 Т	0.64	0.48	42.7	32.0
17 Т	0.64	0.72	42.7	48.0
18 Т	0.59	0.64	39.3	42.7
19 Т	0.96	0.80	60.6	53.4
20 Т	1.00	0.82	66.7	54.7
21 Т	0.93	0.54	62.0	36.0
22 Т	1.36	0.90	90.7	60.0
1 М	0.40	0.46	26.7	30.7
21 М	0.40	0.43	26.7	28.7
	Офисная бумага	Картон	Офисная бумага	Картон
3 Т	0.60	0.66	40.0	44.0
6 Т	1.00	0.74	66.7	49.3
17 Т	0.68	0.76	45.3	50.7
18 Т	0.86	0.70	75.3	46.7
19 Т	1.00	0.80	66.7	53.3
20 Т	1.91	0.78	127.3	52.0
21 Т	0.86	0.82	75.3	54.7
22 Т	0.84	0.62	56.0	41.3
1 М	0.60	0.60	40.0	40.0
21 М	0.49	0.46	32.7	30.7

При разработке различных стратегий по утилизации и биотрансформации целлюлозосодержащих субстратов (отходы) в биогаз селекция микробных сообществ и подбор оптимальных условий для их культивирования могут иметь решающее значение для того, чтобы этот процесс проходил максимально эффективно. В последнее время появились предложения по использованию генно-инженерных штаммов метаногенов, свойства и продуктивность которых значительно превосходили бы таковые у исходных природных видов [25].

При неуклонно сокращающихся запасах традиционных видов топлива все большее внимание уделяют альтернативной энергетике. Одним из наиболее популярных и широко используемых способов переработки органического сырья и отходов является их анаэробное разложение с образованием биогаза. Однако, несмотря на обилие всевозможной информации относительно различных аспектов получения биогаза, до сих пор ощущается недостаток фундаментальных данных о составе и динамике развития микроорганизмов, о механизмах регуляции и влиянии различных факторов, в том числе стрессовых, на все стадии преобразования субстрата в метан, отсутствует глубинное понимание процессов, протекающих в многокомпонентном микробном сообществе. Из-за недостаточности развитой технологической базы альтернативная биоэнергетика остается недооцененной и закрытой для повсеместного использования. Особенно остро эти вопросы стоят при получении биогаза из целлюлозосодержащих материалов, хотя именно целлюлоза, отходы деревообрабатывающей промышленности и бумажное сырье являются одними из наиболее перспективных субстратов для получения биогаза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abelson H.P.* // Science. 1995. V. 268. № 5213. P. 955.
2. *Claassen P.A.M., de Vrije T.* // Int. J. Hydrogen Energy. 2006. V. 31. № 11. P. 1416–1423.
3. *Björnsson P., Mattiasson B.* // Trends Biotechnol. 2008. V. 26. № 1. P. 7–13.
4. *Munasinghe P.C., Khanal S.K.* // Bioresour. Technol. 2010. V. 101. № 13. P. 5013–5022.
5. *Peralta-Yahya P.P., Keasling J.D.* // Biotech. J. 2010. V. 5. № 2. P. 147–162.
6. *Weiland P.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 85. № 4. P. 849–860.
7. *Antizar-Ladislao B., Turrion-Gomez J.L.* // Biofuels, Bioprod. Bioref. 2008. V. 2. № 5. P. 455–469.
8. *Rice W.* // Int. J. Hydrogen Energy. 2006. V. 31. № 14. P. 1955–1963.
9. *Koike Y., An M., Tang Y., Syo T., Osaka N., Morimura S., Kida K.* // J. Biosci. Bioeng. 2009. V. 108. № 6. P. 508–512.
10. *Rude M.A., Scjirmer A.* // Curr. Opin. Microbiol. 2009. V. 12. № 3. P. 274–281.
11. *Angelidaki I., Karakashev D., Batstone D.J., Plugge C.M., Stams A.J.* // Methanogenesis (Methods in Enzymology) / Eds. C. Rosenzweig, W. Ragsdale. Academic Press, 2011. V. 494. P. 327–351.
12. *Калюжный С.В., Пузанков А.Г., Варфоломеев С.Д.* // Биогаз: проблемы и решения. М.: ВИНТИ. Итоги науки и техники. Биотехнология. 1988. Т. 21. 177 с.
13. *Паничева Е.С., Давиденко Е.В.* // Биотехнология. 1990. Т. 6. № 4. С. 49–53.
14. *Glissmann K., Hammer E., Conrad R.* // FEMS Microbiol. Ecol. 2005. V. 52. № 1. P. 43–48.
15. *Kapdi S.S., Vijay V.K., Rajesh S.K., Prasad R.* // Renew. Energy. 2005. V. 30. № 8. P. 1195–1202.
16. *Rasi S., Veijanen A., Rintala J.* // Energy. 2007. V. 32. № 8. P. 1375–1380.
17. *Bochiwal C., O'Malley C., Chong J.P.J.* // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Ed. K.N. Timmis. Berlin: Springer, 2010. P. 2810–2815.
18. *Hecht C., Griehl C.* // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. № 2. P. 654–658.
19. *Hesselsoe M., Boysen S., Iversen N., Jorgensen L., Murrell J.C., McDonald I., Radajewski S., Thestrup H., Roslev P.* // Biodegrad. 2005. V. 16. № 5. P. 435–448.
20. *Ficker M., Krastel K., Orlicky S., Edwards E.* // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 12. P. 5576–5585.
21. *Gassanova L.G., Netrusov A.I., Teplyakov V.V., Modigell M.* // Desalination. 2006. V. 198. № 1–3. P. 56–66.
22. *Verstraete W.* // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Ed. K.N. Timmis. Berlin: Springer, 2010. P. 3333–3336.
23. *Ambulkar A.R., Shekdar A.V.* // Res. Conserv. Recycl. 2004. V. 40. № 2. P. 111–128.
24. *Eze J.I., Uzodinma E.O.* // Pacific J. Sci. Technol. 2009. V. 10. № 2. P. 942–948.
25. *Ferry J.G.* // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. V. 22. № 3. P. 351–357.
26. *Weiland P.* // Eng. Life Sci. 2006. V. 6. № 3. P. 302–309.
27. *Cheunbarn T., Pagilla K.R.* // J. Environ. Eng. 2000. V. 126. № 9. P. 796–801.
28. *Cabirol N., Rojas Oropeza M., Noyola A.* // Wat. Sci. Technol. 2002. V. 45. № 10. P. 269–274.
29. *Sahlström L.* // Bioresour. Technol. 2003. V. 87. № 2. P. 161–166.
30. *Oleskowicz-Popiela P., Lisiecki P., Holm-Nielsen J.B., Thomsen A.B., Thomsen M.H.* // Bioresour. Technol. 2008. V. 99. № 13. P. 5327–5334.
31. *Lübken M., Gehring T., Wichern M.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 85. № 6. P. 1643–52.
32. *Yadvika S., Sreekrishnan T.R., Sreekrishnan T.R., Kohli S.* // Bioresour. Technol. 2004. V. 95. № 1. P. 1–10.
33. *Smiti N., Ollivier B., Garcia J.L.* // FEMS Microbiol. Lett. 1986. V. 35. № 1. P. 93–97.
34. *Nozhevnikova A.N., Zepp K., Vazquez F., Zehnder A.J.B., Holliger C.* // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. № 3. P. 1832–1835.

35. Li T., Mazéas, Sghir A., Leblon G., Bouchez T. // Environ. Microbiol. 2009. V. 11. № 4. P. 889–904.
36. Levén L., Eriksson A.R.B., Schnurer A. // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 59. № 3. P. 683–693.
37. Ferrer I., Vazquez F., Font X. // Bioresour. Technol. 2010. V. 101. № 9. P. 2972–2980.
38. Gao W.J., Leung K.T., Qin W.S., Liao B.Q. // Bioresour. Technol. 2011. V. 102. № 19. P. 8733–8740.
39. Wijekoon K.C., Visvanathan C., Abeynayaka A. // Bioresour. Technol. 2011. V. 102. № 9. P. 5353–5360.
40. Заварзин Г.А. // Микробиология. 1997. Т. 66. № 5. С. 669–673.
41. Заварзин Г.А. // Микробиология. 1989. Т. 51. № 6. С. 3–14.
42. Stams A.J.M. // Antonie van Leeuwenhoek. 1994. V. 66. № 1–3. P. 271–294.
43. Boone D.R., Whitman W.B., Rouviere P. Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics / Ed. J.G. Ferry. N.Y.: Chapman & Hall, 1993. P. 35–80.
44. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed. / Ed. G. Garrity. N.Y.: Springer-Verlag, 2001. 721 p.
45. Ferry G. // Annu. Rev. Microbiol. 2010. V. 64. P. 453–473.
46. Liu Y. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Ed. K.N. Timmis. Berlin: Springer, 2010. P. 549–558.
47. Bapteste E., Brochier C., Boucher Y. // Archaea. 2005. V. 1. № 5. P. 353–363.
48. Anderson K.L. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 4. P. 1488–1491.
49. Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics / Ed. J.G. Ferry. N.Y.: Chapman & Hall, 1993. 553 p.
50. Schink B., Zeikus J.G. // J. General Microbiol. 1982. № 2. V. 128. P. 393–404.
51. Pol A., Demeyer D.I. // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. № 3. P. 832–834.
52. Schink B. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997. V. 61. № 2. P. 262–280.
53. Thauer R., Shima S. // Nature. 2006. V. 440. № 7086. P. 878–879.
54. Rodhe H. // Science. 1990. V. 248. № 8. P. 1217–1219.
55. Pavlostathis S.G., Miller T.L., Wolin M.J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990. V. 33. № 1. P. 109–116.
56. Leschine S.B. // Annu. Rev. Microbiol. 1995. V. 49. P. 399–426.
57. Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2002. V. 66. № 3. P. 506–577.
58. Burrell P.C., O'Sullivan C., Song H., Clarke W.P., Blackall L.L. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 4. P. 2414–2419.
59. Show K.Y., Tay J.H., Hung Y. // Env. Bioeng. Handbook of Environ. Eng. 2010. V. 11. P. 773–807.
60. Cotta M.A. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 1. P. 48–54.
61. Anderson I., Ulrich L.E., Lupa B., Susanti D., Porat I., Hooper S.D., Lykidis A., Sieprawaska-Lupa M., Dharmarajan L., Goltsman E., Lapidus A., Saunders E., Han C., Land M., Lucas S., Mukhopadhyay B., Whitman W.B., Woese C., Bristow J., Kyrpides J. // PLoS One. 2009. V. 4. e5797.
62. Bokkenheuser V. // Clin. Infect. Dis. 1993. V. 16. № 4. P. 427–434.
63. Wang X., Conway P.L., Brown I.L., Evans A.J. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 11. P. 4848–4854.
64. Zhang T., Liu H., Fang H.H.P. // J. Environ. Manag. 2003. V. 69. № 2. P. 149–156.
65. Heinrichová K., Wojciechowicz M., Ziołocki A. // J. General Microbiol. 1985. V. 131. № 8. P. 2053–2058.
66. Hespell R.B., Wolf R., Bothast R.J. // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53. № 12. P. 2849–2853.
67. Dušková D., Marouek M. // Lett. Appl. Microbiol. 2001. V. 33. № 3. P. 159–163.
68. Sirotek K., Slováková L., Kopečný J., Marounek M. // Lett. Appl. Microbiol. 2004. V. 38. № 4. P. 327–332.
69. Mahadevan S., Erfle J.D., Sauer F.D. // J. Anim. Sci. 1980. V. 50. № 4. P. 723–728.
70. Barker H.A. // Annu. Rev. Biochem. 1981. V. 50. P. 23–40.
71. Egli T. // Adv. Microb. Ecol. 1995. V. 14. P. 305–386.
72. Wallace R.J. // J. Nutr. 1996. V. 126. № 4. P. 1326–1334.
73. Baena S., Fardeau M.-L., Ollivier B., Labat M., Thomas P., Garcia J.-L., Patel B.K.C. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 975–982.
74. Díaz C., Baena S., Patel B.K.C., Fardeau M.L. // Braz. J. Microbiol. 2010. V. 41. № 3. P. 707–717.
75. Sieber J.R., McInerney M.J., Plugge C.M., Schink B., Gunsalus R.P. K. // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Ed. K.N. Timmis. Berlin: Springer, 2010. P. 338–350.
76. Stams A.J.M., de Bok F.A.M., Plugge C.M., van Eekert M.H.A., Dolfing J., Schraa G. // Environ. Microbiol. 2006. V. 8. № 3. P. 371–382.
77. Reguera G., McCarthy K.D., Mehta T., Nicoll J.S., Tuominen M.T., Lovley D.R. // Nature. 2005. V. 435. № 7045. P. 1098–1101.
78. Hattori S., Galushko A.S., Kamagata Y., Schink B. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 10. P. 3471–3476.
79. Zinder S.H. Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics / Ed. J.G. Ferry. N.Y.: Chapman & Hall, 1993. P. 128–206.
80. Davies Z.S., Mason D., Brooks A.E., Griffith G.W., Merry R.J., Theodorou M.K. // Anim. Feed Sci. Technol. 2000. V. 83. № 3–4. P. 205–221.
81. Whitman W.B., Bowen T.L., Boone D.R. The methanogenic bacteria. The Prokariotes. 2 ed. / Eds. A. Balows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K. Schleifer. N.Y.: Springer-Verlag, 1992. P. 719–760.
82. Stams A.J.M., Oude Elferink S.J.W.H., Westermann P. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2003. V. 81. P. 31–56.
83. Ferry J.G. // J. Bacteriol. 1992. V. 174. № 17. P. 5489–5495.
84. Yu Y., Kim J., Hwang S. // Biotechnol. Bioeng. 2006. V. 93. № 3. P. 424–433.
85. Kim I.S., Hwang M.H., Jang N.J., Hyun S.H., Lee S.T. // Int. J. Hydr. Energ. 2004. V. 29. № 11. P. 1133–1140.

86. *Staley B.F., de los Reyes III F.L., Barlaz M.A.* // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. № 7. P. 2381–2391.
87. *Jones E.J., Voytek M.A., Corum M.D., Orem W.H.* // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 21. P. 7013–7022.
88. *Василов П.Г.* // Вестник биотехнол. и физ-хим. биологии им Ю.А. Овчинникова. 2007. Т. 3. № 3. С. 54–61.
89. *Шмандий В.М., Никифоров В.В., Алферов В.П., Харламова Е.В., Пронин В.А.* // Гигиена и санитария. 2010. № 6. С. 35–37.
90. *Samson R., Leduy A.* // Biotechnol. Bioeng. 1986. V. 28. № 7. P. 1014–1023.
91. *de Schampelaire L., Verstraete W.* // Biotechnol. Bioeng. 2009. V. 103. № 2. P. 296–304.
92. *Lynd L.R., Wyman C.E., Gerngross T.U.* // Biotechnol. Prog. 1999. V. 15. № 5. P. 777–793.
93. *Saha B.C.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 30. P. 279–291.
94. *Pauly M., Keegstra K.* // Plant J. 2008. V. 54. № 4. P. 559–568.
95. *Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В., Кондратьева Е.Г., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Матыс В.Ю., Синицын А.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 674–80.
96. *Schwarz W.H.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 56. № 5–6. P. 634–649.
97. *Sun Y., Cheng J.* // Bioresour. Technol. 2002. V. 83. № 1. P. 1–11.
98. *Bagnara C., Gaudin C., Belaich J.P.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1987. V. 26. № 2. P. 170–176.
99. *Wachinger G., Bronnenmeier K., Staudenbauer W.L., Schrempf H.* // Appl. Environ. Microbiol. 1989. V. 55. № 10. P. 2653–2657.
100. *Gallagher J., Winters A., Barron N., McHale L., McHale A.P.* // Biotechnol. Lett. 1996. V. 18. № 5. P. 537–540.
101. *Bergquist P.L., Gibbs M.D., Morris D.D., Te'o V.S.J., Saul D.J., Morgan H.W.* // FEMS Microbiol. Ecol. 1999. V. 28. № 2. P. 99–110.
102. *Wirth S., Ulrich A.* // Syst. Appl. Microbiol. 2002. V. 25. № 4. P. 584–591.
103. *Haichar F.Z., Achouak W., Christen R., Heulin T., Marol C., Marais M., Mougel C., Ranjard L., Balesdent J., Berge O.* // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. № 3. P. 625–634.
104. *Okeke B.C., Lu J.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. V. 163. № 7. P. 869–881.
105. *Patel G.B., Khan A.W., Agnew B.J., Colvin J.R.* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1980. V. 30. № 1. P. 179–185.
106. *Perevalova A.A., Svetlichny V.A., Chernyh N.A., Kostrikina N.A., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Bonch-Osmolovskaya E.A.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005. V. 55. № 3. P. 995–999.
107. *Shapiro J.A.* // Annu. Rev. Microbiol. 1998. V. 52. P. 81–104.
108. *Олескин А.В., Ботвинко И.В., Цавкелова Е.А.* // Микробиология. 2000. Т. 69. № 3. С. 309–327.
109. *Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 3. С. 133–143.
110. *Xu Q., Gao W., Ding S., Kenig R., Shoham Y., Bayer E.A., Lamed R.* // J. Bacteriol. 2003. V. 185. № 15. P. 4548–4557.
111. *Bayer E.A., Lamed R., Himmel M.E.* // Curr. Opinion Biotechnol. 2007. V. 18. P. 237–245.
112. *Рабинович М.Л., Мельник М.С.* // Успехи биол. химии. 2000. Т. 40. С. 205–266.
113. *Ljungdahl L.G.* // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2008. V. 1125. P. 308–321.
114. *Kato S., Haruta S., Cui Z.J., Ishii M., Igarashi Y.* // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 11. P. 7099–7106.
115. *O'Sullivan C.A., Burrell P.C., Clarke W.P., Blackall L.L.* // Biotech. Bioeng. 2005. V. 92. № 7. P. 871–878.
116. *Chassard C., Delmas E., Robert C., Bernalier-Donadille A.* // FEMS Microbiol. Ecol. 2010. V. 74. № 1. P. 205–213.
117. *Speece R.E.* Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Nashville, TN: Archae Press, 1996. P. 29–58.
118. *Díaz E.E., Stams A.J.M., Amils R., Sanz J.L.* // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. № 7. P. 4942–4949.
119. *Farhadian M., Borghei M., Umrانيا V.V.* // Bioresour. Technol. 2007. V. 98. № 16. P. 3080–3083.
120. *Tabatabaei M., Rahim R.A., Abdullah N., Wright A.G., Shirai Y., Sakai K., Sulaiman A., Hassan M.A.* // Proc. Biochem. 2010. V. 45. P. 1214–1225.
121. *Clarke W.P.* // Waste Manage. Res. 2000. V. 18. № 6. P. 510–524.
122. *Song H., Clarke P.* // Biores. Technol. 2009. V. 100. P. 1268–1273.
123. *Pommier S., Mañas L.A., Lefebvre X.* // Biores. Technol. 2010. V. 101. P. 463–468.
124. *Eleazer W.E., Odle W.S., Wang Y.S., Barlaz M.A.* // Environ. Sci. Technol. 1997. V. 31. № 3. P. 911–917.
125. *Wolfe R.S.* // ASM News. 1996. V. 62. № 10. P. 529–534.
126. *Hendriks A.T., Zeeman G.* // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. № 1. P. 10–18.
127. *Zheng Y., Pan Z., Zhang R.* // Int. J. Agric. Biol. Eng. 2009. V. 2. № 3. P. 51–68.
128. *Ha S.H., Mai N.L., An G., Koo Y.M.* // Bioresour. Technol. 2011. V. 102. № 2. P. 1214–1219.
129. *Teghammar A., Yngvesson J., Lundin M., Taherzadeh M.J., Horváth I.S.* // Bioresour. Technol. 2010. V. 101. № 4. P. 1206–1212.
130. *Bjerre A.B., Oiesen A.B., Fernquist T., Ploger A., Schmidt A.S.* // Biotechnol. Bioeng. 1996. V. 49. № 5. P. 568–577.
131. *Schell D.J., Ruth M.F., Tucker M.P.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 1999. V. 77. № 1–3. P. 67–81.
132. *Thring R.W., Chorent E., Overend R.* // Biomass. 1990. V. 23. № 4. P. 289–305.
133. *Akin D.E., Rigsby L.L., Sethuraman A., Morrison W.H.-III., Gamble G.R., Eriksson K.E.L.* // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 4. P. 1591–1598.

134. *Muthangya M., Mshandete A.M., Kivaisi A.K.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2009. V. 10. № 11. P. 4805–4815.
135. *Bayer E.A., Morag E., Lamed R.* // *Trends Biotechnol.* 1994. V. 12. № 9. P. 379–386.
136. *Barlaz M., Ham R.K., Shaefer D.M.* // *CRC Crit. Rev. Environ. Control.* 1990. V. 19. № 6. P. 557–584.
137. *Owens J.M., Chynoweth D.P.* // *Wat. Sci. Tech.* 1993. V. 27. № 2. P. 1–14.
138. *Desvaux M., Guedon E., Petitdemange H.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. № 6. P. 2461–2470.
139. *Desvaux M., Guedon E., Petitdemange H.* // *J. Bacteriol.* 2001. V. 183. № 1. P. 119–130.
140. *O'Sullivan C.A., Burrell P.C., Clarke W.P., Blackall L.L.* // *Bioresour. Technol.* 2008. V. 99. № 11. P. 4723–4731.
141. *Weimer P.J., Lopezguisa J.M., French A.D.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V. 56. № 8. P. 2421–2429.
142. *Mourino F., Akkarawongsa R., Weimer P.J.* // *J. Dairy Sci.* 2001. V. 84. № 4. P. 848–859.
143. *O'Sullivan C.A., Burrell P.C., Clarke W.P., Blackall L.L.* // *Bioresour. Technol.* 2006. V. 97. № 18. P. 2356–2363.
144. *Lynd L.R., Grethlen H.E., Wolkin R.H.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1989. V. 55. № 12. P. 3131–3139.
145. *Desvaux M., Guedon E., Petitdemange H.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. № 9. P. 3837–3845.
146. *Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Петрова Е.В., Нетрусов А.И.* // *Вест. МГУ. Сер. Биол.* 2012. № 2. С. 46–51.
147. *Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Петрова Е.В., Нетрусов А.И.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2012. Т. 48. № 4. С. 1–8.
148. *Chin K., Lukow T., Stubner S., Conrad R.* // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1999. V. 30. № 4. P. 313–326.
149. *Wu X.L., Conrad R.* // *Environ. Microbiol.* 2001. V. 3. № 6. P. 355–362.
150. *Qu X., Vavilin V.A., Mazeas L., Lemunier M., Duquenois C., He P., Bouchez T.* // *Waste Manag.* 2009. V. 29. № 6. P. 1828–1837.
151. *Zinder S.H., Koch M.* // *Arch. Microbiol.* 1984. V. 138. № 3. P. 263–272.
152. *Ehrig H.J.* // *Proc. Third Int. Waste Management and Landfill Symposium, Cagliari: CISA Publisher, 1991. P. 87–114.*
153. *Harries C.R., Cross C., Smith R.* // *Proc. Eighth Int. Waste Management and Landfill Symposium, Cagliari: CISA Publisher, 2001. P. 579–588.*
154. *Scheffinger C.C., Wolin M.J.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1973. V. 26. № 5. P. 789–795.

Biogas Production from Cellulose-Containing Substrates: A Review

E. A. Tsavkelova and A. I. Netrusov

Department of Microbiology, Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

e-mail: tsavkelova@mail.ru

Received December 20, 2011

Abstract—Anaerobic microbial conversion of organic substrates to various biofuels is one of the alternative energy sources attracting the greatest attention of scientists. The advantages of biogas production over other technologies are the ability of methanogenic communities to degrade a broad range of substrates and concomitant benefits: neutralization of organic waste, reduction of greenhouse gas emission, and fertilizer production. Cellulose-containing materials are a good substrate, but their full-scale utilization encounters a number of problems, including improvement of the quality and amount of biogas produced and maintenance of the stability and high efficiency of microbial communities. We review data on microorganisms that form methanogenic cellulolytic communities, enzyme complexes of anaerobes essential for cellulose fiber degradation, and feedstock pretreatment, as biodegradation is hindered in the presence of lignin. Methods for improving biogas production by optimization of microbial growth conditions are considered on the examples of biogas formation from various types of plant and paper materials: writing paper and cardboard.

УДК 577.152.35

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НИТРИЛГИДРАТАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА АКТИВИРОВАННОМ ХИТОЗАНЕ

© 2012 г. Ю. Г. Максимова*, Т. А. Рогожникова**, Г. В. Овечкина*, А. Ю. Максимов*, В. А. Демаков*

* Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081
e-mail: maks@iegm.ru

** Пермский государственный университет, Пермь, 614990

Поступила в редакцию 29.06.2011 г.

Исследованы каталитические свойства нитрилгидратазы, изолированной из штамма *Rhodococcus ruber* gtl и иммобилизованной методом ковалентной сшивки с хитозаном, активированным 0.1%-ным раствором бензохинона. Определены кинетические параметры реакции гидратации акрилонитрила, катализируемой иммобилизованной нитрилгидратазой и ферментом в растворе. Установлено, что иммобилизация не приводит к снижению максимальной скорости реакции ($V_{\text{макс}}$), тогда как константа Михаэлиса (K_M) уменьшается в 2.4 раза. Показана возможность многократного использования иммобилизованного фермента на протяжении 50 последовательных циклов трансформации акрилонитрила, причем активность нитрилгидратазы в 50 цикле превышала таковую в первом цикле в 3.5 раза. Показано, что влияние температуры на активность зависело от концентрации фермента, что подтверждает диссоциативный характер инактивации нитрилгидратазы. Обнаружено, что иммобилизованная нитрилгидратаза сохраняет активность при pH 3.0–4.0, тогда как фермент в растворе в этих условиях инактивируется. Полученный биокатализатор может эффективно использоваться для получения акриламида из акрилонитрила.

Нитрилгидратаза (КФ 4.2.1.84), катализирующая гидратацию нитрилов до амидов, является ключевым ферментом метаболизма нитрилов у микроорганизмов. Этот фермент применяется в крупномасштабном промышленном производстве из соответствующих нитрилов акриламида и никотинамида, используемых в химической и фармацевтической индустрии [1, 2]. Биотехнологическое производство акриламида в России основано на высокопродуктивном штамме родококков – *Rhodococcus rhodochrous* M8 [3–5], в Японии – *R. rhodochrous* J1. У промышленно значимого штамма *R. rhodochrous* J1 обнаружено два вида нитрилгидратаз – высокомолекулярная (520 кДа) и низкомолекулярная (130 кДа), гены которых экспрессируются в зависимости от индуктора, добавленного в среду культивирования. Оба фермента – гетеромеры, состоящие из α - и β -субъединиц: высокомолекулярный фермент содержит по 8–10, низкомолекулярный – по 2 каждой субъединицы [6]. Нитрилгидратаза штамма *R. rhodochrous* M8, как и *R. rhodochrous* J1, является гетеромером и содержит ионы кобальта в активном центре [4].

Стабилизация ферментов является необходимым этапом на пути их широкого внедрения в производство. Ограничение конформационных перестроек белковой глобулы позволяет сохранить работоспособность активного центра в течение длительного времени [7]. Иммобилизация на

нерастворимом носителе, основанная на физико-химических принципах, дает возможность более длительной эксплуатации ферментов и, как следствие, повышения их продуктивности.

Перспективным носителем для иммобилизации ферментов является хитозан, получаемый при деацетилировании хитина. По химической структуре хитозан – сополимер D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина. В высокомолекулярных линейных цепях полиглюкозамина имеется большое количество реакционноспособных амино- и гидроксильных групп, подверженных химическим модификациям [8]. За счет образования большого количества водородных связей он может функционировать как универсальный сорбент, связывающий различные вещества органической и неорганической природы [9]. Большое количество реакционноспособных групп в молекуле определяет его способность взаимодействовать с бифункциональными реагентами, образующими химические связи как с молекулой хитозана, так и с молекулой белка, что делает возможным ковалентную сшивку фермента с хитозаном. При ковалентном присоединении ферментов к носителю в качестве бифункционального реагента часто используют глутаровый альдегид [10]. В случае иммобилизации нитрилгидратазы этот активатор не является предпочтительным, т.к. ингибирует ее активность [11]. Сведений об активировании но-

сителей бензохиноном для ковалентной сшивки ферментов практически не встречается.

Нами ранее было изучено влияние адсорбционной иммобилизации на неорганических носителях, включая немодифицированные и углеродсодержащие оксиды алюминия, а также углеродный носитель Сибунит, на активность и стабильность нитрилгидратазы [12]. Активность полученного иммобилизованного фермента не превышала 6–10% исходной в растворе, что обусловило необходимость дальнейших поисков предпочтительных методов иммобилизации нитрилгидратазы.

Цель работы – получение биокатализатора трансформации акрилонитрила в акриламид на основе ферментного препарата, содержащего нитрилгидратазу, ковалентно иммобилизованного на активированном хитозане, и изучение его каталитических свойств.

МЕТОДИКА

Нитрилгидратазу выделяли из штамма бактерий *R. ruber* gt 1, обладающего высокой нитрилгидратазной активностью [13]. Бактериальную культуру выращивали в колбах объемом 1 л на качалке со скоростью вращения 100 об/мин при 30°C до стационарной фазы роста на минимальной солевой среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 3.7, NaCl – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.005, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, pH 7.2–7.4. В качестве источника углерода использовали глюкозу в концентрации 0.1%, источник азота – хлористый аммоний в концентрации 10 мМ. Биомассу центрифугировали 20 мин при 10500 g, отмывали клетки от среды и ресуспендировали в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 44 мМ бутират натрия. Клетки разрушали десятикратной обработкой ультразвуком (УЗГ8-0.4/22, ВНИИ ТВЧ г. Санкт-Петербург, Россия) по 15 с при частоте 22 кГц с охлаждением до 0–4°C. Гомогенат центрифугировали 20 мин при 10500 g и температуре 4°C, затем проводили фракционирование белка сульфатом аммония, последовательно доводя концентрацию до 35 и 60% от насыщающей. В препарате, полученном при 60%-ном насыщении сульфата аммония, содержание фермента составило 72% от общего количества белка. Количество белка в пробе определяли по методу Бредфорд с красителем Кумасси бриллиантовым синим G-250. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин [14].

Нитрилгидратазу иммобилизовали методом ковалентной сшивки с активированным хитозаном. Готовили 2%-ный (вес/об.) раствор хитозана средней вязкости (“Sigma”, Япония) в 2%-ной (об./об.) уксусной кислоте и накапывали с помощью шприца для инъекций объемом 5 мл в 1 М

раствор КОН. После затвердевания в течение 1 ч гранулы отмывали однократно 0.01 М калий-фосфатным буфером, pH 7.2 ± 0.2 . Полученные гранулы активировали 0.1%-ным раствором бензохинона (“Fluka”, Швейцария) в течение 15 мин в соотношении гранул и активатора 1 : 1. Отмывали 3 раза фосфатным буфером, двукратно превышающим объем раствора бензохинона. Активированные гранулы смешивали с ферментным препаратом в соотношении 2.5 : 1, после 40 мин инкубации при 22–25°C отмывали 3 раза фосфатным буфером, пятикратно превышающим объем раствора белка. Количество белка, связанного с активированным хитозаном, определяли по разности концентрации белка в растворе до и после контакта с носителем. Полученный иммобилизованный препарат хранили при температуре от 0 до +10°C.

Нитрилгидратазную активность растворенного и иммобилизованного фермента определяли по концентрации акриламида, образующегося за 10 мин трансформации раствора акрилонитрила (НАК). Удельную активность нитрилгидратазы (Е) выражали в мкмоль амида/мг белка мин.

Концентрацию акриламида определяли методом ВЭЖХ на хроматографе LC-10 (“Shimadzu”, Япония) с колонкой Synergi 4u Hydro-RP 80A (250 × 4.6 мм). В качестве подвижной фазы использовали 25 мМ NaH_2PO_4 , скорость потока составляла 0.75 мл/мин при 25°C, детекцию проводили при длине волны 200 нм.

Константу Михаэлиса (K_M) и максимальную скорость ($V_{\text{макс}}$) нитрилгидратазной реакции, катализируемой иммобилизованным ферментом и ферментом в растворе, вычисляли по графику Лайнуивера–Берка, построенному по методу двойных обратных величин. Для этого проводили реакцию трансформации растворов НАК в диапазоне концентраций от 0.015 до 1.36 М в 1–5 мл калий-фосфатного буфера (pH 7.2 ± 0.2) в течение 10 мин, реакцию останавливали добавлением концентрированной HCl до конечной концентрации 5%, концентрацию образующегося акриламида определяли методом ВЭЖХ.

Операционную стабильность нитрилгидратазы, иммобилизованной на активированном хитозане, оценивали по сохранению нитрилгидратазной активности при последовательном проведении 10 мин циклов конверсии 0.58 М раствора акрилонитрила. После проведения реакционного цикла гранулы хитозана с иммобилизованным на них ферментом отмывали калий-фосфатным буфером (pH 7.2 ± 0.2) и использовали в следующем цикле.

Зависимость активности иммобилизованной нитрилгидратазы и фермента в растворе от температуры определяли при проведении десятиминутной трансформации 0.58 М раствора акрило-

Каталитические свойства свободной и иммобилизованной нитрилгидратазы

Нитрилгидратаза	K_M , моль/л	V_{\max} , мкмоль/мг мин	$K_{\text{ин}}$, мин ⁻¹		
			40°C	50°C	60°C
В растворе	0.41 ± 0.15	50	6.6×10^{-3}	2.7×10^{-2}	1.4×10^{-1}
Иммобилизованная	0.17 ± 0.05	50	2.2×10^{-3}	2.4×10^{-2}	1.0×10^{-1}

нитрила при температуре от 10 до 70°C в калий-фосфатном буфере (pH 7.2 ± 0.2) с предварительным нагревом реакционной смеси до внесения субстрата в течение 10 мин. Нагрев и трансформацию субстрата осуществляли в термостате ТС – 1/80 СПУ (“Лабтех”, Россия). Реакцию останавливали, как описано выше. Концентрацию акрил-амида определяли методом ВЭЖХ.

Термостабильность фермента определяли следующим образом: иммобилизованную и нативную нитрилгидратазу в калий-фосфатном буфере (pH 7.2 ± 0.2) прогревали при 40, 50 и 60°C в течение 15, 30, 45 и 60 мин, резко охлаждали на ледяной бане и проводили реакцию трансформации 0.58 М раствора акрилонитрила при 22°C. Определяли нитрилгидратазную активность, как описано выше. Константы термоинактивации фермента ($K_{\text{ин}}$) вычисляли по графику зависимости натурального логарифма активности от времени экспозиции при данной температуре и выражали в обратных минутах (мин⁻¹).

Зависимость активности иммобилизованной нитрилгидратазы и фермента в растворе от pH реакционной среды изучали при проведении десятиминутной трансформации 0.58 М раствора акрилонитрила при 22°C в универсальном буфере Теорелла–Стенхагена [15] при pH от 2 до 10.5.

Результаты представлены средними значениями по трем независимым опытам. Экспериментальная ошибка составляет не более 15%.

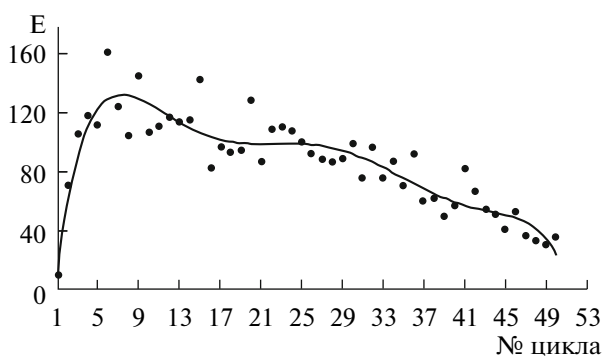


Рис. 1. Операционная стабильность иммобилизованной нитрилгидратазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетические параметры реакции гидратации акрилонитрила в акриламид, катализируемой иммобилизованной нитрилгидратазой и ферментом в растворе. Определено, что максимальная скорость нитрилгидратазной реакции (V_{\max}), катализируемой ковалентно иммобилизованным ферментом, может достигать V_{\max} реакции с участием фермента в растворе – 50 мкмоль/мг мин. Сохранение ферментативной активности при иммобилизации указывает на то, что бензохинон в качестве бифункционального реагента эффективно связывает молекулу фермента с хитозаном, не затрагивая ее активный центр. В то же время константа Михаэлиса (K_M) нитрилгидратазы, ковалентно присоединенной к хитозану, снижается в 2.4 раза и составляет 0.17 ± 0.05 моль/л (таблица). Т.к. по определению V_{\max} и K_M – константы уравнения скорости реакции, выведенного для определения ферментативной активности в разбавленном растворе, в случае иммобилизованных ферментов следует говорить о “кажушейся” константе Михаэлиса [16]. Действительно, субстрат ферментативной реакции остается прежним, и в этом случае снижение K_M может являться результатом различных эффектов распределения молекул субстрата и продукта, возникающих при иммобилизации фермента, либо отражать изменение сродства фермента к субстрату в результате конформационных изменений самого активного центра при ковалентном присоединении молекулы фермента к носителю. Эффект снижения K_M описан в работах, касающихся адсорбционной иммобилизации липазы на хитозане [9].

Операционная стабильность иммобилизованной нитрилгидратазы. При проведении последовательных циклов конверсии акрилонитрила была выявлена высокая операционная стабильность иммобилизованной нитрилгидратазы (рис. 1). Во втором и нескольких последующих (до 6) циклах реакций было отмечено возрастание нитрилгидратазной активности в 18 раз по сравнению с первым циклом, затем постепенное снижение активности, которая в 50 цикле была в 3.5 раза выше, чем в первом. Стабильность иммобилизованного фермента при повторном многократном использовании можно объяснить жестким фиксированием его молекулы на носителе, предотвращающим диссоциацию гетеромера и потерю структуры

субъединиц. Вымывание фермента из носителя также не происходило благодаря ковалентным связям, образованным между его молекулой, бифункциональным реагентом и хитозаном. Для объяснения эффекта возрастания нитрилгидратазной активности были проведены эксперименты по адсорбции продукта реакции — акриламида на активированном хитозане с иммобилизованным на нем белком. Определено, что из 1%-ного (вес/об.) раствора акриламида адсорбируется 25% вещества. Из этого можно сделать вывод, что повышение концентрации акриламида во втором цикле реакции в некоторой степени связано не с повышением активности, а со снижением величины адсорбции продукта за счет взаимодействия с амидом части реакционноспособных групп хитозана и активатора в предыдущем цикле. Т.к. для объяснения 18-кратного возрастания активности с 1 по 6 цикл этого недостаточно, можно высказать предположение, что дробное введение субстрата в реакционную среду вызывало адаптацию каталитического центра фермента к данному субстрату, приводя к увеличению скорости фермент-субстратных взаимодействий.

При многоцикловой конверсии акрилонитрила определено, что иммобилизованный ферментный препарат в количестве 1.4 мг (по белку) за 8.3 ч образует 60 ммоль акриламида.

Зависимость нитрилгидратазной активности от температуры и термоинактивация свободной и иммобилизованной нитрилгидратазы. Известно, что в отличие от оптимума рН не существует температурного оптимума активности ферментов, т.к. зависимость активности от температуры является результатом наложения двух различных процессов: ускорения движения молекул при повышении температуры и денатурации белка, зависящей от температуры и времени ее воздействия [15]. По нашим данным, температурный оптимум активности сдвигался в сторону более высоких значений температуры при увеличении концентрации фермента в растворе. Так, при количестве белка в растворе 0.45–0.5 мг максимальная активность наблюдалась при 30–40°C, а при увеличении количества белка в растворе до 1.1 мг — при 50°C. Интересно, что подобная зависимость активности от температуры прослеживалась и у иммобилизованного фермента: при иммобилизации на хитозане от 0.8 до 2 мг белка максимальная активность наблюдалась при 45°C, от 3.8 до 4 мг — при 55°C. Пример зависимости нитрилгидратазной активности свободной и иммобилизованного фермента от температуры показан на рис. 2. Известно, что зависимость кинетики инактивации от концентрации фермента является критерием диссоциативной инактивации [17]. Таким образом, концентрационная зависимость термоинактивации согласуется с данными об олигомерной структуре нитрилгидратазы [6].

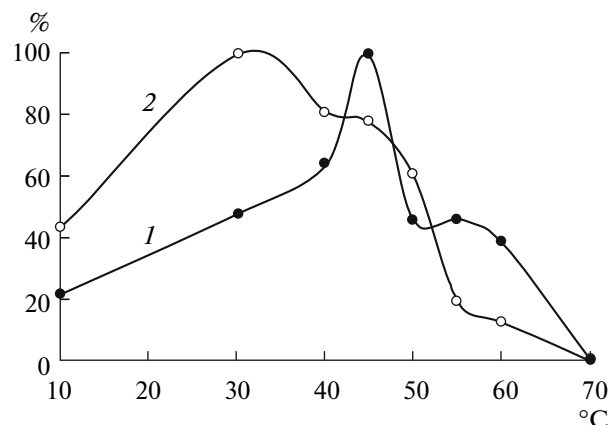


Рис. 2. Зависимость активности (%) нитрилгидратазы от температуры: 1 — иммобилизованной на активированном хитозане; 2 — в растворе. Количество белка в растворе — 0.5, иммобилизованного — 0.8–1.5 мг в 10 мл реакционной смеси. 100% — максимальная активность иммобилизованной и свободной нитрилгидратазы соответственно.

Определены константы термоинактивации иммобилизованной нитрилгидратазы и фермента в растворе (таблица). Показано, что ковалентно иммобилизованная нитрилгидратаза более термостабильна, чем находящаяся в растворе (рис. 3). Наиболее вероятно, что увеличение термостабильности связано с тем, что ковалентная сшивка фермента с носителем предотвращает диссоциацию фермента на субъединицы, происходящую при повышении температуры, а также усиливает общую жесткость молекулы фермента, приводя к его стабилизации [18].

Зависимость активности свободной и иммобилизованной нитрилгидратазы от рН. Показано, что нитрилгидратаза, иммобилизованная на хитозане, проявляет активность при более низких значениях рН, чем фермент в растворе, который инактивируется при рН < 4.0 (рис. 4). Оптимум рН для нитрилгидратазы в растворе более узкий и находится в нейтральной области, тогда как ковалентно связанный фермент проявляет активность, близкую к максимальной, в более широком диапазоне рН — от 5.0 до 7.0. В щелочном диапазоне рН > 10.0 инактивируется и свободный, и иммобилизованный фермент. Подобный эффект влияния рН на активность иммобилизованной нитрилгидратазы можно объяснить природой носителя — хитозана. В данном случае рН в макроокружении фермента, где происходят измерения, отличается от рН микроокружения фермента, на которое оказывает воздействие носитель. Большое количество свободных аминогрупп в молекуле хитозана определяет его свойство связывать ионы водорода и приобретать избыточный положительный заряд [8, 9]. Т.к. поликатионы обычно отталкивают протоны, то вблизи фермен-

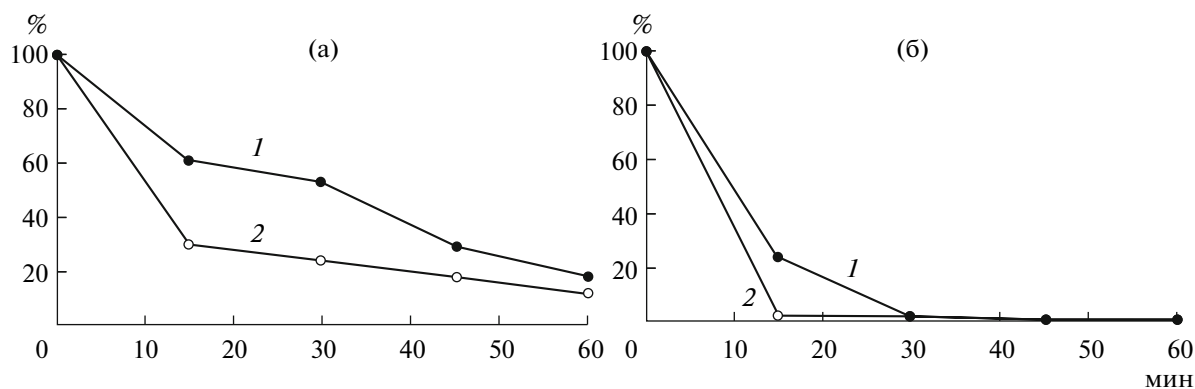


Рис. 3. Термоинактивация (%) нитрилгидратазы при 50 (а) и 60°C (б): 1 – иммобилизованной на активированном хитозане; 2 – в растворе. Количество белка в растворе – 0.3–0.7, иммобилизованного – 1.4–3 мг в 10 мл реакционной смеси. 100% – активность нитрилгидратазы при 22°C.

та рН будет выше, чем в свободном растворе, следовательно, рН-диапазон работы фермента расширится в сторону более низких значений.

Сравнивая два изученных способа иммобилизации нитрилгидратазы – адсорбцию (носители – оксиды алюминия и углеродсодержащие адсорбенты) и ковалентную сшивку (носитель – активированный хитозан), следует отметить преимущества ковалентной иммобилизации – высокую операционную стабильность и сохранение активности нативного фермента. В то же время адсорбция на модифицированных оксидах алюминия позволяла ферменту функционировать при 70°C с сохранением 30% максимальной активности, тогда как фермент, ковалентно сшитый с активированным хитозаном, при этой температуре инактивировался [12]. Следует отметить, что в настоящее время еще не получено достаточно продуктивных препаратов иммобилизованных нитрилгидратаз. По

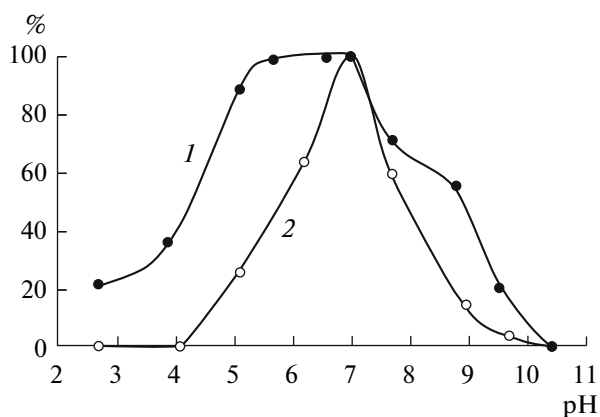


Рис. 4. Зависимость активности (%) свободной и иммобилизованной нитрилгидратазы от рН: 1 – иммобилизованной на активированном хитозане; 2 – в растворе. 100% – максимальная активность иммобилизованной и свободной нитрилгидратазы соответственно.

данным современной научной литературы, касающейся иммобилизации ферментов, широкое распространение получил метод поперечно-сшитых ферментных агрегатов (ПСФА), предложенный Р. Шелдоном [19]. Этот метод иммобилизации без носителя, включающий стадии осаждения частично очищенного фермента и его поперечную сшивку реагентом, был использован и для иммобилизации препарата частично очищенной нитрилгидратазы. ПСФА нитрилгидратазы, сохраняющие 88% активности нативного фермента, трансформировали оксо- и гидроксизамещенные нитрилы в соответствующие амиды [11]. Несмотря на успехи, достигнутые в стабилизации ферментов методом ПСФА, отсутствие носителя лишает иммобилизацию ряда преимуществ, среди которых легкость отделения продукта от реакционной среды и возможность создания непрерывных технологий.

Таким образом, в данной работе было показано влияние ковалентной иммобилизации нитрилгидратазы на хитозане на кинетические параметры реакции гидратации акрилонитрила в акриламид, операционную стабильность и термостабильность фермента, а также рН-зависимость его активности. Было обнаружено, что ковалентное присоединение нитрилгидратазы к активированному хитозану приводит к снижению K_M , в ряде случаев позволяет достичь V_{\max} реакции, катализируемой свободным ферментом, и дает возможность многократного использования биокатализатора с сохранением активности. Было показано, что влияние температуры на активность фермента зависит от его концентрации, что подтверждает диссоциативный характер инактивации нитрилгидратазы. Показано, что иммобилизация дает возможность ферменту функционировать при более низких значениях рН и расширяет диапазон рН, при котором активность близка к максимальной. Использование раствора бензохинона в качестве бифункцио-

нального реагента для ковалентной сшивки фермента с хитозаном позволяет получить активный и стабильный иммобилизованный препарат нитрилгидратазы. Полученный биокатализатор может быть использован в процессах трансформации акрилонитрила в акриламид с достаточной степенью эффективности.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг., государственный контракт 02.740.11.0078.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kobayashi M., Nagasawa T., Yamada H. // Trends Biotechnol. 1992. V. 10. P. 402–408.
2. Kobayashi M., Shimizu S. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2000. V. 4. P. 95–102.
3. Астаурова О.Б., Погорелова Т.Е., Фомина О.Р., Полякова И.Н., Яненко А.С. // Биотехнология. 1991. № 5. С. 10–14.
4. Вейко В.П., Яненко А.С., Алексеева М.Г., Синтин А.А., Гулько Л.Б., Ратманова К.И., Овчарова И.В., Андреева Л.Б., Астаурова О.Б., Полякова И.Н., Пауков В.Н., Воронин С.П., Дебабов В.Г. // Биотехнология. 1995. № 5–6. С. 3–5.
5. Астаурова О.Б., Леонова Т.Е., Полякова К.Н., Синюк И.В., Гордеев В.К., Яненко А.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 1. С. 21–25.
6. Kobayashi M., Shimizu S. // Eur. J. Biochem. 1999. V. 261. P. 1–9.
7. Мартинек К., Березин И.Б. // Успехи химии. 1980. № 5. С. 737–770.
8. Krajewska B. // Enzyme Microb. Technol. 2004. V. 35. P. 125–139.
9. Ковалева Т.А., Беленова А.С., Сливкин А.И., Лапенко В.Л. // Биотехнология. 2010. № 4. С. 59–64.
10. Betancor L., López-Gallego F., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Dellamora-Ortiz G., Mateo C., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M. // Enzyme Microb. Technol. 2006. V. 39. P. 877–882.
11. Kubác D., Kaplan O., Elišáková V., Pátek M., Vejvoda V., Slámová K., Tóthová A., Lemaire M., Gallienne E., Lutz-Wahl S., Fischer L., Kuzma M., Pelantová H., van Pelt S., Bolte J., Křen V., Martínková L. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2008. V. 50. P. 107–113.
12. Максимова Ю.Г., Демаков В.А., Максимов А.Ю., Овечкина Г.В., Коваленко Г.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 4. С. 416–421.
13. Патент РФ. 2004. № 2223316.
14. Практическая химия белка / Ред. А.М. Дарбре. М.: Мир, 1989. С. 297–298.
15. Биссвангер Х. Практическая энзимология. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. С. 96.
16. Тривен М. Иммобилизованные ферменты. М.: Мир, 1983. 213 с.
17. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс. М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. 720 с.
18. Fernández-Lafuente R. // Enzyme Microb. Technol. 2009. V. 45. P. 405–418.
19. Sheldon R.A. // Biochem. Soc. Trans. 2007. V. 35. P. 1583–1587.

Catalytic Properties of a Nitrile Hydratase Immobilized on Activated Chitosan

Yu. G. Maksimova^a, T. A. Rogozhnikova^b, G. V. Ovechkina^a, A. Yu. Maksimov^a, and V. A. Demakov^a

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

^b Perm State University, Perm, 614990

e-mail: maks@iegm.ru

Received June 29, 2011

Abstract—The catalytic properties of a nitrile hydratase, isolated from a strain of *Rhodococcus ruber* gt1 and immobilized by covalent cross-linking with chitosan activated with 0.1% benzoquinone solution, have been investigated. The kinetic parameters of acrylonitrile hydration catalyzed by immobilized nitrile hydratase and the enzyme in a solution have been determined. It is found that the immobilization does not lead to a decrease in the maximum reaction rate (V_{\max}), whereas the Michaelis constant (K_M) is reduced by a factor of 2.4. The possibility of reusing an immobilized enzyme for 50 consecutive cycles of acrylonitrile transformation was shown, and the nitrile hydratase activity in the 50th cycle exceeded that in the first cycle by 3.5 times. It is shown that the effect of temperature on activity depended on the concentration of the enzyme, which confirms the dissociative nature of nitrile hydratase inactivation. It was found that immobilized nitrile hydratases remain active at pH 3.0–4.0, whereas the enzyme is inactivated in a solution under these conditions. The resulting biocatalyst can be effectively used to receive acrylamide from acrylonitrile.

UDC 663.1

PRODUCTION OF CELLULASE BY IMMOBILIZED WHOLE CELLS OF *Haloarcula*

© 2012 A. Ogan*, O. Danis*, A. Gozuacik*, E. Cakmar*, M. Birbir**

*Faculty of Arts and Sciences, Chemistry Department, Marmara University, 34722 Goztepe-Istanbul, Turkey

**Faculty of Arts and Sciences, Biology Department, Marmara University, 34722 Goztepe-Istanbul, Turkey

e-mail: aogan@marmara.edu.tr

Received August 29, 2011

Halophilic Archaea are adapted to a life in the extreme conditions and some of them are capable of growth on cellulosic waste as carbon and energy source by producing cellulase enzyme. The production of cellulase using free and immobilized cells of halophilic archaeal strain *Haloarcula* 2TK2 isolated from Tuzkoy Salt Mine and capable of producing cellulose was studied. The cells were cultured in a liquid medium containing 2.5 M NaCl to obtain the maximum cellulase activity and immobilized on agarose or polyacrylamide or alginate. Optimal salt dependence of free and immobilized cells of *Haloarcula* 2TK2 was established and the effects of pH and temperature were investigated. Immobilization to Na-alginate enhanced the enzymatic activity of the haloarchaeal cells when compared to free cells and other polymeric supports. From the results obtained it is reasonable to infer that decomposition of plant polymers into simpler end products does occur at high salinities and cellulase producing haloarchaeal cells may be potentially utilized for the treatment of hypersaline waste water to remove cellulose.

The microbial conversion of cellulose to soluble compounds requires the action of cellulase. Cellulases can be divided into 3 main groups of enzymes: endocellulase (EC 3.2.1.4), exocellulase (EC 3.2.1.91), and β -glucosidase (EC 3.2.1.21) [1–3]. Cellulases have a huge economic potential in the conversion of plant biomass into fuel and chemicals, and also find applications in the food and detergent industries [4]. Although a large number of microorganisms are capable of degrading cellulose, only a few of them produce significant quantities of cellulase [5–7]. Fungi are the main cellulase producing microorganisms though a number of bacteria and *Actinomycetes* have been reported to yield cellulase activity [1, 8]. There appears to be a tendency for a broader range of carbohydrate utilization in more extreme environments such as halophilic, perhaps as consequence of cellulose input, possibly combined with the presence of fewer competing species in these habitats [7, 9]. Halophilic Archaea are a group of microorganisms that inhabit natural environments containing high salt concentrations, e.g. salt lakes and mines, crystallizer ponds of solar salterns or artificial habitats such as salted fish, vegetables, meat and hides [5, 10, 11]. Hydrocarbon-degrading isolates have been isolated from hypersaline environments and some cellulase-producing haloarchaea bacteria obtained from the Tuzkoy Salt Mine belonging to *Haloarcula* have been reported by Birbir et al. [7]. Cellulosic waste in the mine might have been utilized as carbon source by *Haloarcula* strains. *Haloarcula* is distinguished from other genera in the Halobacteriaceae family by the presence of specific derivatives of triglycosyl diether-2 (TGD-2) polar lipids [12]. Since im-

mobilization of archeal cells and a detailed mechanism study have not been performed before and also to obviate costly and tedious purification procedures that may inactivate the enzyme and to retain the enzyme's native geometry and microenvironment [13, 14]. The aim of the study was to immobilize whole cells of *Haloarcula* 2TK2 on polyacrylamide or Na-alginate and or agarose. The effect of entrapment in different matrixes was evaluated by the determination of the cellulose activity and stability and the results obtained were compared with those of the free cells. Potential usage of the *Haloarchaeal* cells for the biological treatment of saline and hypersaline waste water to remove organic carbon was discussed.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Carboxymethyl cellulose (CM-cellulose), casamino acids, yeast extract, Na-alginate, agarose and acrylamide were purchased from Merck, (Germany). All the chemicals used were analytical grade.

Microorganism. A cellulase producing strain 2TK2 was isolated in our laboratory (Marmara University, Biology Department, Turkey). Identification of the organism was achieved by microbiological and biochemical tests [12]. DNA sequences and phylogenetic analysis revealed that the isolated strain was mainly species of the genus *Haloarcula* [7].

Production. The cells of *Haloarcula* 2TK2 were grown for 7 days at 40°C in a liquid medium (g/l): CM-cellulose – 3.0, KCl – 2.0, MgSO₄ · 7H₂O – 20,

casamino acids – 1.0, yeast extract – 1.0 and 2.5 M NaCl in an orbital shaker incubator [12]. The resulting culture suspension was adjusted to the McFarland nephelometer standard number 3.0 [12–15]. The cells were separated by centrifugation at 10000 g and 4°C for 30 min [16]. The packed cells were suspended in sterile 2.5 M NaCl solution.

Immobilization of whole cells to polyacrylamide, alginate and agarose. The sedimented cells were immobilized on polyacrylamide or alginate or agarose.

Polyacrylamide immobilization. 750 mg of acrylamide monomer and 40 mg of methylenebisacrylamide monomer were mixed in 2 ml of 2.5 M NaCl. The wet *Haloarcula* 2TK2 cells (2.5 g) were added to this solution. 70 µl of TEMED were added as polymerization agent. Polymerization was completed in 20 min at 25°C. The gels formed were cut into pieces in assay buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) with 10 µM MnCl₂, 0.1% β-mercaptoethanol (w/v) and 2.5 M NaCl. Any free cells were removed by washing with 2.5 M NaCl solution [13, 14].

Alginate immobilization. Sterile 3% sodium alginate suspension (w/v) was prepared by suspending sodium alginate in assay buffer. The wet *Haloarcula* 2TK2 cells (2.5 g) were suspended in 5 ml of 2.5 M NaCl and stirred thoroughly to ensure complete mixing. 1 ml of cell paste was suspended in 50 ml of alginate solution. Alginate mixture was added dropwise to 1.0 l of 0.15 M CaCl₂ with constant stirring and the addition was continued until the desired number of beads was obtained. Alginate beads were washed with 2.5 M NaCl solution and filtered [13, 14].

Agarose immobilization. Agarose solution was prepared by dissolving agarose (3% w/v) in 2.5 M NaCl at 100°C. The solution was cooled to 40°C and mixed with 2.5 g of the wet *Haloarcula* 2TK2 cells. The mixture was allowed to cool at room temperature. The gel formed was shredded in a blender and free cells were removed by washing with 2.5 M NaCl solution [17].

Activation of immobilized beads. Immobilized cells were grown in the nutrient rich liquid medium containing (g/l): CM-cellulose – 10.0; casamino acids – 5.0; yeast extract – 5.0; NaCl – 250; MgSO₄ · 7H₂O – 20 and KCl – 2.0, at 40°C and 100 rpm for 7 days. After incubation, the immobilized cells were washed twice with 2.5 M NaCl and transferred to the nutrient poor liquid medium containing (g/l): CM-cellulose – 0.2, casamino acids – 0.1, yeast extract – 0.1, NaCl – 250, MgSO₄ · 7H₂O – 20 and KCl – 2. A nutrient poor medium was used as a reaction medium for improving the activity of cells [17].

Assay of the cellulase activity. The cellulase activity of *Haloarcula* 2TK2 was determined in triplicate with CM-cellulose as a substrate and glucose as the product [18, 19]. Released glucose was determined in a hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase system at 340 nm. One unit of cellulase activity was defined as

0.01 mg of the glucose formation per min from CM cellulose at 25°C.

The effect of pH on the stability of cellulose of *Haloarcula* 2TK2. The effect of different values of pH from 4.0 to 12.0 on the stability of the enzyme was measured, both for free and immobilized cells of *Haloarcula* 2TK2, at optimal salt concentration [13, 17].

The effect of salt on the activity of cellulose of *Haloarcula* 2TK2. The effect of NaCl concentration from 0.1 to 5 M on cellulase activity was determined by varying the concentration of NaCl used in the assay buffer whilst keeping all other conditions constant [20, 21].

The effect of temperature on the stability of cellulose of *Haloarcula* 2TK2. Temperature profile from 25 to 65°C on the cellulase activity both for free and immobilized cells were monitored at optimal salt concentration and pH [22].

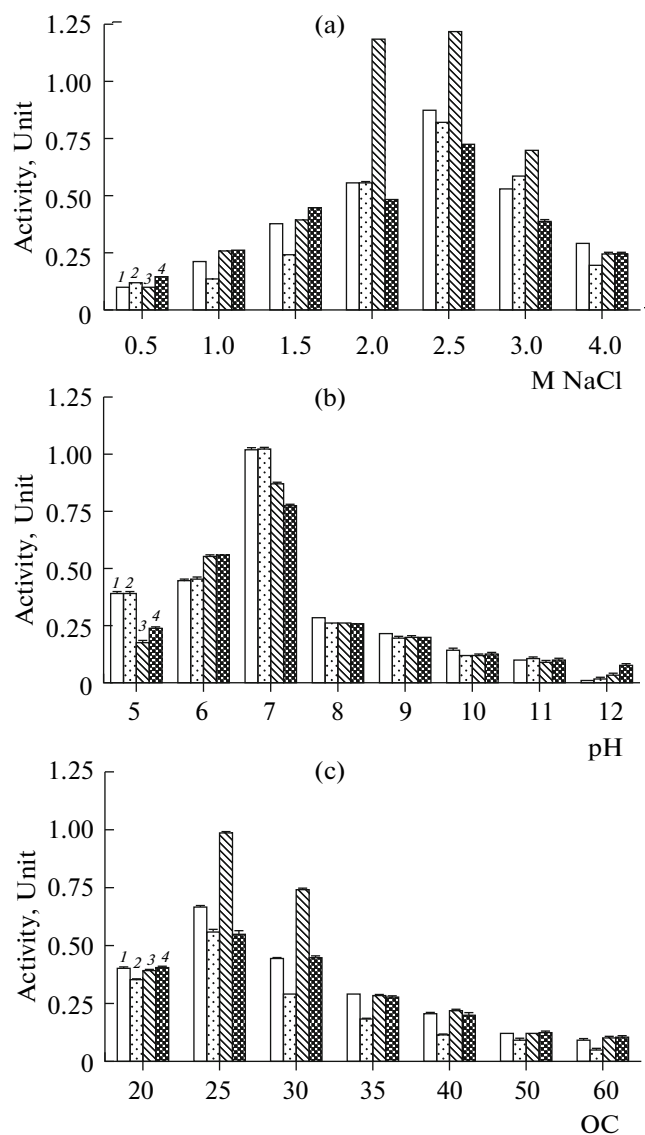
Storage stability. The storage stability of the immobilized *Haloarcula* 2TK2 cells on to alginate in nutrient poor liquid medium containing CM-cellulose as substrate (0.2 g) at 2–6°C was assessed by cellulase assays monitoring the production of glucose [13, 14].

RESULTS AND DISCUSSION

Although ability to digest cellulose is not common among halophils, some cellulase-producing microorganisms in hypersaline environments have been revealed [7, 9, 22, 23]. Birbir et al. [7] have showed the presence of cellulase-producing extremely halophilic archaeal strains in Tuzkoy Salt Mine. Among them *Haloarcula* 2TK2 displayed the highest cellulase activity [24]. *Haloarcula* like other members of the halobacteriaceae family requires at least 1.5 M NaCl for growth but its optimal growth is obtained in 2.0–4.5 M NaCl. Enzymes of *Haloarcula* are of potential interest, for example, amylase produced by *Haloarcula* sp. functions optimally at 4.3 M salt at 50°C and is stable in benzene, toluene and chloroform [25].

The results obtained revealed that the time required for optimum cellulase formation for the *Haloarcula* 2TK2 cells was 7 days. Cellulase-producing strain preferred to hydrolyze CM-cellulose rather than avicel as substrate indicating that the strain is mainly endocellulase producer [26]. Nutrient poor medium as reaction medium has been used to improve the activity [15]. The effect of salt concentration of the enzyme working solution and pH on the cellulase activity of the free *Haloarcula* 2TK2 cells and the cells immobilized on polyacrylamide or alginate or agarose are presented in Figure a and b respectively and the effect of temperature on enzyme activity of free and immobilized cells are shown in Figure c.

Maximum cellulase activity was attained at 2.5 M NaCl both for the free and immobilized *Haloarcula* 2TK2 forms. Cellulase activity of the cells immobilized on alginate was significantly higher than that of free cells (Figure a) but for the cells immobilized to



The effect of salt concentration (a), pH (b) and temperature (c) on cellulase activity for free the *Haloarcula* 2TK2 (1) cells and cells immobilized on polyacrylamide (2) or alginate (3) or agarose (4).

polyacrylamide and agarose it was significantly lower when compared to free cells ($p < 0.001$). Cellulase that we obtained from *Haloarcula* 2TK2 is highly salt tolerant but its specific activity was lower when compared to the enzyme from halophilic bacteria *Salinivibrio* sp. strain NTU-05 described by Wang et al. [22] since they found the maximum specific activity at 0.1 M NaCl as 32.4 U/mg. The optimum pH for cellulase of *Haloarcula* 2TK2 was present over a broad range and showed maximum activity at pH 7.0 (Figure b). Cellulase activities of free cells and the cells immobilized on 3 supports were similar to each other and dramatically higher at pH 7.0 in comparison to other pH. The results in Figure c demonstrate that the optimal temperature of cellulase of *Haloarcula* 2TK2 was 25°C. Cells immo-

bilized to alginate showed higher activity than those of free cells and the cells immobilized to polyacrylamide and agarose ($p < 0.001$). Polyacrylamide and agarose were not a good support for the cells perhaps due to the diffusional barriers set up by the gel against the transport of the substrates [27]. It is important to note that not only the isolated haloarchaeal strain was extremely salt tolerant but it was also capable of retaining stability at ambient pH and temperatures. A similar range of pH and optimal temperatures have been reported for halotolerant cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05 by Wang et al. [22].

Since agarose and polyacrylamide were not good supports, the storage stability of *Haloarcula* 2TK2 cells was only performed for alginate in nutrient poor liquid medium containing CM-cellulose as substrate (0.2 g). The cells were stable for 3 weeks, activity could not be determined at the end of 4-th week. Nutrient poor medium had been used instead of nutrient rich to improve the activity [15]. The nutrient poor storage medium for the immobilized *Haloarcula* 2TK2 cells by itself could not ensure the viability of the cells and the cells became eventually non-viable. The results showed that calcium alginate immobilization is a promising method for the halophilic archaeal cells. We can propose that micro-environment cage created by the alginate gel seems to be beneficial for haloarchaeal cells to maintain their activity [28].

The large volumes of cellulosic waste generated from households and industry is the largest contributor of organic pollution in salt sources [29]. The presence of cellulose-consuming microorganisms in the mine, confirms the organic pollution. For the biological treatment of the industrial waste waters with salt concentrations up to 10%, such as the brines generated by the pickling industry, aerobic treatment systems have been developed. But the results were satisfactory only at salt concentrations up to around 6%, at higher salinities the systems perform less well [30]. Future application of the *Haloarcula* 2TK2 cells immobilized to alginate at higher salinities appears to be a feasible and useful method for the treatment of hypersaline waste water to remove organic carbon.

For the halobacterial cells immobilized on sodium alginate, high enzyme activities relative to the free cells were obtained. The results showed that calcium alginate immobilization is a promising method for halophilic archaeal cells. The use of whole cells instead of isolated cellulase may obviate costly and tedious purification procedures that may inactivate the enzyme. Although a detailed mechanism study was not performed on the whole cells, we can conclude that the microenvironment created by alginate cage seems to be beneficial for the archaeal cells to maintain their activity and stability.

In conclusion, biologic treatment of hypersaline waste by extremely halophilic archaeal strains immobilized to alginate may bring to reduce the environ-

mental impact and cost of waste disposal in hypersaline environments.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was granted by the Marmara University Scientific Research Project Commission as project (project no: FEN-YSL-100105-0065, 2005).

REFERENCES

- Hall, D.O. and House, J.I., *Biomass. Bioenerg.*, 1994, vol. 6, no. 1–2, pp. 11–30.
- Reese, E., Siu, R., and Levinson, H., *J. Bacteriol.*, 1950, vol. 59, no. 4, pp. 485–494.
- Shoham, Y., Lamed, R., and Bayer, E.A., *Trends Microbiol.*, 1999, vol. 7, no. 7, pp. 275–281.
- Bhat, M.K., *Biotechnol. Adv.*, 2000, vol. 18, no. 5, pp. 355–383.
- Bailey, D.G. and Birbir, M.A., *J. Am. Leather Chem. Assoc.*, 1993, vol. 88, pp. 285–293.
- Limauro, D., Cannio, R., Fiorentino, G., Rossi, M., and Batolucci, S., *Extremophiles*, 2001, vol. 5, no. 4, pp. 213–219.
- Birbir, M., Calli, B., Mertoglu, B., Bardavid-Elevi, R., Oren, A., Ogmen, M.N., and Ogan, A., *World J. Microb. Biotechnol.*, 2007, vol. 23, pp. 309–316.
- Zhiyou, W., Wei, L., and Shulin, C., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2005, vol. 121, pp. 93–104.
- Simankova, M.V., Chernych, N.A., Osipov, N.A., and Zavarzin, G.A., *Syst. Appl. Microbiol.*, 1993, vol. 16, no. 3, pp. 385–389.
- Oren, A., *FEMS Microbiol. Rev.*, 1994, vol. 13, pp. 415–440.
- Anton, J., Rosselo-Mora, R.R., Rodriguez-Valera, F.R., and Amann, R., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 66, no. 7, pp. 3052–3057.
- Birbir, M., Ogan, A., Calli, B., and Mertoglu B., *World J. Microb. Biotechnol.*, 2004, vol. 20, pp. 613–621.
- Ellaiah, P., Prabhakar, T., Ramakrishna, B., Taleb, A.T., and Adinarayana, K., *Process Biochem.*, 2004, vol. 39, no. 5, pp. 525–528.
- Chen, J., Xu, Y., Xin, J., Li, S., Xia, C., and Cui, J., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2004, vol. 30, no. 3–4, pp. 167–172.
- Balows, A., Hausler, W.J., Hermann, K., Isenberg, H.D., and Shadomy, H.J., *Manual of Clinical Microbiology*, Washington: American Society for Microbiology, 1991, pp. 1296.
- Brodelius, P. and Vandamme, E.J., *Immobilized cell systems. Biotechnology*, 2nd Edn. Eds., Rehm, H.J., Reed, G., Pühler, A., and Stadler, P., Weinheim: Wiley-VCH, 1987, pp. 653–684.
- Velankar, H.R. and Heble, M.R., *J. Biotechnol.*, 2003, vol. 6, pp. 90–97.
- Almin, K. and Eriksson, K., *Arch. Biochem. Biophys.* 1968, vol. 124, no. 1, pp. 129–134.
- Rajoka, M.I. and Malik, K.A., *Biores. Technol.*, 1997, vol. 59, no. 1, p. 21.
- Studdert A.C., HerreraSeitz, M.K., Gil, M.I.P., Sanchez, J.J., and Castro, R.E., *J. Basic Microbiol.*, 2001, vol. 41, no. 6, pp. 375–383.
- Wright, D.B., Banks, D.D., Lohman, J.R., Hilsenbeck, J.L., and Gloss, L.M., *J. Mol. Biol.*, 2002, vol. 323, pp. 327–344.
- Wang, C.M., Hsieh, Y.R., Ng, C.C., Chan, H., Linc, H.T., Tzeng, W.S., and Shyu, Y.T., *Enzyme Microb. Technol.*, 2009, vol. 44, no. 6–7, pp. 373–379.
- Vreeland, R.H., Piselli, A.F., McDonnough, S., and Meyers, S.S., *Extremophiles*, 1998, vol. 2, no. 3, pp. 321–323.
- Gözüağaç, A., Ogan, A., Birbir, M., *Proceedings of the International Workshop on Bioengineering, Problems and Perspectives*, Istanbul:Yildiz Technical University, TUBITAK, 2004.
- Fukushima, T., Mizuki, T., Echigo, A., Inoue, A., and Usami, R., *Extremophiles*, 2005, vol. 9, no. 1, pp. 85–91.
- Kim, C.H., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, vol. 61, no. 3, pp. 959–965.
- D'souza, S.F., *Indian J. Microbiol.*, 1989, vol. 29, pp. 83–117.
- Norouzian, D., Javadpour, S., Mozami, N., and Akbarzadeh, A., *Enzyme Microb. Technol.* 2002, vol. 30, no. 1, pp. 26–29.
- Santos, C.A., Vieira, A.M., Fernandes, H.L., Empis, J.A., and Novais, J.M., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2001, vol. 76, pp. 1147–1153.
- Oren, A., *Environ. Technol.*, 2010, vol. 31, no. 8–9, 825–834.

UDC 577.150

FRUCTOSE 6-PHOSPHATE PHOSPHOKETOLASE ACTIVITY IN WILD-TYPE STRAINS OF *Lactobacillus*, ISOLATED FROM THE INTESTINAL TRACT OF PIGS

© 2012 E. Bolado-Martínez*, E. Acedo-Félix**,
A. B. Peregrino-Uriarte**, G. Yepiz-Plascencia**

*University of Sonora, Department of Chemical-Biological Sciences, 83000 Hermosillo, Sonora, Mexico

**Research Center for Food and Development, CP 83000, Hermosillo, Sonora, Mexico

e-mail: evelia@ciad.mx

Received May 27, 2011

Phosphoketolases are key enzymes of the phosphoketolase pathway of heterofermentative lactic acid bacteria, which include lactobacilli. In heterofermentative lactobacilli xylulose 5-phosphate phosphoketolase (X5PPK) is the main enzyme of the phosphoketolase pathway. However, activity of fructose 6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) has always been considered absent in lactic acid bacteria. In this study, the F6PPK activity was detected in 24 porcine wild-type strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus mucosae*, but not in the *Lactobacillus salivarius* or in *L. reuteri* ATCC strains. The activity of F6PPK increased after treatment of the culture at low-pH and diminished after porcine bile-salts stress conditions in wild-type strains of *L. reuteri*. Colorimetric quantification at 505 nm allowed to differentiate between microbial strains with low activity and without the activity of F6PPK. Additionally, activity of F6PPK and the X5PPK gene expression levels were evaluated by real time PCR, under stress and nonstress conditions, in 3 *L. reuteri* strains. Although an exact correlation, between enzyme activity and gene expression was not obtained, it remains possible that the *xpk* gene codes for a phosphoketolase with dual substrate, at least in the analyzed strains of *L. reuteri*.

Bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* are common inhabitants of the gastrointestinal tracts of vertebrate animals and have received considerable attention due to their putative health-promoting properties when they are ingested as probiotics. Although they comprise only a minor part of the bacterial community in human feces and animals, such as pigs, chickens, mice, and rats, lactobacilli are the predominant bacteria in the proximal regions of the gut [1]. Since low pH, bile acids and increasing osmolality are encountered by bacteria during gastrointestinal tract transit, gene expression in these conditions is likely to code for different proteins, including carbon and energy sources, which enable *Lactobacillus* to compete and survive better in hostile environment conditions [2]. Several strains of *Lactobacillus* also appear to be metabolically active *in vivo* in the intestine [3], however, the factors that allow lactobacilli to become established and persist in the gastrointestinal tract are unknown [1, 3].

Phosphoketolases are key enzymes of the phosphoketolase pathway of heterofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria, and of the fructose 6-phosphate shunt of bifidobacteria. Phosphoketolases catalyze an irreversible thiamine diphosphate dependent phosphorolytic reaction splitting d-xylulose-5-phosphate (X5PPK, EC 4.1.2.9) or d-fructose-6-phosphate (F6PPK, EC 4.1.2.22) in the presence of inorganic phosphate [4]. Bifidobacteria have

two distinct types of F6PPK. One is specific for fructose 6-phosphate; the other is less stringent and is able to utilize d-xylulose-5-phosphate as an alternative substrate. The dual-specific X5P/F6PPK is encoded by the gene *xfp*, first described in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* [5].

In heterofermentative lactobacilli, X5PPK is the central enzyme of the phosphoketolase pathway. This enzyme is encoded by the gene *xpk* [6], and is the only phosphoketolase activity expected. Moreover, for many years it has been stated that “the most direct and reliable characteristic for the assignment of Gram-positive rod shaped bacteria to the genus *Bifidobacterium* is that based on the demonstration of F6PPK in cellular extracts” [7]. This taxonomic criterion is still used for a rapid identification of the *Bifidobacterium* genus [8] and to demonstrate that novel strains are members of the genus *Bifidobacterium* [9]. Nevertheless, it has been demonstrated that other related genera: *Gardnerella*, also possesses the activity of this enzyme [10].

Four years ago, publications of protein sequences in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) were reporting the presence of F6PPK in *Lactobacillus reuteri* (accession number: ZP_01273782). However, recently this sequence was removed “because it has been superseded by a new assembly of the genome” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/92088824>). Nevertheless, to our knowledge,

no other genus belonging to lactic acid bacteria, that colonizes the gastrointestinal tract of vertebrates, has been associated with F6PPK activity.

The aim of the present study was to evaluate the presence of F6PPK, under stress and nonstress conditions, in wild-type strains of *L. reuteri* and *L. salivarius*, isolated from the intestinal tract of pigs. Moreover, in 3 wild-type strains of *L. reuteri*, the expression level of the xylulose 5-phosphate phosphoketolase gene, was evaluated by correlation search between the F6PPK activity and *xpk* gene expression under stress and nonstress conditions.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. The bacterial strains, including 39 strains *Lactobacillus* and 6 strains of *Bifidobacterium*, used in this study are listed in Table 1. The wild-type strains were isolated from the gastrointestinal tract of healthy post-weaning and slaughtered adult pigs, and characterized by polyphasic taxonomy in a previous work [11]. Wild-type *Lactobacillus* and *L. reuteri* ATCC 53608 strains were grown at 37°C in 5% CO₂ atmosphere in MRS (Man, Rogosa & Sharpe) broth (Difco, USA). *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* ATCC 29602 and *L. salivarius* subsp. *salicinus* ATCC 11742 strains were grown at 37°C in MRS broth under aerobic conditions. *Bifidobacterium* strains were grown anaerobically at 37°C in MRS broth, (pH 6.0) supplemented with 0.05% (w/v) cysteine hydrochloride (Sigma, USA). All strains were conserved in MRS broth with glycerol (20% v/v) at -20°C.

The F6PPK activity. The detection of F6PPK activity was carried out as previously described [12]. All reagents were obtained from Sigma (USA). The ability of the bacterial strains to express F6PPK, after stress conditions, was evaluated as follows: all the wild-type strains were grown overnight in MRS broth at 37°C as described previously. After incubation, culture media were distributed into 3 aliquots. One aliquot was kept at 37°C in 5% CO₂ and used as control. The other two aliquots were centrifuged to precipitate the cell pack (5 min at 2000 g). One of the pellets was suspended in MRS broth, pH 3.0 (low pH), and the other one was suspended in MRS broth with 0.5% (w/v) porcine bile salts. Both samples were incubated for 1 h at 37°C in aerobic conditions and used with control sample for the detection of F6PPK activity. Subsequently, they were centrifuged to clarify the bacterial suspension (5 min at 2600 g) and absorbance was measured at 505 nm spectrophotometrically. Each procedure was carried out by duplicate.

Absorption spectra. Some samples obtained from different strains of lactobacilli and bifidobacteria were selected for absorption spectra measurement. Ultraviolet/visible difference spectra with tandem trays were carried out in an Ultrospec 400 (Pharmacia Bio-

Table 1. Bacterial strains used in this study

Species	Code	Source
<i>B. breve</i>	ATCC 15700, CECT 4839	Human
<i>B. infantis</i>	ATCC 15697	Human
<i>B. longum</i>	CECT 4503	Human
<i>B. angulatum</i>	CECT 5775	Human
<i>B. lactis</i>	Bb12	Lactic product
<i>L. reuteri</i>	ATCC 53608, 2, 30, 32, 107, 119, 124, 169, 676, 703, 1415, 1447, 1703, 1704, 1705, 1709, 1715, 1717, 1722, 1723, 1725, 1726, 1729, L6D14	Pig
<i>L. salivarius</i>	L5I22, L6D6, L6YD6, L7Y17, L7Y18, L7Y20, L7Y21, L7Y24, L7Y28, L8YD6, L8YD15, L8I7	Piglet
<i>L. mucosae</i>	L7Y23	Piglet
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	ATCC 29602, ATCC 11742	Human
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salicinus</i>	ATCC 11742	

tech, UK). Difference spectrum was obtained by subtracting the contribution of the blank control (all the reagents used in the detection of F6PPK activity, except the microorganism) spectrum.

Protein quantification. In order to obtain an adjusted value for enzymatic activity, protein measurement was performed in an aliquot of the selected samples after cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) treatment as previously described [12]. Total proteins were obtained by a trichloroacetic acid precipitation procedure, as previously described [13]. Total protein in the crude cell extract was quantified with the Bradford protein assay, and the quotient OD₅₀₅/total protein was obtained for the adjusted value of phosphoketolase activity.

Statistic analysis. Differences between species were evaluated by two samples t-tests. Differences between stressing and not stressing conditions were evaluated by paired t-tests. All statistics were performed in a standard computerized statistical program (NCSS statistical software, USA). A probability of $p < 0.05$ in two tailed test was used as the criterion for statistical significance.

Bacterial strains and culture conditions for *xpk* gene expression. Wild type *L. reuteri* strains 2,676 and 1704 were grown at 37°C in 5% CO₂ atmosphere in MRS broth for 10–11 h. After incubation, culture media were divided in 4 aliquots. 3 aliquots were used to make the control, low-pH and bile-salts samples as it was described in chapter “The F6PPK activity”. The fourth aliquot after centrifugation and the low pH treatment was centrifuged again, suspended in MRS broth with 0.5% (w/v) porcine bile salts and incubated

for 1 h at 37°C in aerobic conditions. After incubation, all the samples: control, low-pH, bile-salts and low-pH+bile-salts were used for RNA isolation. The same stress procedures were used to evaluate the F6PPK activity. After incubation, all the samples and one positive control (*B. breve* strain), were used for the detection of F6PPK as mentioned above. Each procedure was carried out by triplicate.

Real time PCR (RT-PCR). Total RNA was isolated from all the treatments of the three wild-type strains of *L. reuteri* using RNeasy Protect Bacteria reagent (Qiagen, Germany) and RNeasy mini kit (Qiagen, USA), according to manufacturer's protocols. Total RNA was quantified spectrophotometrically and the integrity was evaluated in a 1.2% agarose gel (Sigma, USA).

The primers for the xylulose 5-phosphate phosphoketolase gene XPK3F (5'-TTGATGCTTACTGGCGTG-3') and XPK4R (5'-AACTTGACCACCGTGACCT-3') were designed according to *xpk* sequence from *L. reuteri* strain ATCC 55730 (GenBank accession number DQ466581). 16S rRNA was used as internal control for normalization of expression [14] and the primers LR16S1F (5'-TTTGGCTATCACTCTGGGA-3') and LR16S2R (5'-CCGAAACCCTTCTTCACTC-3') were designed from a 180 to 200 bp consensus sequence obtained from the three wild-type strains as mentioned above. All primers were designed using DNAMAN software package (Lynnon, Canada). *In silico* comparisons and PCR amplification products confirmed that the 16S rRNA and X5PPK primers sets were specific for *L. reuteri* and would not hybridize to other *Lactobacillus* species neither to other related genera (data not shown). All primers were purchased from Sigma-Genosys (Sigma, USA) and evaluated by conventional PCR with genomic DNA, the resulting PCR products were purified using GFX columns (GE Healthcare, USA) and sequenced at the Genomic Analysis and Technology Core at the University of Arizona (USA). Sequences were compared to the data available at GenBank using BLAST software [15], available at NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

All the RNA samples were treated with DNase I (Sigma, USA) to eliminate any remaining genomic DNA contamination prior to cDNA synthesis. Reverse transcription was carried out using 100 ng of total RNA and the specific reverse primers with QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen, Germany), according to manufacturer's instructions. Negative controls (all the reagents except reverse transcriptase) were prepared for each treatment and each strain. The resulting cDNA samples were stored at -20°C until use.

RT-PCR amplification was performed in 96 well plates on an iQ5 RT-PCR detection system (Bio-Rad, USA), using SYBR green for the product detection. Each well contained SYBR green master mix (Bio-Rad, USA), 200 nM 16S rRNA or 800 nM X5PPK of each primer and cDNA synthesized from 100 ng of total RNA as template. Negative controls: NTC (no

template control) and NPC (no prime control) and reverse transcription negative controls were included for each treatment and each strain. PCR amplification was initiated at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 35 s and 72°C for 30 s. PCR specificity and product detection were evaluated by examining the dissociation curves of the PCR products. These melting curve profiles were generated by heating the samples from 60°C to 94.5°C for 30 s.

RT-PCR data analysis. For RT-PCR, all the samples and their respective negative controls were analyzed by triplicate and the averages of the C_T values were used for further analysis. Real time PCR amplification efficiencies were determined for each primer pair by standard curves generated by plotting the starting amplicon concentrations against the observed C_T values in serial ten-fold dilutions. The slope of the calibration curve was used to determine the reaction efficiency as $E = 10^{-1/\text{slope}}$ and final comparisons were done by double delta C_T analysis, and the mean, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) were then determined from the triplicate samples at each time point [16].

RESULTS AND DISCUSSION

F6PPK activity. The F6PPK test is considered the standard phenotypic assay in the identification of bacteria belonging to *Bifidobacterium* genus [7, 8] and to demonstrate that novel strains are members of this genus [9]. In this work, all the bifidobacteria strains showed a typical positive reaction, with colors from red to purplish, in the F6PPK assay. In contrast, all wild-type *L. salivarius* strains, *L. reuteri* ATCC 53608, *L. salivarius* subsp. *salivarius* ATCC 29602 and *L. salivarius* subsp. *salicinus* ATCC 11742 revealed a typical negative reaction to the test, with a pale yellow color.

However, the colors obtained for wild-type *L. reuteri* strains were from orange to red, and were clearly distinguishable from the typical yellow color observed in the negative controls and the *L. salivarius* strains, although not as intense as the *Bifidobacterium* strains. Furthermore, the authors of the original technique for detection of acyl phosphates, considered that "depending on the concentration of acyl phosphate the color shade will be from orange-brown to purplish brown" [17]. In fact, the appearance of a red to purple color is considered as positive, and a yellow color is considered a negative result of the test [12, 18]. In addition, some bifidobacterial strains do not have considerable phosphoketolase activity [18]. Differences between the absorbance values of wild-type *L. reuteri* and *L. salivarius* strains were clearly observed (Fig. 1). Whereas the mean absorbance for *L. reuteri* strains was 0.212 ± 0.046 , the mean absorbance for *L. salivarius* was 0.092 ± 0.022 in a two sample t-test analysis. Taking into account these results, it was considered that the *L. reuteri* strains were positive for the test and the

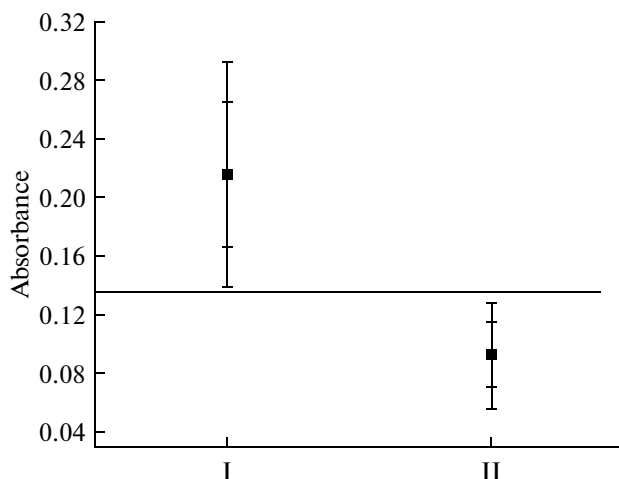


Fig. 1. F6PPK activity in 35 wild-type strains of lactobacilli. Representation of statistic values: mean, standard deviation and interquartile range, obtained for 23 wild-type strains of *L. reuteri* (I) and 12 wild-type strains of *L. salivarius* (II) in F6PPK activity.

L. salivarius strains were negative. The value of 0.260 obtained for the *L. mucosae* strain revealed F6PPK activity, similar to that observed in the *L. reuteri* strains.

Absorption spectra. The absorption spectra were quite different between strains. In Fig. 2, absorption spectra of selected strains are demonstrated. It could be seen that *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 displayed a characteristic increase in absorption between 480 and 505 nm. Although *L. reuteri* strains did not show an identical pattern to those obtained for bifidobacteria, it is possible to detect the same behavior between 479 and 490 nm. However, as mentioned above, it has been noted that some bifidobacterial strains do not have considerable phosphoketolase activity, but could be differentiated from other *Streptococcus* and *Lactobacillus* strains that did not lead to color development in the test [18]. Moreover, absorption spectra of *L. salivarius*, as it could be seen in *L. salivarius*, strain L7Y18 spectrum, showed a maximum absorption between 455 and 465 nm, values that correspond to the yellow color observed in the test,

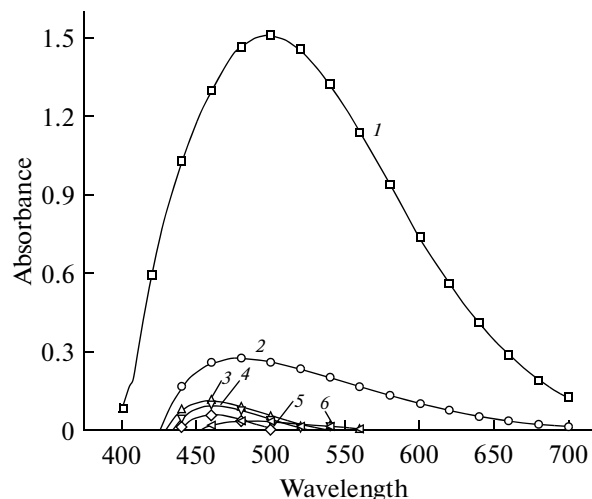


Fig. 2. Absorption spectra obtained from the F6PPK assay in the selected *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. 1 – *B. infantis* ATCC 15697; 2 – *L. reuteri* 676; 3 – *L. salivarius* subsp. *salivarius* ATCC 29602; 4 – *L. salivarius* subsp. *salicinum* ATCC 11742; 5 – *L. salivarius* L7Y18; 6 – *L. reuteri* ATCC 53608.

and at 505 nm it is possible to differentiate from *L. reuteri* (Fig. 2).

The only wild-type strain of *L. mucosae* evaluated, exhibited the F6PPK activity. This species has been previously isolated from pig's intestine and differentiated from other related species, but it is closely related to *L. reuteri* [19]. A possible explanation of our results is that the *L. reuteri* and *L. mucosae* phosphoketolases can utilize both substrates: xylulose 5-phosphate and fructose 6-phosphate, as it had been demonstrated for the bifidobacteria [5, 20] and *Leuconostoc oenos* phosphoketolases [21]. Another possible explanation for this low activity of F6PPK observed in *L. reuteri* wild-type strains could be that fructose 6-phosphate is not splitted as efficiently as the enzyme's original substrate: xylulose 5-phosphate.

Adjusted F6PPK activity. Selected strains were assayed to obtain adjusted F6PPK activity (Table 2). The absorption spectra were quite different between strains and although it could not be possible to obtain specific activity, since the enzyme was not purified, it was pos-

Table 2. Comparison between λ_{\max} and adjusted F6PPK activity in selected strains of lactobacilli and *B. infantis*

Strain	λ_{\max} , nm	OD $_{\lambda_{\max}}$	OD $_{505}$	Protein, $\mu\text{g/ml}$	Adjusted activity*
<i>L. reuteri</i> 676	481	0.273	0.252	55	0.0046
<i>L. salivarius</i> L7Y18	463	0.058	0	305	–
<i>L. reuteri</i> ATCC 53608	489	0.035	0.032	165	1.9×10^{-4}
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> ATCC 29602	462	0.111	0.045	634	7.09×10^{-5}
<i>L. salivarius</i> subsp. <i>salicinum</i> ATCC 11742	462	0.094	0.032	954	3.35×10^{-5}
<i>B. infantis</i> ATCC 15697	501	1.511	1.507	308	0.0048

* Adjusted the F6PPK activity according to protein concentration in the crude extract.

Table 3. Comparison of the F6PPK activity obtained for 23 wild-type strains of *L. reuteri* under stress and nonstress conditions

Treatment	Group	OD ₅₀₅	P*
Low pH	Control	0.215 ± 0.05	0.000004
	Low pH	0.298 ± 0.06	
Bile salts	Control	0.215 ± 0.05	0.00003
	Bile salts	0.163 ± 0.07	

* Two tailed paired t-tests.

sible to obtain adjusted phosphoketolase activity, according to protein concentration in the crude extract. In Table 2 it could be appreciated differences in λ_{\max} and OD₅₀₅ between all strains. However, when activity is adjusted to total protein content in crude extracts, activity of F6PPK is almost identical in *L. reuteri* strain 676 and *B. infantis* ATCC 15697.

In this work, wild-type strains of *L. salivarius* did not show F6PPK activity. These results are logical since this species is considered as obligate homofermentative, so it does not have phosphoketolase activity [22]. However, the complete genomic sequence of *L. salivarius* strain UCC118 has been obtained, and this strain contains genes that codify for enzymes of the phosphoketolase pathway. Although *L. salivarius* is currently regarded as homofermentative, the authors, based on these results, recommended that it should be grouped among facultative heterofermentative lactobacilli [23]. It could be that *L. salivarius* phosphoketolase is specific for xylulose 5-phosphate, that the expression of the enzyme requires some stimulation or that this enzyme is not functional, since the presence of the gene for phosphoketolase does not guarantee its expression, as observed previously in a great number of organisms [4].

F6PPK activity under stress conditions. After stress conditions with low pH and bile salts, the F6PPK activity remains negative in *L. salivarius* strains. A slight, and statistically significant, increase in absorbance values was detected after incubation with bile salts. As well, an increase in the mean from 0.092 in control to 0.112 after bile-salts treatment was detected, but these results remained negative. Another interesting feature evidenced in this work is that in *L. reuteri*, the phosphoketolase activity increased after exposure to low-pH stress and decreased after treatment by bile salts, as it could be seen in Table 3. It has been demonstrated that phosphoketolase expression increased in response to the combination of the lactic acid stress and a lower growth rate in *Lactobacillus plantarum* [24], and that the expression of proteins participating in the sugar metabolism is generally rather variable [25].

Since bile salts are toxic for bacterial cells, the autochthonous gastrointestinal microbiota must have developed strategies to prevent damage caused by bile

salts [26]. When wild-type strains of *L. reuteri* were stressed with porcine bile salts, the F6PPK activity diminished. These results do not agree with previous studies in *Bifidobacterium* strains. Sánchez and colleagues [27] found that *B. longum* NCIMB 8809 strain increases the F6PPK activity, after exposure to bile salts. Although some *L. reuteri* strains possess the bile salt hydrolase activity, and this property is utilized in the selection of potentially probiotic organisms [28], some studies had demonstrated that free bile acids are toxic to lactobacilli [29], and this condition could be the responsible for the low F6PPK activity detected in the bile-salts stress conditions.

F6PPK and *xpk* gene expression. Three wild-type strains of *L. reuteri* were selected for simultaneous evaluation of the F6PPK activity and mRNA levels of *xpk* gene after exposure to low pH, bile salts and low pH+bile salts. After these stress conditions the activity of F6PPK was characterized by high variability and distinct patterns in each strain. Although a great variability could be observed in Table 4, tendencies observed in the mean values of each treatment and controls were maintained in the replicas of each procedure. Using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [16], the data are presented as the fold change in mRNA levels as normalized to an endogenous reference gene (16S rRNA) and relative to the untreated control. Stress conditions influenced the *xpkA* gene expression in all strains. Low pH had more influence in strains 32 and 676 as shown in Table 4. However, low pH did not influence the mRNA levels of *xpk* in strain 1704.

In *L. lactis* subsp. *cremoris* MG 1363 the changes in glycolytic enzyme concentrations, under acid stress conditions, did not correlate directly with modifications in transcript concentrations because acceleration of glycolysis was regulated by both, an increase in the concentrations of glycolytic enzymes (hierarchical regulation) and the specific modulation of enzyme activities (metabolic regulation) [30]. Moreover, it has been documented that *L. reuteri* ATCC 55730, while growing in an optimal medium and when all the enzymes of both pathways are active, prefers the phosphoketolase functioning over the Embden-Meyerhoff pathway [2].

The F6PPK activity after consecutive stress with low pH and bile salts resulted in an apparent lower activity of the enzyme with similar results to those obtained after bile stress in strains 32 and 1704, but in strain 676 the result resembled more those obtained after low pH treatment. The low-pH+bile-salts stress showed similar results to those observed in bile-salts stress in strains 32 and 676. Whereas in the first strain the expression was almost the same with the treatment as in the control, in strain 676 the treatment with low-pH+bile-salts generated the highest levels of expression observed in this work. The increase of phosphoketolase gene expression in strain 1704 after low pH- bile salts treatment was notable since this was the only

Table 4. F6PPK activity and *xpk* expression, under stress and nonstress conditions in wild-type strains of *L. reuteri*

Strain	Treatment	F6PPK		
		OD ₅₀₅	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	CV*
32	Control	0.272 ± 0.107		
	Low pH	0.350 ± 0.112	2.10 ± 0.204	9.728
	Bile salts	0.185 ± 0.060	1.44 ± 0.092	6.405
	Low pH+ bile salts	0.178 ± 0.078	1.04 ± 0.098	9.450
676	Control	0.212 ± 0.091		
	Low pH	0.189 ± 0.065	3.93 ± 0.271	6.909
	Bile salts	0.099 ± 0.069	2.41 ± 0.523	21.712
	Low pH+ bile salts	0.179 ± 0.111	3.33 ± 0.384	11.542
1704	Control	0.194 ± 0.110		
	Low pH	0.242 ± 0.067	1.00 ± 0.074	7.445
	Bile salts	0.144 ± 0.065	0.67 ± 0.061	9.101
	Low pH+ bile salts	0.110 ± 0.074	1.84 ± 0.153	8.308

* CV – coefficient of variation.

treatment that really affected positively expression in this strain.

It is known that tolerance to some lethal treatments can be triggered by preexposure to sublethal pretreatments [31]. In *B. longum* NCIMB 8809, resistance level of bile-resistant derivatives was dependent on the external pH, decreasing at neutral values and increasing in acidic environments [26]. General stress proteins are induced by bile in agreement with the cross-protection against bile after thermal or detergent pretreatment that has been observed in several bacteria including *Listeria monocytogenes* [32], and *Bifidobacterium adolescentis* [33]. For example, *L. monocytogenes* LO28 cells are exquisitely sensitive to unconjugated bile acids, but prior adaptation to sublethal levels of bile acids or heterologous stresses, such as acid, heat, salt, or SDS, significantly enhanced bile resistance. This adaptation response was independent of protein synthesis, and in the cases of the bile and SDS adaptation, occurred in seconds [32].

Although the double delta C_T , results were not too high, variations in gene expression were detected in this study. In *L. plantarum* WCFS1 strain, the relative expression levels of the *in-vivo* inducible genes increased up to 350-fold in the mouse intestine compared to levels observed for the *L. plantarum* WCFS1 cells grown in a rich laboratory medium [3]. Moreover, several genes displayed intestinal compartment-specific (small intestine versus colon) activities, confirming that this strain displayed specific and differential responses at various sites along the mammalian intestine. Furthermore, comparisons of transcript levels found in stationary- and exponential-phase of the *L. plantarum* cells revealed that many genes were more

highly expressed in the stationary-phase cells fed to mice [3].

It is noteworthy that two genes and some insert sequences identified in *Lactobacillus reuteri* LTH5531 during type II sourdough fermentation were not present in the genome of *L. reuteri* ATCC 55730, which is a human isolate. As the available sequence is estimated to cover 90 to 95% of the complete genome, it was suggested that these genes or sequences may be located in the unsequenced regions or may not be present in the genome of the bacteria obtained from humans [34]. This situation must call the attention to some intriguing aspects related to the presence of specific genes, required, utilized or present only in some strains of the same species, but that colonize different hosts like pig and human.

In some cases, RNA levels may not correlate directly to the levels of the proteins produced by the cell, since post-transcriptional regulation occurs. RT-PCR data are totally uninformative about protein activity [35], but genome-wide transcript analyses using DNA microarrays will provide opportunities for even more comprehensive and integrative views of bacterial activities occurring within the intestinal tract [3].

In conclusion, activity of F6PPK was detected in porcine wild-type strains of *L. reuteri*, but not in wild-type *L. salivarius* or in ATCC *L. reuteri* and *L. salivarius* strains. This activity seems to be influenced by stress conditions in wild-type strains of *L. reuteri* and colorimetric quantification at 505 nm could differentiate between strains with low activity and strains without activity of phosphoketolase. Furthermore, low pH and porcine bile stresses influenced the X5PPK gene expression. Although an exact correlation, between enzyme activity and gene expression could not be ob-

tained, it remains possible that the *xpk* gene encodes for a phosphoketolase with dual substrate, at least in these *L. reuteri* strains.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología grant SEP-2004-C01-47691. Authors are thankful to E. Valenzuela, PhD and C. Figueroa, MSc for the invaluable technical assistance in absorption spectra analysis.

REFERENCES

- Walter, J., Heng, N.C.K., Hammes, W.P., Loach, D.M., Tannock, G.W., and Hertel, C., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, vol. 69, no. 4, pp. 2044–2051.
- Årsköld, E., Lohmeier-Vogel, E., Cao, R., Roos, S., Rådström, P., and van Niel, E.W.J., *J. Bacteriol.*, 2008, vol. 190, no. 1, pp. 206–212.
- Marco, M.L., Bongers, R.S., de Vos, W.M., and Kleerebezem, M., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 73, no. 1, pp. 124–132.
- Rohr, L.M., Teuber, M., and Meile, T., *Chimia*, 2002, vol. 56, no. 6, pp. 270–273.
- Meile, L., Rohr, L.M., Geissman, T.A., Herensperger, M., and Teuber, M., *J. Bacteriol.*, 2001, vol. 183, no. 9, pp. 2929–2963.
- Okano, K., Yoshida, S., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, vol. 75, no. 15, pp. 5175–5178.
- Scardovi, V. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. P.H.A. Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe, J.G., Holt, vol. 2, Baltimore: Williams Wilkins, 1986, p. 1418–1434.
- Martín, R., Jiménez, E., Heilig, H., Fernández, L., Marín, M.L., Zoetendal, E.G., and Rodríguez, J.M., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, vol. 75, no. 4, pp. 965–969.
- Watanabe, K., Makino, H., Sasamoto, M., Kudo, Y., Fujimoto, J., and Demberel, S., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2009, vol. 59, pp. 1535–1540.
- Gavini, F., Van Esbroeck, M., Touzel, J.P., Fourment, A., and Goossens, H., *Anaerobe*, 1996, vol. 2, no. 3, pp. 191–193.
- Bolado-Martínez, E. and Acedo-Félix, E., *Czech. J. Anim. Sci.*, 2009, vol. 54, no. 7, pp. 307–314.
- Orban, J.I. and Paterson, J.A., *J. Microbiol. Methods*, 2000, vol. 40, no. 3, pp. 221–224.
- Stone, K.L. and Williams, K.R. *A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*. Ed. P., Matsudaira, San Diego: Academic Press Inc., 1993, p. 43–69.
- Bustin, S.A., *J. Mol. Endocrinol.*, 2000, vol. 25, no. 2, pp. 169–193.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J., *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, no. 7, pp. 3389–3402.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., *Methods*, 2001, vol. 25, no. 4, pp. 402–408.
- Lipmann, F. and Tuttle, L.C., *J. Biol. Chem.*, 1945, vol. 159, no. 1, pp. 21–28.
- Bibiloni, R., Pérez, P.F., and De Antoni, G.L., *J. Food Prot.*, 2000, vol. 63, no. 3, pp. 322–326.
- Roos, S., Karner, F., Axelsson, L., and Jonsson, H., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2000, vol. 50, pp. 251–258.
- Sgorbati, B., Lenaz, G., and Casalicchio, F., *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1976, vol. 42, no. 1–2, pp. 49–57.
- Veiga-da-Cunha, M., Santos, H., and Van Schaftingen, E., *J. Bacteriol.*, 1993, vol. 175, no. 13, pp. 3941–3948.
- Kandler, O. and Weiss, N. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. P.H.A. Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe, J.G., Holt, vol. 2, Baltimore: Williams Wilkins, 1986, p. 1209–1234.
- Claesson, M.J., Li, Y., Leahy, S., Canchaya, C., Van Pijkeren, J.P., Cerdeño-Tárraga, A.M., Parkhill, J., Flynn, S., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K., Higgins, D., Shanahan, F., Fitzgerald, G.F., Van Sinderen, D., and O'Toole, P.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, no. 17, pp. 6718–6723.
- Pieterse, B., Leer, R.J., Schuren, F.H.J., and van der Werf, M.J., *Microbiology*, 2005, vol. 151, Pt. 12, pp. 3881–3894.
- Plumed-Ferrer, C., Koistinen, K.M., Tolonen, T.L., Lehesranta, S.J., Kärenlampi, S.O., Mäkimattila, E., Joutsjoki, V., Virtanen, V., and von Wright, A., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, vol. 74, no. 17, pp. 5349–5358.
- De los Reyes-Gavilán, C.G., Ruas-Madiedo, P., Noriega, L., Cuevas, I., Sánchez, B., and Margolles, A., *Lait*, 2005, vol. 85, no. 1–2, pp. 113–123.
- Sánchez, B., Champomier-Vergès, M.C., Anglade, P., Baraige, F., Gavilán, C.G., Margolles, A., and Zagorec, M., *J. Bacteriol.*, 2005, vol. 187, no. 16, pp. 5799–5808.
- Rodríguez, E., Arqués, J.L., Rodríguez, R., Nuñez, M., and Medina, M., *Lett. Appl. Microbiol.*, 2003, vol. 37, no. 3, pp. 259–263.
- Taranto, M.P., Perez-Martinez, G., and de Valdez, G.F., *Res. Microbiol.*, 2006, vol. 157, no. 8, pp. 720–725.
- Even, S., Lindley, N.D., and Cocaign-Bousquet, M., *Microbiology*, 2003, vol. 149, Pt. 7, pp. 1935–1944.
- Leverrier, P., Dimova, D., Pichereau, V., Auffray, Y., Boyaval, P., and Jan, G., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, vol. 69, no. 7, pp. 3809–3818.
- Begley, M., Gahan, C.G.M., and Hill, C., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, vol. 68, no. 12, pp. 6005–6012.
- Schmidt, G. and Zink, R., *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, vol. 55, no. 1–3, pp. 41–45.
- Dal Bello, F., Walter, J., Roos, S., Jonsson, H., and Hertel, C., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, vol. 71, no. 10, pp. 5873–5878.
- Bustin, S.A., *J. Mol. Endocrinol.*, 2002, vol. 29, no. 1, pp. 23–39.

УДК 579.2:579.26:579.6

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА АДГЕЗИВНУЮ АКТИВНОСТЬ РОДОКОККОВ В ОТНОШЕНИИ Н-ГЕКСАДЕКАНА

© 2012 г. Е. В. Рубцова*, М. С. Куюкина*, **, И. Б. Ившина*, **

* Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990

** Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081, kuyukina@iegm.ru

Поступила в редакцию 18.01.2012 г.

Исследовано влияние условий роста (состав, кислотность, соленость питательной среды, температура и гидродинамический режим культивирования) на адгезию актинобактерий рода *Rhodococcus* к н-гексадекану. Проведенные исследования показали, что адгезивная активность родококков зависит от состава питательной среды и температуры их культивирования. Обсуждены возможные механизмы влияния ростовых условий на адгезию родококков к жидким углеводородам посредством изменения содержания клеточных липидов и зета-потенциала клеток. В результате исследования отобраны штаммы родококков, обладающие высокой (80–90%) адгезивной активностью при пониженной температуре (18°C), высокой солености (5.0% NaCl) и кислотности (рН 6.0) питательной среды, которые могут быть перспективны для использования в биотехнологиях очистки загрязненных углеводородами почв и вод.

Известно, что в решении одной из наиболее актуальных проблем современности – загрязнение окружающей среды нефтяными углеводородами, ключевую роль играют углеводородокисляющие микроорганизмы. Поэтому микробиологические методы деструкции углеводородных соединений рассматриваются в настоящее время, как наиболее перспективные способы очистки нефтезагрязненных экосистем. В естественных условиях процессы биодegradации углеводородов часто осложняются влиянием неблагоприятных факторов, таких, как пониженная температура, высокая минерализация, экстремальные значения кислотности среды и т.д. Следует отметить, что начальным этапом процесса биотрансформации любого гидрофобного соединения является бактериальная адгезия, интенсивность которой в значительной мере зависит от физико-химических параметров среды [1]. В связи с этим исследование адгезивных свойств углеводородокисляющих бактерий, обладающих устойчивостью к различным экологическим факторам, представляется актуальным для развития биотехнологий очистки загрязненных нефтяными углеводородами почв и вод.

Адгезивная активность микроорганизмов определяется свойствами клеточной поверхности, прежде всего степенью ее гидрофобности [2], на которую значительное влияние оказывают условия культивирования. В зарубежной литературе встречаются исследования адгезивной активности представителей родов *Bifidobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* [3–5]. Однако особенности адгезии актинобактерий рода *Rhodococcus*, активно разрабатываемых биотехнологических агентов

окислительной трансформации природных и антропогенных углеводородов, практически не изучены [6, 7]. Нами ранее [8] показана высокая адгезивная активность родококков разных видов в отношении жидких н-алканов с длиной цепи от 6 до 16 атомов углерода. При этом наибольшие показатели адгезии к исследуемым углеводородам наблюдались у представителей *R. ruber*, адгезивная активность которых увеличивалась с возрастанием числа углеродных атомов в молекуле н-алкана.

Цель работы – изучение влияния условий роста (состав, кислотность, соленость питательной среды, температура и гидродинамический режим культивирования) родококков на их адгезивную активность в отношении н-гексадекана.

МЕТОДИКА

Объект исследования и условия культивирования. Использовали культуры актинобактерий рода *Rhodococcus*, принадлежащих к видам *R. erythropolis* (10 штаммов), *R. fascians* (11 штаммов), *R. longus* (5 штаммов), *R. opacus* (6 штаммов), *R. rhodochrous* (4 штамма), *R. ruber* (6 штаммов) и поддерживаемых в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН (акроним ИЭГМ; WFCC #768; www.iegm.ru/iegmcol/index.html), а также 30 мутантных клонов *R. ruber* ИЭГМ 231, полученных методом неспецифического in vitro Tn5 мутагенеза.

Для оценки влияния условий культивирования на адгезивную активность родококки параллельно выращивали на мясо-пептонном агаре

(МПА) и агаризованной минеральной среде К [9] следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.0, K_2HPO_4 – 1.0, NaCl – 1.0, KNO_3 – 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2, $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.02, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.02. Дополнительно в минеральную среду вносили раствор микроэлементов (1.0 мл/л) [10]; дрожжевой экстракт (“Микроген”, Россия) (0.05 г/л), а также один из н-алканов: н-гексан, н-гептан, н-нонан, н-декан, н-ундекан, н-додекан, н-тетрадекан, н-гексадекан (98%, ООО “Вектон”, Санкт-Петербург) (1.0 об. %) либо глюкозу (10 г/л) в качестве источника углеродного питания. Культивирование осуществляли при 18, 28, 37°C на качалке (160 об/мин) либо стационарно в течение 3–7 сут. Также клетки выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) с добавлением различных (1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10, 15 и 20%) концентраций хлорида натрия, в диапазоне рН от 4.0 до 9.0 на качалке (160 об/мин) при 28°C.

Tn5-мутagenез клеток родококков. Использовали транспозому EZ::TNTM (KAN-2) Tnp TransposomeTM (“Epicentre Technologies”, США), представляющую собой комплекс транспозона Tn5 с встроенным геном устойчивости к канамицину и белка транспозазы. Процедуру трансформации проводили с помощью электропоратора *E. coli* PulserTM Transformation Apparatus (“Bio-Rad”, США) при напряжении 2.5 кВ и емкости 10 мкФ. Частоту трансформации вычисляли по количеству выросших на чашках с LB агаром (концентрация антибиотика в среде 100 мкг/мл) устойчивых к канамицину колоний по отношению к исходному числу клеток. Возможность спонтанных мутаций оценивали путем высева клеток исходной бактериальной культуры, не подвергнутой трансформации, на чашки с агаром LB, содержащим канамицин [11].

Присутствие транспозона Tn5 в бактериальной ДНК подтверждали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров KAN-2 FP-1 (5'-АЦЦТАЦААЦАААГЦТЦТЦАТЦА-АЦЦ-3') и KAN-2 RP-1 (5'-ГЦААТГТААЦАТЦАГА-ГАТТТТГАГ-3') (“Epicentre Technologies”, США). ДНК из бактериальных клеток выделяли с помощью InstaGeneTM Matrix (“Bio-Rad”, США), согласно протоколу компании-производителя. Амплификацию проводили в термоциклере MyCycler (“Bio-Rad”, США). В качестве положительного контроля использовали транспозон EZ::TNTM (KAN-2).

Устойчивость мутантов к канамицину оценивали дискдиффузионным методом по величине диаметра отсутствия роста вокруг индикаторных дисков (“НИЦФ”, Санкт-Петербург), содержащих 30 мкг канамицина. Мутантные клоны хранили в среде LB с 10% глицерина и 100 мкг/мл канамицина при –84°C.

Определение степени адгезии клеток родококков к н-гексадекану. Адгезивную активность родо-

кокков к н-алканам (н-гексан, н-гептан, н-нонан, н-декан, н-ундекан, н-додекан, н-тетрадекан, н-гексадекан) (98%, ООО “Вектон”, Санкт-Петербург) определяли с помощью МАТН-теста (Microbial Adhesion to Hydrocarbons – Микробная адгезия к углеводородам) по модифицированной методике, приведенной нами ранее [12]. Модификация метода заключалась в экспериментальном подобранном соотношении гидрофобной–водной фаз, равном 1 : 2.5, при котором наблюдались устойчивые показатели клеточной адгезии к гидрофобному субстрату.

Для определения влияния температурных условий проведения МАТН-теста на адгезивную активность родококков к н-гексадекану показатели адгезии определяли при 18, 28 и 37°C.

Определение степени гидрофобности клеток родококков. Использовали метод солевой агрегации [13], для этого готовили различные (от 0.2 до 4 М с интервалом 0.2 М) концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 0.001 М натрий-фосфатном буфере. На предметном стекле смешивали в равных количествах раствор сульфата аммония и суспензию клеток (10^7 кл./мл) в физиологическом растворе. Наблюдение процесса образования клеточных агрегатов проводили через 1 мин с использованием фазово-контрастной микроскопии (Axiostar Plus, “Karl Zeiss”, Германия) с масляно-иммерсионным объективом (ув. $\times 1000$). Минимальную концентрацию раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, при которой наблюдалось образование клеточных агрегатов, принимали за условное значение степени гидрофобности клеток. Согласно данному методу, чем более гидрофобна клеточная стенка бактерий, тем при меньшей концентрации раствора сульфата аммония наблюдается агрегация клеток [14]. Исходную клеточную суспензию без добавления $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ использовали в качестве контроля. Фотодокументирование полученных изображений осуществляли с помощью фотокамеры “Pixer” (США) и компьютерной программы “Видео-Тест – Размер 5.0” (Санкт-Петербург).

Определение суммарных клеточных липидов. Суммарные клеточные липиды экстрагировали по методике [15], согласно которой 0.05 г сухой биомассы суспендировали в 1 мл дистиллированной воды с последующим добавлением 4 мл смеси хлороформ–метанол (1 : 2). Полученную смесь встряхивали и оставляли на 1 сут, центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин, надосадочную жидкость сливали в центрифужную пробирку, к осадку добавляли 5 мл смеси хлороформ–метанол–вода (1 : 2 : 0.8), встряхивали и центрифугировали. Супернатант объединяли с ранее полученным экстрактом и добавляли 5 мл смеси хлороформ–вода (1 : 1), повторно центрифугировали. Хлороформный слой переносили в предварительно взвешенную круглодонную колбу и упаривали на ротор-

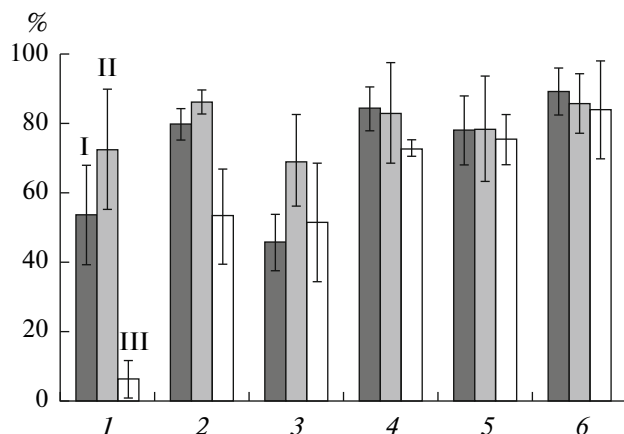


Рис. 1. Адгезивная активность (%) в отношении н-гексадекана клеток родококков, выращенных на разных средах: I – МПА; II – минеральная среда в присутствии н-гексадекана; III – в присутствии глюкозы. Приведены средние данные для родококков разных видов. 1 – *R. erythropolis* (4), 2 – *R. fascians* (4), 3 – *R. longus* (3), 4 – *R. opacus* (3), 5 – *R. rhodochrous* (4), 6 – *R. ruber* (5). В скобках указано число исследованных штаммов.

ном испарителе при 60°C, после чего колбу взвешивали до достижения постоянной массы на высокоточных аналитических весах AUW 120D (“Shimadzu”, Япония). Количество общих липидов выражали в процентах от сухой массы клеток. Эксперименты проводили в пятикратной повторности.

Определение зета-потенциала клеток родококков. Клетки *R. ruber* ИЭГМ 231, выращенные в МПБ, при различной температуре (18, 28 и 37°C), pH (от 6.0 до 8.0) и солёности (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0% NaCl) дважды отмывали и ресуспендировали в 10 mM KNO₃ (pH 7.0) до достижения значения оптической плотности (ОП_{600нм}) 0.2 (спектрофотометр Lambda EZ 201, “Perkin Elmer”, США). Зета-потенциал родококков в суспензиях регистрировали методом динамического светорассеяния на анализаторе ZetaSizer Nano ZS (“Malvern Instruments”, Великобритания) при 25°C. Автоматическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения Malvern Zetasizer, v. 2.2 (“Malvern Instruments”, Великобритания). Эксперименты проводили в трехкратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние состава среды культивирования на адгезивную активность родококков. Результаты определения адгезивной активности клеток родококков к н-гексадекану в зависимости от состава среды их культивирования (рис. 1) свидетельствуют, что представители *R. opacus*, *R. rhodochrous* и *R. ruber* проявляют высокую (75–90%) адгезив-

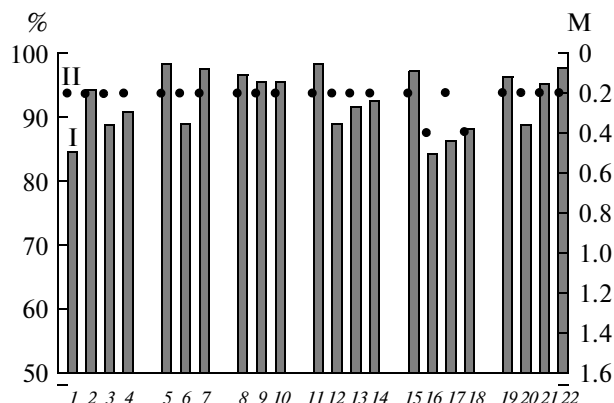


Рис. 2. Сравнительный анализ адгезивной активности и гидрофобности клеток родококков: I – результаты МАТН-теста (% адгезии), II – результаты метода солевой агрегации (M (NH₄)₂SO₄). 1 – *R. erythropolis* ИЭГМ 24, 2 – *R. erythropolis* ИЭГМ 186, 3 – *R. erythropolis* ИЭГМ 268, 4 – *R. erythropolis* ИЭГМ 271, 5 – *R. fascians* ИЭГМ 35, 6 – *R. fascians* ИЭГМ 278, 7 – *R. fascians* ИЭГМ 170, 8 – *R. longus* ИЭГМ 27, 9 – *R. longus* ИЭГМ 28, 10 – *R. longus* ИЭГМ 29, 11 – *R. opacus* ИЭГМ 37, 12 – *R. opacus* ИЭГМ 62, 13 – *R. opacus* ИЭГМ 716, 14 – *R. opacus* ИЭГМ 458, 15 – *R. rhodochrous* ИЭГМ 64, 16 – *R. rhodochrous* ИЭГМ 632, 17 – *R. rhodochrous* ИЭГМ 633, 18 – *R. rhodochrous* ИЭГМ 646, 19 – *R. ruber* ИЭГМ 231, 20 – *R. ruber* ИЭГМ 235, 21 – *R. ruber* ИЭГМ 219, 22 – *R. ruber* ИЭГМ 326.

ную активность при культивировании как в присутствии углеводорода, так и без него. Это указывает на повышенную гидрофобность клеточной стенки родококков данных видов независимо от состава ростовой среды, что, по-видимому, обуславливает их врожденную адаптацию к усвоению углеводородных субстратов [16]. Как видно из рис. 1, для представителей видов *R. erythropolis*, *R. fascians* и *R. longus* среда культивирования оказывала дифференцированное влияние на адгезивную активность: средние показатели клеточной адгезии при использовании глюкозы в качестве источника углерода не превышали 55%, тогда как культивирование в присутствии н-гексадекана способствовало значительному (до 30%) повышению адгезивной активности по сравнению с культурами, выращенными на МПА. По-видимому, присутствие углеводорода в среде культивирования способствует повышению степени гидрофобности клеточной поверхности у представителей данных видов родококков и, как следствие, увеличению адгезивной активности в отношении н-гексадекана. Данные о гидрофобности бактериальных клеток, полученные с использованием метода солевой агрегации, свидетельствовали (рис. 2), что большинство исследуемых культур родококков характеризуются высокой гидрофобностью клеточной поверхности (0.2 M (NH₄)₂SO₄). На микрофотографиях (рис. 3) пред-

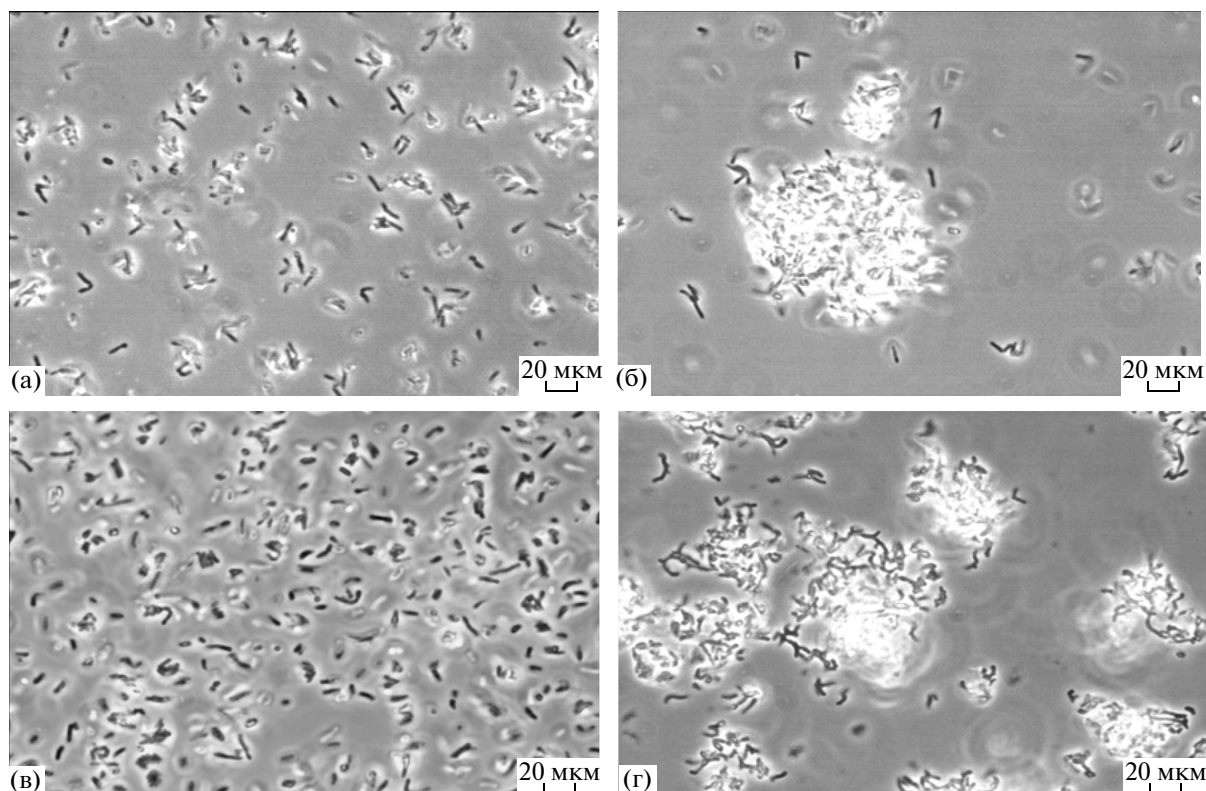


Рис. 3. Микрофотографии клеточных агрегатов родококков, формируемых в растворах сульфата аммония: *R. fascians* ИЭГМ 34 (а – контроль; б – в присутствии 0.2 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), *R. erythropolis* ИЭГМ 271 (в – контроль; г – 0.2 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

ставлены примеры коагрегации клеток родококков под действием раствора сульфата аммония.

С целью более детального исследования влияния природы гидрофобного источника углеродного питания на адгезивную активность клетки родококков выращивали в присутствии *n*-алканов с длиной цепи от 6 до 16 атомов углерода. Нами установлена четкая зависимость ($R = 0.87$, $p = 0.0049$) между интенсивностью клеточного роста в присутствии данных углеводов и степенью адгезии к ним клеток родококков (рис. 4). Полученные данные свидетельствуют о том, что интенсивность роста родококков в присутствии различных алифатических углеводов обу-

словлена эффективностью процесса их адгезии к исследованным гидрофобным соединениям.

Эффективным способом изучения генетических основ функциональных характеристик бактериальных клеток является получение мутантов. Результаты исследования адгезивной активности Тn5-мутантных клонов родококков показали (табл. 1), что полученные мутанты характеризуются пониженной степенью адгезии к *n*-гексадекану по сравнению с родительским штаммом *R. ruber* ИЭГМ 231, а также более низкими показателями накопления клеточной биомассы.

Известно, что степень гидрофобности микробных клеток определяется содержанием клеточных липидов [17]. Проведенные нами сравни-

Таблица 1. Адгезивная активность и показатели роста Тn5 мутантных клонов *R. ruber* ИЭГМ 231 в присутствии *n*-гексадекана

Исследуемые мутантные клоны	Степень адгезии, %	Клеточная биомасса, г/л
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 231 (исходный штамм)	96.6 ± 2.4	4.4 ± 0.1
2, 3, 4, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 30, 35, 42, 46, 49, 50, 119, 137	80 ± 4.3 – 97 ± 2.5	2.6 ± 0.05 – 4.1 ± 0.63
7, 25, 31, 58, 66, 87, 110	60 ± 3.1 – 79 ± 4.2	1.4 ± 0.52 – 2.5 ± 0.46
61	0	0

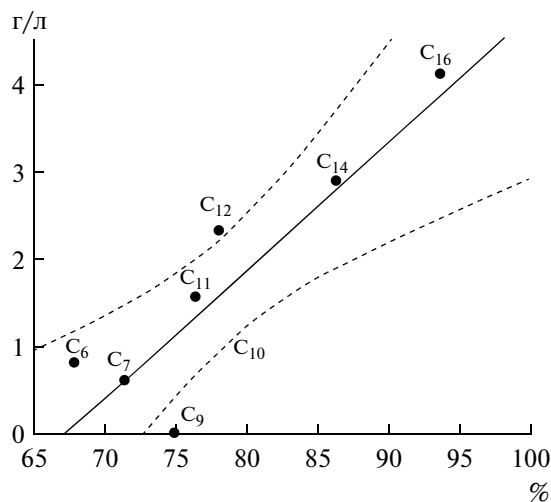


Рис. 4. Зависимость показателя клеточной биомассы родококков (г/л) от их адгезивной активности (%) в отношении алифатических углеводородов (н-гексан, C_6 ; н-гептан, C_7 ; н-нонан, C_9 ; н-декан, C_{10} ; н-ундекан, C_{11} ; н-додекан, C_{12} ; н-тетрадекан, C_{14} ; н-гексадекан, C_{16}). Представлены средние данные для *R. ruber* ИЭГМ 219, ИЭГМ 231, ИЭГМ 326.

тельные исследования количества липидов при росте на разных средах (рис. 5) показали увеличение данного компонента в клетках родококков при росте на минеральной среде с добавлением н-гексадекана (17–22%) по сравнению с таковыми, растущими в МПБ (8–14%). Кроме того, ранее нами было показано [17], что в составе клеточных липидов родококков, выращенных в присутствии н-гексадекана, содержание предельных (насыщенных) жирных кислот и нейтральных фосфолипидов (в частности, кардиолипина и фосфатидилэтаноламина) выше, чем в клетках, растущих в МПБ. Это, по-видимому, обуславливает повышение степени клеточной адгезии к неполярному углеводороду. Следует отметить, что полученный мутант 61 (см. табл. 1), дефицитный по адгезии и неспособный к росту на н-гексадекане, характеризуется наиболее гидрофильной клеточной стенкой (количество суммарных липидов

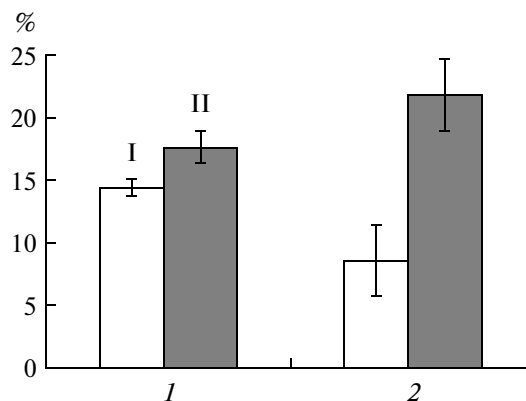


Рис. 5. Содержание липидов (%) в клетках родококков, выращенных в МПБ (I) и агаризованной среде “К” в присутствии паров н-гексадекана (II). Бактериальные штаммы: 1 – *R. ruber* ИЭГМ 371, 2 – *R. ruber* ИЭГМ 324.

клеток составляет $5.4 \pm 0.76\%$ от сухой массы клеток, что в 2 раза меньше по сравнению с таковым родительского штамма).

При исследовании влияния показателя кислотности среды на адгезивную активность 23 штаммов родококков было показано, что 90% исследуемых культур не способны расти в кислой (pH 5.0) питательной среде. Благоприятные условия для роста подавляющего большинства культур ограничены диапазоном pH 6.0–8.0, за исключением представителей *R. ruber*, способных расти и в щелочных (pH 9.0) условиях. При этом наиболее высокие (70–100%) показатели адгезии наблюдались при культивировании родококков в нейтральной и слабощелочной среде (pH 7.0–8.0) (табл. 2). Выявлено 2 штамма родококков (*R. rhodochrous* ИЭГМ 66, *R. ruber* ИЭГМ 231), способных расти в условиях кислой (pH 5.0) среды, однако при этом их адгезивная активность в отношении н-гексадекана не превышала 50%.

Влияние солености питательной среды на адгезию родококков к н-гексадекану оказалось неоднозначным (табл. 3). Наиболее высокие (75–

Таблица 2. Влияние показателя кислотности среды культивирования родококков на их адгезивную активность в отношении н-гексадекана*

Бактериальный вид	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	pH 9.0
<i>R. erythropolis</i> (5)	43 ± 11	61 ± 12	57 ± 14	–
<i>R. fascians</i> (4)	61 ± 8	74 ± 10	75 ± 6	–
<i>R. longus</i> (4)	48 ± 9	51 ± 11	42 ± 14	–
<i>R. opacus</i> (4)	75 ± 9	88 ± 7	68 ± 7	–
<i>R. rhodochrous</i> (7)	88 ± 9	89 ± 4	91 ± 4	–
<i>R. ruber</i> (6)	85 ± 6	84 ± 6	73 ± 5	58 ± 9

*Представлены средние для вида значения адгезии. В скобках указано количество штаммов. Прочерк означает отсутствие роста.

Таблица 3. Адгезивная активность родококков разных видов в зависимости от концентрации NaCl в среде культивирования*

Бактериальный вид	Концентрация NaCl в среде культивирования, %					
	0.5	1	2	3	4	5
<i>R. erythropolis</i> (7)	51 ± 7	55 ± 11	46 ± 7	53 ± 6	46 ± 11	51 ± 12
<i>R. fascians</i> (5)	88 ± 5	79 ± 9	78 ± 8	75 ± 9	0	–
<i>R. longus</i> (4)	70 ± 8	50 ± 12	41 ± 13	31 ± 14	0	0
<i>R. opacus</i> (4)	86 ± 4	77 ± 8	46 ± 12	62 ± 8	58 ± 10	–
<i>R. rhodochrous</i> (8)	73 ± 9	70 ± 12	70 ± 11	73 ± 11	74 ± 9	60 ± 9
<i>R. ruber</i> (10)	90 ± 4	79 ± 8	76 ± 9	72 ± 9	70 ± 10	39 ± 14

* В скобках указано количество штаммов. Представлены средние для вида данные адгезивной активности по результатам МАТН-теста. Прочерк означает отсутствие роста.

95%) показатели адгезии были зафиксированы при низких (0.5–1.0%) концентрациях NaCl. Установлено, что содержание хлорида натрия в среде свыше 4.0% не способствует росту родококков за исключением отдельных представителей *R. erythropolis*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*.

Для большинства штаммов родококков наблюдалась общая тенденция понижения адгезивной активности с увеличением концентрации NaCl в среде культивирования, что согласуется с данными [18] для умеренно-галофильной бактерии *Halomonas elongata*, которые авторы объясняли адаптационным механизмом к условиям высокой солености среды, реализуемым в снижении степени гидрофобности клеточной стенки с целью увеличения сродства клеток к молекулам воды в концентрированном водно-солевом растворе. Однако в то же время нами выявлены штаммы *R. opacus* ИЭГМ 262, *R. rhodochrous* ИЭГМ 608, ИЭГМ 639, для которых концентрация хлорида натрия в среде более 2.0% оказывала стимулирующий эффект на их адгезивную активность. Кроме того, у единичных штаммов (*R. rhodochrous* ИЭГМ 63, ИЭГМ 64, ИЭГМ 67, *R. ruber* ИЭГМ 73, ИЭГМ 219, ИЭГМ 326, ИЭГМ 328) наблюдались стабильные показатели адгезии к углеводороду при повышении концентрации NaCl в среде от 0.5 до 5.0%. Следует отметить, что умеренная галотолерантность, свойственная данным видам родококков [19], дает им определенные экологические преимущества по сравнению с другими

представителями углеводородокисляющей микрофлоры, в частности в биотопах наземных и морских экосистем, подвергнутых нефтяному загрязнению.

Влияние температурных условий культивирования на адгезивную активность родококков. По нашим данным, температура культивирования оказывала дифференцированное влияние на адгезивную активность родококков (рис. 6). При выращивании клеток в МПБ или на МПА (рис. 6а, б) для большинства исследованных штаммов наблюдались стабильные показатели адгезии независимо от температурного режима культивирования. Однако при выращивании родококков на минеральной среде с добавлением н-гексадекана (рис. 6в) понижение или повышение температуры культивирования до 18 и 37°C соответственно, значительно снижали адгезивную активность клеток, которая в среднем не превышала 65%. Так, показатели адгезии подавляющего большинства представителей видов *R. fascians*, *R. opacus*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*, выращенных на минеральной среде при 28°C, значительно (на 35–55%) превышали таковые родококков, культивируемых при 37°C.

Таким образом, оптимальная температура культивирования представителей рода *Rhodococcus* и достижения максимальной эффективности их клеточной адгезии к жидким углеводородам составляет 28°C. Вместе с тем нами были отобраны еди-

ничные штаммы (*R. rhodochrous* ИЭГМ 64, ИЭГМ 608, *R. opacus* ИЭГМ 246, *R. ruber* ИЭГМ 328), адгезивная активность которых возрастала на 25–30% при снижении температуры культивирования до 18°C. Данные культуры могут быть использованы в процессах биоремедиации нефтезагрязненных экосистем в холодных климатических условиях [20, 21].

Следует отметить, что минеральная среда с добавлением *n*-гексадекана оказалась наименее благоприятной средой культивирования родококков при пониженной (18°C) температуре. При этом в отдельных случаях (штаммы *R. longus* ИЭГМ 68 и *R. opacus* ИЭГМ 56) гексадеканосодержащая среда не поддерживала бактериального роста, что, очевидно, связано с низкой биодоступностью данного субстрата при низких температурах вследствие увеличения его вязкости (температура замерзания *n*-гексадекана 16°C).

Для определения вклада электростатической компоненты в процессы адгезии родококков к углеводороду определяли зета-потенциал клеток *R. ruber* ИЭГМ 231, выращенных при различных температурах, pH и солёности среды культивирования. По нашим данным, температура и pH среды культивирования оказывали одинаковое влияние как на адгезию родококков, так и на значение их зета-потенциала (рис. 7а, б), однако при изменении солёности среды аналогичной зависимости не наблюдалось (рис. 7в). При этом оказалось, что наиболее высоким значениям зета-потенциала (–22 ... –26 мВ) соответствуют максимальные (95–98%) показатели адгезивной активности клеток. Известно, что *n*-гексадекан в водной среде обладает отрицательным зарядом [22], следовательно, чем выше зета-потенциал бактериальных клеток, тем в меньшей степени происходит их отталкивание от поверхности углеводорода, а показатели адгезии выше.

Влияние гидродинамических условий культивирования на адгезивную активность родококков.

При исследовании влияния гидродинамического режима культивирования родококков было установлено, что выращивание клеток на орбитальной качалке (160 об/мин) способствует 5–20% повышению их адгезивной активности в отношении *n*-гексадекана. Однако нами установлено для единичных штаммов (*R. longus* ИЭГМ 68, *R. rhodochrous* ИЭГМ 608, ИЭГМ 647 в частности), что рост в стационарных условиях способствует 25–40% увеличению степени их адгезии к углеводороду. Представители видов *R. opacus*, *R. rhodochrous* и *R. ruber* характеризуются высокими (60–85%) показателями адгезивной активности независимо от гидродинамических условий.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что изменение температуры и pH среды культивирования оказывает влия-

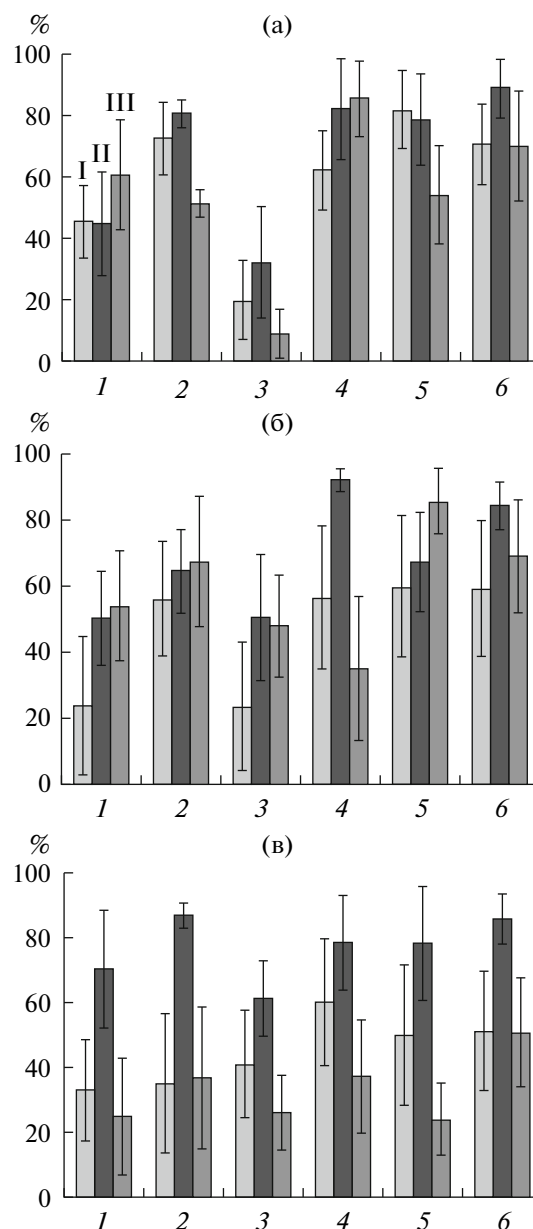


Рис. 6. Адгезивная активность (%) родококков, выращенных в МПБ (а), МПА (б) и агаризованной среде “К” в присутствии паров *n*-гексадекана (в), при различных температурах: I – 18°C, II – 28°C, III – 37°C. Бактериальные виды: 1 – *R. erythropolis* (4), 2 – *R. fascians* (4), 3 – *R. longus* (3), 4 – *R. opacus* (3), 5 – *R. rhodochrous* (4), 6 – *R. ruber* (5). В скобках указано число исследованных штаммов.

ние на гидрофобные и электростатические свойства клеток родококков, которые, по-видимому, принимают участие в процессах адгезии к жидким углеводородам [22]. Показано, что наиболее высокая адгезивная активность клеток родококков к *n*-гексадекану проявляется при их культивировании в углеводородсодержащей среде, а также в нейтральной или слабощелочной (pH 7.0–8.0)

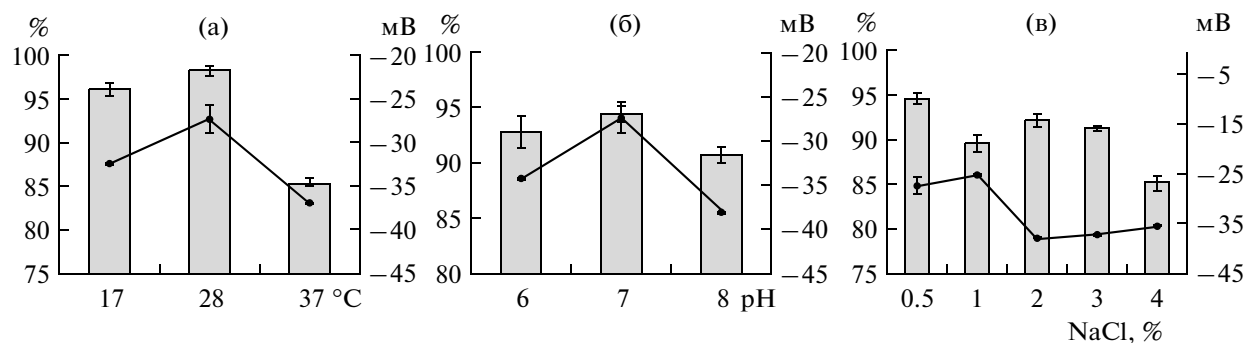


Рис. 7. Адгезивная активность (%) и зета-потенциал (мВ) клеток *R. ruber*, выращенных при различных температурах (а), рН (б) и солёности (в) среды культивирования.

среде при 28°C в присутствии 0.5–1.0% NaCl. В результате исследования отобраны штаммы, обладающие высокой адгезивной активностью при пониженной температуре, повышенной солёности (кислотности) питательной среды и толерантные к условиям культивирования. Данные представители рода *Rhodococcus* могут быть рекомендованы для использования в процессах биотрансформации углеводородных соединений, а также в составе биопрепаратов, предназначенных для биоремедиации нефтезагрязнённых наземных и морских экосистем в холодных климатических условиях.

Исследование выполнено при поддержке грантов Президента РФ “Ведущие научные школы”, Министерства образования и науки РФ (16.518.11.7069; 16.513.12.3015) и Программы Президиума РАН “МКБ”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Katsikogianni M., Missirlis Y.F. // Eur. Cell Mater. 2004. V. 8. P. 37–57.
2. Bos R., van der Mei H.C., Busscher H.J. // FEMS Microbiol. Rev. 1999. V. 23. № 2. P. 179–230.
3. Mikucka A., Gospodarek E., Ulatowska B. // Med. Dosw. Mikrobiol. 2000. V. 52. № 1. P. 9–15.
4. Norman R.S., Frontera-Suau R., Morris P.J. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 10. P. 5096–5103.
5. Ram C., Chander H. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 19. № 4. P. 407–410.
6. Ivshina I. // WFCC Newsletter. 2001. № 33. P. 8–14.
7. Martinková L., Uhnáková B., Pátek M., Nešvera J., Křen V. // Environ. Int. 2009. V. 35. № 1. P. 162–177.
8. Куюкина М.С., Ившина И.Б., Рубцова Е.В., Иванов Р.В., Лозинский В.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 2. С. 176–182.
9. Каталог штаммов региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / Ред. И.Б. Ившина. М.: Наука, 1994. 163 с.
10. Романенко В.И., Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных вод. Лабораторное руководство. М.: Наука, 1974. 194 с.
11. Fernandes P.J., Powell J.A., Archer A.C. // Microbiology. 2001. V. 147. № 9. P. 2529–2536.
12. Kuyukina M.S., Rubtsova E.V., Ivshina I.B., Ivanov R.V., Lozinsky V.I. // J. Microbiol. Methods. 2009. V. 79. № 1. P. 76–81.
13. Krepsky N., Ferreira R.B.R., Nunes A.P.F., Lins U.G.C., Filho F.C.S., de Mattos-Guaraldi A.L., Nettos Santos K.R. // Current Microbiol. 2003. V. 46. № 4. P. 280–286.
14. Sorongon M.L., Bloodgood R.A., Burchard R.P. // Appl. Environ. Microbiol. 1991. V. 57. № 11. P. 3193–3199.
15. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. М.: Мир, 1975. 324 с.
16. Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C.R. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Ed. K.N. Timmis. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 2010. P. 1840–1852.
17. Куюкина М.С., Ившина И.Б., Рычкова М.И., Чумаков О.Б. // Микробиология. 2000. Т. 69. № 1. С. 62–69.
18. Hart D.J., Vreeland R.H. // J. Bacteriol. 1988. V. 170. № 1. P. 135–135.
19. Плотникова Е.Г., Рыбкина Д.О., Ананьина Л.Н., Ястребова О.В., Демаков В.А. // Экология. 2006. № 4. С. 261–268.
20. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Костарев С.М. // Нефтяное хозяйство. 2003. № 9. С. 116–119.
21. Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Biology of *Rhodococcus* / Ed. H.M. Alvarez. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 2010. P. 291–313.
22. Geertsema-Doornbusch G.I., van der Mei H.C., Busscher H.J. // J. Microbiol. Methods. 1993. V. 18. № 1. P. 61–68.

Effect of Cultivation Conditions on the Adhesive Activity of Rhodococci towards n-Hexadecane

E. V. Rubtsova^a, M. S. Kuyukina^{a, b}, and I. B. Ivshina^{a, b}

^a Perm State National Research University, Perm, 614990 Russia

^b Institute of Microorganism Ecology and Genetics, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia

e-mail: kuyukina@iegm.ru

Received January 18, 2012

Abstract—The effect of cultivation conditions (the composition, acidity, and salinity of the cultivation medium; temperature; and the hydrodynamic conditions of cultivation) on the adhesion of actinobacteria of the genus *Rhodococcus* to n-hexadecane has been investigated. A study performed showed that the adhesive activity of rhodococci depends on the composition of the cultivation medium and on the cultivation temperature. The possible mechanisms underlying the effect of growth conditions on the adhesion of rhodococci to liquid hydrocarbons and involving changes in the cell lipid content or the zeta potential of cells are addressed. Rhodococcal strains displaying high adhesive activity (80–90%) at a low temperature (18°C), high salinity (5.0% NaCl), and acidity (pH 6.0) of the cultivation medium have been selected as a result of the present work; these strains have a considerable potential for use in bioremediation of soil and water contaminated by hydrocarbons.

UDC 663.18

DEGRADATION OF NICOSULFURON BY *Bacillus subtilis* YB1 AND *Aspergillus niger* YF1

© 2012 X. H. Lu*, Z. H. Kang*, B. Tao*, Y. N. Wang*, J. G. Dong**, J. L. Zhang*

*College of Plant Protection, of Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

**College of Life Sciences of Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

e-mail: zhangjinlin@hebau.edu.cn

Received November 30, 2011

The optimal degrading conditions for the nicosulfuron degradation by *Bacillus subtilis* YB1 and *Aspergillus niger* YF1, and site of their action on nicosulfuron were studied. The results showed that the degradation efficiency of free cells of *B. subtilis* YB1 and *A. niger* YF1 was respectively 87.9 and 98.8% in basic medium III containing 2 mg/l of nicosulfuron after inoculation with 1 ml of culture containing 2.3×10^7 CFU ml⁻¹ and incubation for 5 days at 35°C. Moreover, the degradation rate of nicosulfuron by the mixture of microorganisms was much higher than for every of them taken separately in the same conditions. The mass spectrometric analysis of the products degraded by *B. subtilis* YB1 revealed that the sulfonylurea bridge in nicosulfuron molecule had been broken. Extracellular (EXF) and endocellular (ENF) fractions obtained from bacterium and fungus were tested for the ability to degrade nicosulfuron. The degradation efficiency of fractions extracted from *B. subtilis* YB1 was 66.8% by EXF and 15.8% by ENF, but neither EXF nor ENF extracted from *A. niger* YF1 had the activity of degrading nicosulfuron.

Nicosulfuron, one kind of the sulfonylurea herbicides, is mainly used for weed control in corn field. The effective application dose for it is much lower than that of the traditional herbicides [1–3]. The nicosulfuron moves easily in soil and causes groundwater contamination [4–6]. Even low remains of nicosulfuron in the soil may still cause phytotoxicity to some sensitive crops.

The bioremediation is one of the effective approaches to improve the environment conditions, especially to manage herbicides pollution. According to previous studies, Gu et al. [7] isolated the ethametsulfuron-methyl-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. SW4 from contaminated soil. Luo et al. [8] reported on *Brevibacterium* sp. degrading bensulfuron-methyl; Xu et al. [1] isolated 3 strains (*Pseudomonas* sp. D61, D66 and *Bacillus* sp. D713) from pyrazosulfuron-ethyl contaminated soil and identified the main pyrazosulfuron-ethyl biodegradation products as pyrazosulfuron acid by liquid chromatography–mass spectroscopy and MS–MS techniques. Ma et al. [9] studied and reported the degradation characteristics, pathways and products of chlorimuron-ethyl by strain *Pseudomonas* sp. LW3; Valle et al. [10] described the biodegradation of azimsulfuron and its degradation products. Zhang et al. [11] found that *Klebsiella jilinsis* 2N3 was able to degrade sulfonylurea herbicides, including the nicosulfuron, but only with 8% degradation efficiency.

It is well known that the most biodegradation pathways on the pesticides are environmental enzymatic degradation [12]. Preparation of degrading enzymes

can better to manage poor environment conditions than the use of the corresponding microbes, and the activity of degrading enzyme is much higher than the microorganism itself. Many studies on enzymatic degradation of pesticides were reported in literatures. Huang et al. [2] reported cell-free extract of S113 identified as *Methylopila* sp. was able to metabolize metsulfuron-methyl and other sulfonylurea herbicides and proved that enzymes played an important role in the decontamination of this compound. Pizzul et al. [13] revealed that the pure manganese peroxidase, laccase, lignin peroxidase and horseradish peroxidase could degrade glyphosate and other pesticides.

Recently, *Aspergillus niger* YF1 and *Bacillus* sp. YB1 were isolated in laboratory of Department of pesticide (Agricultural University of Hebei, Baoding, China) as efficient microorganisms to degrade nicosulfuron [14]. The aim of the study is to investigate the degradation characteristics of two strains and mechanism of the nicosulfuron degradation by *Bacillus* sp. YB1. The results obtained could be helpful in providing the theoretical evidence for controlling environment pollution of nicosulfuron. Furthermore, the potential for the use of strains *Bacillus subtilis* YB1 and *Aspergillus niger* YF1 in the treatment of soil polluted with the nicosulfuron need to be thoroughly investigated.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms, culture media and chemicals. The tested strains were *Bacillus* sp. YB1 and *Aspergillus niger* YF1 isolated and stored at the laboratory of Plant

Protection Institute of Pesticides of Hebei Agricultural University (China). Main apparatus were Agilent 1200 LC and HPLC–MS/MS (Thermo Electron Corp., San Jose, CA, USA); 94.87% nicosulfuron original drugs were provided by the Institute for Drug Control of Hebei Province (China).

A potato dextrose agar medium (PDA) containing (g/l): potato – 200, glucose – 20, agar – 20, was used for the activation of strains. The potato dextrose medium (PD) was the PDA medium without agar. Basic medium I contained (g/l): KH_2PO_4 – 0.5, K_2HPO_4 – 0.5, NaCl – 0.5, MgSO_4 – 0.5 and glucose – 5. In some experiments basic I medium was supplemented with 0.5 g/l of NH_4Cl (medium II) or 5 g/l of glucose (medium III). The described above 4 types of culture media were used for the degradation of nicosulfuron by *B. subtilis* YB1 and *A. niger* YF1. Luria-Bertani (LB) medium containing (g/l): yeast extract – 5.0, peptone – 10, NaCl – 5.0, was used for the bacterial culture to produce enzyme. Methanol and acetonitrile were chromatographic pure grade and other inorganic and organic chemicals were analytical grade.

Characteristics of the nicosulfuron degradation by *B. subtilis* YB1 and *A. niger* YF1. To detect the effect of different media on degradation of nicosulfuron, 1 ml suspension of microorganism was inoculated into 250 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of liquid medium with 2 mg/l of nicosulfuron and incubated for 5 days at 30°C. To detect the effect of nicosulfuron concentration on degradation, 1 ml bacterial or fungal suspension was inoculated into the optimal III medium with nicosulfuron at concentrations of 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10.0 mg/l, respectively. To reveal the effect of temperature, 1 ml suspension of microorganism was inoculated to the optimal III medium with 2.0 mg/l of nicosulfuron. The samples were separately cultivated at 15, 20, 25, 30, 35 and 40°C for 5 days. All treatments described above were compared with two controls: one with nicosulfuron without microorganism and another with microorganism without nicosulfuron. Each treatment was carried out in triplicate. Samples were extracted and determined as the following method below.

Analysis of microbial samples treated with nicosulfuron by HPLC. In order to quantify the nicosulfuron in samples, the culture medium was centrifuged at $12000 \times g$ for 10 min after 5 days of incubation at 30°C. 20 ml supernatant was transferred to a 250 ml glass separation funnel and extracted with 40 ml of dichlormethane thrice for the liquid-liquid distribution. The dichlormethane was evaporated by 40°C water bath under a stream of nitrogen, and redissolved in 5 ml of methanol. After filtration, 2 μl sample was subjected to HPLC analysis and the degradation rate of nicosulfuron was calculated.

Agilent Technologies 1200 series HPLC system (USA) consisted of a quaternary pump and a UV spectrophotometric detector. The separation was performed using an Agilent reversed phase C_{18} column (150 \times 4.0 mm,

5 μm). The acetonitrile–water–glacial acetic acid mixture at the ratio of 30 : 70 : 0.05 (v : v : v) was used for elution detected at 240 nm and 1.0 ml min^{-1} , the temperature of the column was 30°C.

Dynamics of the nicosulfuron degradation by *B. subtilis* YB1 and *A. niger* YF1. Two treatments were conducted by inoculating 1 ml suspension of strains to 250 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of running water with 0.2% glucose and nicosulfuron (2 mg/l) placed in static culture at 30°C and inoculating 1 ml of bacterial or fungal suspension to the same liquid medium, with the 1 : 1 (v : v) mixed, respectively. Two controls were set up as described above. The samples were withdrawn at regular intervals of 12 h and extracted as the protocol described above. Degradation kinetics equation was calculated as following formula:

$$C_t = C_0 e^{-Kt} \rightarrow \ln C_t = \ln C_0 - Kt \rightarrow t_{1/2} = \ln 2 / K,$$

where K is the degradation constant; t is reaction time; C_0 is the initial concentration of pesticide solution at the start of response; C_t is the concentration of pesticide solution when reaction time is t , and $t_{1/2}$ is half-life of pesticide.

Preparation of extracellular and endocellular microbial fractions degrading nicosulfuron. The *B. subtilis* YB1 cells were inoculated to the plate with solid LB medium and incubated at 30°C for 24 h. Then a single colony was transferred to 500 ml Erlenmeyer flask containing 200 ml LB liquid medium and shaken at 30°C and 150 rpm for 72 h. The cells were separated by centrifugation at $5000 \times g$ for 30 min at room temperature. The culture supernatant was further filtered using 0.22 μm membrane of vacuum filtration to remove the bacteria and concentrated by ammonium sulfate precipitation (80% saturation, w/v). It was left statically for overnight at 4°C and centrifuged at $8000 \times g$ for 30 min to discard the supernatant. To resuspend the proteins, 10 ml of phosphate-buffered saline (PBS, 20 mM, pH 7.0) was added. Denatured proteins were removed by centrifugation and the crude enzyme was obtained. It was dialyzed against the same buffer which was changed several times until the ammonium sulfate was utterly removed. The solutions were concentrated 5-fold with polyethylene glycol 20000 (PEG 20000) and the concentrated solution was designated as the extracellular fraction (EXF). In addition, cells were washed twice with 40 ml of 20 mM PBS, pH 7.0, and then centrifuged at $8000 \times g$ for 30 min to obtain sediment, which was resuspended with the same PBS and broken intermittently by ultrasonic cell crusher for 10 min on ice. After centrifugation at $10000 \times g$ for 30 min the supernatant was designated as the endocellular fraction (ENF). The protein content in crude extracts was determined colorimetrically at 595 nm by Bradford method [15] with the BSA as a standard protein.

The *A. niger* YF1 cells were inoculated to PDA plate and incubated at 35°C for 48 h. Then a fungal

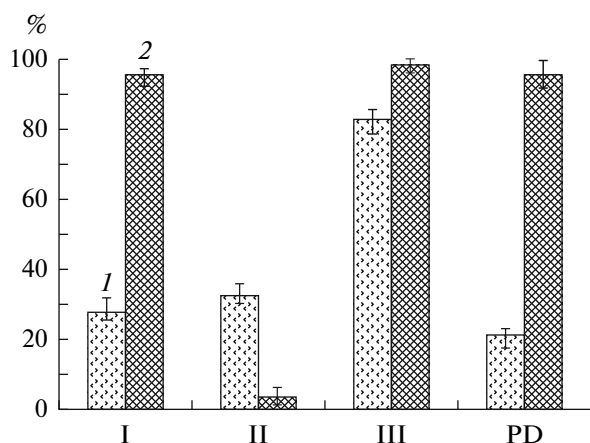


Fig. 1. Biodegradation of nicosulfuron by *B. subtilis* YB1 (1) and *A. niger* YF1 (2) in different culture media - I-III, PD.

cake was transferred to 500 ml Erlenmeyer flask containing 200 ml of PD liquid medium and shaken at 35°C and 150 rpm for 5 days. The culture medium and mycelium were separated by filtration through filter paper. EXF was obtained by ammonium sulfate precipitation as the described above. The mycelium was squeezed between filter-paper sheets and grinded into powder with liquid nitrogen. Then it was resuspended with 20 mM PBS, pH 7.0 and centrifuged at 10000 × g for 30 min to obtain the supernatant as the ENF.

Nicosulfuron-degradating activity was measured in the reaction medium containing 2.7 ml of nicosulfuron (2 mg/l) and 0.3 ml of diluted enzyme after incubation at 30°C for 60 min. The reaction was stopped by adding 0.2 ml of 1.0 M HCl, the amount of nicosulfuron was determined by HPLC and compared with a control containing 0.3 ml inactive enzyme. The treatment was carried out in triplicate. One unit (U) of the crude enzyme was defined as its amount required to degrade 1 µg of nicosulfuron per min under the conditions described above.

Determination of the nicosulfuron degradation products by *B. subtilis* YB1. Nicosulfuron (200 mg/l) was added to 250 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of basic medium III, inoculated with 2 ml of suspension of *B. subtilis* YB1 (2.3×10^7 CFU ml⁻¹) and incubated for 10 days at 30°C. Then culture medium was filtered, the filtrate was extracted with an equal volume of dichloromethane 3 times, organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, finally the extracts were concentrated into 2 ml in a rotary vacuum evaporation at 40°C. The residue was dissolved in 5 ml of methanol and determined by HPLC.

The HPLC-MS/MS was used. The HPLC system was equipped with a C₁₈ column (150 × 2.1 mm, 5 µm) and the UV detector was operated at a wavelength of 240 nm. The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.05% glacial acetic acid at a flow rate of 200.0 µl min⁻¹. The gradient conditions were 0–7–

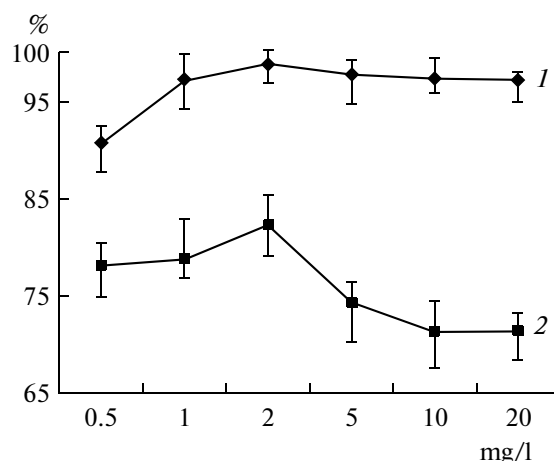


Fig. 2. The effect of different nicosulfuron concentrations of on its biodegradation by *B. subtilis* YB1 (2) and *A. niger* YF1 (1).

10–15 min, with acetonitrile 15–10–10–15% respectively. Mass spectrum (MS) analysis was carried out using electron impact ionization at 350°C and 15 eV with a mass scanning range from 100 to 400 m/z.

RESULTS AND DISCUSSION

Effects of different media on the nicosulfuron degradation by *B. subtilis* YB1 and *A. niger* YF1. The effect of different culture media on the nicosulfuron degradation by both microorganisms was tested, and the results (Fig. 1) showed that in the basic medium III containing carbon-nitrogen the highest degradation rate for *B. subtilis* YB1 and *A. niger* YF1 was, 82.1 and 98.2%, respectively. On the other hand, the lowest degradation rate for *B. subtilis* YB1 was 20.9% in the PD medium and 3.5% for *A. niger* YF1 in basic medium (without glucose). Therefore, the basic medium III was more appropriate for the degradation of nicosulfuron by bacterium and fungus. The basic medium III was not only with carbon sources but also with nitrogen sources, as well as its ingredients were simple, available and low-cost.

Effects of different concentrations of nicosulfuron on its degradation by *B. subtilis* YB1 and *A. niger* YF1. The degradation nicosulfuron curves (Fig. 2) showed that degradation rate depended on its concentration. The degradation ability of microorganisms in the medium containing 0.5–2.0 mg/l of nicosulfuron was significantly higher than at concentration 5–10 mg/l. In the basic medium III containing 2 mg/l of nicosulfuron, the highest degradation rate for *B. subtilis* YB1 and *A. niger* YF1 was 82.5 and 98.5%, respectively. With the increase in the concentration, the degradation ability of strains decreased. When the concentration was 10 mg/l, the degradation rate reduced to 71.3% and 97.4% respectively. The results showed that the *B. subtilis* YB1 cells were more suitable for degradation of nicosulfuron at low concentration (0.5–2.0 mg/l), although some studies indicated that degradation abili-

ties of many microorganisms were stronger on the higher concentration of sulfonylurea herbicides in environment and poorer on the lower's [2, 7, 9, 11]. Previous studies showed that the most of microorganisms were better for degrading of sulfonylurea taken in high concentration in comparison with its low concentration in environment. This study discovered that the low concentration (2 mg/l) of nicosulfuron was the most optimal for strains *A. niger* YF1 and *B. subtilis* YB1 to degrade this compound. It is important that nicosulfuron presents at lower levels in nicosulfuron-used soil, nicosulfuron-contaminated water, pesticide manufacturers and treated industrial wastewater, but even if the concentration is very low, it still causes chemical injury to sensitive crops. Thus, *B. subtilis* YB1 and *A. niger* YF1 could be practically significant to degrade nicosulfuron.

Effects of temperature on the nicosulfuron degradation by *B. subtilis* YB1 and *A. niger* YF1. The temperature was an important factor influencing the microbial degradation. The results obtained (Fig. 3) showed that the different temperature could obviously affect the nicosulfuron degradation by both microorganisms. When the temperature was at 15°C, the degradation rates for *B. subtilis* YB1 and *A. niger* YF1 were only 6.4% and 40.9%, respectively. With the increase in the temperature, the degradation rate of nicosulfuron also increased. When the temperature reached 35°C, it was the highest, 87.9% and 98.5%. However, when the temperature reached 40°C, the degradation rate of *B. subtilis* YB1 decreased to 83% and that of *A. niger* YF1 stayed at level 98.5%. Therefore, too low or too high temperature suppresses the degradation of nicosulfuron by bacterium and the low temperature suppresses it by fungus. The optimal temperature for both microorganisms was 35°C, however, at 25–30°C, the degradation activity remained high.

Determination of degradation dynamic of nicosulfuron by free cells of *B. subtilis* YB1 and *A. niger* YF1. The results illustrated degrading reaction of nicosulfuron obeyed first-order kinetic models [16–18]. Degradation rates of nicosulfuron by single microorganism and mixture of them and the kinetic parameters of the nicosulfuron degradation were displayed in Table. The results proved that the degradation rate by the mixture was higher than by single microorganism, and it was speculated that a mixture of two strains promoted the

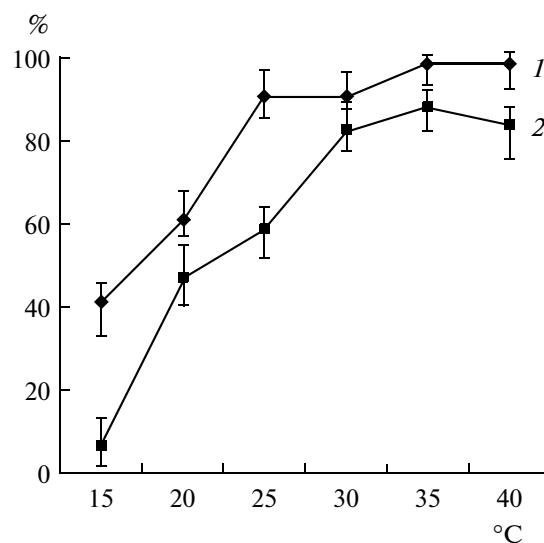


Fig. 3. The effect of different temperatures on biodegradation of nicosulfuron by *B. subtilis* YB1 (2) and *A. niger* YF1 (1).

degradation of nicosulfuron. Due to low levels of nicosulfuron in polluted environment, bacterium and fungus were inoculated to the culture medium containing a small quantity of glucose in running water to determine the degradation dynamic. Results revealed that the degradation rate of the mixed microorganisms was much higher than that of single one. The bioremediation of mixed strains has great developing prospects in future [19–20]. In this study, only glucose was added into the running water to provide nutrition for the growth and reproduction of the microorganisms, hence, the optimal conditions of degradation kinetics of nicosulfuron by mixed strains need further study. At the same time, the toxicity of degradation products to humans, animals and environments is necessary to be tracked and monitored.

Determination of degradation dynamic of nicosulfuron by partially purified microbial EXF and ENF. Through precipitation of the supernatant with ammonium sulfate, crushing cells by ultrasonic or grinding cells with liquid nitrogen, corresponding EXF and ENF were extracted, which were diluted to the same concentration of protein with 20 mM PBS (pH 7.0). The degradation activities were measured as described

The kinetic parameters for degradation of nicosulfuron by *B. subtilis* YB1 and *A. niger* YF1 in basic medium III

Strains	Kinetics equation of degradation	Rate constants of degradation		
		r^*	K	$T_{1/2}(d)$
<i>B. subtilis</i> YB1	$C = 2.0e^{-0.00274t}$	0.9883	0.00274	6.5929
<i>A. niger</i> YF1	$C = 2.0e^{-0.0136t}$	0.9900	0.01360	4.9908
<i>A. niger</i> YF1+ <i>B. subtilis</i> YB1	$C = 2.0e^{-0.0380t}$	0.9958	0.03800	3.9633

* Correlation coefficient.

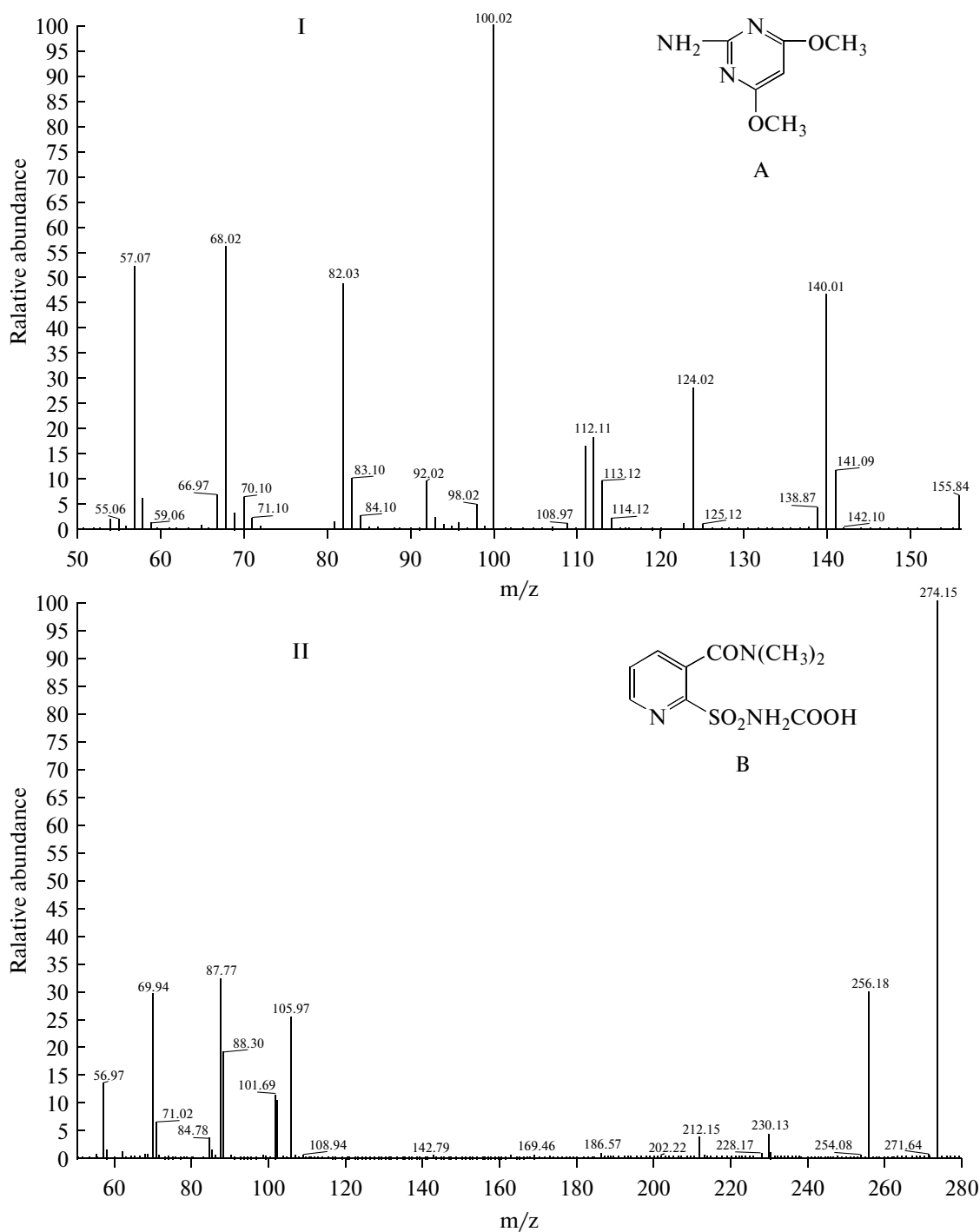


Fig. 4. Mass spectra of the metabolites A (I) and B (II) of nicosulfuron transformed by the *B. subtilis* YB1.

above. The results showed that *B. subtilis* YB1's ENF was capable of degrading nicosulfuron at 15.8% (2 mg/ml of nicosulfuron for 2.7 ml) in 60 min; the EXF had a higher degradation activity of nicosulfuron (about 66.8%). However, the EXF and ENF of *A. niger* YF1 had no the nicosulfuron degradation. It is known that the effective ways of biodegradation of pesticides

include enzymatic and non-enzymatic degradation in environment. Most microorganisms degrade pesticides by exuding enzymes. This work built a foundation for constructing genetically engineered bacteria.

Degradation mechanism of nicosulfuron by *B. subtilis* YB1. Fig. 4 showed total ion chromatograms on degradation products of nicosulfuron. Product A

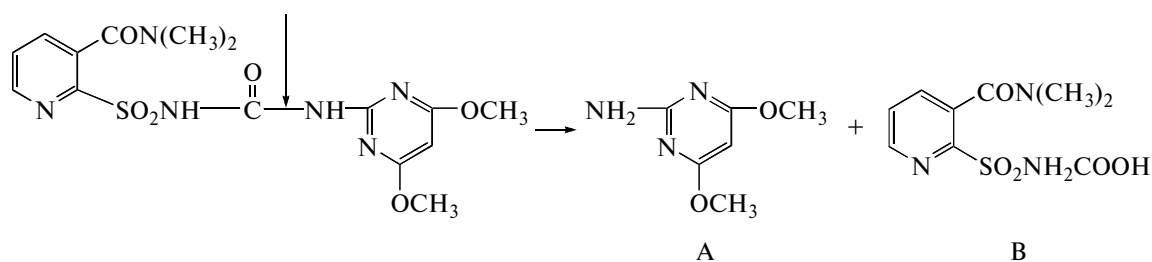


Fig. 5. Biodegradation pathway of nicosulfuron by *B. subtilis* YB.

(Fig. 4a) showed prominent protonated molecular ion at m/z 155.8. Product B (Fig. 4b) showed prominent protonated molecular ions at m/z 274.1. Based on this information, products A and B were identified as sulfonamide and heterocyclic amine, respectively. So the possible pathway of the nicosulfuron degradation is the cleavage of the sulfonylurea bridge (Fig. 5). The results proved that the degrading pathway was different between the microbial metabolic and hydrolysis mechanisms of nicosulfuron. Although the hydrolysis mechanism is also the cleavage of sulfonylurea bridge, the products are corresponding sulfonamide, amino heterocyclic compounds and CO_2 [1]. According to previous reports [1, 8, 9, 11, 21], the cleavage of sulfonylurea bridge seemed to be the common degrading pathway of sulfonylurea herbicides, yielding the corresponding hydrolysis products of sulfonamide and heterocyclic amine [22, 23]. In our work, the active site of nicosulfuron degradation by *B. subtilis* YB1 was preliminarily studied, which provided a theoretical basis for controlling pesticides-contaminated environment. Because only two major peaks of degradation products were determined by mass spectrometry, the remaining products need further separation and determination. The products and site of the nicosulfuron degradation by *A. niger* YF1 need further study.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31171877) and the Youth Foundation Program for Science and Technology of Hebei Province (2010141).

REFERENCES

- Xu, J., Li, X.S., Xu, Y.J., Qiu, L.H., and Pan, C.P., *Chemosphere*, 2009, vol. 74, pp. 682–687.
- Huang, X., He, J., Sun, J.Q., Pan, J.J., Sun, X.F., and Li, S.P., *Int. Biodeterior. Biodegr.*, 2007, vol. 60, pp. 152–158.
- Sarmah, A. and Sabadie, J., *J. Agric. Food Chem.*, 2002, vol. 50, pp. 6253–6265.
- Arias-Estévez, M., López-Periagosa, E., Martínez-Carballob, E., Simal-Gándarab, J., Mejutoc, J.C., and García-Ríod, L., *Agr. Ecosyst. Environ.*, 2008, vol. 123, pp. 247–260.
- Koskinen, W. and Regitano, J., *J. Agr. Food Chem.*, 2008, vol. 56, pp. 5801–5805.
- Nélieu, S., Perreau, F., Guichon, R., Seguin, F., Bry, C., and Einhorn, J., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, vol. 382, pp. 108–114.
- Gu, L.F., Jiang, J.D., Li, X.H., Ali, S.W., and Li, S.P., *Curr. Microbiol.*, 2007, vol. 55, pp. 420–426.
- Luo, W., Zhao, Y.H., Ding, H.T., Lin, X.Y., and Zheng, H.B., *J. Hazard. Mater.*, 2008, vol. 158, pp. 208–214.
- Ma, J.P., Wang, Z., Lu, P., Wang, H., Ali, S., Li, S.P., and Huang, X., *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, vol. 296, pp. 203–209.
- Valle A., Boschin G., Negri M., Abbruscato P., Sorlini C., D'Agostina, A., and Zanardini, E., *J. Appl. Microbiol.*, 2006, vol. 101, pp. 443–452.
- Zhang, H., Zhang, X., Mu, W., Wang, J., Pan, H., and Li, Y., *J. Environ. Sci. Health B*, 2010, vol. 45, pp. 501–507.
- Wackett, L., *Curr. Opin. Microbiol.*, 2009, vol. 12, pp. 244–251.
- Pizzul, L., Castillo, M., and Stenstr, J., *Biodegradation*, 2009, vol. 20, pp. 751–759.
- Yang, Y.J., Tao, B., Zhang, W.H., and Zhang, J.L., *Front. Agric. China*, 2008, vol. 2, pp. 224–228.
- Bradford, M.M., *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248–254.
- Batstone, D.J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S.V., Pavlostathis, S.G., Rozzi, A., Sanders, W.T.M., Siegrist, H., and Vavilin, V.A., *Water Sci. Technol.*, 2002, vol. 45, pp. 65–73.
- Sanders, W.T.M., Geerink, M., Zeeman, G., and Lettinga, G., *Water Sci. Technol.*, 2000, vol. 41, pp. 17–24.
- Beni, L., Sheldon, T., Michael, B., and Michal, G., *Bioresource Technol.*, 2009, vol. 100, pp. 6155–6162.
- Sørensen, S.R., Albers, C.N., and Aamand, J., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, vol. 74, pp. 23–32.
- Euisoon, J., Mitsuyo, H., and Makoto, S., *J. Biosci. Bioeng.*, 2009, vol. 108, pp. 136–141.
- Kim, J., Liu, K.H., Kang, S.H., Koo, S.J., and Kim, J.H., *Pest. Manag. Sci.*, 2003, vol. 59, pp. 1037–1042.
- Boschin, G., D'Agostina, A., Arnoldi, A., Marotta, E., Zanardini, E., Negri, M., Valle, A., and Sorlini, C., *J. Environ. Sci. Health B*, 2003, vol. 38, pp. 737–746.
- Yu, Y.L., Wang, X., Luo, Y.M., Yang, J.F., Yu, J.Q., and Fan, D.F., *Chemosphere*, 2005, vol. 60, pp. 460–466.

УДК 579.841:577.214/215

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМНОГО ФРАГМЕНТА, УЧАСТВУЮЩЕГО В АЭРОБНОЙ ДЕГРАДАЦИИ ДИХЛОРМЕТАНА *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4

© 2012 г. Ю. Е. Фирсова, Д. Н. Фёдоров, Ю. А. Троценко

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пушкино, Московская обл., 142290

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 14.01.2012 г.

Исследованы гипотетические гены *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4 METDI 2671 (*bioD*₂) и METDI 2680 в составе хромосомного фрагмента (126 т.п.н.), связанного с деградацией дихлорметана (ДХМ). Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) показано, что в клетках, выращенных как на ДХМ, так и на метаноле, присутствуют транскрипты обоих генов. С использованием мобилизуемого суицидного вектора рK18mob получены нокаут-мутанты по этим генам. Мутант **БИО** (с инсерцией в гене *bioD*₂) после культивирования на метаноле характеризовался пониженной скоростью роста на ДХМ по сравнению со штаммом ДМ4 дикого типа, в то время как мутант **МТ** (с инсерцией в гене METDI 2680) не отличался по этим показателям от исходного штамма. Результаты свидетельствуют об участии гена *bioD*₂ в биосинтезе биотина, сопряженном с деградацией ДХМ.

В последние годы активно разрабатываются методы очистки промышленных сточных вод и газовых выбросов, содержащих дихлорметан (СН₂Сl₂, ДХМ), с использованием биофильтров на основе аэробных метиловых бактерий, использующих этот персистентный, канцерогенный и мутагенный поллютант в качестве источника углерода и энергии [1]. Установлено, что при росте метиловых бактерий на ДХМ индуцируется дихлорметандегалогеназа DcmA (КФ 4.5.1.3) – цитоплазматический фермент – гомогексамер, катализирующий трансформацию СН₂Сl₂ до формальдегида и двух молекул НСl в реакции, зависимой от восстановленного глутатиона [2]. Однако до сих пор не идентифицированы дополнительные ферменты и гены, участвующие в процессе деградации ДХМ наряду с DcmA [3, 4]. Секвенирование генома *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4 выявило уникальный для этого штамма участок бактериальной хромосомы (“ДХМ-остров”), связанный с деградацией данного поллютанта [5–7]. В пределах этого обширного фрагмента ДНК (126 т.п.н.) обнаружены 129 кодирующих белки нуклеотидных последовательностей, отсутствующих у метилотрофа *Methylobacterium extorquens* AM1, наиболее генетически близкого штамму ДМ4, но не способного расти на ДХМ. Сравнение этого фрагмента ДНК с известными геномами деструкторов галометанов *Methylobacterium chloromethanicum* СМ4 и *Hyphomicrobium denitrificans* ATCC 51888 выявило внутри “ДХМ-острова” штамма ДМ4 несколько кодирующих белки нуклеотидных последовательностей, участие которых в про-

цессе разложения ДХМ вполне вероятно, но нуждается в экспериментальной проверке [7]. Так, продукт гена METDI 2680 предположительно является метилтрансферазой, имеющей 83 и 56% сходства с белками деструктора хлорметана *M. chloromethanicum* СМ4 (MCHL_5330) и *H. denitrificans* ATCC 51888 (Hden_0265) соответственно. В то же время этот ген отсутствует у не использующих ДХМ представителей рода *Methylobacterium*.

В пределах “ДХМ-острова” обнаружены гены биосинтеза биотина. Ген *bioD*₂ (METDI 2671) предположительно кодирует гомолог детиобиотинсинтетазы, предпоследнего фермента в цепи биосинтеза биотина. Этот ген весьма существенно отличается от своего паралога *bioD*₁ (METDI 3114), расположенного за пределами “ДХМ-острова” у штамма ДМ4, и от *bioD* других штаммов рода *Methylobacterium* (уровень аминокислотной идентичности 27%). Напротив, гены детиобиотинсинтетаз *M. dichloromethanicum* ДМ4 (из “ДХМ-острова”) и *H. denitrificans* ATCC 51888 весьма похожи и являются смежными с генами *bioA*, по-видимому, кодирующими еще один фермент биосинтеза биотина. Потенциальная связь между функциями биотина и метаболизмом С₁-соединений может заключаться в роли биотина как кофактора реакций карбоксилирования и декарбоксилирования [8, 9].

Цель работы – исследование транскрипции генов METDI 2680 и *bioD*₂ (METDI 2671) у *M. dichloromethanicum* ДМ4 и их участия в деградации ДХМ.

Таблица 1. Штаммы бактерий и плазмиды

Штамм или плаزمида	Характеристика	Ссылка или источник
Штаммы:		
<i>Methylobacterium dichloromethanicum</i> ДМ4	Деструктор ДХМ, штамм дикого типа	DSM 6343 [10]
БИО	Производный ДМ4, <i>bioD₂::aacC1</i> , Gm ^r	Данная работа
МТ	Производный ДМ4, METDI 2680:: <i>aacC1</i> , Gm ^r	Данная работа [4]
<i>Methylobacterium extorquens</i> ДМ17	Деструктор ДХМ	[4]
<i>Methylohabdus multivorans</i> ДМ13	Деструктор ДХМ, типовой штамм	BKM В-2030 [4]
<i>Methylohabdus multivorans</i> ДМ15	Деструктор ДХМ	DSM 21470 [4]
<i>Methylophila helvetica</i> ДМ9	Деструктор ДХМ, типовой штамм	BKM В-2189 [4]
<i>Albibacter methylovorans</i> ДМ10	Деструктор ДХМ, типовой штамм	DSM 22840 [4]
<i>Ancylobacter dichloromethanicus</i> ДМ16	Деструктор ДХМ, типовой штамм	DSM 21507 [4]
<i>E. coli</i> S17-1	F ⁻ <i>thi pro recA hsdR</i> [RP4-2Tc::Mu-Km::Tn7] Tr ^r Sm ^r	[11]
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^r) endA1 nupG λ-</i>	Invitrogen
Плазмиды:		
pK18mob	Мобилизуемый многоцелевой вектор, Km ^r	[12]
p34S-Gm	Источник Gm ^r -кассеты, Ap ^r , Gm ^r	[13]
pBIOf-01	pK18mob, содержащий 542 п.н. <i>XbaI/HindIII</i> – фрагмент гена METDI 2671 (<i>bioD₂</i>) из штамма ДМ4	Данная работа
pBIOf-02	pBIOf-01, содержащий Gm ^r -касету, клонированную по сайтам <i>PstI</i> из p34S-Gm, в обратной ориентации	Данная работа
pMT-01	pK18mob, содержащий 702 п.н. <i>XbaI/HindIII</i> – фрагмент мутантного гена METDI 2680 из штамма ДМ4	Данная работа
pMT-02	pMT-01, содержащий Gm ^r -касету, клонированную по сайтам <i>SalI</i> из p34S-Gm, в прямой ориентации	Данная работа

МЕТОДИКА

Культивирование бактерий и использованные векторы. Штаммы бактерий и плазмиды представлены в табл. 1. Динамику роста на ДХМ и метаноле исходного штамма *M. dichloromethanicum* ДМ4 и полученных на его основе мутантов БИО и МТ изучали с использованием жидкой минимальной среды “ММ” [14], как описано ранее [4]. В других экспериментах метиловобактерии культивировали на минеральной среде “К” с метанолом, мутантные штаммы – с добавлением соответствующих антибиотиков [4].

Филогенетический анализ. Построение укорененного филогенетического дерева на основе анализа аминокислотных последовательностей BioD представителей *Proteobacteria*, доступных в базе данных NCBI Database Project, производили методом Neighbor-Joining, реализованным в пакете программ TREECON [15].

Изучение экспрессии генов “ДХМ-острова” методом ОТ-ПЦР. Тотальную РНК из клеток *M. dichloromethanicum* ДМ4, выращенных без добавления биотина на минеральной среде “К”, содержащей CH₂Cl₂ или CH₃OH, выделяли с помо-

щью реагента TRIzol (“Invitrogen”, США) и обрабатывали ДНКазой (“Fermentas”, Литва) согласно инструкциям фирм-производителей. Для контроля отсутствия ДНК в препарате РНК проводили ПЦР с использованием праймеров DRTfог и DRTrev на ген *dcmA* [4]. При отсутствии амплификации фрагментов ожидаемой длины препарат считали свободным от примеси ДНК. Реакцию обратной транскрипции проводили при помощи обратной транскриптазы RevertAid™ M-Mulv (“Fermentas”, Литва) по протоколу фирмы-производителя с использованием специфических праймеров на гены METDI 2680, METDI 2671 (табл. 2). Условия ОТ-ПЦР аналогичны опубликованным ранее [4], за исключением температур отжига праймеров (61°C).

Получение нокаут-мутантов *M. dichloromethanicum* ДМ4 с выключенными генами METDI 2680 и *bioD₂*. Выделение геномной и плазмидной ДНК, клонирование ДНК и трансформацию компетентных клеток осуществляли согласно стандартным методикам [16].

Для получения инсерционного варианта гена *bioD₂* (METDI 2671) посредством гомологичной

Таблица 2. Праймеры, использованные в данной работе*

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'-3') и сайт рестрикции	Целевой ген	Назначение
1MTf	CGGCTCTAGAAATGGACGCATTCTCCGATCC <i>XbaI</i>	METDI 2680	ПЦР-мутагенез и клонирование мутантного гена (702 п.н.) в рК18mob; анализ экспрессии методом ОТ-ПЦР; детекция методом ПЦР
2MTg*	ATTCGACTTATATTGTAGTCGACGAAGCCCTCGTGCAACTG <i>SalI</i>		
3MTf*	GTCGACTACAATATAAGTCGAATAGCGCGCCGGAAGGCCCATTT <i>SalI</i>		
4MTg	GCCAAAGCTTTCAGGCGTAGGGCGACCC <i>HindIII</i>		
BIOf	AGGTCTCTAGAGCTCGCGGATTCGATATCCGT <i>XbaI</i>	<i>bioD</i> ₂ (METDI 2671)	Клонирование 542 п.н. фрагмента гена в рК18mob
BIOg	TACTAAGCTTCGCACAAAGCACGATCGGCA <i>HindIII</i>		
2671f	GAGATCGGGAAGTCGGTCTTCTCT	<i>bioD</i> ₂ (METDI 2671)	Анализ экспрессии методом ОТ-ПЦР, продукт – 311 п.н.
2671g	TAAAGCGTGCTGCGACTAAGCG		

* Комплементарные участки выделены курсивом.

рекомбинации амплифицировали фрагмент размером 542 п.н. (содержащий 5'-концевой участок последовательности гена *bioD*₂ размером 393 п.н. и часть соседнего гена METDI 2672 размером 149 п.н.), используя праймеры BIOf и BIOg, содержащие сайты эндонуклеаз *XbaI* и *HindIII* соответственно (табл. 2). Амплификацию данного фрагмента с использованием Pfu-ДНК-полимеразы ("Fermentas", Литва) и его очистку проводили, как описано ранее [4]. Полученный фрагмент, обработанный рестриктазами *XbaI* и *HindIII*, клонировали в мобилизуемом суицидном векторе рК18mob по тем же сайтам, в результате была получена плазида рBIOf-01 (табл. 1). Далее *PstI*-фрагмент (895 п.н.) из вектора р34S-Gm, содержащий ген устойчивости к гентамицину, клонировали в векторе рBIOf-01, который имел единственный сайт рестрикции *PstI* приблизительно в середине клонированного фрагмента длиной 542 п.н. Сайт рестрикции *PstI* располагался на участке гена *bioD*₂ на расстоянии 58 п.н. от его начала. Полученный таким образом вектор рBIOf-02 содержал мутантный фрагмент гена *bioD*₂ со встроенной Gm^r-кассетой в обратной ориентации, а также небольшой участок соседнего гена METDI 2672, который в процессе гомологичной рекомбинации оставался неизменным.

Аналогично был получен инсерционный вариант гена METDI 2680, при этом необходимый для вставки Gm^r-касеты сайт рестрикции *SalI* вводили методом ПЦР-мутагенеза. С использованием разработанных нами пар праймеров 1MTf и 2MTg, а также 3MTf и 4MTg (табл. 2) были получены ампликоны, соответствующие правой и левой половинам гена METDI 2680 (325 п.н. и 397 п.н.). Ампликоны очищали на колонках Quantum Prep[®] PCR Kleen Spin Columns ("Bio-Rad", США) и раз-

бавляли в 50 раз. Праймеры 2MTg и 3MTf содержали сайт рестрикции *SalI*, а также взаимно комплементарные участки. В дальнейшем в качестве матрицы ПЦР использовали смесь обоих ампликонов и проводили первый цикл амплификации без добавления праймеров, а последующие циклы – с использованием фланкирующих праймеров 1MTf и 4MTg. ПЦР проводили в стандартном режиме, указанном для фрагмента гена *bioD*₂. Полученный ПЦР-фрагмент размером 702 п.н., соответствующий мутантному гену METDI 2680 с введенным сайтом рестрикции *SalI*, после очистки на колонках фирмы "Bio-Rad" клонировали в мобилизуемом суицидном векторе рК18mob по сайтам *XbaI* и *HindIII*. В результате была получена плазида рMT-01. Далее *SalI*-фрагмент (895 п.н.) из вектора р34S-Gm, содержащий ген устойчивости к гентамицину, клонировали в векторе рMT-01. Полученный таким образом вектор рMT-02 содержал ген METDI 2680, нуклеотидная последовательность которого была прервана вставкой Gm^r-касеты в прямой ориентации.

Плазмиды рBIOf-02 и рMT-02 мобилизовали путем двуродительского скрещивания *M. dichloromethanicum* ДМ4 и *E. coli* S17-1 (рBIOf-02 или рMT-02), как описано ранее [4]. Потенциальные трансконъюганты очищали двукратным пересевом из единичных колоний на селективной среде "К", содержащей 2% метанола и 20 мкг/мл гентамицина. Все рекомбинанты дополнительно проверяли посредством ПЦР на наличие мутантного аллеля со вставкой Gm^r-касеты.

Аналитические методы. Концентрацию ионов СГ⁻ в супернатанте после центрифугирования (8000 g, 5 мин) суспензии клеток определяли по описанному методу [17]. Оптическую плотность

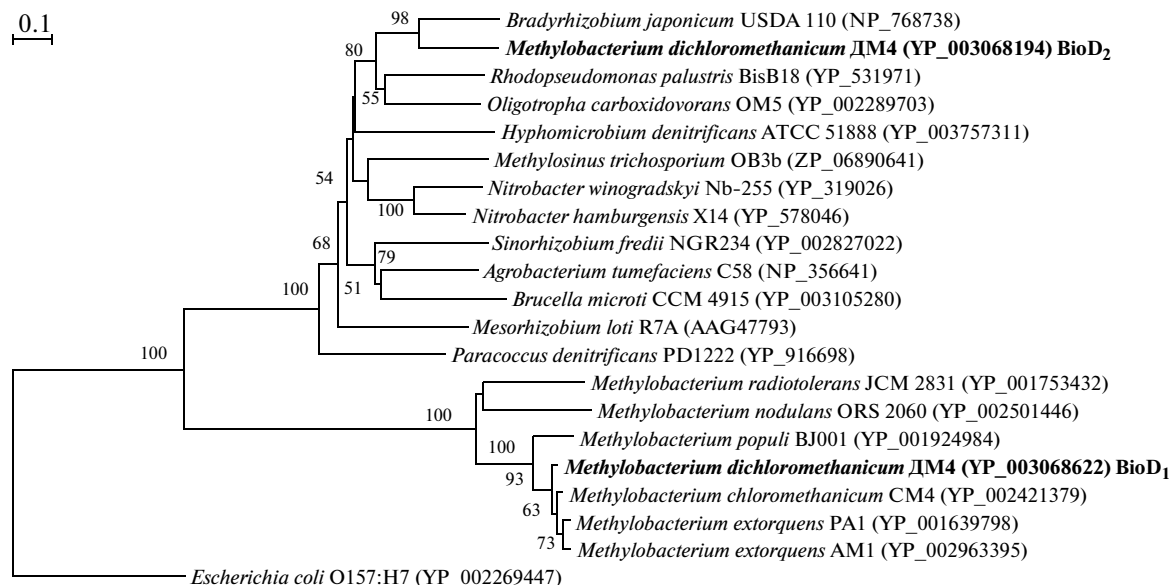


Рис. 1. Филограмма, построенная на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей детио-биотинсинтетаз (BioD) метилотрофных и немилотрофных представителей Proteobacteria. Корень определен включением последовательности BioD *Escherichia coli* O157:H7 в качестве внешней группы. Масштаб соответствует 10 аминокислотным заменам на каждые 100 аминокислот. Статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью “bootstrap-анализа” 100 альтернативных деревьев.

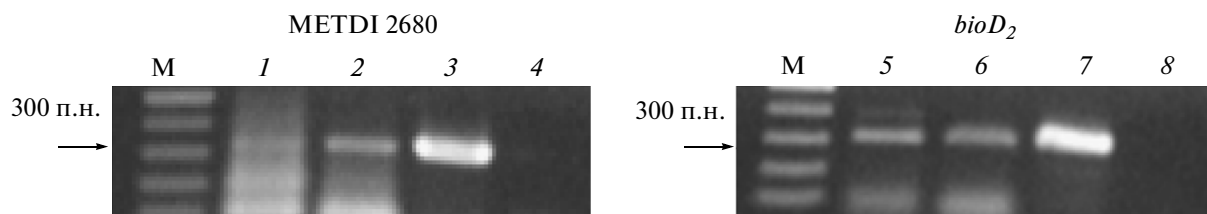


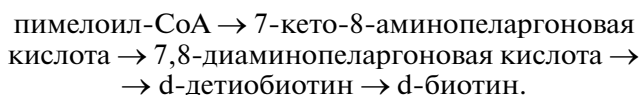
Рис. 2. ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов METDI 2680 и *bioD*₂ в клетках штамма ДМ4, выращенных на метаноле (1, 5) и ДХМ (2, 6).

М – маркер молекулярной массы; 1, 2 – ПЦР с кДНК METDI 2680; 5, 6 – ПЦР с кДНК *bioD*₂; 3, 7 – ПЦР с геномной ДНК штамма ДМ4 (положительный контроль) с праймерами на перечисленные гены; 4, 8 – ПЦР без матрицы (отрицательный контроль).

измеряли при 340 нм на регистрирующем спектрофотометре “Shimadzu UV-160” (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основании данных анализа генома предположили, что синтез биотина у штамма ДМ4 осуществляется через следующие интермедиаты:



В этот процесс последовательно вовлечены гены *bioF*, *bioA*, *bioD* и *bioB*; гомологичные им последовательности имеются в геноме штамма ДМ4, причем две (*bioD*₂, *bioA*₂) находятся внутри “ДХМ-острова”.

На рис. 1 показано филогенетическое положение детиобиотинсинтетаз BioD *M. dichloromethanicum* ДМ4 среди метилотрофных и немети-

лотрофных протеобактерий. Видно, что транслированная аминокислотная последовательность BioD₂ штамма ДМ4, кодируемая геном из “ДХМ-острова”, близка соответствующим ферментам ризобий, тогда как BioD₁ является общей для представителей рода *Methylobacterium*.

Методом ПЦР с использованием специфических праймеров на ген детиобиотинсинтетазы *bioD*₂ штамма ДМ4 соответствующий данному гену фрагмент был найден нами у деструкторов ДХМ с сериновым (*M. helvetica* ДМ9, *M. multivorans* ДМ13 и ДМ15, *M. extorquens* ДМ17) и рибулозобисфосфатным (*A. methylovorans* ДМ10, *A. dichloromethanicus* ДМ16) путями. Факт наличия одинакового варианта гена у метилобактерий, принадлежащих к различным родам и реализующих разные пути первичной С₁-ассимиляции, весьма интересен и может быть обусловлен латеральным переносом этого гена. В дальнейшем пла-

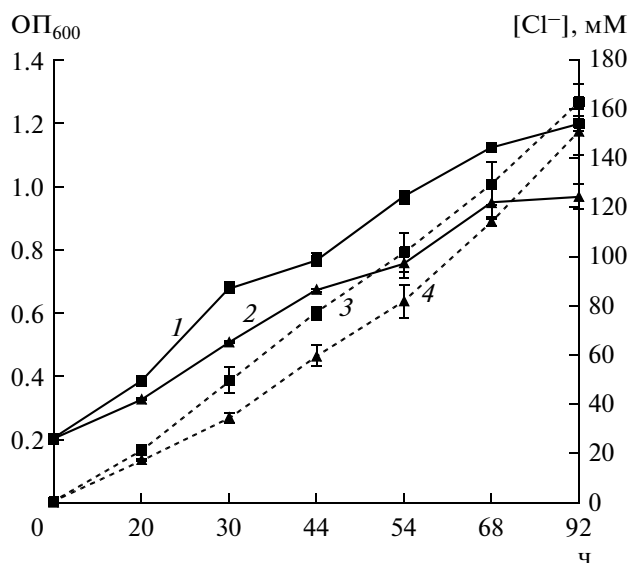


Рис. 3. Динамика роста на ДХМ штамма ДМ4 (1, 3) и нокаут-мутанта БИО (2, 4). 1, 2 – ОП суспензии клеток; 3, 4 – концентрация ионов хлора в среде.

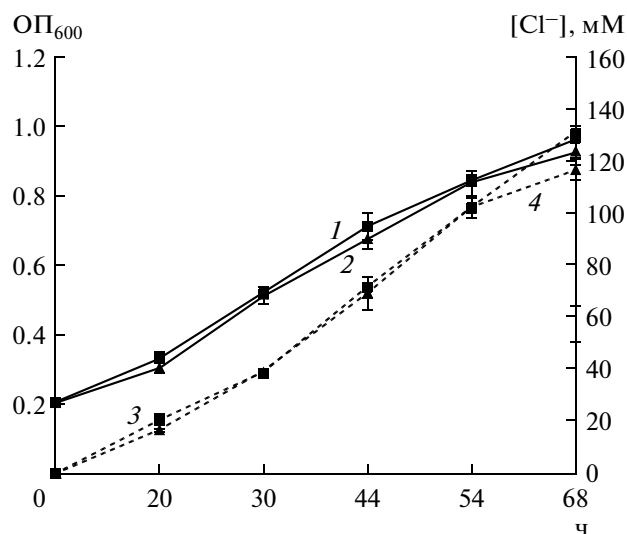


Рис. 4. Динамика роста на ДХМ штамма ДМ4 (1, 3) и нокаут-мутанта МТ (2, 4). 1, 2 – ОП суспензии клеток; 3, 4 – концентрация ионов хлора в среде.

нируется определить полную нуклеотидную последовательность *bioD* генов у этих деструкторов ДХМ.

В то же время ген-ортолог предполагаемой метилтрансферазы METDI 2680 штамма ДМ4 методом ПЦР обнаружен только у близко родственного деструктора ДХМ *M. extorquens* ДМ17.

Транскрипционный анализ экспрессии генов *bioD*₂ и METDI 2680 методом ОТ-ПЦР показал, что в клетках *M. dichloromethanicum* ДМ4, выращенных как на ДХМ, так и на метаноле, присутствуют РНК-транскрипты указанных генов (рис. 2). Экспрессия этих генов на уровне транскрипции ниже, по сравнению с геном дихлорметандегалогеназы *dcmA*, на что указывает относительно невысокий выход продукта в параллельных реакциях при использовании одного и того же препарата РНК. Результаты ПЦР с кДНК METDI 2680 свидетельствуют о необходимости экспериментальной проверки гипотезы об индукции транскрипции этого гена в клетках, выращенных на ДХМ.

Далее, используя мобилизуемый суицидный вектор рK18mob, получили нокаут-мутанты МТ и БИО с выключенными генами METDI 2680 и *bioD*₂, нуклеотидная последовательность которых была прервана инсерцией Gm^r-кассеты. Установлено, что мутанты МТ и БИО сохранили способность к росту на ДХМ как в жидких, так и на агаризованных средах. Не выявлены различия в динамике роста обоих мутантов в жидкой среде “ММ” с метанолом по сравнению со штаммом ДМ4 дикого типа. Однако при переходе от культивирования на метаноле к росту на ДХМ наблюдали статистически достоверное снижение скорости роста мутанта БИО по сравнению с исходным штам-

мом, что отражено на графиках изменения оптической плотности бактериальной суспензии и концентрации в среде хлор-ионов, экскретируемых клетками при деградации ДХМ (рис. 3). Так, в разных точках отбора проб ОП₆₀₀ мутанта БИО составляла 74.3–87.2% относительно контроля, а концентрация ионов Cl⁻ – 69.5–92.5%. Аналогичные графики для мутанта МТ и исходного штамма ДМ4 практически полностью совпадали (рис. 4). Это означает, что ген предполагаемой метилтрансферазы METDI 2680, сходной с белками дехлорирующих штаммов *M. chloromethanicum* СМ4 и *H. denitrificans* АТСС 51888, не имеет отношения к деградации ДХМ или действует в условиях, отличных от условий эксперимента.

Напротив, замедление роста на ДХМ мутанта *M. dichloromethanicum* ДМ4 с выключенным геном *bioD*₂ свидетельствует о том, что детиобiotинсинтетазы BioD₂ участвует в биосинтезе биотина. При этом следует учитывать, что ген *bioD*₂ может котранскрибироваться со следующим за ним геном *bioA*₂ (METDI 2670), предположительно, кодирующим аминотрансферазу 7,8-диаминопеларгоновой кислоты, действующую на предшествующем этапе биосинтеза кофактора. В этом случае у мутанта БИО может быть одновременно заблокирован синтез двух ферментов (BioD₂ и BioA₂), что предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

Пока не получен ответ на вопрос, почему в “ДХМ-острове” штамма ДМ4 отсутствуют два других гена биосинтеза биотина *bioF* и *bioB*. Видимо, соответствующие реакции биосинтеза не являются лимитирующими. В целом, роль биотина в процессе деградации ДХМ метиловыми бактериями детально не исследована. Возможно,

важность биотина в этом процессе обусловлена особой ролью биотинзависимых карбоксилаз, в частности ацетил-СоА-карбоксилазы (КФ 6.4.1.2) и пропионил-СоА-карбоксилазы (КФ 6.4.1.3), катализирующих ключевые этапы биосинтеза жирных кислот [18]. Известно, что адаптация штаммов бактерий, толерантных к токсичным органическим растворителям, сопровождается изменением состава жирных кислот фосфолипидов клеточных мембран [19]. Как было показано нами ранее, при бактериальной деградации ДХМ происходит уплотнение барьера проницаемости клеточных мембран путем увеличения содержания насыщенных ($C_{16:0}$) и уменьшения уровня ненасыщенных жирных кислот ($C_{18:1}$ и $C_{20:1}$) с одновременным повышением содержания фосфатидилхолина. Вероятно, такие адаптивные перестройки при использовании ДХМ увеличивают потребность деструкторов в биотине, синтез которого *de novo* происходит в условиях кислотного, осмотического и окислительного стресса и может осуществляться при участии разных изоферментов. Следовательно, изучение свойств ферментов биосинтеза биотина, кодируемых генами “ДХМ-острова” у штамма ДМ4, необходимо для понимания молекулярных механизмов деградации этого поллютанта.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ГК № 16.512.11.2024) и гранта РФФИ № 12-04-00760-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловобактерии / Ред. В.Ф. Гальченко. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
2. Vuilleumier S., Pagni M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 58. P. 138–146.
3. Kayser M.F., Ucurum Z., Vuilleumier S. // Microbiology (UK). 2002. V. 148. P. 1915–1922.
4. Фирсова Ю.Е., Фёдоров Д.Н., Троценко Ю.А. // Микробиология. 2011. Т. 80. № 6. С. 796–802.
5. Vuilleumier S., Chistoserdova L., Lee M.-L., Bringel F., Lajus A., Zhou Y. et al. // PloS ONE. (www.plosone.org) 2009. V. 4. № 5. e5584. doi:10.1371/journal.pone.0005584.
6. Muller E., Hourcade E., Louhichi-Jelail Y., Hammann P., Vuilleumier S., Bringel F. // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. № 9. P. 2518–2535.
7. Muller E., Bringel F., Vuilleumier S. // Res. Microbiol. 2011. V. 162. № 9. P. 869–876.
8. Lin S., Hanson R.E., Cronan J.E. // Nature Chem. Biol. 2010. V. 6. P. 682–688.
9. Chapman-Smith A., Cronan J.E. // Trends Biochem. Sci. 1999. V. 24. P. 359–363.
10. Doronina N.V., Trotsenko Y.A., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Leisinger T. // Syst. Appl. Microbiol. 2000. V. 23. P. 210–218.
11. Simon R., Priefer U., Puhler A. // Nature Biotechnology. 1983. V. 1. 784–791.
12. Schäfer A., Tauch A., Jager W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A. // Gene. 1994. V. 145. P. 69–73.
13. Dennis J.J., Zylstra G.J. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 2710–2715.
14. Vuilleumier S., Leisinger T. // Eur. J. Biochem. 1996. V. 239. P. 410–417.
15. Van de Peer Y., de Wachter R. // CABIOS. 1994. V. 10. № 5. P. 569–570.
16. Sambrook J., Russel D.W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd ed. / Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
17. Jörg G., Bertau M. // Anal. Biochem. 2004. V. 328. P. 22–28.
18. Streit W., Entcheva P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 61. P. 21–31.
19. De Bont J.A.M. // Trends Biotechnol. 1998. V. 16. № 12. P. 493–499.

Functional Analysis of the Genome Fragment Involved in Aerobic Dichloromethane Degradation by *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4

Yu. E. Firsova, D. N. Fedorov, and Yu. A. Trotsenko

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

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Received January 14, 2012

Abstract—The hypothetical genes of *Methylobacterium dichloromethanicum* DM4, METDI 2671 (*bioD*₂), and METDI 2680 located within the chromosomal fragment (126 kb) associated with dichloromethane (DCM) degradation have been studied. The reverse transcription polymerase chain reaction method (RT-PCR) showed the presence of transcripts of both genes in cells grown on DCM and methanol. The mobilized suicidal vector pK18mob was used to obtain knockout mutants in these genes. The BIO mutant (with an insertion in the *bioD*₂ gene) after cultivation on methanol was characterized by a lower growth rate on DCM compared to the wild-type DM4 strain, while the MT mutant (with an insertion in the METDI 2680 gene) did not differ from the initial strain in respect of these characteristics. The results demonstrate the involvement of the *bioD*₂ gene in biotin biosynthesis coupled with DCM degradation.

UDC 577.152

CLONING AND BIOINFORMATIC ANALYSIS OF AN ACIDOPHILIC β -MANNANASE GENE, *Anman5A*, FROM *Aspergillus niger* LW-1

© 2012 S. G. Zhao, M. C. Wu, C. D. Tang, S. J. Gao, H. M. Zhang, J. F. Li

Jiangnan University, 214122 China

e-mail: biowmc@126.com; lijf@163.com

Received September 30, 2011

Using 3' and 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques, the full-length cDNA sequence of the *Anman5A*, a gene that encodes an acidophilic β -mannanase of *Aspergillus niger* LW-1 (abbreviated to AnMan5A), was identified from the total RNA. The cDNA sequence was 1417 bp in length, harboring 5'- and 3'-untranslated regions, as well as an open reading frame (ORF) which encodes a 21-aa signal peptide, a 17-aa propeptide and a 345-aa mature peptide. Based on the topology of the phylogenetic tree of β -mannanases from glycoside hydrolase (GH) family 5, the AnMan5A belongs to the subfamily 7 of the GH family 5. Its 3-D structure was modeled by the bitemplate-based method using both MODELLER 9.9 and SALIGN programs, based on the known β -mannanase crystal structures of *Trichoderma reesei* (1QNO) and *Lycopersicon esculentum* (1RH9) from the GH family 5. In addition, the complete DNA sequence of the *Anman5A* was amplified from the genomic DNA using the pUCm-T vector-mediated PCR and conventional PCR methods. The DNA sequence was 1825 bp in length, containing a 5'-flanking regulatory region, 2 introns and 3 exons when compared with the full-length cDNA.

Mannan, the second most abundant hemicellulose after xylan, can be classified into 4 subfamilies: linear mannan, glucomannan, galactomannan and galactoglucomannan. Each of these polysaccharides presents a β -1,4-*D*-linked backbone, containing only mannose residues or a combination of mannose and glucose residues. For complete biodegradation of mannans, besides β -mannanase, β -mannosidase and β -glucosidase, additional enzymes such as acetyl mannan esterase (EC 3.1.1.6) and α -galactosidase (EC 3.2.1.22) are required to remove side-chain substituents [1]. β -Mannanase (β -1,4-*D*-mannan mannohydrolase, EC 3.2.1.78) can catalyze the random cleavage of internal β -1,4-*D*-mannosidic linkages of the mannan backbone [2]. To date, almost all known β -mannanases have been grouped into glycoside hydrolase (GH) families 5, 26 and 113 based on their primary sequence alignment and hydrophobic cluster analysis (<http://www.cazy.org/>). Recently, β -mannanases have attracted much attention owing to their potential applications in diverse industrial processes [1]. Like the other GH members, β -mannanases played important roles in simplifying the industrial processes improving the quality of products, and reducing the environmental pollution caused by using the chemicals [3].

So far, β -mannanases have been isolated and characterized from microorganisms, plants and metazoans, among which filamentous fungi were considered to possess great potential for their production [4]. Studies have been performed on enhancing the β -mannanase activity by mutating enzyme-producing strains and optimizing fermentation conditions, and

on producing enzyme on an industrial scale. However, the commercialization and broad applications of β -mannanases are still limited by their low activities and expensive production costs [5]. Therefore, increasing the enzyme activities and improving its properties, by means of genetic engineering, are highly desirable. Up to date, some β -mannanase genes from filamentous fungi, such as *Aspergillus usarii* [4], *Aspergillus sulphureus* [6], *Aspergillus aculeatus* [7], *Biopora* sp. MEY-1 [3] and *Trichoderma reesei* [8], were cloned, characterized and rationally modified, and several recombinant β -mannanases were expressed in heterologous cells [3, 7].

In our previous research, the bimutation breeding and fermentation conditions optimizing of *Aspergillus niger* LW-1 for enhancing the β -mannanase (AnMan5A) activity were performed [5, 9]. The enzymatic properties of the AnMan5A were also characterized, which possessed some crucial properties including the superior V_M and good chemical tolerance [10]. The aim of this study was the cloning of both full-length cDNA and complete DNA sequences of the *Anman5A*, a gene that encodes an acidophilic β -mannanase of *A. niger* LW-1. Moreover, the bioinformatic analysis of the AnMan5A and *Anman5A* sequences was also described.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and kits. Restriction enzymes, *Taq* DNA polymerase, T4 DNA ligase, X-gal, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), DNA marker,

RNA PCR Kit and 5'-Full RACE Kit were purchased from TaKaRa (China). RNA extraction Kit, BCA-200 protein assay Kit and protein markers were obtained from Sangon (China). Phenyl-Sepharose CL-4B, DEAE-Sepharose FF and Sephadex G-75 were products of Pharmacia (Sweden). EZ-10 Spin column DNA gel extraction Kit was purchased from BBI (Canada). Locust bean gum and Coomassie brilliant blue R-250 were products of Sigma (USA). All other chemicals were of analytical grade.

Strains, media, and vector. *A. niger* LW-1, isolated from the soil in China as reported previously [9], was used to extract the total RNA and genomic DNA. The strain was cultured in a liquid medium containing (%): of tryptone – 1.0, yeast extract – 0.5, dextrose – 1.0 and locust bean gum – 0.5 (pH 6.0). *E. coli* JM109 (TaKaRa, China), used as a host strain for gene cloning and DNA sequencing, was cultured in a Luria-Bertani medium [11]. The pUCm-T vector (Sangon, China) was used both for the vector-mediated PCR method originally developed in our laboratory [4] and for the directly cloning of PCR products.

Total RNA and genomic DNA extraction. *A. niger* LW-1 was cultured at 32°C and 220 rpm for 36 h. Mycelia were collected, and washed with deionized water. Total RNA was extracted by using one-step method according to the instruction of RNA extraction Kit. Analytical results of the extracted total RNA showed that the ratio of OD₂₆₀ to OD₂₈₀ was 1.96, and the 18S and 28S rRNA bands, characterized for eukaryotes, on formaldehyde denatured agarose gel electrophoresis [4] were specific, indicating that the total RNA had high purity and was not decomposed. Extraction of the genomic DNA from *A. niger* LW-1 was performed according to the method reported previously [12].

Enzyme activity assay. β -Mannanase activity was assayed by measuring the amount of released reducing sugar from locust bean gum, using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method as described previously [9]. One unit (U) of β -mannanase activity was defined as the amount of enzyme liberating 1 μ mol of reducing sugar equivalent per min under the assay conditions, using *D*-mannose as standard.

Protein and carbohydrate content assays. SDS-PAGE was performed on a 12.5% gel by the method of Laemmli [13], and isolated proteins were visualized by staining with the Coomassie brilliant blue R-250. Protein concentration was determined by using the BCA-200 Protein Assay Kit, using bovine serum albumin as a standard. Carbohydrate content of the purified native AnMan5A was assayed by the phenol-sulfuric acid method [14], using *D*-mannose as a standard.

Purification of the AnMan5A. AnMan5A synthesized by *A. niger* LW-1 was secreted into the solid-state

culture medium (koji) [9]. The koji (10 g) was extracted with 10 volumes (w/v) of 20 mM Na₂HPO₄–NaH₂PO₄ buffer (pH 7.0) at 30°C for 30 min with shaking (100 rpm). The crude extract was fractionated by ammonium sulfate at concentrations ranging from 40 to 75% saturation, and the fraction containing the AnMan5A activity was retained. The resulting precipitate was dissolved in 10 ml of the same buffer, and then dialyzed against it overnight. Subsequent purification manipulations were performed by using phenyl-Sepharose CL-4B hydrophobic chromatography, DEAE-Sepharose FF ion exchange chromatography and Sephadex G-75 gel filtration according to the method reported previously [10].

Primers for PCR amplification. After aligning 4 fungal β -mannanase sequences from the GH family 5: *A. usarii* (ADZ99027), *A. sulphureus* (ABC59553), *A. aculeatus* (AAA67426) and *T. reesei* (AAA34208), we found 2 most conserved peptide fragments, GYF-AGTNS(/C)YW and STINTGADGLQ, located in the N-terminal region. Therefore, 2 degenerate primers ManF1 and ManF2 were designed corresponding to GYFAGTN and STINTGA, respectively. Primers dT-PR and PR (original names, oligo dT-M₁₃ primer M₄ and M₁₃ primer M₄), as well as OP and IP (original names, 5'-RACE outer primer and 5'-RACE inner primer) were provided by RNA PCR Kit and 5'-full RACE Kit, respectively. By pUCm-T vector-mediated PCR, the 5'-flanking regulatory region of the *Anman5A* of *A. niger* LW-1 was amplified using primers T-5prF (identical to the 21-bp fragment upstream the T/A clone site of the pUCm-T vector) and ManR1 or ManR2. Primers CManF and CManR were used to amplify the complete DNA sequence of the *Anman5A*. As listed in Table 1, all primers (except those provided by Kits) were synthesized by Sangon (China).

Cloning of the full-length cDNA. The 3'-end fragment of AnMan5A cDNA was amplified by using RNA PCR Kit and nested PCR technique. The primer dT-PR was used for reverse transcription of the first-strand cDNA from the *A. niger* LW-1 total RNA. Using the resulting first-strand cDNA as template, the first-round PCR amplification was carried out using primers ManF1 and PR as following conditions: a denaturation at 94°C for 2 min; 30 cycles of at 94°C for 30 s, then 53°C for 30 s and 72°C for 75 s; an extra elongation at 72°C for 10 min. Then the second-round PCR amplification was performed for confirmation (nested PCR) using primers ManF2 and PR under the same conditions as the first-round PCR. Next, the 5'-end fragment of AnMan5A cDNA, originating from the transcription starting point, was amplified using 5'-full RACE Kit. The first-strand cDNA was used as template for the first-round PCR using primers OP and ManR1, and then subjected to the second-round PCR using primers IP and ManR2 for

The oligonucleotide sequences of primers for PCR amplification

Cloned fragments	Primers	Oligonucleotide sequences (5'–3')*	Size, bp
3'-end fragment of AnMan5A cDNA	ManF1	GCTACTTYGCSGGVACSAAC	20
	ManF2	TCDACVATCAACACKGGNGC	20
	dT-PR	GTTTTCCCAGTCACGAC-Oligo dT	37
	PR	GTTTTCCCAGTCACGAC	17
5'-end fragment of AnMan5A cDNA	OP	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	23
	IP	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	34
	ManR1	ATTGTCGATTTGCCGTCCTG	20
	ManR2	GCAGTTGGTACCAGACTGTG	20
5'-flanking region of the <i>Anman5A</i>	T-5prF	ACGACTCACTATAGGGCGACA	21
	ManR1	ATTGTCGATTTGCCGTCCTG	20
	ManR2	GCAGTTGGTACCAGACTGTG	20
Complete DNA of the <i>Anman5A</i>	CManF	GGATCCCACCACTCAGAGGAT	21
	CManR	TTAAGTTTTACTTGTTTGATT	22

* Y = C/T, S = C/G, V = A/G/C, D = A/G/T, K = G/T and N = A/T/G/C.

confirmation. Finally, the full-length cDNA sequence of the *Anman5A* was identified by assembling above cloned 3'- and 5'-end fragments of AnMan5A cDNA.

Cloning of the complete DNA. The pUCm-T vector-mediated PCR amplification, a novel method initially developed in our laboratory to amplify 5'- or 3'-flanking region of a known DNA fragment, was performed by 4 steps as flowcharted in Fig. 1 (exemplified as the cloning of a 5'-flanking regulatory region of the *Anman5A*). Firstly, the *A. niger* LW-1 genomic DNA was digested using two optimum restriction enzymes, which were selected by a series of pre-experiments, to obtain a longer unknown 5'-flanking region. In this work, *Bam*HI and *Eco*RV were selected for the digestion of the genomic DNA. Secondly, a *Bam*HI cohesive end was filled in and an adenine nucleotide (A) was added to the 3'-end of each DNA strand using *Taq* DNA polymerase at 72°C for 10 min. The third step was the ligation of the second step's products into pUCm-T vector. And finally, the recombinant vectors were first amplified using T-5prF and ManR1 to obtain the 5'-flanking regulatory region of the *Anman5A*, and then subjected to the second-round PCR using T-5prF and ManR2 for confirmation. The complete DNA sequence of the *Anman5A* was directly amplified from the *A. niger* LW-1 genomic DNA by conventional PCR using CManF and CManR.

Nucleotide sequence accession number. Both the full-length cDNA and complete DNA sequences of the *Anman5A* of *A. niger* LW-1 have been deposited in the GenBank database under the accession numbers of JN123356 and JN811092, respectively.

Analysis of the AnMan5A structures from *A. niger* LW-1. The signal peptide of the preproAnMan5A was

predicted by using SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The putative N-glycosylation sites were located by using the NetNGlyc program 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). The physico-chemical properties of the mature AnMan5A were assayed by using the ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>). The homology alignment of the protein primary structures between the AnMan5A from *A. niger* LW-1 and other β -mannanases from the GH family 5 was accomplished in GenBank using the BLAST program. The phylogenetic tree was constructed by Swiss-Prot protein knowledgebase (<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>) using the PC/GENE CLUSTAL method [4]. The 3-D structure of the AnMan5A was modeled by the bitemplate-based method using both MODELLER 9.9 (<http://salilab.org/modeller/>) and SALIGN programs (http://salilab.org/DBAli/?page=tools&action=f_salign), based on known crystal structures of the *T. reesei* β -mannanase (1QNO) and *Lycopersicon esculentum* β -mannanase (1RH9) from the GH family 5.

Analysis of the *Anman5A* sequence from *A. niger* LW-1. The open reading frame (ORF) was determined by using the program of NCBI ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). The GeneMark (<http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/eukhmm.cgi>) was applied for the exact localization of the exon/intron boundaries. The prediction of 5'-promoter region and its characterization were carried out by using both the Berkeley Drosophila Genome Project (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) and PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>).

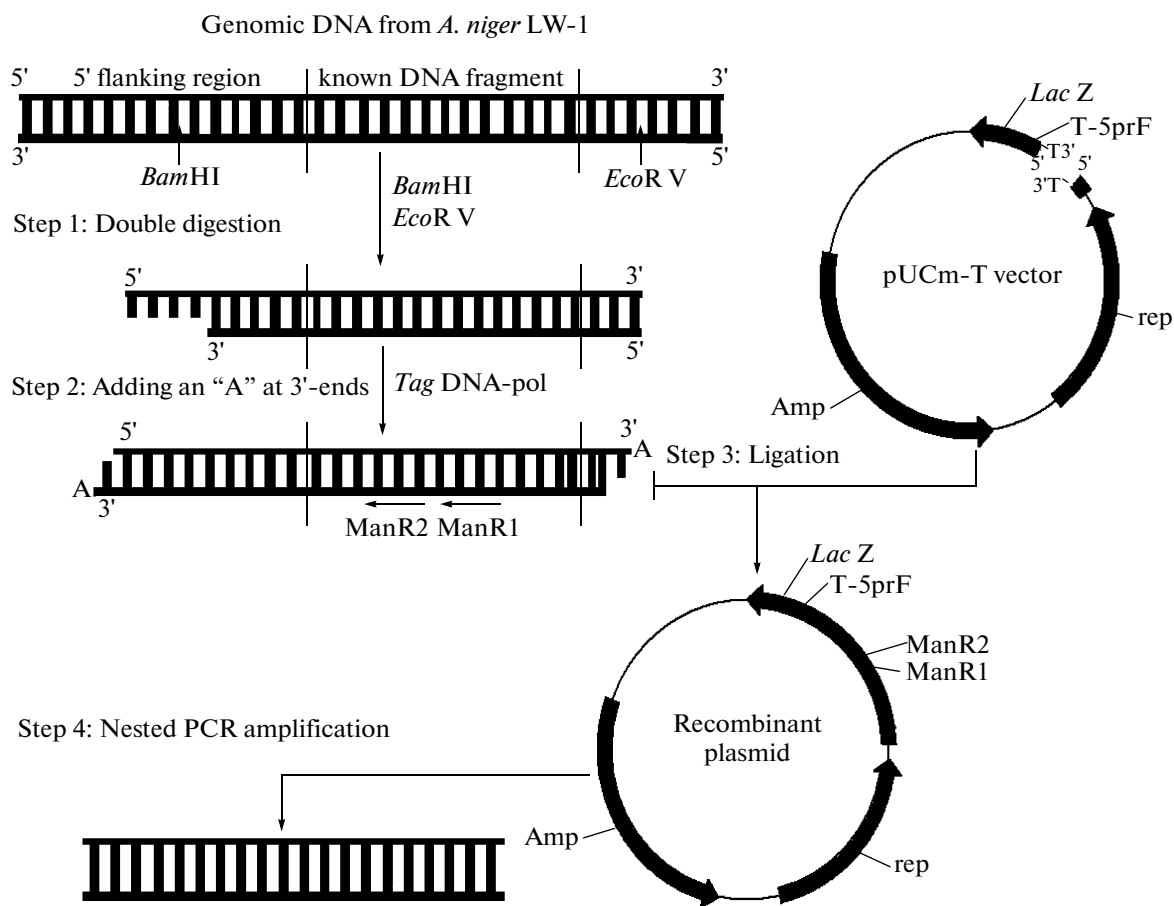


Fig. 1. Flowchart of the pUCm-T vector-mediated PCR and nested PCR amplification methods (exemplified as the cloning of a 5'-flanking region of the *Anman5A* from *A. niger* LW-1).

RESULTS AND DISCUSSION

Purification and N-terminus sequencing. The native AnMan5A from the cultivated koji of *A. niger* LW-1 was purified to homogeneity by using ammonium sulfate fractionation, phenyl-Sepharose CL-4B hydrophobic chromatography, DEAE-Sepharose FF ion exchange chromatography and Sephadex G-75 gel filtration [10]. The specific enzyme activity of the native AnMan5A towards locust bean gum was 238.1 U/mg. SDS-PAGE analysis revealed a single protein band of about 48.0 kDa, an apparent molecular weight of the native AnMan5A, which is larger than the theoretical molecular weight of 38 kDa. The carbohydrate content of the purified AnMan5A was detected to be 25.2% using the phenol-sulfuric acid method. The N-terminal amino acid sequence of the native AnMan5A was analyzed on 470A automatic sequencer obtained from Applied Biosystems (Foster, CA, USA). The sequence of N-terminal 15 amino acid residues was determined to be SFASTSGLQFTIDGE, which is identical to those of the *A. usarii* and *A. sulphureus* β -mannanase [4, 6].

Cloning of the full-length cDNA of the *Anman5A*.

Using the reverse transcribed first-strand cDNA as template, one 1.2-kb band and the other faint band were amplified by the first-round PCR amplification using primers *Man*F1 and *PR* (Fig. 2, lane 1). Based on the principle of the nested PCR technique, each band was agarose gel-purified and subjected to the second-round PCR for confirmation using primers *Man*F2 and *PR*. Only the 1.2-kb band can be amplified again (Fig. 2, lane 2), and then was ligated into pUCm-T vector. DNA sequencing result verified that the cloned 3'-end cDNA fragment was exactly 1213 bp in length (except complementary sequence of dT-*PR*). An approximate 450-bp band of the 5'-end cDNA fragment was first-round amplified using primers *OP* and *Man*R1 as a major PCR product (Fig. 2, lane 3), and then subjected to the second-round PCR for confirmation using primers *IP* and *Man*R2 (Fig. 2, lane 4). DNA sequencing result showed that the first-round major PCR product was exactly 394 bp in length (except primers *OP* and *IP*), containing a 190 bp of sequence identical to that between *Man*F1 and *Man*R1, and a 204 bp of sequence in which a transcription

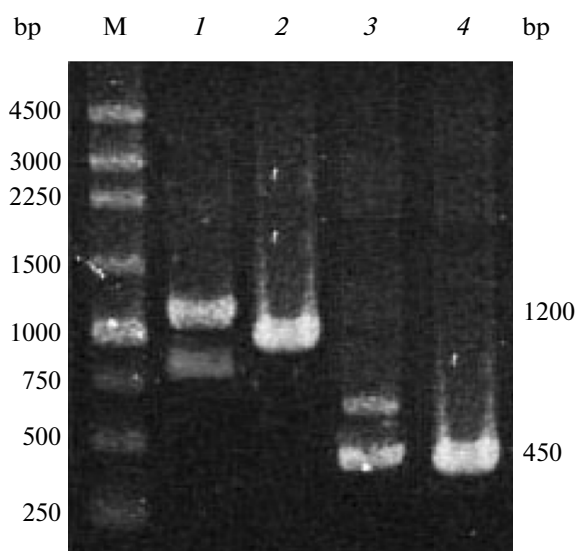


Fig. 2. Cloning of the full-length cDNA sequence of the *Anman5A* from *A. niger* LW-1. M – 250 bp DNA marker; 1 – one 1.2-kb band and the other faint band amplified by the first-round PCR using primers ManF1 and PR; 2 – an agarose gel-purified 1.2-kb band in lane 1 subjected to the second-round PCR for confirmation using primers ManF2 and PR; 3 – an approximate 450-bp band amplified by first-round PCR using primers OP and ManR1 as a major PCR product; 4 – a gel-purified 450-bp band in lane 3 subjected to the second-round PCR for confirmation using primers IP and ManR2.

starting point (G) and a cDNA fragment encoding a 21-aa signal peptide, a 17-aa propeptide and a determined N-terminal 15 amino acid residues (SFASTS-GLQFTIDGE) of the native AnMan5A were recognized (Fig. 3). The full-length cDNA sequence was obtained by assembling two cloned 3'- and 5'-end cDNA fragments. It was 1,417 bp in length (except polyA), including a 41 bp of 5'-untranslated region (5'-UTR), a 1,152 bp of ORF encoding a 383-aa preproAnMan5A, and a 224 bp of 3'-untranslated region (3'-UTR).

Analysis of the AnMan5A primary structure of *A. niger* LW-1. The SignalP 3.0 predicted an unambiguous signal peptide cleavage site between Ala21 and Leu22, indicating that the AnMan5A is a secretory protein. With the information of the determined sequence of N-terminal 15 amino acids of the native AnMan5A purified from *A. niger* LW-1, it was probable that a 383-aa preproAnMan5A was predicted to contain a 21-aa signal peptide from Met1 to Ala21, a

17-aa propeptide from Leu22 to Thr38 and a 345-aa mature peptide (namely AnMan5A) (Fig. 3). Propeptides also exist in other β -mannanases or microbial enzymes [15, 16]. The molecular weight of 38 kDa and pI of 4.15 were calculated from the deduced AnMan5A. There were 2 putative N-glycosylation sites (N156-S-S158 and N225-F-T227) in the AnMan5A sequence. Amino acid homology alignment showed that identities of the AnMan5A from *A. niger* LW-1 with other 4 fungal β -mannanases of *A. usarii* (ADZ99027), *A. sulphureus* (ABC59553), *A. aculeatus* (AAA67426) and *T. reesei* (AAA34208) from GH family 5 were 98.6, 93.0, 73.9 and 56.3%, respectively. Alignment analysis also revealed that the AnMan5A sequence contained 7 functional amino acid residues that were strictly conserved among the GH family 5 members [6]: 2 catalytic residues (acid/base, Glu168 and nucleophile, Glu276) located respectively in the β 4 and β 7 strands, and 5 active site residues (Arg52, Asn167, His241, Tyr243, and Trp306) (Fig. 4). These features verified that the AnMan5A from *A. niger* LW-1 was a member of GH family 5.

As the amino acid sequence identity among the members of GH family 5 is less than 20%, an additional classification into more than 10 subfamilies has been introduced. As a result, GHs within any subfamily show at least 25% sequence identity and may display similar substrate specificity. On the basis of their sequence similarity and substrate specificity, β -mannanases belong to subfamilies 7, 8 and 10 [17]. In 1998 β -mannanases from the eukaryotic and prokaryotic organisms were grouped under subfamily 7 and 8, respectively [18]. Phylogenetic tree of 24 known β -mannanases from various microorganisms, plants and metazoans of the GH family 5 and the *A. niger* LW-1 AnMan5A was constructed using the PC/GENE CLUSTAL method as shown in Fig. 5. Based on the topology of a phylogenetic tree, the AnMan5A is related to β -mannanases from the subfamily 7 and is closest to those of *A. usarii* (ADZ99027), *A. sulphureus* (ABC59553) and *A. aculeatus* (AAA67426).

Analysis of the 3-D structure. Based on crystal structures of the *T. reesei* β -mannanase (1QNO) and *L. esculentum* β -mannanase (1RH9) from the GH family 5, we modeled the 3-D structure of the AnMan5A from *A. niger* LW-1 using the bitemplate-based method (Fig. 4). The 3-D structure consisted principally of the $(\alpha/\beta)_8$ TIM-barrel protein fold. The structure has been likened to a 'salad bowl', with one

Fig. 3. Nucleotide sequence of the full-length cDNA or complete DNA of the *Anman5A* from *A. niger* LW-1 and its deduced amino acid sequence of the AnMan5A. Two introns with sizes of 63 and 60 bp are shown in lowercase letters. A signal peptide from Met1 to Ala21 and a propeptide from Leu22 to Thr38 are underlined. The determined N-terminal 15 amino acid sequence of the native AnMan5A is indicated in a grayed box. The bold letters of TATAAA and G in boxes indicate a putative TATA box and a transcription starting point, respectively. The grayed italic letters of ATG and TAA represent the starting codon and stop codon, respectively. A polyadenylation signal, AATAAAA, is shown as grayed underlined letters. The bold arrows below the letters represent the primers for PCR amplification.

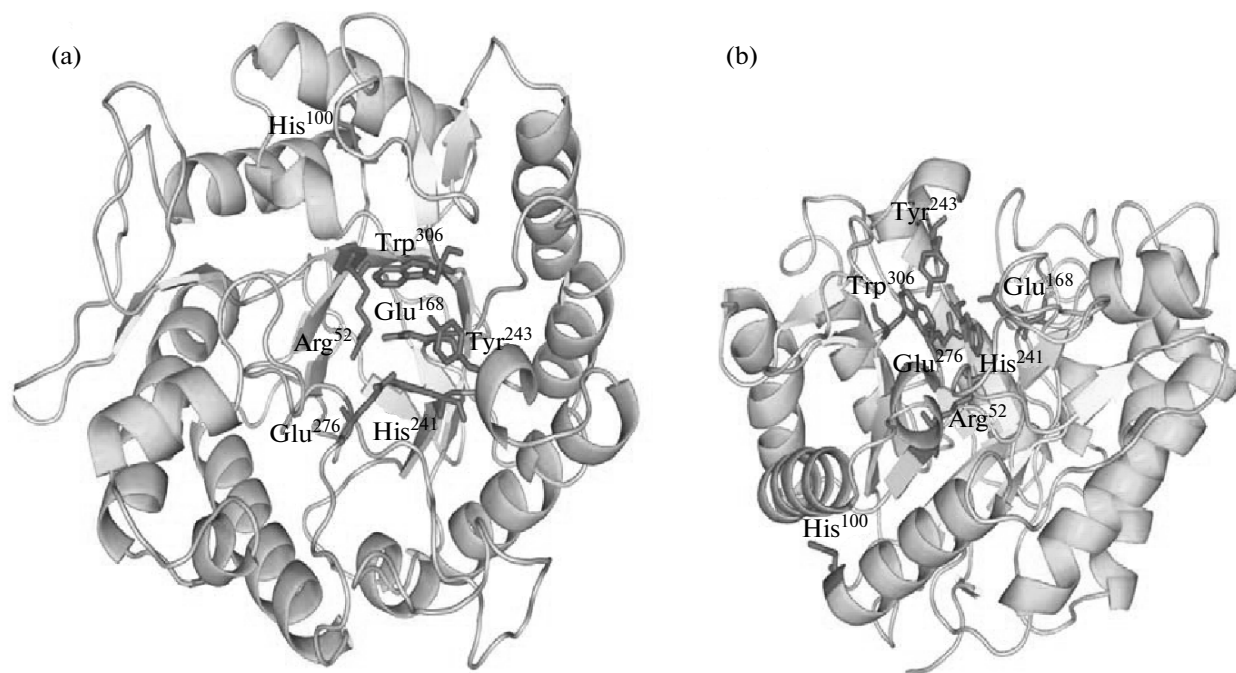


Fig. 4. The 3-D structure of the AnMan5A from *A. niger* LW-1 modeled with the bitemplate-based method using both MODELLER 9.9 and SALIGN programs, based on crystal structures of the *T. reesei* β -mannanase (1QNO) and *L. esculentum* β -mannanase (1RH9). The 3-D structure consists principally of the $(\alpha/\beta)_8$ TIM barrel fold. Two catalytic residues (Glu168 and Glu276) and 5 active site residues (Arg52, Asn167, His241, Tyr243, and Trp306) were strictly conserved among the GH family 5 members. (a) View along the barrel axis. (b) The “salad bowl” view showing the hydrophobic cleft for substrate binding and cleaving.

face of the molecule having a large radius (approximately 45 Å) due to an elaborate loop architecture, while the opposite face, which consists of simple α/β turns, had a radius of approximately 30 Å. This was similar to the fold described for GH family 10 enzymes and both were members of GH clan-A [19]. Indeed, two GH families 5 and 10 were quite closely related and in addition to sharing a common fold they had the same type of catalytic mechanism and shared several common residues [17, 20]. Two catalytic residues, Glu168 and Glu276, located in the hydrophobic cleft of the AnMan5A, where the β -1,4-*D*-mannosidic linkages of the mannan or heteromannan backbone were inserted and got cleaved.

Cloning of the complete DNA of the *Anman5A*. An approximate 750-bp 5'-flanking regulatory region of the *Anman5A* from *A. niger* LW-1 was first amplified using primers T-5prF and ManR1, then subjected to the second-round PCR for confirmation using primers T-5prF and ManR2. DNA sequencing result showed that the second-round PCR product was exactly 657 bp in length (except the sequence from the primer T-5prF to T/A clone site of pUCm-T vector), containing a new 275-bp sequence and a 382-bp sequence identical to that from the transcription starting point (G) to ManR2. Using the *A. niger* LW-1 genomic

DNA as template, an approximate 1.8-kb complete DNA sequence of the *Anman5A* was directly amplified by the conventional PCR using primers CManF and CManR, and then cloned into pUCm-T vector, followed by DNA sequencing. Result showed that the DNA sequence was exactly 1,825 bp in length, containing a 5'-flanking regulatory region, 3 exons and 2 short introns with sizes of 63 and 60 bp, respectively (Fig. 3).

Analysis of the complete DNA of the *Anman5A*. Compared with the full-length cDNA sequence of the *Anman5A*, the complete DNA sequence was composed of a 285 bp of 5'-flanking regulatory region, a 41 bp of 5'-UTR region, 2 short introns with sizes of 63 and 60 bp respectively, 1152 bp of ORF, and a 224 bp of 3'-UTR. Both of the exon/intron boundaries conform to the canonical GT-AG rule. It was predicted that the 5'-promoter region of the *Anman5A* located at the range from -40 to +10 bp, designating the transcription starting point (G) as +1 bp. The TATAAA sequence as a classical TATA box locates at -30 bp upstream the transcription starting point, which is in agreement with the consensus distance generally found in 5'-promoter regions of eukaryote genes. In some cases, other consensus sequences, such as TTATTT, also could act as substitutes for the classical

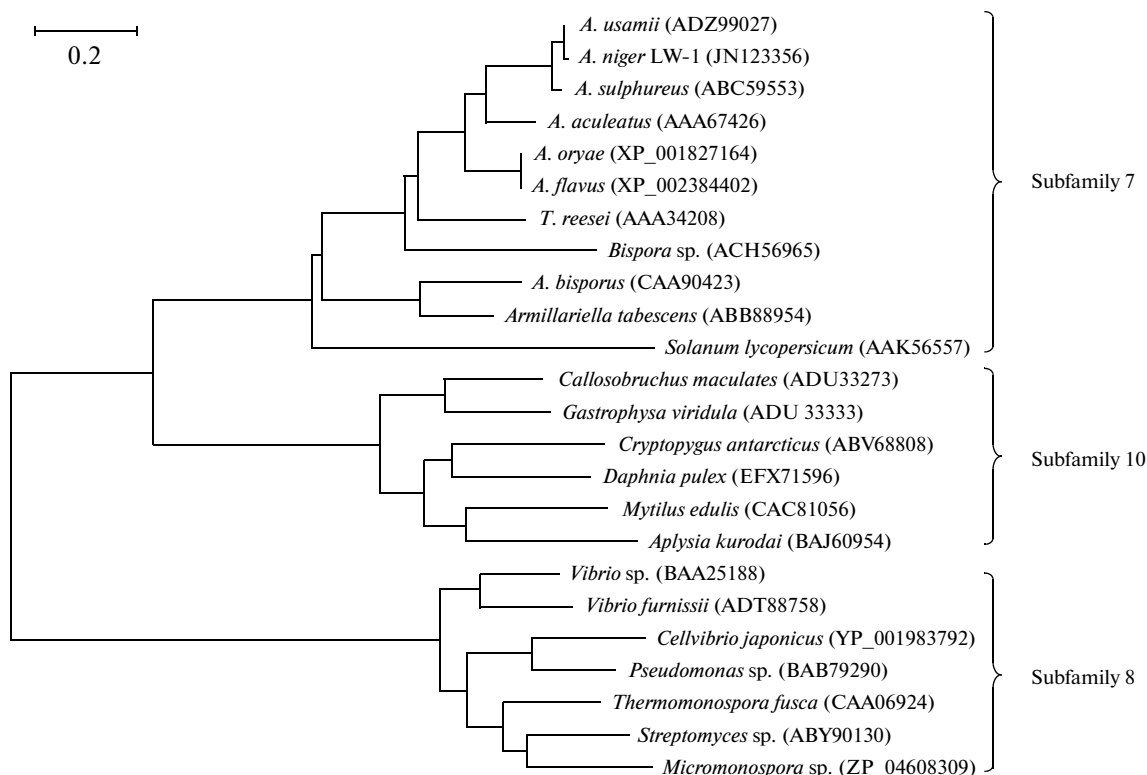


Fig. 5. The phylogenetic tree showing the evolutionary relativity and the homological degrees among the β -mannanase amino acid sequences from the GH family 5. The estimated genetic distance between sequences is proportional to the lengths of the horizontal lines connecting one sequence to another.

TATA box [21]. In eukaryotes, the functional CAAT box is typically found about -75 bp upstream the transcription starting point. Some CAAT boxes may locate far from the starting point [22]. However, we did not find any CAAT box in the *Anman5A* until -285 bp. It was also found that the AATAAA sequence as a putative polyadenylation signal located at $+1500$ bp downstream the transcription starting point.

The native AnMan5A purified from the cultivated koji of *A. niger* LW-1 possesses some predominant properties including the superior V_M , and good chemical tolerance, pH stability and thermostability, which are very suitable for industrial applications. But, its purification processes were time-consuming and laborious. To simplify the purification manipulations and to produce the AnMan5A inexpensively, it is necessary to express the *Anman5A* in heterologous cells, such as *Pichia pastoris* GS115 that is one of the favorite hosts.

In this work, we developed a procedure to clone both the full-length cDNA and complete DNA sequences of the *Anman5A* from *A. niger* LW-1 by using 4 steps of PCR amplification based on different principles. In addition, the bioinformatic analysis of the AnMan5A and *Anman5A* sequences was also reported. Our present work provided a solid basis for further re-

searches on the *Anman5A* expression in *P. pastoris* GS115, the relationship between AnMan5A's structure and function, and improvement of its enzymatic properties by means of genetic engineering such as the site-directed mutagenesis, directed evolution and computational design.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Doctoral Research Funds of Jiangnan University (No. JUDCF11011) and the Postgraduate Innovation Training Project of Jiangsu, China (CXZZ11_0480). We are grateful to Prof. Xianzhang Wu (School of Biotechnology, Jiangnan University) for providing technical assistance.

REFERENCES

1. Moreira, L.R.S. and Filho, E.X.F., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol. 79, no. 2, pp. 165–178.
2. Dhawan, S. and Kaur, J., *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2007, vol. 27, no. 4, pp. 197–216.
3. Luo, H.Y., Wang, Y.R., Wang, H., Yang, J., Yang, Y.H., Huang, H.Q., Yang, P.L., Bai, Y.G., Shi, P.J., Fan, Y.L., and Yao, B., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, vol. 82, no. 3, pp. 453–461.

4. Tang, C.D., Guo, J., Wu, M.C., Zhao, S.G., Shi, H.L., Li, J.F., and Wang, J.Q., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, vol. 27, no. 12, pp. 2921–2929.
5. Wu, M.C., Tang, C.D., Li, J.F., Zhang, H.M., and Guo, J., *Carbohydr. Res.*, 2011, vol. 346, no. 14, pp. 2149–2155.
6. Chen, X.L., Cao, Y.H., Ding, Y.H., Lu, W.Q., and Li, D.F., *J. Biotechnol.*, 2007, vol. 128, no. 3, pp. 452–461.
7. Roth, R., Moodley, V., and van Zyl, P., *Mol. Biotechnol.*, 2009, vol. 43, no. 2, pp. 112–120.
8. Stalbrand, H., Saloheimo, A., Vehmaanpera, J., Henrissat, B., and Penttila, M., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, vol. 61, no. 3, pp. 1090–1097.
9. Li, J.F., Wu, M.C., and Xia, W.S., *J. Food Sci. Biotechnol.*, 2007, vol. 26, no. 4, pp. 88–92. (in Chinese)
10. Li, J.F., Wu, M.C., and Xia, W.S., *Food Ferment. Ind.*, 2008, vol. 34, no. 1, pp. 5–9.
11. Sambrook, J. and Russell, D.W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed), Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab., 2001, pp. 1595–1604.
12. Wu, M.C., Wang, J.Q., Zhang, H.M., Tang, C.D., Gao, J.H., and Tan, Z.B., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, vol. 27, no. 4, pp. 831–839.
13. Laemmli, U.K., *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685.
14. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F., *Anal. Chem.*, 1956, vol. 28, no. 3, pp. 350–356.
15. Ademark, P., Varga, A., Medve, J., Harjunpaa, V., Drakenberg, T., Tjerneld, F., and Stalbrand, H., *J. Biotechnol.*, 1998, vol. 63, no. 3, pp. 199–210.
16. Wang, J.Q., Zhang, H.M., Wu, M.C., and Tang, C.D., *Biotechnol. Lett.*, 2011, vol. 33, no. 3, pp. 1029–1038.
17. Larsson, A.M., Anderson, L., Xu, B., Munoz, I.G., Uson, I., Janson, J.C., Stalbrand, H., and Stahlberg, J., *J. Mol. Biol.*, 2006, vol. 357, no. 5, pp. 1500–1510.
18. Hilge, M., Gloor, S.M., Rypniewski, W., Sauer, O., Heightman, T.D., Zimmermann, W., Winterhalter, K., and Piontek, K., *Structure*, 1998, vol. 6, no. 11, pp. 1433–1444.
19. Zhang, Y.L., Ju, J.S., Peng, H., Gao, F., Zhou, C., Zeng, Y., Xue, Y.F., Li, Y., Henrissat, B., Gao, G.F., and Ma, Y.H., *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, no. 46, pp. 31551–31558.
20. Larson, S.B., Day, J., Barba de la Rosa, A.P., Keen, N.T., and McPherson, A., *Biochem.*, 2003, vol. 42, no. 28, pp. 8411–8422.
21. Lampidonis, A.D., Stravopodis, D.J., Voutsinas, G.E., Messini-Nikolaki, N., Stefos, G.C., Margaritis, L.H., Argyrokastritis, A., Bizelis, I., and Rogdakis, E., *Gene*, 2008, vol. 427, no. 1–2, pp. 65–79.
22. Wenkel, S., Turck, F., Singer, K., Gissot, L., Le Gourrier, J., Samach, A., and Coupland, G., *Plant Cell*, 2006, vol. 18, no. 11, pp. 2971–2984.

UDC 577.152

PRODUCTION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) DEPOLYMERASE FROM *Aspergillus* sp. NA-25

© 2012 A. Nadhman, F. Hasan, Z. Shah, A. Hameed, A. A. Shah

Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Quaid-i-Azam University, Islamabad 45320, Pakistan
e-mail: alishah_75@yahoo.com

Received December 8, 2011

Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) degrading thermophilic fungus was isolated from soil sample collected from waste disposal site, Islamabad, Pakistan. It was able to grow efficiently on a medium containing PHBV as a sole source of carbon and has been identified as *Aspergillus* sp. NA-25 by 18S rRNA. Using 9% of inoculum maximum production of PHBV depolymerase was observed at 45°C, pH 7.0 in the presence of 0.2% lactose as an additional carbon source. PHBV depolymerase was purified by precipitation with 80% ammonium sulfate and gel filtration chromatography on Sephadex G-75. The four enzyme forms obtained after gel filtration were analyzed on SDS-PAGE and their molecular weights (36, 68, 72 and 90 kDa) were determined. They were characterized on the basis of effect of different temperatures, pH, metal ions and different reagents on the PHBV activity and stability. It is obvious that the fungal strain *Aspergillus* sp. NA-25 is capable of degrading PHBV with the help of different types of depolymerases.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) may form complex subcellular structures referred to as “carbonosomes”, produced by microorganisms due to excess of carbon source [1]. They have gained much attention as they are a better replacement of fossil fuel polymers. These polymers have similar material properties to that of polyolens [2]. Microorganisms in isolated form or in consortia can degrade them easily [3]. The fascinating feature of these polymers is their complete degradation to carbon dioxide and water under aerobic conditions and into methane under anaerobic conditions. Natural PHA degraders of various bacterial species from soil and water include genera i.e. *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Streptomyces*, *Ilyobacter* [4, 5], as well as fungi belonging to *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*, *Mastigomycetes*, *Myxomycetes* [3].

At present, approximately 150 different constituents of PHAs have been identified as homopolymers or as copolymers [6]. The most important are polyhydroxybutyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV). PHBV is a copolymer of PHB, which contain 3-hydroxyvalerate monomers in the side chain. Because of the better mechanical performance of PHBV, it is used in making various products like films, compost bags, disposable food service ware and moulded products [7]. The PHBV molecules are large enough to be transported directly across the cell wall and, therefore, nature has provided bacterial and fungal species with the ability to degrade PHBV extracellularly. This ability is realized in the form of extracellular depolymerases, which convert these large polymers to its respective monomers i.e. 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate [8].

Among the microorganisms, fungi are considered to be appropriate candidates for the PHA degradation because they show fast surface growth rate and high depolymerase activity. Fungi belonging to *Aspergillus* species contribute considerably to PHA breakdown. Many thermotolerant strains of *Aspergillus fumigatus* that are capable of degrading PHB and PHBV at high temperatures (above 40°C) have been isolated from soil samples [9] and compost [10]. A number of researchers have isolated different strains of *A. fumigatus*, degrading PHA as a carbon source [10–13].

Many extracellular PHA depolymerases from prokaryotic and eukaryotic microorganisms have been purified and characterized. Scherer with coworkers [11] reported that the extracellular PHB depolymerase of *Aspergillus fumigatus* M2A isolated from compost had a molecular weight of 57 kDa whose activity was maximum at pH 8.0 and 70°C. It was revealed [14] that the extracellular PHB depolymerase of *Paecilomyces lilacinus* D218 isolated from soil had a molecular weight of 48 kDa and its optimum activation conditions were pH 7.0 and 45°C. Han and Kim [15] reported that the extracellular PHB depolymerase of *Penicillium simplicissimum* had a molecular weight of 36 kDa and activity at 45°C at pH 5.0. In another study, Shah et al. [16] purified two types of extracellular PHBV depolymerases from *Streptovorticillium kashmirensis* AF1, isolated from municipal sewage sludge. They had molecular weights of 35 and 45 kDa and maximum activity at 45°C and at pH 7.0 and 8.0. PHA depolymerases purified from recombinant *Escherichia coli* appeared as 4 bands on SDS-PAGE with molecular masses 44, 46, 49, and 65 kDa. *Pseudomonas lemoignei* was found to have five PHB depolymerases [17].

The aim of the study was to isolate and identify PHBV degrading fungi from soil, and to purify and characterize the degradative enzymes.

MATERIALS AND METHODS

Material. Poly-3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid (PHBV) containing 5% 3-hydroxyvaleric acid (3-HV), was obtained in powder form from Sigma-Aldrich (Germany).

Sample collection. Soil samples were collected from waste disposal sites, Islamabad, Pakistan, and were used to screen for PHBV utilizing microorganisms.

PHBV-agar plates. PHBV-degrading microorganisms were isolated from soil, by inoculating on mineral salt agar [17] supplemented with 0.2% (w/v) of PHBV as a sole source of carbon source. PHBV suspension was prepared by sonicating PHBV powder in a flask, containing mineral salt medium (MSM) for 20 min in ultrasonic water bath (35 KHz, 285 W). 2% agar was added to the PHBV suspension and poured into petri plates for the clear-zone assay.

Isolation of PHBV degrading microorganisms. The PHBV degrading microorganisms were isolated through enrichment technique. The soil sample (1.0 g) was added to Erlenmeyer flask containing 100 ml of MSM containing 0.2% PHBV (pH 7.0) as the sole carbon source and incubated at 30°C with shaking (150 rpm/min). MSM contained (g/l): K_2HPO_4 – 0.5; KH_2PO_4 – 0.04; NaCl – 0.1; $CaCl_2 \cdot H_2O$ – 0.002; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.02; $(NH)_2SO_4$ – 0.2 and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.001. After a week, 0.5 ml of this culture broth was transferred into a fresh MSM supplemented with PHBV. This step for re-culturing into fresh medium was repeated 5 times. At the end of the experiment, the culture was spread on PHBV emulsified mineral salt agar plates for single-colony isolation.

Identification of PHBV degrading microorganism. A fungal strain NA-25 was isolated on the basis of clear zone around its growth on PHBV emulsified mineral salt agar plates. It was identified by macroscopic (conidial and mycelial color) and microscopic (seriation, vesicle, conidia and ascospores) examination and also through 18S rRNA sequencing.

18S rRNA sequencing procedure. The DNA was extracted from *Aspergillus* sp. NA-25 and 18S rRNA gene was amplified from DNA using ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') primers. For PCR reaction, 1 µl of template DNA was mixed in 20 µl of PCR reaction solution, then 35 amplification cycles at 94°C for 45 s, 55°C for 60 s, and 72°C for 60 s were made. DNA fragments were amplified about 500 ~ 800 bp. The unincorporated PCR primers and dNTPs from PCR products were removed by using Montage PCR Clean up kit (Millipore, USA). The purified PCR products of approximately

about 500 ~ 800 bp were sequenced by using ITS1/ITS4 primers. Sequencing was performed by using Big Dye terminator cycle sequencing kit v.3.1 (Applied Biosystems, USA). Sequencing products were resolved on an Applied Biosystems model 3730XL automated DNA sequencing system (Applied Biosystems, USA) at the Macrogen (Korea).

Preparation of spore suspension. Spore suspension was prepared by adding autoclaved 0.9% NaCl solution directly on to sporulating fungal colonies grown on Petri plates, and then spore suspension was collected under aseptic conditions in screw capped tubes. The spores were counted as 2.3×10^5 cells/ml, with the help of hemocytometer (424027 – BD BBL™ Hemacytometer Cover Glass, USA).

Optimization of various factors for the production of PHBV depolymerase. PHBV depolymerase production was observed at different temperatures (30, 37, 45, 50, 55°C), pH ranges (3.0–9.0), substrate concentrations (0.1–0.5% w/v), 1% carbon sources (glucose, fructose, lactose, sucrose) and size of inoculum (1, 3, 5, 7, 9, 11%). For these experiments, PHBV was emulsified in MSM; the suspension was prepared by sonicating the mixture for 30 min at 90 duty cycles using a Branson sonifier (Branson Ultrasonic Cooperation, USA).

PHBV depolymerase assay. PHBV depolymerase activity was determined by the method described by Kobayashi et al. [18]. PHBV was taken in a concentration of 0.03% in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. This suspension was sonicated for 30 min in Branson sonifier (Branson Ultrasonic Cooperation, USA). After centrifugation at 10000 g for 10 min, 0.1 ml of culture supernatant was added to 0.9 and the mixture was incubated for 24 h at 30°C. Activity was measured as the decrease in turbidity of PHBV suspension at OD_{650} against blanks (substrate + buffer). One unit of activity is defined as the activity resulting in a decrease in OD at 650 nm per 24 h.

Protein estimation. The protein determination was done by using the method described by Lowry et al.

Purification of PHBV depolymerase. The fungal strain was grown in liquid MSM containing PHBV as a carbon source under optimized culture conditions at 30°C and 150 rpm for 2 days.

Ammonium sulfate precipitation. The culture was centrifuged at 10,000 g for 30 min at 4°C. To precipitate the protein, cell free extract was subjected to increasing concentrations (10–80%) of ammonium sulfate. The material was sedimented at 10,000 g, for 20 min at 0°C. The pellet was dissolved in minimum amount of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, and kept at –20°C.

Gel permeation chromatography (Sephadex G-75). About 2 ml of crude enzyme was loaded in the Sephadex G-75 column and eluted by using the same phosphate buffer. Fractions showing maximum enzyme activity were pooled, lyophilized and used for SDS-

PAGE analysis on a 12% polyacrylamide gel according to the method of Laemmli [19]. The samples were run along with the standard protein markers of 26–170 kDa (Fermentas, USA). The gel was stained with silver staining kit (Bio-Rad, USA) and was visualized on gel documentation system (Bio-Rad, USA).

Characterization of purified PHBV depolymerases.

The purified enzymes were characterized on the basis of effect of temperature, pH, metal ions and inhibitors on enzyme activity and stability.

Effect of temperature on the activity of purified PHBV depolymerases. The residual PHBV depolymerase activity was determined after incubating the purified enzyme for 1 h at 25, 35, 45, 55, 60 and 70°C at pH 7.0. The percentage stability was also calculated.

Effect of pH on the activity of purified PHBV depolymerases. The PHBV depolymerase activity was measured by incubating the purified enzyme forms in the presence of buffers of various pH (4.0–9.0) for 1 h at 37°C and residual enzyme activity was calculated. Buffer solutions (20 mM) of different pH values were used: acetate buffer (pH 4.0–5.0), phosphate buffer (pH 6.0–7.0), Tris- HCl (pH 8.0) and glycine- NaOH buffer (pH 9.0).

Effect of metal ions on the activity of purified PHBV depolymerases. The effects of various metal ions on the activity of the purified PHBV depolymerase were examined by assaying the remaining activity after incubating the enzymes with 1 mM metal ions (chloride and sulphate salts of the metal ions included Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Co²⁺, and Zn²⁺) for 1 h at 37°C at pH 7.0.

Effect of reagents influencing enzyme activity. Effect of 1 mM inhibitors (EDTA, β-mercaptoethanol, SDS) was determined after incubation with the PHBV depolymerase for 1 h at 37°C at pH 7.0 and determining the residual activities.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and identification of PHBV degrading microorganism. A fungal strain was isolated from waste disposal site by enrichment and plate assay techniques. The sequencing result of microorganism named strain NA-25 showed a total of 967 bp nucleotides of 18S rRNA. The resultant sequence was matched with those in the NCBI GeneBank and Ribosomal Database Project (RDP). The blast analysis of the 18S rRNA sequence revealed that the strain NA-25 belongs to genus *Aspergillus* having 100% similarities with *Aspergillus* sp. DX12 with accession number GU726139.1.678. The polymer-mineral salt agar plates were used to determine the PHBV degradation by this fungus. The results showed that *Aspergillus* sp. NA-25 was capable of degrading PHBV as a carbon source by producing clear zones of hydrolysis. *Aspergillus* species are considered as predominant PHA-degraders [20]. According to systematic screening of 45 soil fungi for degradation of PHAs 6 potent *Aspergillus* isolates belonging to *As-*

pergillus flavus, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, and *A. racemosus* were selected [21]. Recently, Shah et al. [16] isolated an *Actinomyces* strain i.e. *Streptovorticillium kashmirensis* AF1, from sewage sludge capable of degrading PHBV and Ghanem et al. [22] isolated PHBV and PHB degrading *Nocardiopsis aegyptia* from marine seashore environment.

Production of PHBV depolymerase by *Aspergillus* sp. NA-25. Different factors (temperature, pH, substrate concentration, different carbon sources and inoculum size) influence the production of PHBV depolymerases. These environmental factors had a drastic effect on the degradation of polymer [23]. The maximum degradation of PHBV by *Aspergillus* sp. NA-25 was found at temperature 45°C (6.70 U/mg). Thermotolerant *Aspergillus* sp. ST-01, *Streptomyces* MG and *Bacillus* TT96 isolated from soil were able to degrade polycaprolactone (PCL), PHB and poly(butylene succinate-co-adipate) at 50°C after 144 h of incubation [24]. Many thermotolerant *A. fumigatus* strains that are capable of degrading PHB and PHBV at high temperatures (above 40°C) have been isolated from soil samples [12] and compost [10]. Phithakrotchanakoon et al. [25] isolated 5 bacterial species, degrading PHA's at high temperature.

The influxes of H⁺ and OH⁻ ions have a drastic impact on the production of degradation enzymes. *Aspergillus* NA-25 was capable of degrading PHBV at vast range of pH but the maximum degradation occurred at neutral pH (7.22 U/mg). Phithakrotchanakoon et al. [25] isolated a *Streptomyces* sp. BCC23167 showing degradation of several biopolymers including PHA copolymers, PCL and polybutylene succinate at neutral pH. A fungus *Paecilomyces lilacinus* F4-5 showed maximum enzyme production at pH 7.0 for PHB and PHBV depolymerases [26].

The substrate concentration plays an important role because it suppresses the activity of enzyme [27]. *Aspergillus* sp. NA-25 had maximum depolymerase production in the presence of 0.2% of PHBV (6.39 U/mg). Elbanna et al. [28] used 0.2% PHB for the production of PHB depolymerase from *Schlegelella thermodepolymerans*. Increase in concentration of PHBV decreased the production of depolymerases. The decrease in enzyme production at higher concentration of polymer in growth medium seems to be due to saturation of extracellular depolymerase by the substrate in the immediate vicinity of the microbial growth. PHA degrading activity is known to be regulated by simple carbon substrates. We have found lactose as the best carbon source, which enhanced enzyme production (8.62 U/mg). Regulation of PHA degrading activity generally acts through a catabolite repression mechanism [25] and lactose can participate in this process. According to Manna and Paul [27], degradation of PHB by bacteria isolated from soil and sewage sludge, was affected significantly when the PHB-containing medium was supplemented with easily consumable carbon sources.

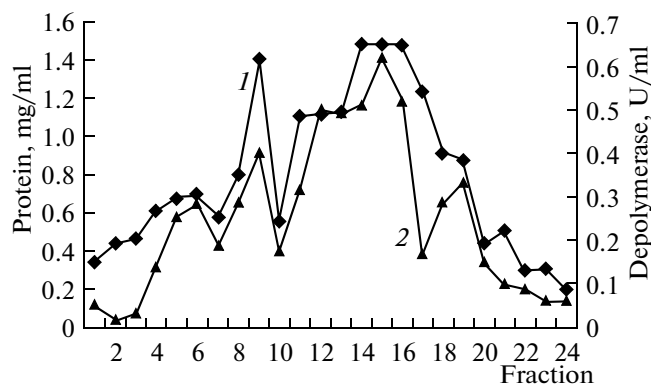


Fig. 1. Purification of PHBV depolymerase from *Aspergillus* sp. NA-25 by gel permeation chromatography on Sephadex G-75. 1 – protein; 2 – enzyme activity.

The utilization of the nutrients is largely dependent on the population of microorganisms. To ensure a high production of enzyme in the limited volume of medium, the inoculum size should be controlled [29]. Maximum production of PHBV depolymerase from *Aspergillus* sp. NA-25 (13.18 U/mg) was observed in the presence of 9% of inoculum. In these conditions the incubation time decreased from 120 h (5% inoculum) to 48 h.

Purification of PHBV depolymerase from *Aspergillus* sp. NA-25. *Precipitation of PHBV depolymerase.* To purify PHBV depolymerase from *Aspergillus* sp. NA-25 precipitation by 80% of ammonium sulphate was made. Shah et al. [16, 30] had used the same procedure for the purification of PHBV depolymerases from *Streptovorticillium kashmirensis* AF1 [16] and *Bacillus* sp. AF3 [30].

Gel permeation chromatography. It is obvious that 4 peaks of PHBV depolymerase activity obtained by gel filtration represent different forms of the enzyme (Fig. 1). Sephadex G-75 was also used for PHBV depolymerase purification and one peak was obtained from *Bacillus* sp. AF3 [35] but two peaks from *Streptovorticillium kashmirensis* AF1 [16]. Sephadex G-100 was used for purification of PHB depolymerase from fungus *Emericlesopsis minima* W2 [9]. Kim et al. [31] used Sephadex G-150 for PHA depolymerase purification from *Streptomyces* sp. KJ-72.

SDS-PAGE. The purified forms of the enzyme were further analyzed by SDS-PAGE showing 4 bands with molecular weights of 68, 90, 72 and 36 kDa, respectively (Fig. 2). It can be assumed that 4 forms of PHBV depolymerase from *Aspergillus* sp. NA-25 are encoded by 4 different genes, which can be further sequenced. Scherer et al. [11] purified PHB depolymerase from *A. fumigatus* M2A having molecular mass 57 kDa. PHBV depolymerase isolated from a fungus *Paecilomyces lilacinus* F4-5 [26] had molecular weight 45 kDa. PHB depolymerases purified from a fungus *Penicillium simplicissimum* LAR13 [15] and thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB8 [37] had

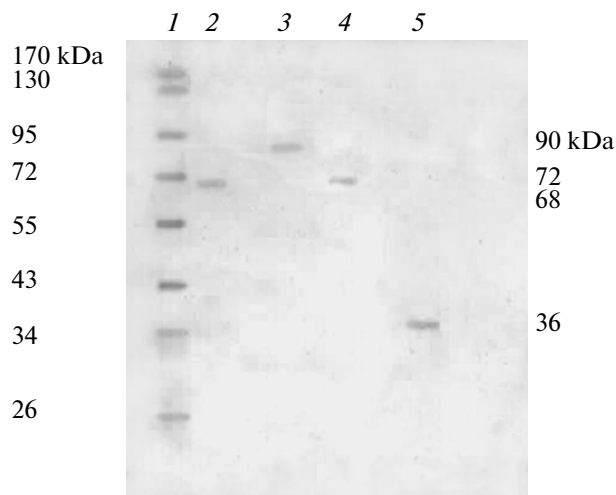


Fig. 2. SDS-PAGE of the purified PHBV depolymerase (E) from *Aspergillus* sp. NA-25. 1 – molecular mass standards; 2 – E1; 3 – E2; 4 – E3; 5 – E4.

molecular weights 36 kDa and 42 kDa, respectively. Shah et al. [16] purified two PHBV depolymerases i.e. 35 and 45 kDa, from *Streptovorticillium kashmirensis* AF1. The *Pseudomonas lemoignei* enzyme had at least 5 forms, which differ slightly in their biochemical properties [17].

Characterization of purified forms of PHBV depolymerases. *Effect of temperature on the activity of the purified PHBV depolymerase forms.* After incubation at 70°C for 1 h the residual activity of the two enzyme forms from *Aspergillus* sp. NA-25, E2 and E1, was 99.16% and 86%, respectively (Fig. 3a). PHB depolymerase, isolated from *T. thermophilus* HB8 showed 75% of stability at 60°C and 50% at 70°C after 4 h of incubation [32]. Scherer et al. [11] isolated a PHB depolymerase from *A. fumigatus* M2A, showing maximal stability at 70°C. The PHB depolymerase of *Penicillium simplicissimum* LAR13 remained stable at 45°C for 0.5 h [15]. The PHB depolymerases from *Comamonas acidovorans* YM1609 [33] and *Paecilomyces lilacinus* F4-5 [26] were stable for 30 min at temperature below 37°C and 40°C, respectively.

Effect of pH on the activity of purified PHBV depolymerase forms. The residual activity of all enzyme forms from *Aspergillus* sp. NA-25 was 100% at pH 7.0 while decreased of it above or below neutral pH (Fig. 3b). The PHA depolymerase of *Pseudomonas alcaligenes* showed over 60% of its maximum activity in the pH range 7.0 to 9.5 [34]. The purified enzyme of *T. thermophilus* HB8 showed stability at pH 8.0 [32]. In another work, the depolymerase from *Pseudomonas indica* K2 showed activity at a wide range of pH (6.0–10.5) but the maximal stability was found at pH 8.2 [28].

Effect of metal ions on activity of PHBV depolymerase forms. Different types of metal ions were added at a concentration of 1.0 mM to incubation mixture

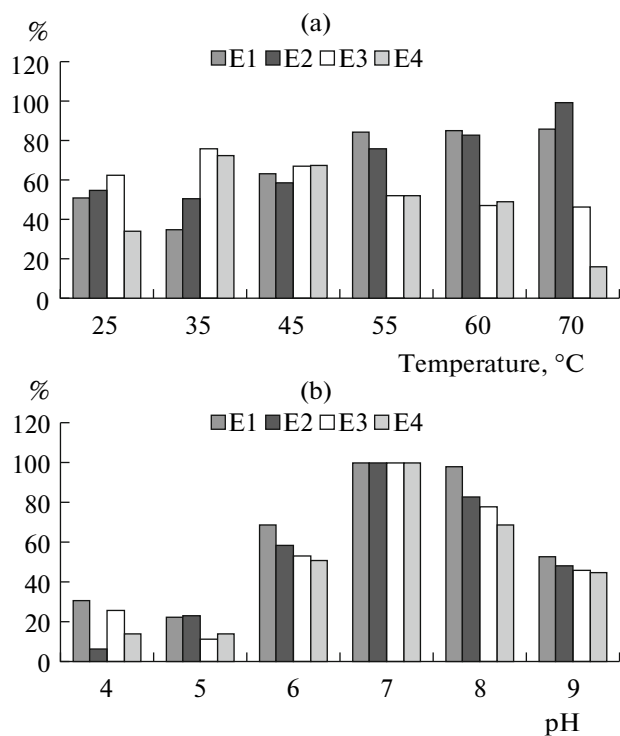


Fig. 3. Effect of temperature (a) and pH (b) on the activity of the purified PHBV depolymerase from *Aspergillus* sp. NA-25.

and the activities of all the purified enzyme forms were detected. Their residual activities were less in the presence of metal ions except E1 and E2 which showed 91% and 97% of residual activity in the presence of Co^{2+} and Mg^{2+} , respectively (Fig. 4a). Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} and Cd^{2+} had a negligible effect on the activity of *P. simplicissimum* LAR13 [19]. Kobayashi et al. [18] observed that the activity of the PHB depolymerase from *Agrobacterium* sp. and was nearly independent of Co^{2+} , Mg^{2+} . The PHB depolymerase from *P. lilacinus* was 80% deactivated by Zn^{2+} , Mn^{2+} and Cu^{2+} [14]. Na^+ and K^+ and Mg^{2+} caused inhibitory effect on the PHB depolymerase of *T. thermophilus* HB8, when they were used in high concentration i.e. 5 and 10 mM [37]. 5 mM Zn^{2+} and 5 mM Mg^{2+} had also inhibitory effect on the PHB depolymerase of *Penicillium* sp. DS9701-D2 [35].

Effect of reagents influencing the activity of purified PHBV depolymerase. In our study, all enzyme forms were strongly inhibited by reagents such as EDTA, SDS and 2-mercaptoethanol except form E2, which was partially inhibited by EDTA and 2-mercaptoethanol (Fig. 4b). The PHB depolymerase of *Schlegelella thermodepolymerans* was also partially inhibited by EDTA. The recombinant PHB depolymerases of *Escherichia coli* were totally inhibited, when the enzymes were pre-incubated for 5 min in 3 mM EDTA [17]. The extracellular PHB depolymerase of *T. thermophi-*

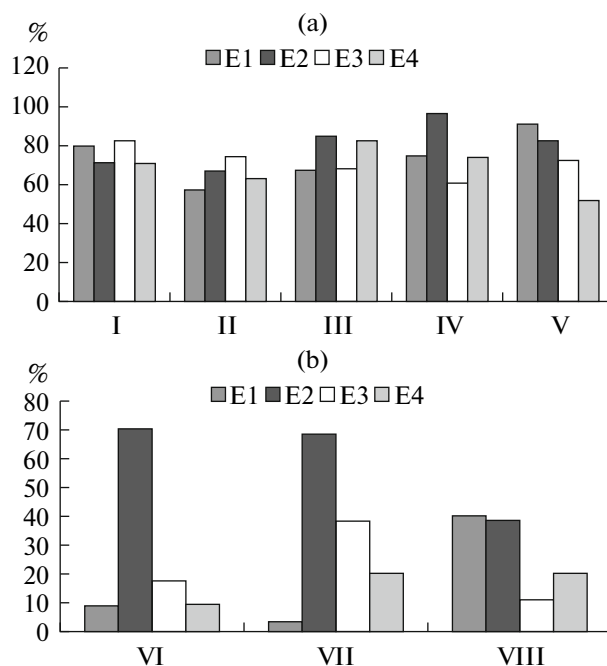


Fig. 4. Effect of metal ions (a) and reagents (b) on the activity of the purified PHBV depolymerase (E) from *Aspergillus* sp. NA-25. I–4 – E1–E4; I – Na^+ , II – Ca^{2+} ; III – Zn^{2+} , IV – Mg^{2+} , V – Co^{2+} , VI – EDTA, VII – 2-mercaptoethanol, VIII – SDS.

lus HB8 was greatly inhibited by EDTA and 2-mercaptoethanol [32]. These facts indicate that this enzyme belongs to the serine hydrolase family like other PHA depolymerases because the enzyme requires some metal ions and disulfide bonds, which play an essential role in enzyme activity [17].

The present study shows that the *Aspergillus* NA-25 has the ability to produce the extracellular PHBV depolymerase that degrades PHBV. The enzyme forms produced by the *Aspergillus* NA-25 are robust with the ability to perform at a wide range of temperature, pH and in the presence of different metal ions and protein inhibitors. The application of specific plastic degrading enzymes is highly advantageous where pure monomers can be recovered from the mixed plastic wastes without distinction. The results imply that the PHA can be applied to enzymatic monomer recycling using specific microbial enzymes.

ACKNOWLEDGMENTS

We are very much grateful to Macrogen Incorporation (Korea) for providing facility for identification of fungal strain through 18S rRNA.

REFERENCES

- Jendrossek, D., *J. Bacteriol.*, 2009, vol. 191, pp. 3195–3202.

2. Reddy, C.S., Ghai, R., Rashmi, and Kalia, V.C., *Biore-sour. Technol.*, 2003, vol. 87, pp. 137–146.
3. Jendrossek, D. and Handrick, R., *Ann. Rev. Microbiol.*, 2002, vol. 56, pp. 403–432.
4. Müller, R.J., Kleeberg, I., and Deckwer, W.D., *J. Bio-technol.*, 2001, vol. 86, pp. 87–95.
5. Sudesh, K., Abe, H., and Doi, Y., *Prog. Polym. Sci.*, 2000, vol. 25, pp. 1503–1555.
6. Steinbüchel, A. and Lutke-Eversloh, T., *Biochem. Eng. J.*, 2003, vol. 16, pp. 81–96.
7. Khanna, S. and Srivastava, A.K., *Process Biochem.* 2005, vol. 40, pp. 607–619.
8. Luzier, W.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, pp. 839–42.
9. Kim, D.Y., Yun, J.H., Kim, H.W., Bae, K.S., and Rhee, Y.H., *J. Microbiol.*, 2002, vol. 40, pp. 129–133.
10. Mergaert, J., Wouters, A., and Swings, J., *Syst. Appl. Microbiol.*, 1994, vol. 17, pp. 601–612.
11. Scherer, T.M., Fuller, R.C., Lenz, R.W., and Goodwin, S., *Polym. Degrad. Stab.*, 1999, vol. 64, pp. 267–275.
12. Kim, M.N., Lee, A.R., Yoon, J.S., and Chin, I.J., *Euro-p. Polym J.*, 2000, vol. 36, pp. 1677–1685.
13. Iyer, S., Shah, R., Sharma, A., Jendrossek, D., and De-sai, A., *J. Polym. Environ.*, 2000, vol. 8, pp. 197–203.
14. Oda, Y., Osaka, H., Urakami, T., and Tonomura, K., *Curr. Microbiol.*, 1997, vol. 34, pp. 230–232.
15. Han, J. and Kim, M., *J. Microbiol.*, 2002, vol. 1, pp. 20–25.
16. Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., and Safia, A., *Ann. Microbiol.*, 2007, vol. 57, no. 4, pp. 583–588.
17. Jendrossek, D., Frisse, A., Beherends, A., Andermann, M., Kratzin, H.D., Stanislawskit, T., and Schlegel, H.G., *J. Bacteriol.*, 1995, vol. 177, pp. 596–607.
18. Kobayashi, T., Sugiyama, A., Kawase, Y., Saito, T., Mergaert, J., and Swings, J., *J. Environ. Polym. De-grad.*, 1999, vol. 7, pp. 9–17.
19. Laemmli, U.K., *Nature* 1970, vol. 227, pp. 680–685.
20. Matavulj, N. and Molitoris, H.P., *FEMS Microbiol. Rev.*, 1992, vol. 103, pp. 323–332.
21. Puspita, S., Parama, S., and Paul, A.K. *J. Polymer. En-viron.*, 2006, vol. 14, pp. 257–263.
22. Ghanem, N.B., Mabrouk, M.E., Sabry, S.A., and El-Baden, D.E., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2005, vol. 51, pp. 151–158.
23. Abou-Zeid, D.M., Müller, R.J., and Deckwer, W.D., *J. Biotechnol.*, 2001, vol. 86, pp. 113–126.
24. Tokiwa, Y. and Calabia, B.P., *Biotechnol. Lett.*, 2004, vol. 26, pp. 1181–1189.
25. Phithakrotchanakoon, C., Rudeekit, Y., Tanapongpi-pat, S., Leejakpai, T., Aiba, S., Noda, I., and Champreda, V., *Biologia*, 2009, vol. 64, pp. 246–251.
26. Sang, B.I., Lee, W.L., Hori, K., and Unno, H., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 22, pp. 51–57.
27. Manna, A. and Paul, A.K., *Biodegradation*, 2000, vol. 11, pp. 323–329.
28. Elbanna, K., Lütke-Eversloh, T., Jendrossek, D., Luft-mann, H., and Steinbüchel, A., *Arch. Microbiol.*, 2004, vol. 182, pp. 212–224.
29. Abusham, R.A., Raja, N.Z., Rahman, R.A., Abu, B.S., and Mahiran, B., *Microb. Cell Fact.*, 2009, vol. 8, pp. 20–28.
30. Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., and Safia, A., *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2007, vol. 60, pp. 109–115.
31. Kim, D.Y. and Rhee, Y.H., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, vol. 61, pp. 300–308.
32. Papaneophytou, C.P., Pantazaki, A.A., and Dimitrios, A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, vol. 83, pp. 659–668.
33. Kasuya, K., Inoue, Y., Tanaka, T., Akehata, T., Iwata, T., Fukui, T., and Doi, Y., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, vol. 63, pp. 4844–4852.
34. Kim, D.Y., Kim, H.C., Kim, S.Y., and Rhee, Y.H., *J. Microbiol.* 2005, vol. 43, pp. 285–294.
35. Zhou, H., Wang, Z., Chen, S., Liu, D., and Xia, H., *Polym. Plast Technol. Eng.*, 2009, vol. 48, pp. 58–63.

УДК 582.282.123.4:577.152.34

МИКРОМИЦЕТЫ *Aspergillus ochraceus* – ПРОДУЦЕНТЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ – АКТИВАТОРОВ ПРОТЕИНА С ПЛАЗМЫ КРОВИ

© 2012 г. А. А. Осмоловский*, В. Г. Крейер*, А. В. Кураков*, Н. А. Баранова*, Н. С. Егоров**

* Биологический факультет и **Международный биотехнологический центр

Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991; e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 28.12.2011 г.

Проведен скрининг природных изолятов микромицетов *Aspergillus ochraceus* из почв и растительных остатков разных регионов. Выделенные штаммы характеризовались сходными культурально-морфологическими свойствами и идентичной нуклеотидной последовательностью по участку ITS1-5, 8S-ITS2 рДНК. Установлена способность внеклеточных протеиназ микромицетов *A. ochraceus* активировать протеин С плазмы крови. Выявлены различия в накоплении протеиназ с активаторной к протеину С активностью и протеиназ с тромбиноподобной и плазминоподобной активностью в динамике роста продуцентов.

Тромбоэмболические осложнения становятся наиболее частыми и серьезными заболеваниями сердечно-сосудистой системы. Факторы риска развития таких осложнений могут быть не только приобретенными, но и наследственными, в результате которых тромбоэмболии переходят в тромбофилии. К ним относятся недостаточность содержания в плазме крови антитромбина, протеина С, протеина S, повышенное содержание фактора VIII и появление в кровотоке фактора V Лейдена – мутантной формы фактора V, резистентного к активированному протеину С [1]. Протеин С является витамин К-зависимым белком, циркулирующим в крови в виде профермента – предшественника ключевой протеиназы системы гемостаза – активированного протеина С. Активация профермента в фермент осуществляется на поверхности эндотелия комплексом тромбин-тромбомодулин. Важнейшие функции активированного протеина С в организме связаны с его антикоагулянтными и цитопротекторными свойствами: он инактивирует факторы свертывания крови (Va и VIIa), предотвращая чрезмерное тромбообразование, и участвует в ингибировании освобождения цитокинов (прежде всего факторов некроза опухоли), ингибировании апоптоза, блокировании воспаления и изменении экспрессии генов в эндотелиальных клетках, выступая в качестве сигнальной молекулы [2–4]. Недостаточность содержания в крови самого профермента (протеин С) может привести как к рискам возникновения тромбоэмболических осложнений, так и в ряде случаев к летальным исходам. Поэтому актуальными представляются средства, активирующие протеин С, а также позволяющие качественно и своевременно диагностировать его содержание в крови человека. К

настоящему времени известны активаторы протеина С, содержащиеся в яде некоторых видов змей [5]. Протеолитические ферменты – активаторы протеина С, выделенные из яда южно-американского щитомордника *Agkistrodon contortrix contortrix*, находят широкое применение в составе диагностикумов для определения протеина С в плазме крови человека [5, 6].

Характерной особенностью микромицетов является способность продуцировать широкий спектр внеклеточных ферментов, в том числе и протеиназ [7]. Поэтому более доступными и перспективными могут оказаться протеиназы грибного происхождения, осуществляющие активацию протеина С или других факторов свертывания крови.

Особенно интенсивно в последнее время изучаются протеолитические ферменты мицелиальных грибов, оказывающие воздействие на белки системы гемостаза [8–10]. Микромицеты вида *A. ochraceus* являются известными продуцентами протеиназ, проявляющих фибринолитические и прокоагулянтные свойства [11].

Впервые антикоагулянтная активность внеклеточных протеиназ микромицетов была показана сотрудниками Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова [12]. Одним из наиболее активных продуцентов подобных протеиназ оказалась культура *A. ochraceus*. Ферменты *A. ochraceus*, добавленные к плазме крови, удлиняли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) по типу активаторов протеина С аналогично тромбин-тромбомодулиновому комплексу и активаторам из яда щитомордника [12, 13]. Было высказано предположение, что данная активность может быть связана с активацией протеина С. В связи с этим зна-

чительный интерес представляет изучение внеклеточных протеиназ *A. ochraceus* как возможных активаторов протеина С плазмы крови человека.

Цель работы — определение способности микроскопических грибов *A. ochraceus* образовывать протеиназы — активаторы протеина С плазмы крови.

МЕТОДИКА

Выделение и идентификация микромицетов *Aspergillus ochraceus*. Выделение проводили методом посева почвенного мелкозема и фрагментов растительных остатков на чашки Петри с агаровой средой с целлюлозой (среда Гетчинсона) и сусло-агаром с последующей инкубацией при 25°C [14]. Использовали образцы верхних горизонтов пустынных песчаных почв, сероземов, солончаков, карбонатных черноземов, дерново-аллювиальных почв, красно-коричневых почв и растительных субстратов, отобранных соответственно в степной (Воронежская обл., Краснодарский край), пустынной и полупустынной зонах (Туркмения) и регионах с субтропическим и тропическим климатом (Крым, Греция, Мексика). Чашки с нанесенным мелкоземом предварительно выдерживали в течение нескольких часов при повышенной температуре 52–54°C, а затем инкубировали при 20°C. В качестве ингибитора роста бактерий использовали сульфат стрептомицина. Поддержание выделенных штаммов осуществляли на среде Чапека–Докса и сусло-агаре.

Идентификацию штаммов проводили по культурально-морфологическим признакам с помощью определителя [15] и молекулярно-генетическим признакам на основе ПЦР-анализа с последующим секвенсом амплификонов и анализом секвенсов.

Выделение ДНК из мицелия проводили по стандартной методике [16].

Для проведения полимеразной цепной реакции использовали рекомендуемые для микромицетов праймеры ITS-1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') и ITS-4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3') [17]. Амплификацию для каждого образца ДНК проводили с 1 мкл выделенной тотальной ДНК, разведенной в 100 раз, в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 2 mM MgCl₂, 1.5 E Taq ДНК-полимеразы (“Синтол”, Россия), 0.5 мкМ каждого праймера и 400 мкМ каждого дНТФ в соответствии со следующим протоколом: первичная денатурация в течение 5 мин при 95°C с последующими 40 циклами денатурации при 95°C 30 с, отжигом при 50°C 30 с и элонгацией при 72°C 1 мин с заключительным этапом элонгации 3 мин при 72°C. Полученные ПЦР-продукты были очищены с использованием набора реактивов Wizard® DNA Clean-Up System (“Promega”,

США). Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems.

Анализ полученных последовательностей осуществляли с использованием программы BioEdit. Поиск и ранжирование гомологичных нуклеотидных последовательностей в международной базе данных GenBank проводили в программе BLAST.

Культивирование микромицетов. Микромицеты выращивали в условиях глубинного культивирования в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды на орбитальных качалках (200 об/мин) при 28°C. В качестве посевного материала использовали 7-суточные культуры микромицетов, выращенные на скошенном сусло-агаре. Культивирование проводили в две стадии, сначала на среде с суслон, глюкозой и пептоном [13], после чего, по истечении 2 сут культивирования часть биомассы переносили в ферментационную среду следующего состава (%): глюкоза — 3.5, крахмал — 1.0, соевая мука — 0.2, гидролизат рыбной муки — 0.5, пептон — 0.5, NaCl — 0.2, K₂HPO₄ — 0.05, MgSO₄ — 0.05.

Определение протеолитической активности. Активность протеиназ определяли в культуральной жидкости, предварительно отделив биомассу фильтрованием.

Общую протеолитическую активность культур определяли модифицированным методом Ансона [18]. Активность выражали в мкМ тирозина, образовавшегося в течение 1 мин в 1 мл культуральной жидкости.

Активаторную к протеину С активность определяли по расщеплению хромогенного пептидного субстрата пироглутамил-L-пролил-L-аргинил-п-нитроанилида (pGlu-Pro-Arg-pNA) [19] с помощью метода, модифицированного В.Г. Крейер. Для проведения анализа к 200 мкл фильтрата культуральной жидкости добавляли 50 мкл разведенной в 2 раза человеческой плазмы крови, используемой в качестве источника протеина С. Полученную смесь инкубировали на водяной бане в течение 5 мин при 37°C, после добавляли 100 мкл 0.05%-ного раствора хромогенного субстрата в 0.05 M Трис-HCl-буфере, pH 8.2 и продолжали инкубацию еще в течение 5 мин при тех же условиях. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты. Измерение оптической плотности проводили при 405 нм. Для расчета активаторной активности строили калибровочную кривую по п-нитроанилину. Линейность поглощения наблюдали в интервале 10 × 10⁻³–150 × 10⁻³ мкМ pNA/мл.

Тромбиноподобную и плазминоподобную активность определяли с хромогенными субстрата-

Таблица 1. Определение активаторной к протеину С активности культуральной жидкости *A. ochraceus* L-1 с хромогенным субстратом pGlu-Pro-Arg-pNA

№ пробы	Состав инкубационной смеси	Активаторная к протеину С активность, Е/мл $\times 10^{-3}$
1	Культуральная жидкость <i>A. ochraceus</i> L-1 + плазма (протеин С) + субстрат	77.0
2	Культуральная жидкость <i>A. ochraceus</i> + субстрат	0.0
3	Плазма + субстрат	0.8

ми тозил-L-глицил-L-пролил-L-аргинил-п-нитроанилидом (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA) и D-валил-L-лейцил-L-лизил-п-нитроанилидом (DVal-Leu-Lys-pNA) соответственно добавляя к 100 мкл культуральной жидкости 150 мкл 0.05 М Трис-HCl-буфера, pH 8.2, и 100 мкл 0.05%-ного раствора соответствующего субстрата. Смесь инкубировали в течение 5 мин при 37°C, после чего реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты. Измерение оптической плотности проводили при 405 нм на спектрофотометре Hitachi 200-20 (Япония).

За единицу активности (Е) во всех случаях принимали количество мкМ отщепившегося п-нитроанилина в 1 мл культуральной жидкости за 1 мин.

Биомассу определяли весовым методом, высушивая ее при 86°C до постоянной массы.

Эксперименты выполнены в 3 повторностях, полученные результаты приведены, как средние величины из трех опытов. Ошибка средних значений не превышала 5–7%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

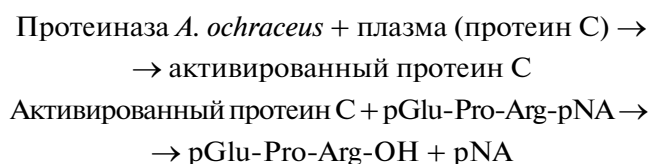
Аспергиллы и, в частности *A. ochraceus*, широко представлены в микобиоте почв южных регионов, что и обусловило их выбор для поиска данных микроорганизмов [20, 21]. В результате проведенных посевов были выделены в чистую культуру 10 изолятов, которые имели типичные для *A. ochraceus* культурально-морфологические признаки [15]. Незначительные отличия между штаммами были отмечены в скорости роста, интенсивности спороношения и пигментации. Изоляты хорошо росли на стандартных средах: суло-агар, среда Чапека–Докса, глюкозо-пептонная среда при 25°C. Спороношение начиналось на 4, 5 сут, обильно спороносящие колонии формировались к 7–10 сут. Часть культур выделяло экссудат янтарного цвета.

Микромицеты вида *A. ochraceus* Wilhelm относятся к митоспоровым грибам – анаморфам аскомицетного аффинитета: рода *Aspergillus*, семейства Trichosomaceae, порядка Eurotiales, класса Eurotiomycetes, отдела Ascomycota и являются космополитными и термотолерантными организмами, способными расти в широком интервале

температур (8–55°C) с оптимальным ростом при 25–30°C.

Определение нуклеотидной последовательности локусов ITS1-5,8S-ITS2 рДНК всех штаммов *A. ochraceus* показало их полную идентичность. Сравнительный анализ полученных последовательностей участков ITS изученных штаммов с последовательностями ITS-участков этого вида, представленными в GenBank (JN246072.1, EU273559.1, AY373856.1), выявил их 100% сходство, что подтверждает проведенную нами идентификацию штаммов как *A. ochraceus* и данные литературы о гомогенности этого вида [22].

Результаты определения активаторной к протеину С активности культуральной жидкости на примере микромицета *A. ochraceus* L-1 с хромогенным пептидным субстратом pGlu-Pro-Arg-pNA в сравнении с контролями (пробы № 2 и 3 соответственно) приведены в табл. 1. Из таблицы видно, что ни культуральная жидкость, ни плазма по отдельности не расщепляли хромогенный субстрат, и только после предварительной инкубации культуральной жидкости *A. ochraceus* L-1 и плазмы (протеин С), действительно, происходит активация протеина С, и образующийся активированный протеин С расщепляет хромогенный субстрат по аргинину в соответствии со следующей схемой:



Таким образом протеиназы *A. ochraceus* отщепляют п-нитроанилин (pNA) от субстрата, аналогично активаторам яда змеи щитомордника [6, 23, 24].

Способность к образованию внеклеточных протеиназ – активаторов протеина С установлена у всех изученных изолятов *A. ochraceus* вне зависимости от экотопов и регионов, из которых они были выделены. Причем активаторная к протеину С активность обнаруживалась в культуральной жидкости *A. ochraceus* уже на 1 сут культивирования (табл. 2).

Образование протеиназ, активирующих протеин С плазмы крови, было изучено в динамике. Параллельно проводили определение тромбино-

Таблица 2. Активаторная к протеину С активность штаммов *A. ochraceus*, выделенных из разных экотопов

Штамм <i>A. ochraceus</i> №	Источник и место выделения	Активаторная к протеину С активность, Е/мл × 10 ⁻³ *
121	Солончак (Крым, Украина)	59.0
154	Растительные остатки подстилки (Греция)	66.3
247	Чернозем на карбонатных породах (Воронежская обл., Россия)	65.0
513N	Пустынная почва (Туркмения)	63.5
L-1	Погребенная почва (раскопки г. Фанагории, Краснодарский край, Россия)	63.9
L-2	Растительные остатки подстилки (Мексика)	34.0
МА-1	Серая лесная почва (Московская обл., Россия)	58.1
МА-2	Растительные остатки (Московская обл., Россия)	58.8
X-1	Растительные остатки (Греция)	59.2
X-2	Дерново-аллювиальная почва (Мексика)	55.8

* На 1 сут культивирования микромицетов.

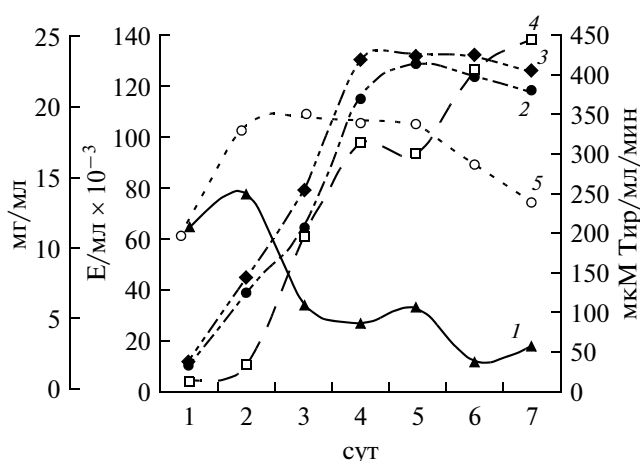
подобной и плазминоподобной активностей культуральной жидкости со специфическими хромогенными субстратами, общую протеолитическую активность с казеином и биомассу. На рисунке представлены данные по накоплению в культуральной жидкости внеклеточных протеиназ для *A. ochraceus* L-1. Сходную динамику показателей роста и активностей протеиназ наблюдали у всех остальных изученных штаммов.

Максимальные значения активаторной к протеину С активности обнаруживали на 2 сут культивирования в логарифмической фазе роста, после чего активность снижалась с небольшим пиком активности на 5 сут в стационарной фазе. Максимумы образования протеиназ с тромбиноподобной и плазминоподобной активностями

приходились на 3, 4 сут культивирования (стационарная фаза роста), имели близкие значения и сходную положительную корреляцию и не совпадали с пиком активности протеиназ-активаторов протеина С. Полученные данные свидетельствуют, что протеиназы – активаторы протеина С и протеиназы с плазмино- и тромбиноподобной активностью являются разными ферментами. В то же время трудно говорить о принадлежности тромбиноподобной и плазминоподобной активностей разным ферментам, т.к. известно, что плазмин (плазминоподобные ферменты) способен расщеплять субстраты тромбина [25].

Динамика общей протеолитической активности культуральной жидкости была сходной с тромбино- и плазминоподобными активностями и не совпадала с максимальными значениями активаторной к протеину С активности (рисунок).

Интересно отметить, что протеиназы культуральной жидкости изученных микромицетов гидролизуют субстрат тромбина Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (активность варьировала в пределах 110–144 Е/мл × 10⁻³ у разных штаммов) и не способны были расщеплять субстрат pGlu-Pro-Arg-pNA, отличающийся на 1 аминокислоту (табл. 1, № 2). Эти данные свидетельствуют, что протеолитические ферменты *A. ochraceus* обладают разной субстратной специфичностью по отношению к хромогенным пептидным субстратам. В случае с активаторами протеина С из яда щитомордника наличие в хромогенном субстрате-трипептиде перед аргинином пролина приводит к его гидролизу активированным протеином С, если же пролин замещен на другую аминокислоту, например фенилаланин, субстрат не гидролизует. Введение в дипептид пролил-аргинил-pNA дополнительной аминокислоты незначительно влияло на



Динамика накопления (сут) протеолитических ферментов микромицетом *A. ochraceus* L-1. 1 – активаторная к протеину С активность, 2 – тромбиноподобная активность, 3 – плазминоподобная активность, 4 – общая протеолитическая активность, 5 – биомасса.

Таблица 3. Плазминоподобная, тромбиноподобная и общая протеолитическая активность внеклеточных протеиназ штаммов *A. ochraceus* в максимуме активаторной к протеину С активности

Штамм <i>A. ochraceus</i> , №	Активность активаторов протеина С, Е/мл × 10 ⁻³	Плазминоподобная, Е/мл × 10 ⁻³	Тромбиноподобная, Е/мл × 10 ⁻³	Общая протеолитическая активность, мкМ Тир/мл/мин
121	71.9	125.5	95.2	149.8
154	69.0	81.4	62.3	110.5
247	77.9	99.8	84.2	67.2
513N	76.1	81.4	82.7	40.2
L-1	77.5	46.3	47.5	54.3
L-2	67.4	65.3	84.0	167.8
МА-1	71.0	40.4	32.3	37.7
МА-2	64.4	44.9	39.3	95.1
X-1	72.5	80.6	72.1	58.8
X-2	69.6	74.5	63.5	87.9

расщепление субстрата активированным протеином С [6].

В табл. 3 приведены значения протеолитической активности разных штаммов *A. ochraceus* в максимуме активаторной к протеину С активности. Видно, что максимальные значения активаторной к протеину С активности микромицетов близки и их варьирование не превышало 15%. Активности с субстратами плазмينا и тромбина, а также общая протеолитическая активность в максимальных значениях активаторной активности различаются. Варьирование по тромбиноподобной, плазминоподобной и общей протеолитической активности составило 67, 66 и 77% соответственно. Значительный интерес представляют продуценты протеиназ–активаторов протеина С, проявляющие более низкие величины значений сопутствующей протеолитической активности. По этому критерию были отобраны штаммы *A. ochraceus* 247, *A. ochraceus* 513N, *A. ochraceus* L-1 и *A. ochraceus* X-1, которые депонированы в ВКМ под соответствующими номерами ВКМ F-4106D, ВКМ F-4107D, ВКМ F-4104D, ВКМ F-4105D.

Полученные результаты показывают, что способность образовывать протеиназы – активаторы протеина С плазмы крови изученных штаммов *A. ochraceus* – изолятов различных экотопов географически отдаленных регионов может являться характерным признаком аспергиллов этого вида. Кроме протеиназ–активаторов протеина С, изоляты образуют протеиназы с тромбиноподобной и плазминоподобной активностью. Небольшой срок культивирования микромицетов и образование протеиназ с активаторной к протеину С активностью на доступных средах делает возможным практическое использование микромицетов *A. ochraceus* в качестве альтернативных яду шитомордника источников активаторов протеина С.

Авторы глубоко благодарны сотрудникам кафедры микробиологии МГУ А.Л. Брюханову, В.А. Корнеевой и И.А. Бубнову за консультации и помощь в проведении молекулярно-генетических исследований.

Секвенирование ДНК проводили в межинститутском центре коллективного пользования “ГЕНОМ” ИМБ РАН (<http://www.genome-centre.narod.ru/>), организованном при поддержке РФФИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rosendaal F.R., Reitsma P.H.* // J. Thromb. Haemost. 2009. V. 7. № S1. P. 301–304.
2. *Струкова С.М.* // Биохимия. 2004. Т. 69. № 10. С. 1314–1331.
3. *Dahlbäck B., Villoutreix B.O.* // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2005. V. 25. № 7. P. 1311–1320.
4. *Mosnier L.O., Zlokovich B.V., Griffin J.H.* // Blood. 2007. V. 109. № 3. P. 3161–3172.
5. *Gempeler-Messina P.M., Müller C.* // Toxin Rev. 2006. V. 25. № 4. P. 335–349.
6. *Stoker K., Fisher H., Meier J., Brogli M., Svedsen L.* // Toxicol. 1987. V. 25. № 3. P. 239–252.
7. *Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е.* // Биохимия. 1998. Т. 63. № 8. С. 1059–1089.
8. *Подорольская Л.В., Серебрякова Т.Н., Шаркова Т.С., Неумывакин Л.В., Андреев Г.В.* // Вопр. биол. мед. и фарм. химии. 2007. № 1. С. 10–13.
9. *Wu B., Wu L., Chen D., Yang Z., Luo M.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 36. № 3. P. 451–459.
10. *Gopinath S.M., Suneetha T.B., Ashwini Patil G.M.* // J. Research Biol. 2011. V. 1. № 4. P. 242–245.
11. *Клечковская В.В., Егоров Н.С.* // Микробиология. 1983. Т. 52. № 3. С. 396–403.
12. *Ландау Н.С., Кураков А.В., Гуликова О.М., Батомункеева Б.П., Струкова С.М., Егоров Н.С.* // Микробиология. 1998. Т. 67. № 2. С. 215–220.
13. *Батомункеева Б.П., Егоров Н.С.* // Микробиология. 2001. Т. 70. №5. С. 602–606.

14. Кураков А.В. Методы выделения и характеристики комплексов микроскопических грибов наземных экосистем. М.: МАКС Пресс, 2001. 89 с.
15. Klich M.A., Pitt J.I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde: CSIRO Division of food Processing. 1992. 116 p.
16. Rodrigues P., Soares C., Kozakiewich Z., Paterson R.R.M., Lima N., Venancio A. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in App. Microbiol. V. 2 / Ed. A. Méndez-Vilas. Badajoz: Formatex, 2007. P. 527–534.
17. Henry T., Iwen P., Hinrichs H. // J. Clinical Microb. 2000. V. 38. № 4. P. 1510–1515.
18. Егоров Н.С., Ландау Н.С., Буюк Л.И., Крейер В.Г. // Микробиология. 1991. Т. 60. № 4. С. 637–643.
19. Sakata T., Hatsuyama H., Kitamura T., Uchida K., Katsuyama Y., Matsuyama T. // Rinsho Byori. 1990. V. 38. № 8. P. 937–941.
20. Кураков А.В., Болобова А.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. № 3. С. 332–341.
21. Klich M.A. // Mycologia. 2002. V. 94. № 1. P. 21–27.
22. Gil-Serna J., Gonzalez-Salgado A., Gonzalez-Jaen M.T., Vazquez C., Patino B. // Int. J. Food Micr. 2009. № 131. P. 162–167.
23. Exner T., Vaasjoki R. // Thromb. Haemost. 1988. V. 59. P. 40–44.
24. Orthner C.L., Brattacharia P., Strickland D.K. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 7. P. 2558–2564.
25. Suomela H. // Haemostasis. 1978. V. 7. № 2–3. P. 95–96.

***Aspergillus ochraceus* Myxomycetes Produce Extracellular Proteinases—Protein C Activators of Blood Plasma**

A. A. Osmolovskii^a, V. G. Kreier^a, A. V. Kurakov^a, N. A. Baranova^a, and N. S. Egorov^b

^a Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^b International Biotechnological Center, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

e-mail: aosmol@mail.ru

Received December 28, 2011

Abstract—Natural isolates of *Aspergillus ochraceus* myxomycetes from soil and plant remains from various regions have been screened. The isolated strains were characterized by similar cultural and morphological features and an identical nucleotide sequence in the ITS1–5,8S–ITS2 region of rDNA. The ability of the extracellular proteinases of *A. ochraceus* myxomycetes to activate protein C of blood plasma has been established. Differences are revealed in the accumulation of proteinases activating protein C and proteinases with thrombin- and plasmin-like activities in the growth dynamics of producers.

УДК 579.254.2, 663.15, 544.473:577.15

СОЗДАНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПЕКТИНАЗ И ЦЕЛЛЮЛАЗ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА

© 2012 г. Е. В. Бушина*, А. М. Рожкова**, И. Н. Зоров**, А. Д. Сатрутдинов**,
А. О. Беккаревич***, А. В. Кошелев***, О. Н. Окунев***, А. П. Сеницын*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991

e-mail: info@rector.msu.ru

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

e-mail: inbi@inbi.ras.ru

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

Поступила в редакцию 08.11.2011 г.

На основе рекомбинантных штаммов грибов *Penicillium canescens*, получены комплексные ферментные препараты, обладающие активностью гомологичной пектинлиазы А, гетерологичных эндо-1,4-β-глюканазы *Penicillium verruculosum* и β-глюкозидазы *Aspergillus niger*. В работе были реализованы два подхода: создание ферментного препарата на основе нового штамма – продуцента всех трех ферментов и получение ферментного препарата путем совместного культивирования трех штаммов – продуцентов каждого отдельного фермента.

Проведено сравнение осаживающей способности этих ферментных препаратов по отношению к свекловичному жому. Наибольшей эффективностью обладал ферментный препарат, полученный в результате совместного культивирования штаммов – (моно)продуцентов, по сравнению с ферментным препаратом, полученным с помощью штамма-продуцента трех ферментов.

Свекловичный жом – отход сахарного производства России, очень малая часть которого (15% на основании данных Росстата за 2008 год, www.gks.ru) используется как кормовая добавка, большая же часть остается невостребованной. Экологически безопасным и экономически оправданным способом утилизации свекловичного жома и подобных ему отходов пищевой промышленности является превращение полисахаридов растительной клеточной стенки в сахара, которое может быть осуществлено комплексом ферментов – карбогидраз. Поскольку клеточная стенка в составе свекловичного жома содержит 8.4% пектиновых веществ, 20.1% целлюлозы и 37.4% гемицеллюлозы [1], очевидно, что предназначенный для ее гидролиза ферментный препарат (ФП), должен быть обогащен карбогидразами, расщепляющими основные полисахариды клеточной стенки – целлюлозу и гемицеллюлозу, а также пектиназой, разрушающей сеть пектиновых веществ.

На протяжении последних лет рекомбинантный штамм *P. canescens* широко используется в качестве лабораторного штамма для получения различных типов ФП [2, 3]. К преимуществам использования данного штамма относятся активный комплекс гемицеллюлаз, дешевая среда культивирования, простота процесса ферментации [4], отработанные методики трансформации

экзогенной ДНК, что делает штамм-реципиент *P. canescens* удобной системой для получения комплексных ФП пектиназ, целлюлаз и гемицеллюлаз.

Цель работы – получение комплексных ФП, обогащенных активностями пектинлиазы и целлюлазы на основе рекомбинантных штаммов *P. canescens* и сравнение их способности к осаживанию свекловичного жома.

МЕТОДИКА

Штаммы микроорганизмов. Штамм-реципиент для плазмидной трансформации – мутантный штамм *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾ с дефектом в гене *niaD*, кодирующем фермент нитратредуктазу. Штамм *E. coli* Mach-1 (ΔrecA1398 endA1 tonA Ф80ΔlacM15 ΔlacX74 hsdR_K⁽⁻⁾m_K⁽⁺⁾) (“Invitrogen”, США) использовали для субклонирования генов пектинлиазы и целлюлаз, а также для препаративной наработки ДНК.

Плазмидные конструкции. Экспрессионные плазмидные конструкции pEGII и pβGlu с целевыми генами эндо-1,4-β-эндоглюканазы *P. verruculosum* (ЭГП) и β-глюкозидазы *A. niger* (БГП) под гомологичным ксиланазным промотором штамма *P. canescens* были получены ранее в лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН [2].

Плазмида pPelA с геном пектинлиазы А *P. canescens* (ПЕЛ) была получена путем амплификации гена ПЕЛ методом полимеразной

цепной реакции (ПЦР) из геномной ДНК штамма *P. canescens* с использованием олигонуклеотидов:

pepA-UpLIC: caaacagaagcaaccgacacaatgggtgtcttcagccagatcacg

pepA-LowLIC: agagcaagccgaggttaggcctggggagccgaagccaaga,

и клонирования полученного ПЦР-продукта в вектор pXEGuniversal, обеспечивающий экспрессию целевого гена ПЕЛ за счет стабильной интегративной встройки гена в хромосому гриба *P. canescens*. Клонирование гена ПЕЛ осуществляли с применением метода независимого лигирования, описанного в работе [5], и примененного ранее для штамма гриба *P. verruculosum* [6] и *Aspergillus awamori* [7]. Все стандартные процедуры с ДНК, а именно: выделение геномной ДНК, выделение ПЦР-продуктов из агарозного геля, а также выделение плазмидной ДНК осуществляли с помощью наборов фирмы “QIAGEN” (США) по методикам фирмы-производителя. ПЦР проводилась на приборе MyCycler (“BioRad”, США) по следующей схеме: 95°C 5 мин – 1 цикл; 95°C 1 мин 30 с, 55°C 1 мин, 68°C 1 мин 30 с – 20 циклов; 68°C 10 мин, 4°C 30 мин.

Таким образом, в результате клонирования была получена плазмида pPelA (рис. 1), экспрессионная кассета которой состояла из гомологичного промотора и терминатора гена ксиланазы (КСИЛ) гриба *P. canescens*, гомологичного нуклеотидой последовательности, кодирующей сигнальный пептид β -галактозидазы (bgaS SS) и нуклеотидной последовательности гена зрелого белка ПЕЛ *P. canescens*.

Трансформация грибного штамма *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾ и селекция трансформантов. Для получения трансформантов с целевыми активностями в качестве реципиента использовали штамм *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾. Штамм-реципиент был трансформирован плазмидами pPelA, p β Glu и pEGII по методике, описанной ранее [8].

Отбор трансформантов, секретирующих ЭГП, БГЛ и ПЕЛ, проводили в иммунологических 96-луночных планшетах. Трансформанты, выросшие на селективной минимальной среде, отдельно пересевались в лунки планшета с 600 мкл среды, содержащей (г/л): соевая шелуха – 45.0, кукурузный экстракт – 50.0 и КН₂РО₄ – 25.0. Через 144 ч выращивания при 220 об/мин и 30°C из каждой лунки отбирали аликвоты культуральной жидкости (КЖ) и проводили электрофорез образцов в ПААГ в присутствии Na-ДДС, а также определяли удельные активности секретируемых ферментов.

Ферментные препараты. В работе использовали полученные ранее препараты ЭГП *P. verruculosum*, БГЛ *A. niger* и ПЕЛ *P. canescens* [9, 10], а также ФП

исходного штамма *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾. Другие использованные в исследованиях ФП были получены путем лиофильного высушивания КЖ новых штаммов-продуцентов или КЖ после совместного культивирования полученных ранее штаммов – (моно)продуцентов. Культивирование штаммов проводили в 3 л ферментерах, используя среду, следующего состава (%): соевая шелуха – 4.5, кукурузный экстракт – 5.0 и КН₂РО₄ – 2.5. Ферментацию проводили в течение 120 ч при 30°C и pH 4.5.

Электрофорез белков. Электрофорез образцов КЖ и растворов ФП проводили в 12%-ном ПААГ в присутствии Na-ДДС с использованием электрофоретической ячейки Mini Protean (“BioRad”, США). Образцы растворов ФП, содержащие 30 мкг белка, инкубировали 15–20 мин при 100°C в присутствии 1.0% Na-ДДС и 5.0% β -меркаптоэтанола. Для определения молекулярной массы белков в исследуемых образцах использовали белковые маркеры с молекулярной массой в пределах 14.4–116 кДа (“Fermentas”, Литва). Белковые полосы окрашивали с использованием ку-масси бриллиантового синего G-250 (“Ferak”, Германия).

Субстраты. Для определения ферментативных активностей использовали следующие субстраты: цитрусовый пектин со степенью этерификации ~70%, Na-соль КМЦ, березовый ксилан и п-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид (ПНФГ) производства “SIGMA” (США).

Коммерчески доступный сухой гранулированный жом был измельчен на мельнице, позволяющей получать частицы размером 1.5–2 мм, а затем в ножевой мельнице мелкого помола MF10 basic (“IKA Werke”, Германия) до частиц размером 0.5–1.0 мм.

Определение ферментативных активностей. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое в оптимальных условиях образует 1 мкмоль продукта за 1 мин.

Активность пектинлиазы определяли, регистрируя начальную скорость накопления ненасыщенных продуктов деструкции цитрусового пектина при 232 нм с коэффициентом поглощения 5500 М⁻¹ см⁻¹. Реакцию проводили в термостатируемой кювете при 40°C и pH 5.0 (50 мМ ацетатный буфер), концентрация пектина в реакционной смеси составляла 2.4 г/л [10].

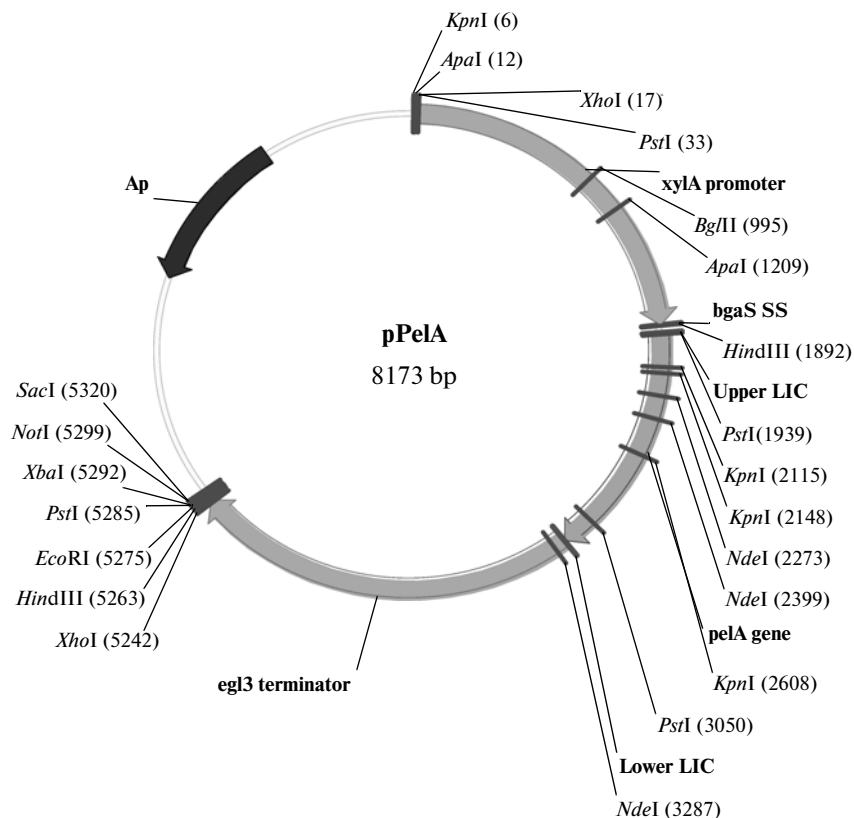


Рис. 1. Схема плазмиды pPelA, несущей ген гомологичной ПЕЛ *P. canescens*.

Активность эндо-1,4-β-глюканазы определяли по скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС) при гидролизе КМЦ (5.0 г/л) при 50°C и pH 5.0 (0.1 М ацетатный буфер), время гидролиза – 5 мин. Концентрацию ВС определяли методом Шомоди–Нельсона [11].

Активность ксиланазы определяли по скорости образования ВС при гидролизе березового ксилана (5.0 г/л) при 50°C и pH 5.0 (0.1 М ацетатный буфер), время гидролиза – 10 мин [11].

Активность β-глюкозидазы определяли по количеству п-нитрофенола, образующегося в результате гидролиза ПНФГ [11].

Определение концентрации белка. Содержание белка в ФП, а также концентрацию белка в образцах культуральной жидкости или хроматографических фракций определяли методом Лоури.

Гидролиз свекловичного жома. Эксперимент проводили в пластиковых емкостях объемом 60 мл. Реакционная смесь содержала: измельченный свекловичный жом – 100 г/л (в пересчете на сухие вещества), 2.0 или 10 мг белка соответствующего ФП на 1.0 г сухих веществ свекловичного жома, 0.1 М ацетатный буфер, pH 5.0, а также антибактериальные агенты, предотвращающие брожение (0.001 М азид натрия и ампицилин с конечной концентрацией 0.1 г/л). Объем реакционной

смеси составлял 20 мл. Емкости с реакционной смесью инкубировали в термошейкере INNOVA 40 (“New Brunswick Scientific”, США) при 50°C и 250 об/мин в течение 24 ч. По истечении указанного времени из реакционной смеси отбирали 600 мкл гидролизата, центрифугировали в течение 10 мин при 8765 g и измеряли концентрацию ВС в супернатанте методом Шомоди–Нельсона.

Анализ состава ферментных препаратов. Предварительную очистку ФП проводили путем осаждения белков сульфатом аммония (80% от насыщения) с последующим центрифугированием и перерастворением в 20 мМ буфере Bis-Tris/HCl, pH 6.8. Затем раствор ФП обессоливали на колонке с носителем Биогель-Р4 (“BioRad”, США). Последующие стадии разделения проводили с использованием жидкостного хроматографа среднего давления FPLC (“Pharmacia”, Швеция). Обессоленный раствор ФП подвергали анионообменной хроматографии на колонке Source 15 Q (“Pharmacia”, Швеция), нанесение образца проводили в 20 мМ буфере Bis-Tris/HCl, pH 6.8. Элюирование связавшихся белков проводили в градиенте концентрации NaCl от 0 до 0.4 М. Последующее разделение несвязавшейся фракции, а также негомогенных фракций, в составе которых присутствовали целевые белки, проводили с помо-

Таблица 1. Активности ферментов (ед./мл) в КЖ исходного штамма *P. canescens* (RN_niaD⁽⁻⁾) и полученных штаммов-продуцентов (С3, С5, D3 и С9)

Препарат	БГЛ	ЭГП	ПЕЛ
RN_niaD ⁽⁻⁾	5.8 ± 0.9	17.5 ± 2.6	0
С3	34.9 ± 5.2	55.5 ± 8.3	6.5 ± 1.0
С5	31.9 ± 4.8	61.1 ± 9.1	26.6 ± 4.0
D3	67.3 ± 10.1	98.1 ± 14.7	6.5 ± 0.8
С9	57.6 ± 8.6	85.9 ± 12.9	10.3 ± 1.5

щью гидрофобной хроматографии на колонке Source 15 ISO (“Pharmacia”, Швеция) в градиенте концентрации сульфата аммония от 1.7 до 0 М (50 мМ ацетатный буфер, рН 5.0). В полученных фракциях определяли концентрацию белка и активность по отношению к цитрусовому пектину, КМЦ, ксилану и ПНФГ. На основании полученных данных рассчитывали компонентный состав исследуемого ФП.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение ФП на основе нового штамма-продуцента. Реципиентный штамм *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾ был котрансформирован 10 мкг смеси трех целевых плазмид pPelA, pβGlu и pEGII, взятых в равных соотношениях по 3.3 мкг ДНК. В результате было получено 82 трансформанта, что соответствует литературным данным о частоте трансформации штамма *P. canescens* [8].

Первичное исследование КЖ рекомбинантных штаммов показало, что количество трансформантов, обладающих тремя, двумя или одной активностью составляет 12, 21 и 24% от общего количества трансформантов соответственно.

Трансформанты С3, С5, D3 и С9, обладающие всеми целевыми активностями, культивировали в колбах на среде с соевой шелухой, в полученной КЖ определяли активности ферментов (табл. 1). Трансформант С9, обладавший максимальной активностью 3 ферментов, был отобран для культивирования в ферментерах с целью получения и изучения комплексного ФП на его основе.

Свойства ферментных препаратов. На рис. 2 приведена электрофореграмма образцов всех исследуемых ФП. Препараты БГЛ, ЭГП и ПЕЛ, полученные на основе штаммов-продуцентов БГЛ (117 кДа), ЭГП (39 кДа) и ПЕЛ (38 кДа) сильно отличались от ФП исходного штамма (RN_niaD⁽⁻⁾) и имели в основном одну активность.

ФП, полученный на основе созданного штамма-продуцента С9, содержал 3 целевых фермента, что подтвердили данные по удельной активности (табл. 2) и электрофореграмма (рис. 2). Отметим, что полоса ~40 кДа соответствовала ЭГП и ПЕЛ, молекулярные массы которых были близки. ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ, полученный путем высушивания КЖ при совместном культивировании штаммов – (моно)продуцентов, также содержал 3 активности (рис. 2). Удельная активность ЭГП в ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ была в 1.5 раза выше по сравнению с ФП С9, а удельная активность β-глюкозидазы – в 4 раза. Напротив, удельная активность пектинлиазы в ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ была в 2 раза ниже по сравнению с ФП С9 (табл. 2).

Необходимо отметить уменьшение удельной ксиланазной активности в полученных рекомбинантных ФП. Это, по-видимому, обусловлено процессом “титровки промотора”, связанного с замещением гена КСИЛ генами ПЕЛ, БГЛ и ЭГП в результате задействования гомологичных регуляторных элементов в процессе гомологичной рекомбинации [2]. Наиболее заметное падение ксиланазной активности наблюдалось в ФП БГЛ,

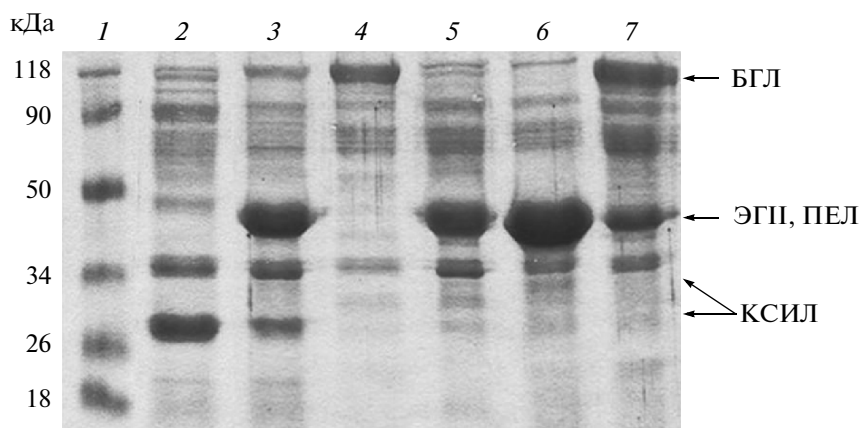


Рис. 2. ДДС-электрофорез ФП: 1 – белковый маркер, 2 – ФП исходного штамма *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾, 3 – ФП штамма-продуцента С9, 4 – ФП БГЛ, 5 – ФП ЭГП, 6 – ФП ПЕЛ, 7 – ФП, полученный в результате совместного культивирования штаммов – (моно)продуцентов (БГЛ_ЭГП_ПЕЛ).

Таблица 2. Активности (ед./мг белка) исследуемых ФП

Препарат	БГЛ	ЭГП	КСИЛ	ПЕЛ
RN_niaD ⁽⁻⁾	0.1 ± 0.03	1.3 ± 0.08	101.0 ± 5.05	0
С9	2.1 ± 0.11	12.2 ± 0.61	30.1 ± 1.50	5.7 ± 0.29
БГЛ	5.8 ± 0.29	0.6 ± 0.31	2.6 ± 0.13	0
ЭГП	0.1 ± 0.01	7.3 ± 0.37	5.8 ± 0.29	0
ПЕЛ	0.2 ± 0.03	0.8 ± 0.04	6.5 ± 0.33	30.6 ± 1.53
БГЛ_ЭГП_ПЕЛ	7.8 ± 0.39	19.2 ± 0.96	12.3 ± 0.62	2.6 ± 0.13

ЭГП и ПЕЛ (табл. 2). ФП С9 обладал в 3 раза большей по сравнению с ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ удельной активностью ксиланазы, однако относительно ФП, полученного с помощью исходного штамма RN_niaD⁽⁻⁾, ксиланазная активность ФП С9 была снижена в 3 раза.

Сравнение ферментных препаратов по эффективности осахаривания свекловичного жома. Эффективность осахаривания свекловичного жома оценивали по концентрации ВС в реакционной смеси после 24 ч гидролиза, проведенного ФП при 50°C и pH 5.0.

На рис. 3 приведены результаты осахаривания при дозировке препарата 2 и 10 мг белка на 1 г сухих веществ свекловичного жома. Из рис. 3а видно, что при дозировке 2.0 мг/г выход ВС под действием ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ на 72% выше относительно выхода ВС для контрольного ФП RN_niaD⁽⁻⁾, полученного на основе исходного штамма *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾, тогда как ФП С9 при дозировке 2.0 мг/г белка увеличивал выход ВС всего на 11% по сравнению с контрольным ФП RN_niaD⁽⁻⁾.

При дозировке 10 мг/г белка (рис. 3б) осахаривающая способность ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ и С9 также были выше по сравнению с ФП RN_niaD⁽⁻⁾ – на 43 и 18%, соответственно.

Полученные данные позволяют утверждать, что ФП, полученный при совместном культивировании штаммов – (моно)продуцентов БГЛ, ЭГП и ПЕЛ был наиболее эффективным среди исследуемых.

Состав исследуемых ФП. Нами были проанализированы составы ФП, полученных в результате совместного культивирования 3 штаммов (БГЛ_ЭГП_ПЕЛ), на основе штамма-продуцента 3 целевых ферментов (С9), а также исходного штамма (RN_niaD⁽⁻⁾). ФП фракционировали согласно описанной выше методике. В полученных фракциях, соответствующих БГЛ, ЭГП, ПЕЛ А и КСИЛ определяли концентрацию белка и активности по КМЦ, пектину ПНФГ и КСИЛ, далее, на основании данных об удельных активностях этих ферментов [10, 11–14], рассчитывали содержание указанных ферментов в составе соответ-

ствующих ФП. Установлено, что содержание КСИЛ и ПЕЛ в ФП С9 на 5.9% и 2.2% соответственно выше по сравнению с ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ (рис. 4), а содержание ЭГП и БГЛ напротив в ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ на 1.2% и 16.6% выше по сравнению с ФП С9. Содержание КСИЛ в ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ и С9 падало на 20.8% и 14.9% соответственно по сравнению с ФП RN_niaD⁽⁻⁾.

Сравнение данных о компонентном составе и осахаривающей способности исследованных препаратов позволило предположить, что более высокая эффективность осахаривания свекловичного жома ФП, полученным в результате совместного

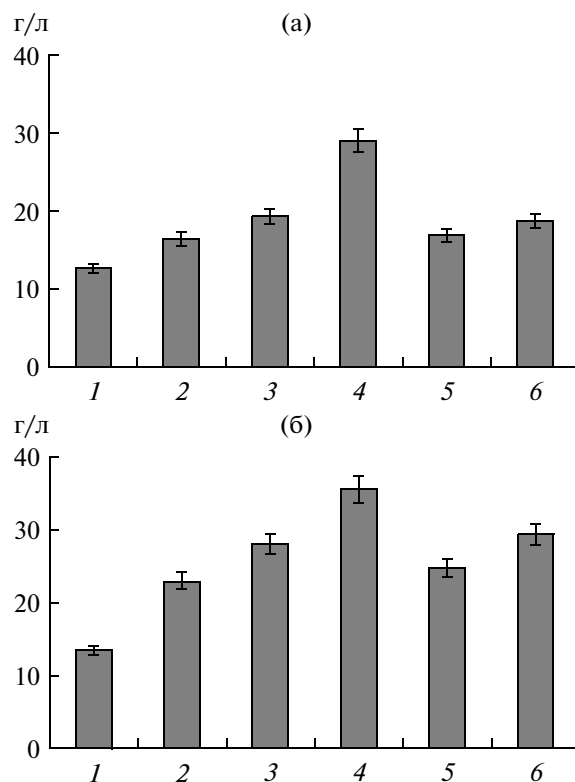


Рис. 3. Выход ВС после 24 ч гидролиза свекловичного жома при дозировке – 2 мг/г (а) и 10 мг/г (б). 1 – ФП БГЛ, 2 – ФП ЭГП, 3 – ФП ПЕЛ, 4 – ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ, 5 – ФП исходного штамма *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾, 6 – ФП штамма-продуцента С9.

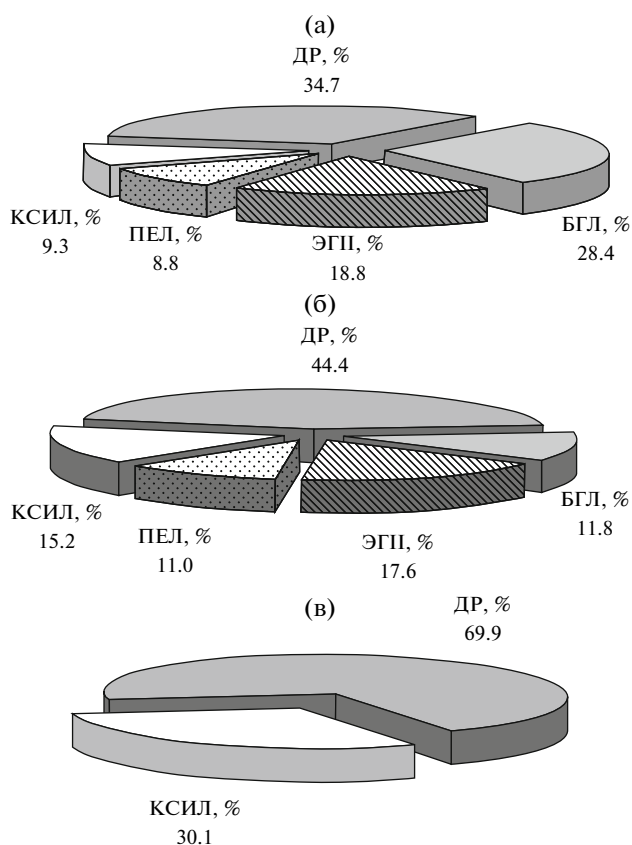


Рис. 4. Компонентный состав исследуемых ФП. а – ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ, полученный в результате совместного культивирования штаммов – (моно)продуцентов, б – ФП штамма-продуцента С9, в – ФП исходного штамма *P. canescens* RN_niaD. БГЛ – β -глюкозидаза, ЭГП – эндо-1,4- β -глюканаза, ПЕЛ – пектинлиаза А, КСИЛ – ксиланазы, ДР – другие белки.

культивирования штаммов – (моно)продуцентов (ФП БГЛ_ЭГП_ПЕЛ), по сравнению с ФП на основе штамма С9 объясняется более высоким (на 18%) содержанием в первом целлюлолитических ферментов – ЭГП и БГЛ.

Таким образом, на основе рекомбинантных штаммов *P. canescens* PCA-RN_niaD⁽⁻⁾ были получены два ФП, обладающих активностью гомологичной ПЕЛ и гетерологичных ЭГП *P. verrucosum* и БГЛ *A. niger*. Показано, что ФП, полученный в результате совместного культивирования штаммов – (моно)продуцентов, секретирующих БГЛ, ЭГП и ПЕЛ, обладал большей эффективностью осахаривания свекловичного жома по сравнению с препаратом на основе штамма-продуцента 3 ферментов. Через 24 ч гидролиза свекловичного жома под действием ФП, полученного при совместном культивировании штаммов, выход ВС составил 35.6 г/л, что на 43% больше по сравнению с ФП, полученным с помощью исходного штамма *P. canescens* RN_niaD⁽⁻⁾ и на 21%

больше по сравнению с ФП созданного штамма-продуцента 3 ферментов.

Работа была выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (2009–2013 гг.), а также частичной поддержки из средств ГК № 12.741.11.0102.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кислухина О.В. Ферменты в производстве пищи и кормов. М: ДеЛипринт, 2002. С. 273.
2. Рожкова А.М., Волков П.В., Кондратьева Е.А., Сатрутдинов А.Д., Рубцова Е.А., Бушина Е.А., Зоров И.Н., Сеницына О.А., Сеницын А.П., Кошелев А.В., Беккаревич О.А., Бубнова Т.В., Окунев О.Н. // Хранение и переработка сельхозсырья. 2010. № 7. С. 37–39.
3. Волков П.В., Рожкова А.М., Правильников А.Г., Андрианов Р.М., Доценко Г.С., Беккаревич А.О., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Зоров И.Н., Сеницын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 47. № 1. С. 66–73.
4. Вавилова Е.А. Винецкий Ю.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 2. С. 167–172.
5. Aslanidis C., de Jong P. // Nucleic. Acid Res. 1990. V. 18. P. 6069–6075.
6. Осипов Д.О., Рожкова А.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Рубцова Е.А., Правильников А.Г., Зоров И.Н., Сеницына О.А., Овешников И.Н., Давидов Е.Р., Сеницын А.П. // Катализ в промышленности. 2010. Т. 5. № 5. С. 64–71.
7. Рожкова А.М., Середа А.С., Цурикова Н.В., Нуртаева А.К., Семенова М.В., Римарева Л.В., Рубцова Е.А., Зоров И.Н., Сеницына О.А., Сеницын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 3. С. 308–317.
8. Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J. // Curr. Genet. 1995. V. 28. P. 474–477.
9. Патент РФ. 2006. № 2288267.
10. Сеницына О.А., Федорова Е.А., Семенова М.В., Гусаков А.В., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П., Сеницын А.П. // Биохимия. 2007. Т. 72. № 5. С. 699–706.
11. Сеницын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. Методы изучения и свойства целлюлолитических ферментов. Итоги науки и техники, Сер. “Биотехнология”. ВИНТИ. М., 1990. Т. 25. С. 30–37.
12. Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В., Кондратьева Е.Г., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Матыс В.Ю., Сеницын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 674–680.
13. Серебряный В.А., Сеницына О.А., Фёдорова Е.А., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Соколова Л.М., Вавилова Е.А., Винецкий Ю.П., Сеницын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 665–673.
14. Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В., Зоров И.Н., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Сеницын А.П. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 5. С. 699–70.

Development of Complex Enzymatic Preparations of Pectinases and Celulases for Sugar Beet Marc Digestion

E. V. Bushina^a, A. M. Rozhkova^b, I. N. Zorov^b, A. D. Satrutdinov^b, A. O. Bekkarevich^c, A. V. Koshelev^c, O. N. Okunev^c, and A. P. Sinitsyn^a

^a Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
e-mail: info@rector.msu.ru

^b Bakh Research Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia
e-mail: inbi@inbi.ras.ru

^c Skryabin Research Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

Received November 8, 2011

Abstract—Complex enzymatic preparations demonstrating activities homologous to pectinlyase A and heterologous to endo-1,4- β -glucanase from *Penicilliumverruculosum* and β -glycosidase from *Aspergillusniger* have been obtained on the basis of recombinant strains of the fungus *Penicilliumcanescens*. Two approaches were utilized: development of an enzymatic preparation on the basis of a new strain, which produced all three enzymes, and development of an enzymatic preparation via combined cultivation of three strains, each of which produced one of the enzymes.

УДК 577.15:581.1

ИНДУКЦИЯ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ КОЛЕОПТИЛЕЙ ПШЕНИЦЫ САЛИЦИЛОВОЙ И ЯНТАРНОЙ КИСЛОТАМИ: СВЯЗЬ ЭФФЕКТОВ С ОБРАЗОВАНИЕМ И ОБЕЗВРЕЖИВАНИЕМ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

© 2012 г. Ю. Е. Колупаев, Т. О. Ястреб, Н. В. Швиденко, Ю. В. Карпец

Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков 62483, Украина

e-mail: plant_biology@mail.ru

Поступила в редакцию 11.11.2011 г.

Изучено влияние салициловой и янтарной кислот (**СК** и **ЯК**) на генерацию активных форм кислорода (**АФК**) колеоптилями пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и их устойчивость к повреждающему нагреву. Обработка колеоптилей **СК** и **ЯК** в концентрации 10 мкМ приводила к усилению образования супероксидного анион-радикала и накоплению в них пероксида водорода. Данный эффект частично подавлялся как ингибитором НАДФ-Н-оксидазы α -нафтолом, так и ингибитором пероксидазы салицилгидроксамовой кислотой. Под влиянием **СК** и **ЯК** повышались активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и растворимой пероксидазы, а также и теплоустойчивость колеоптилей. Антиоксидант ионол, ингибиторы НАДФ-Н-оксидазы и пероксидазы существенно снижали положительное влияние **СК** и **ЯК** на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы. Сделано заключение, что посредниками в индуцировании теплоустойчивости при обработке колеоптилей **СК** и **ЯК** являются **АФК**, усиление образования которых может быть обусловлено повышением активности НАДФ-Н-оксидазы и пероксидазы.

Салициловая кислота (**СК**) в настоящее время рассматривается как один из стрессовых фитогормонов, участвующих в формировании защитных реакций растений. Особенно детально исследуется роль **СК** в развитии иммунитета растений при действии патогенов [1, 2]. Показано участие **СК** и в бобово-ризобиальном симбиозе [3]. Увеличение содержания эндогенной **СК** у растений зарегистрировано также в ответ на действие абиотических стрессоров – гипертермии [4], ультрафиолета [5], тяжелых металлов [6]. В пользу представлений об участии **СК** в формировании устойчивости растений к абиотическим факторам свидетельствуют и данные об индуцировании их резистентности под влиянием экзогенной **СК** [7–9].

Считается, что, по крайней мере, часть физиологических эффектов **СК** связана с ее способностью вызывать усиление генерации активных форм кислорода (**АФК**), в частности пероксида водорода [3, 10]. Следствием транзитного увеличения содержания H_2O_2 , выполняющего роль сигнальной молекулы, может быть как активация процессов, направленных на уничтожение патогенов (окислительный взрыв, синтез PR-белков и др.) [11], так и повышение активности антиоксидантных ферментов, накопление полифункциональных низкомолекулярных протекторов, что важно для формирования устойчивости растений к абиотическим стрессорам [9, 12].

Одной из основных причин накопления пероксида водорода в растительных тканях под влиянием **СК** считается ингибирование каталазы (**КФ** 1.11.1.6) [13]. В то же время для многих видов растений характерно лишь незначительное угнетение этого фермента **СК** в физиологических концентрациях [14, 15]. Увеличение содержания пероксида водорода в растительных тканях под влиянием **СК** может быть и следствием повышения активности супероксиддисмутазы (**СОД**, **КФ** 1.15.1.1) [14]. Также усилению образования H_2O_2 под действием **СК** может способствовать генерация супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$), обусловленная увеличением активности НАДФ-Н-оксидазы (**КФ** 1.6.3.1) [16] и отдельных форм пероксидазы (**КФ** 1.11.1.7) [17].

Некоторые физиологические реакции, характерные для **СК** (например, усиление генерации супероксидного анион-радикала и синтеза ряда белков), могут быть вызваны и действием на растения кислот цикла Кребса, в частности янтарной кислоты (**ЯК**) [18, 19]. Последняя обладает способностью повышать устойчивость растений к ряду неблагоприятных факторов [20] и рассматривается некоторыми авторами как миметик **СК** [18]. Так, показано сходное (ингибирующее) влияние **СК** и **ЯК** на каталазу клубней картофеля в системе *in vitro* [21]. В то же время исследований, в которых бы на одном и том же объекте сравни-

валось действие СК и ЯК на конкретные ферментные системы, участвующие в генерации и обезвреживании АФК, пока недостаточно.

Несмотря на применение обеих кислот в практике растениеводства, механизмы их влияния на устойчивость растений к абиотическим стрессорам изучены недостаточно полно. Менее исследованы в этом отношении реакции, индуцируемые экзогенной ЯК.

Цель работы – сравнение влияния СК и ЯК на генерацию растительными клетками $O_2^{\cdot-}$ и пероксида водорода, установление ферментных систем, участвующих в увеличении количества АФК, а также выяснение возможной связи между способностью изучаемых кислот вызывать окислительный стресс и индуцированием ими устойчивости растений к абиотическому стрессу (гипертермии).

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили отрезки колеоптилей, отделенные от четырехсуточных этиолированных проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Элегия, которые являются модельным объектом, чувствительным к действию экзогенных фитогормонов и гормоноподобных соединений, в т. ч. СК. Как было установлено нами ранее, колеоптиль пшеницы реагировали на обработку экзогенной СК быстрым увеличением активности СОД и содержания пероксида водорода, а также повышением теплоустойчивости [22].

Подготовка растительного материала описана в предыдущих работах [9, 22]. После отделения от проростков колеоптиль инкубировали в чашках Петри на 2%-ном растворе сахарозы в течение 14–16 ч, затем отрезки опытных вариантов выдерживали в течение 2 ч в растворах СК (10 мкМ), ЯК (10 мкМ) или их комбинации. Для выяснения механизмов действия СК и ЯК колеоптиль соответствующих вариантов обрабатывали антиоксидантом ионолом (5 мкМ), ингибиторами НАДФ-Н-оксидазы – α -нафтолом (1 мкМ) [23] и пероксидазы – салицилгидроксамовой кислотой (СГК, 500 мкМ) [24]. Концентрации эффекторов выбирали на основании предварительных опытов. В вариантах с комбинированной обработкой указанные соединения добавляли в основную среду инкубации колеоптилей (2%-ный простерилизованный раствор сахарозы) за 1 ч до введения в нее СК или ЯК. Колеоптиль контрольных вариантов инкубировали в 2%-ной сахарозе.

После окончания инкубации колеоптилей в растворах исследуемых эффекторов часть отрезков из каждого варианта подвергали потенциально летальному нагреву в водном ультратермостате в стерильной дистиллированной воде при температуре $43 \pm 0.1^\circ\text{C}$ в течение 10 мин, а затем поме-

щали в чашки Петри с 2%-ным раствором сахарозы. Через 3 сут после нагрева оценивали повреждения колеоптилей по появлению специфического буроватого оттенка и потере тургора. В это же время оценивали состояние колеоптилей, которые не подвергались нагреву. Во всех вариантах опытов, независимо от природы добавляемых в среду эффекторов, выживание не подвергнутых нагреву колеоптилей составляло не менее 95%.

После окончания обработки колеоптилей исследуемыми соединениями определяли интенсивность генерации супероксидного анион-радикала, содержание пероксида водорода, активность пероксидазы, СОД и каталазы. Активность антиоксидантных ферментов также анализировали через 1 и 24 ч после нагрева колеоптилей.

Генерацию супероксидных анион-радикалов интактными отрезками колеоптилей во внешний раствор определяли по восстановлению нитротетразолия синего [25]. По 15 колеоптилей помещали в пробирки с 5 мл 0.1 М К,Na-фосфатного буфера (рН 7.6), содержащего 0.05% нитротетразолия синего, 10 мкМ ЭДТА, 0.1% тритона X-100. Пробы выдерживали на шейкере-качалке при 120 об/мин в течение 1 ч, после чего оптическую плотность инкубационного раствора измеряли при длине волны 530 нм. Для проверки специфичности генерации $O_2^{\cdot-}$ в специальных опытах в пробы добавляли СОД (50 ед./мл), которая ингибировала генерацию супероксидного анион-радикала не менее чем на 90%. В связи с этим считали, что количество восстановленного нитротетразолия синего определяется содержанием $O_2^{\cdot-}$.

Содержание пероксида водорода определяли по образованию комплекса с ксиленоловым оранжевым [26]. Перед анализом реактив готовили смешиванием 1 мл 25 мМ раствора соли Мора в 2.5 М серной кислоте со 100 мл 125 мМ раствора ксиленолового оранжевого в 100 мМ сорбитоле. Для определения содержания H_2O_2 навеску колеоптилей растирали на льду в 0.025 мМ Na-фосфатном буфере, рН 6.2, гомогенат центрифугировали 10 мин при 8000 g, супернатант добавляли к 10-кратному объему указанного реактива и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. После центрифугирования при 8000 g в течение 10 мин определяли оптическую плотность раствора при длине волны 560 нм.

Активность растворимой пероксидазы определяли по методу [27] с незначительными модификациями. Колеоптиль гомогенизировали на холоде в 0.06 М К,Na-фосфатном буфере, рН 6.2, гомогенат центрифугировали 15 мин при 8000 g и в супернатанте определяли активность фермента. В качестве субстрата использовали пероксид водорода, а в качестве донора водорода – гваякол.

Образование активных форм кислорода в колеоптилях пшеницы после обработки эффекторами, выживание после повреждающего нагрева (43°C, 10 мин)

Вариант опыта	Генерация супероксидного анион-радикала, % к контролю	Содержание пероксида водорода, мкмоль/г сухого вещества	Выживаемость, %
Контроль	100.0 ± 4.1	0.70 ± 0.02	47.6 ± 1.9
Салициловая кислота (10 мкМ)	134.3 ± 5.4	0.99 ± 0.04	71.6 ± 2.7
Янтарная кислота (10 мкМ)	130.8 ± 4.9	0.95 ± 0.04	67.2 ± 3.3
Салициловая кислота (10 мкМ) + янтарная кислота (10 мкМ)	136.3 ± 4.4	1.02 ± 0.04	65.4 ± 3.7
Ионол (5 мкМ)	87.6 ± 3.7	0.58 ± 0.03	42.6 ± 2.9
Салициловая кислота (10 мкМ) + ионол (5 мкМ)	89.2 ± 4.1	0.54 ± 0.06	46.6 ± 3.0
Янтарная кислота (10 мкМ) + ионол (5 мкМ)	86.4 ± 4.7	0.68 ± 0.07	47.7 ± 2.8
α-нафтол (1 мкМ)	95.6 ± 3.9	0.72 ± 0.05	43.7 ± 3.1
Салициловая кислота (10 мкМ) + α-нафтол (1 мкМ)	108.7 ± 3.6	0.74 ± 0.04	60.5 ± 2.6
Янтарная кислота (10 мкМ) + α-нафтол (1 мкМ)	111.3 ± 3.8	0.77 ± 0.06	58.1 ± 2.8
Салицилгидроксамовая кислота (500 мкМ)	92.6 ± 2.8	0.66 ± 0.03	46.1 ± 2.3
Салициловая кислота (10 мкМ) + салицилгидроксамовая кислота (500 мкМ)	113.5 ± 6.2	0.69 ± 0.05	55.2 ± 3.5
Янтарная кислота (10 мкМ) + салицилгидроксамовая кислота (500 мкМ)	108.4 ± 4.8	0.74 ± 0.04	49.4 ± 3.3
α-нафтол (1 мкМ) + салицилгидроксамовая кислота (500 мкМ)	83.2 ± 5.1	0.51 ± 0.06	37.9 ± 3.8
Салициловая кислота (10 мкМ) + α-нафтол (1 мкМ) + салицилгидроксамовая кислота (500 мкМ)	91.1 ± 6.9	0.52 ± 0.08	37.2 ± 5.0
Янтарная кислота (10 мкМ) + α-нафтол (1 мкМ) + салицилгидроксамовая кислота (500 мкМ)	100.6 ± 5.6	0.59 ± 0.06	41.4 ± 3.7

Активность внеклеточной пероксидазы определяли в инкубационном растворе после 1 ч выдерживания на шейкере-качалке при 120 об./мин 10 отрезков колеоптилей в пробирках с 5 мл 0.1 М К₂Na-фосфатного буфера, pH 6.2, с добавлением 0.1%-ного тритона X-100, также используя в качестве субстрата H₂O₂, а восстановителя гваякол.

Для определения активности СОД ткани колеоптилей гомогенизировали на холоде в 0.15 М К₂Na-фосфатном буфере, pH 7.6, с добавлением детергента тритона X-100 (конечная концентрация 0.1%). Для анализа использовали надосадочную жидкость после центрифугирования гомогената при 8000 g. Активность СОД определяли, используя метод, основанный на способности фермента конкурировать с нитротетразолием синим за супероксидные анионы, образующиеся

вследствие аэробного взаимодействия НАДН и феназинметасульфата [22].

Активность каталазы определяли по количеству разложившегося пероксида водорода, экстрагируя фермент 0.1 М трис-HCl буфером, pH 7.4 [22].

Биологические эксперименты проводили в трех- или четырехкратной повторности и воспроизводили независимо не менее трех раз. На рисунках и в таблице представлены средние значения и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обработка колеоптилей пшеницы растворами СК и ЯК существенно повышала их выживаемость после повреждающего нагревания (таблица), т.е. вызывала эффект преадаптации к тепло-

вому стрессу. В то же время при совместной обработке колеоптилей СК и ЯК их выживание после теплового стресса достоверно не отличалось от значений, наблюдавшихся в вариантах с использованием каждой кислоты в отдельности. Иными словами, заметных эффектов синергизма, аддитивности либо антагонизма при совместном действии СК и ЯК на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы не проявлялось.

После двухчасового воздействия на колеоптили обеих органических кислот отмечалось усиление генерации ими супероксидного анион-радикала и увеличение содержания в них пероксида водорода (таблица). При этом совместное действие двух кислот на колеоптили существенно не отличалось от эффектов, вызываемых каждой кислотой в отдельности.

Для установления возможного значения АФК в индуцировании теплоустойчивости колеоптилей под действием СК и ЯК, а также ферментных источников образования O_2^- и H_2O_2 исследовали комбинированное действие органических кислот с антиоксидантом ионолом и ингибитором НАДФ-Н-оксидазы (α -нафтолом) и пероксидазы (СГК). В использованных концентрациях указанные соединения сами по себе либо не оказывали существенного влияния на образование O_2^- и содержание пероксида водорода в колеоптилях пшеницы, либо вызывали их снижение (таблица).

Предобработка колеоптилей антиоксидантом ионолом полностью снимала усиление образования АФК, вызываемое действием СК и ЯК. Предварительное воздействие α -нафтола и СГК также значительно уменьшало эффект увеличения генерации супероксидного радикала и содержания пероксида водорода, обусловленный действием на колеоптили органических кислот. При этом ингибирующее влияние СГК на накопление H_2O_2 было более существенным по сравнению с действием α -нафтола (таблица).

При совместном действии двух ингибиторов прооксидантных ферментов (α -нафтола и СГК) их эффекты, по крайней мере частично, суммировались и усиление образования супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в колеоптилях, вызываемое СК и ЯК, подавлялось полностью (таблица).

Если допустить, что действие используемых ингибиторов ферментов в условиях наших экспериментов достаточно специфично (α -нафтол ингибирует НАДФ-Н-оксидазу, а СГК пероксидазу), то можно предположить, что СК и ЯК усиливают генерацию АФК в колеоптилях, влияя на оба их ферментных источника.

В пользу предположения об участии пероксидазы в генерации АФК, индуцированной дей-

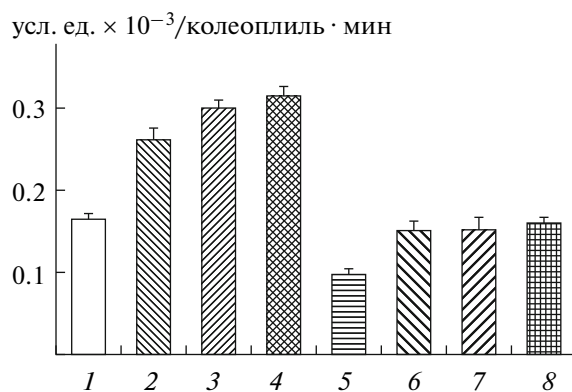


Рис. 1. Активность внеклеточной пероксидазы колеоптилей пшеницы.

1 – контроль; 2 – СК (10 мкМ); 3 – ЯК (10 мкМ); 4 – СК (10 мкМ) + ЯК (10 мкМ); 5 – СГК (500 мкМ); 6 – СК (10 мкМ) + СГК (500 мкМ); 7 – ЯК (10 мкМ) + СГК (500 мкМ); 8 – α -нафтол (1 мкМ).

ствием на колеоптили СК и ЯК, свидетельствуют и результаты непосредственного определения активности апопластной формы этого фермента. СК и ЯК вызывали увеличение активности внеклеточной пероксидазы колеоптилей (рис. 1). При совместном действии обеих кислот на колеоптили суммирования их влияния на активность внеклеточной пероксидазы не наблюдалось. Обработка колеоптилей СГК приводила к снижению активности апопластной пероксидазы почти в два раза и снятию эффекта повышения активности этой формы фермента под действием СК и ЯК. В то же время α -нафтол, используемый нами как ингибитор НАДФ-Н-оксидазы, не оказывал заметного влияния на активность пероксидазы (рис. 1). В связи с этим частичное снятие α -нафтолом эффекта усиления генерации АФК колеоптилями пшеницы, вызываемого их обработкой СК и ЯК, можно рассматривать как аргумент в пользу предположения об участии НАДФ-Н-оксидазы в данном процессе.

Как уже отмечалось, увеличение содержания АФК в клетках колеоптилей, происходящее под влиянием СК и ЯК, может быть обусловлено не только повышением активности АФК-генерирующих ферментов (НАДФ-Н-оксидазы и пероксидазы), но и модификацией активности антиоксидантных ферментов, в т.ч. СОД и каталазы [13, 14].

В наших экспериментах предобработка колеоптилей СК вызывала увеличение активности СОД в колеоптилях более чем в 1.5 раза (рис. 2). Эффект ЯК был не столь существенным, но вполне достоверным. В то же время активность каталазы в физиологически нормальных условиях (до воздействия гипертермии) под влиянием СК и ЯК в колеоптилях пшеницы существенно не изменялась (рис. 2). Следует отметить, что ранее в

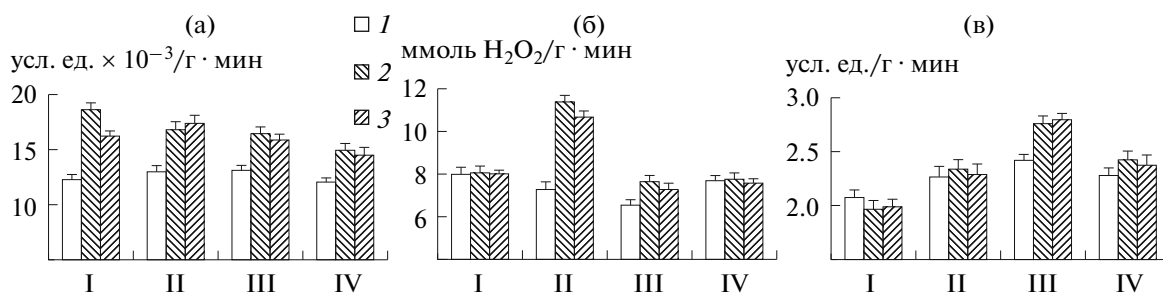


Рис. 2. Влияние обработки колеоптилей пшеницы СК и ЯК на активность СОД (а), каталазы (б) и пероксидазы (в). I – сразу после двухчасовой обработки СК или ЯК; II и III – через 1 и 24 ч после повреждающего нагрева соответственно; IV – через 24 ч после обработки СК и ЯК без последующего повреждающего нагрева. 1 – контроль; 2 – СК (10 мкМ); 3 – ЯК (10 мкМ).

опытах с колеоптилями пшеницы другого сорта (Донецкая 48) нами было выявлено заметное повышение активности СОД и относительно небольшое ингибирование каталазы (приблизительно на 20%) под действием СК [22]. По-видимому, ингибирование каталазы действием СК и, возможно, ЯК зависит от изоферментного состава и, следовательно, может быть сортоспецифичным. Сортоспецифичное действие СК на каталазу показано другими авторами на примере растений кукурузы [28]. В целом же можно полагать, что каталаза колеоптилей пшеницы менее чувствительна к действию СК и ЯК по сравнению каталазой ряда других видов растений [21, 28].

Активность внутриклеточной растворимой формы пероксидазы, которая рассматривается как антиоксидантный фермент [29], до воздействия повреждающего нагрева в вариантах с обработкой колеоптилей СК и ЯК не изменялась (рис. 2).

Обработка колеоптилей α -нафтолом и СГК не оказывала достоверного влияния на активность СОД и каталазы (результаты не приводятся), что позволяет говорить, по крайней мере, об относительной специфичности этих ингибиторов ферментов. Более того, СГК, используемая нами как ингибитор пероксидазы, как уже упоминалось, существенно угнетала апопластную форму фермента (рис. 1), но при этом снижала активность растворимой (внутриклеточной) пероксидазы не более чем на 10% (результаты не приводятся).

Таким образом, увеличение генерации АФК колеоптилями пшеницы под влиянием СК и ЯК может быть связано с повышением активности супероксид-генерирующих ферментов, локализованных в апопласте и (или) плазмалемме – НАДФ-Н-оксидазы и пероксидазы. К наблюдаемому в наших экспериментах увеличению содержания пероксида водорода в колеоптилях под влиянием СК и ЯК также, по-видимому, причастна СОД, активность которой заметно повышалась (рис. 2).

Если предположить, что АФК (O_2^- и H_2O_2) являются посредниками в индуцировании СК и ЯК

защитных реакций, обуславливающих рост теплоустойчивости колеоптилей, то угнетение их образования должно отразиться на этом показателе. Ионол, нейтрализующий радикальные АФК, сам по себе достоверно не влиял на теплоустойчивость колеоптилей, но полностью снимал эффект ее повышения, обусловленный действием СК и ЯК (таблица). СГК и α -нафтол, нивелирующие эффект увеличения генерации АФК, вызываемый СК и ЯК, частично снимали и повышение теплоустойчивости колеоптилей, индуцируемое этими органическими кислотами. Наименьшую устойчивость к нагреву имели колеоптили, обработанные одновременно двумя ингибиторами ферментов, являющихся источниками АФК. При комбинированном действии ингибиторов НАДФ-Н-оксидазы и пероксидазы как с СК, так и с ЯК, выживание колеоптилей после нагрева также было низким.

Одной из защитных реакций, индуцируемых СК и ЯК при посредничестве АФК, может быть повышение активности антиоксидантных ферментов в колеоптилях пшеницы. Как уже отмечалось, обработка колеоптилей обеими органическими кислотами не влияла на активность каталазы и растворимых форм пероксидазы, но вызывала существенное повышение активности СОД. Через 1 ч после стрессового воздействия (повреждающего нагрева) активность СОД и каталазы в колеоптилях, предобработанных СК и ЯК, была достоверно выше, чем в соответствующих контрольных (рис. 2). Более высокий по сравнению с контролем уровень активности этих ферментов в колеоптилях опытных вариантов отмечался и через 24 ч после нагрева. Кроме того, через 24 ч после нагрева происходило повышение активности растворимой пероксидазы в колеоптилях, при этом в опытных вариантах оно было более существенным. В колеоптилях, которые не подвергались нагреву, различия в активности СОД и каталазы на этой фазе эксперимента были незначительными, а активность растворимой пероксидазы в колеоптилях, обработанных

СК и ЯК, превышала значения соответствующего контроля (рис. 2).

Таким образом, в настоящей работе показано повышение теплоустойчивости колеоптилей пшеницы под воздействием экзогенных СК и ЯК. Важными посредниками в реализации физиологических эффектов этих органических кислот, по-видимому, являются АФК.

Следует заметить, что в литературе на основании данных, полученных на различных растительных объектах, обсуждается вклад ряда ферментов в усиление генерации АФК, наблюдавшееся под влиянием СК. На культуре клеток проса показан значительный вклад НАДФ·Н-оксидазы в генерацию супероксида и пероксида водорода и меньшая роль пероксидаз [16]. В то же время на изолированных корнях пшеницы [19] получены данные о преимущественном вкладе супероксид-генерирующих форм пероксидазы в реализацию эффектов СК. У растений арабидопсиса зарегистрировано значительное СК-индуцируемое увеличение содержания пероксида водорода на фоне повышения активности СОД [14].

На основании результатов ингибиторного анализа можно полагать, что в колеоптилях пшеницы ферментативными источниками образования АФК, стимулируемого СК и ЯК, являются НАДФ·Н-оксидаза и апопластная пероксидаза, поскольку ингибиторы этих ферментов (α -нафтол и СГК) частично нивелировали усиление образования АФК и повышение теплоустойчивости колеоптилей (таблица). Одной из причин увеличения продукции супероксидного анион-радикала с участием пероксидазы может быть активация выхода отдельных молекулярных форм этого фермента в апопласт [30]. Наблюдаемое в наших экспериментах повышение содержания пероксида водорода в колеоптилях, обработанных СК и ЯК, в какой-то степени может быть обусловлено и увеличением активности СОД (рис. 2). В целом же, для выяснения механизмов влияния исследуемых органических кислот на активность ферментов, продуцирующих АФК, необходимы специальные исследования.

Следует также отметить, что исследуемые в нашей работе физиологические эффекты СК и ЯК на колеоптили пшеницы были очень похожими, что в целом согласуется с гипотезой о действии ЯК как миметика СК, обусловленном сходным расположением гидроксильных групп по отношению к гидрофобному блоку у молекул обеих кислот [18]. Косвенно на сходство механизмов действия СК и ЯК на теплоустойчивость колеоптилей пшеницы указывает отсутствие эффектов как синергизма, так и антагонизма при совместном применении этих органических кислот (таблица). В то же время необходимо учитывать, что данных о физиологических эффектах

ЯК, в частности об ее влиянии на активность АФК-генерирующих и антиоксидантных ферментов, накоплено пока мало и они неоднозначны. Так, на основании полученных нами результатов вряд ли можно сделать предположение о вкладе модификации активности каталазы в реализацию эффектов ЯК, поскольку под ее влиянием активность этого фермента в колеоптилях, не подвергнутых нагреву, не изменялась (рис. 2). Тем не менее, на примере двудольных показано существенное ингибирование каталазы физиологическими концентрациями ЯК и СК [21]. В литературе имеются данные об увеличении активности внеклеточных пероксидаз корней пшеницы под влиянием ЯК [19], однако в этой работе использовались достаточно высокие (миллимолярные) концентрации ЯК, эффекты которых могут отличаться от действия физиологических концентраций.

В целом, можно высказать предположение о том, что антистрессовые эффекты ЯК при ее использовании в низких концентрациях могут быть связаны с модификацией ферментов, локализованных на клеточной поверхности и участвующих в образовании АФК (НАДФ·Н-оксидаза, пероксидаза). Их активация может приводить к формированию и передаче в генетический аппарат сигнала, индуцирующего неспецифические защитные реакции, например усиление экспрессии генов антиоксидантных ферментов [9]. В этом отношении физиологические эффекты СК и ЯК могут быть достаточно близкими. Однако для подтверждения данного предположения необходимы детальные исследования действия различных органических кислот (алифатических и ароматических) на окислительно-восстановительный баланс и конкретные физиологические реакции, важные для устойчивости растений к определенным стрессорам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 405–411.
2. Тарчевский И.А., Яковлева В.Г., Егорова А.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 3. С. 263–275.
3. Глянько А.К., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г., Миронова Н.В. // Изв. РАН. Сер. биол. 2005. № 3. С. 300–305.
4. Kaplan F., Kopka J., Haskell D.W., Zhao W., Schiller K.C., Gatzke N., Sung D.Y., Guy C.L. // Plant Physiol. 2004. V. 136. № 4. P. 4159–4168.
5. Catinot J., Buchala A., Abou-Mansour E., Metraux J.P. // FEBS Lett. 2008. V. 582. № 4. P. 473–478.
6. Rodriguez-Serrano M., Romero-Puertas M.C., Zabalza A., Corpas F.J., Gymez M., Del Rio L.A., Sandalio L.M. // Plant Cell Environ. 2006. V. 29. № 8. P. 1532–1544.

7. Сахабутдинова А.Р., Фатхутдинова Д.Р., Шакирова Ф.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 5. С. 579–583.
8. Wang L.J., Li S.H. // Plant Sci. 2006. V. 170. № 4. P. 685–694.
9. Колупаев Ю.Е., Карнец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. Киев: Основа, 2010. 352 с.
10. Janda T., Szalai G., Tari I., Paldi E. // Planta. 1999. V. 208. № 2. P. 175–180.
11. Wendehenne D., Durner J., Chen Z., Klessing D.F. // Phytochemistry. 1998. V. 47. № 4. P. 651–657.
12. Liu H.T., Huang W.D., Pan Q.H., Weng F.H., Zhan J.C., Liu Y., Wan S.B., Liu Y.Y. // J. Plant Physiol. 2006. V. 163. № 4. P. 405–416.
13. Chen Z., Silva H., Klessig D.F. // Science. 1993. V. 262. № 5141. P. 1883–1886.
14. Rao M.V., Paliyaht G., Ormrod D.P., Murr D.P., Watkins C.B. // Plant Physiol. 1997. V. 115. № 1. P. 137–149.
15. Васюкова Н.И., Герасимова Н.Г., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 1999. Т. 35. № 5. С. 557–563.
16. Geetha H.M., Shetty H.S. // Plant Sci. 2002. V. 163. № 3. P. 653–660.
17. Mika A., Boenisch M.J., Hopff D., Luthje S. // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. № 3. P. 831–841.
18. Тарчевский И.А., Максютлова Н.Н., Яковлева В.Г., Гречкин А.Н. // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 1. С. 23–28.
19. Minibayeva F.V., Gordon L.K., Kolesnikov O.P., Chasov A.V. // Protoplasma. 2001. V. 217. № 1–2. P. 125–128.
20. Андрианова Ю.Е., Сафина Н.И., Максютлова Н.Н., Кадошников И.Г. // Агрохимия. 1996. № 8–9. С. 118–123.
21. Панина Я.С., Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. // Докл. РАН. 2004. Т. 397. № 1. С. 131–133.
22. Колупаев Ю.Е. // Укр. ботан. журн. 2007. Т. 64. № 2. С. 270–278.
23. Hung K.T., Hsu Y.T., Kao C.H. // Physiol. Plant. 2006. V. 127. № 2. P. 293–303.
24. Mori I.C., Pinontoan R., Kawano T., Muto S. // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. № 12. P. 1383–1388.
25. Шорнинг Б.Ю., Смирнова Е.Г., Ягужинский Л.С., Ванюшин Б.Ф. // Биохимия. 2000. Т. 65. № 12. С. 1612–1618.
26. Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R., Bolwell G.P. // New Phytologist. 2001. V. 151. № 1. P. 185–194.
27. Ridge I., Osborne D.J. // J. Exp. Bot. 1970. V. 21. № 4. P. 843–856.
28. Horvath E., Janda T., Szalai G., Paldi E. // Plant Sci. 2002. V. 163. № 6. P. 1129–1135.
29. Ivanov S., Konstantinova T., Parvanova D., Todorova D., Djilianov D., Alexieva V. // Докл. Българ. АН. 2001. V. 54. № 7. P. 71–74.
30. Minibayeva F., Mika A., Lūthje S. // Protoplasma. 2003. V. 221. № 1–2. P. 67–72.

Induction of Heat Resistance in Wheat Coleoptiles by Salicylic and Succinic Acids: Connection of the Effect with the Generation and Neutralization of Active Oxygen Forms

Yu. E. Kolupaev, T. O. Yastreb, N. V. Shvidenko, and Yu. V. Karpets

Dokuchaev Kharkov National Agrarian University, Kharkov, 62483 Ukraine

e-mail: plant_biology@mail.ru

Received November 11, 2011

Abstract—The influence of salicylic (SaA) and succinic (SuA) acids on the generation of active oxygen forms (AOFs) and the heat resistance of wheat (*Triticum aestivum* L.) coleoptiles has been studied. The treatment of coleoptiles with 10 μ M SaA or SuA results in the accumulation of hydrogen peroxide and enhanced formation of a superoxide anion radical. This effect is partially suppressed by both α -naphthol (the NADPH oxidase inhibitor) and salicylhydroxamic acid (peroxidase inhibitor). SaA and SuA cause an increase in the activity of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase, catalase, and soluble peroxidase, and improve the heat resistance of coleoptiles. Antioxidant ionol and compounds, which inhibit the NADPH oxidase and peroxidase, significantly reduce the positive influence of SaA and SuA on the heat resistance of wheat coleoptiles. AOFs are considered to be intermediates for heat resistance induction in coleoptiles, treated with SaA and SuA; enhanced AOF generation can be caused by an increased activity of the NADPH oxidase and peroxidase.

УДК 612.577.11

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ АДСОРБЦИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ НА АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ

© 2012 г. Ю. Н. Тараканова*, Д. А. Дмитриев*, Ю. С. Массино*, М. Б. Смирнова**, О. Л. Сегал**, О. В. Фартушная*, Д. А. Яковлева*, Г. И. Коляскина***, В. Ф. Лавров*, А. Д. Дмитриев*

* Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, 105064

** Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

*** Научный центр психического здоровья РАМН, Москва

e-mail: add0547@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.11.2011 г.

Исследована антигенсвязывающая активность иммобилизованных антител в зависимости от pH насыщающего буфера. Проанализировано 28 моноклональных антител (МКА), секретированных различными гибридомами к трем вирусным антигенам: ядерный белок p23 вируса гепатита С (С core-protein p23), белок p24 ВИЧ 1 и поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg). Антитела адсорбировали на поверхности иммунных планшетов в кислом (pH 2.8), нейтральном (pH 7.5) и щелочном (pH 9.5) буферах. Проведено тестирование связывания меченых антигенов (биотинилированные или конъюгированные с пероксидазой хрена) с иммобилизованными антителами. Показано, что 10 из 28 (36%) проанализированных МКА значительно лучше сохраняли антигенсвязывающую активность, если процесс их пассивной адсорбции на поверхности полистироловых планшетов происходил в кислом буфере (pH 2.8). Этот подход позволил сконструировать высокочувствительный сэндвич-метод определения HBsAg с минимальной, достоверно определяемой концентрацией антигена – 0.013–0.017 нг/мл. Описанный прием может быть рекомендован для оптимизации сэндвич-методов и твердофазных конкурентных методов.

Биологическая активность сорбированных антител является важнейшим фактором, определяющим эффективность твердофазных конкурентных и сэндвич-методов тестирования антигенов. В упомянутых методах пассивная адсорбция является наиболее распространенным способом иммобилизации антител на поверхность твердой фазы, что обусловлено ее простотой и дешевизной [1–5]. Вместе с тем адсорбция на поверхности пластиковых иммунных планшетов вызывает значительное уменьшение антигенсвязывающей активности МКА. Показано, что после адсорбции биологическую активность утрачивают от 75 до 99% МКА [6, 7]. К числу наиболее существенных факторов, влияющих на сохранение биологической активности антител, относятся состав и физико-химические свойства буферных систем, используемых в процессе сорбции [5]. Имеется большое число работ, посвященных анализу влияния pH на адсорбцию разнообразных антигенов (вирусные белки, липополисахариды и др.) на поверхности иммунных пластиковых планшетов в твердофазных вариантах иммуноферментного анализа (ИФА) [8–10]. Однако, как ни парадоксально, вопрос воздействия pH на биологическую активность сорбированных антител в литературе освещен весьма скудно. Традиционно полагают, что оптимальными буферными системами для адсорбции антител на полистироловую поверхность

являются фосфатный (pH 7.0–7.5) и карбонатный (pH 9.0–9.6) буферы [5]. Вместе с тем в некоторых более ранних работах описаны поликлональные и моноклональные антитела, требующие для сохранения своей биологической активности использования буферов с низким значением pH [11, 12]. Так, в работе французских авторов [11] наблюдали увеличение активности поликлональных козьих антител (обнаружено по возрастанию сигнала в ИФА) после их сорбции на полистироловые планшеты при pH 5.0 (по сравнению с pH 7.5). Кроме того, согласно неопубликованным в реферируемых журналах, но известным среди специалистов техническим заметкам [12], встречаются такие МКА, которые дают лучшие результаты при конструировании сэндвич-методов после их адсорбции на полистироловую поверхность при pH 3.0. Однако в указанной работе [12] не было представлено подробного анализа антигенсвязывающей активности МКА после их адсорбции при разных значениях pH.

Цель работы – анализ биологической активности 28 МКА после их сорбции при различных значениях pH: в щелочном (pH 9.5), нейтральном (pH 7.5) и кислом (pH 2.8) буферах.

МЕТОДИКА

В исследовании использовали 96-луночные полистироловые планшеты “MaxiSorp” фирмы “Nunc” (Дания), стрептавидин-пероксидазу фирмы “Biosource” (США) и LC-LC-биотин фирмы “Pierce” (США). Прочие реактивы были произведены фирмой “Sigma” (США). Рекомбинантные белки р24 ВИЧ1 (генотип 1a) [13] и core-белок р23 вируса гепатита С (генотип 1b) [14] были экспрессированы в *Escherichia coli*. Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) серотипа ауw (S-полипептид) [14] был экспрессирован в *Pichia pastoris*. Рекомбинантные белки произведены НПО “Диагностические системы” (Россия).

Получение моноклональных антител к рекомбинантным белкам. Гибридомы, секретирующие МКА к рекомбинантным белкам, получали, как описано ранее [15, 16]. Отбирали гибридомы, антитела которых давали окрашивание в ИФА при связывании с иммобилизованным антигеном при разведении культуральных супернатантов в $(2-3) \times 10^4$ раз. Положительные гибридомы клонировали не менее трех раз. МКА очищали из асцитной жидкости до чистоты более 95% с помощью хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе, как было описано ранее [16, 17].

Биотинилирование рекомбинантных белков и моноклональных антител. Белки р24, р23 и МКА 18С8 биотинилировали в соответствии с рекомендациями фирмы “Pierce” (США). С этой целью белок р24 ВИЧ 1 и МКА растворяли в 0.1 М гидрокарбонате Na. Core-белок вируса гепатита С (р23) растворяли в том же буфере с 0.5% лаурилсаркозила и биотинилировали 2 ч в ледяной бане. Молярное отношение LC-LC-биотина (2 мг/мл в диметилсульфоксиде) и белка в инкубационной смеси составляло 4 : 1. Биотинилированный белок отделяли от свободного лиганда путем хроматографии на сефадексе G-25.

Получение конъюгата HBsAg с пероксидазой хрена. HBsAg (S-полипептид серотипа ауw) конъюгировали с пероксидазой хрена методом Накане [18]. Молярное отношение антигена и пероксидазы при ковалентном связывании составляло 1 : 1.

Определение антигенсвязывающей активности иммобилизованных антител. МКА адсорбировали на поверхности 96-луночных полистироловых планшетов “MaxiSorp” (3 мкг/мл, 100 мкл на лунку, ночь при комнатной температуре) в следующих буферах: 0.1 М глицин-HCl-буфер, pH 2.8; 0.025 М Na-фосфатный буфер, pH 7.5, и 0.05 М Na-гидрокарбонатный буфер, pH 9.5. Насыщенные антителами планшеты инкубировали (120 мин, 37°) с серийными разведениями меченых антигенов (1, 2, ..., 64 нг/мл). Антигены разводили в 0.025 М Na-фосфатном буфере (pH 7.5), содержащем 0.15 М NaCl, 0.2% БСА и 0.05% твина 20 (ELI-буфер). После отмывки в лунки добавляли стрептавидин-пероксидазу (50 нг/мл), растворенную в ELI-буфере, содержащем 1% казеина вместо БСА. После инкубации (30 мин, 37°) и

отмывки иммунные комплексы окрашивали тетрамethylбензидином (ТМБ). Окрашивание регистрировали на планшетном сканере при длине волны 450 нм.

Определение относительного количества антител, иммобилизованных на поверхности 96-луночных полистироловых планшетов при кислых, нейтральных и щелочных значениях pH сорбции. Первый подход: биотинилированные антитела клона 18С8 адсорбировали на поверхности полистироловых планшетов в кислом, нейтральном и щелочном буферах, как описано выше. После отмывки планшеты инкубировали со стрептавидин-пероксидазой, растворенной в ELI-буфере с казеином в концентрациях 0, 0.5, ..., 16 нг/мл. Комплексы биотинилированных антител и стрептавидин-пероксидазы окрашивали, как описано выше. Второй подход: антитела клона 18С8 сорбировали, как описано выше. После отмывки планшеты инкубировали с антимышиными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена в концентрациях: 0, 1.25, 2.5, ..., 40 нг/мл. Комплексы антител с антимышиным конъюгатом окрашивали, как описано выше.

Сэндвич-метод тестирования HBsAg. Полистироловые планшеты насыщали при комнатной температуре в течение ночи антителами клона 18С8, растворенными в 0.1 М глицин-HCl-буфере, pH 2.8, или в 0.025 М Na-фосфатном буфере, pH 7.5 (3 мкг/мл, 100 мкл на лунку). Инкубационная смесь (конечный объем 200 мкл) включала 150 мкл стандарта (разведенного в сыворотке крови, заведомо не содержащей HBsAg) и 50 мкл раствора детектирующих антител: конъюгат МКА F4F3 с пероксидазой хрена в ELI-БСА буфере (1.5 мкг/мл). Планшеты инкубировали 2 ч при 42°С и после серии отмывок выявляли иммунные комплексы, как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Мы проанализировали биологическую активность иммобилизованных антител, секретируемых 52 гибридами к трем вирусным антигенам: белок р24 ВИЧ 1 – антитела 20 гибридом, core-белок р23 вируса гепатита С – антитела 16 гибридом, HBsAg – антитела 16 гибридом. Очищенные антитела сорбировали на 96-луночные полистироловые планшеты “MaxiSorp” при pH 7.5 в концентрации 3 мкг/мл. В предварительных экспериментах для антител клонов 18С8, Р6 и С11 нами было показано, что увеличение насыщающей концентрации антител при pH 7.5 не приводило к увеличению связывания меченого антигена с сорбированными антителами. К сорбированным антителам добавляли нарастающие количества меченых антигенов: биотинилированных белков р24 ВИЧ 1 или core-белка р23 вируса гепатита С; HBsAg был конъюгирован с пероксидазой хрена. Типичные кривые связывания меченого антигена с сорбированными антителами

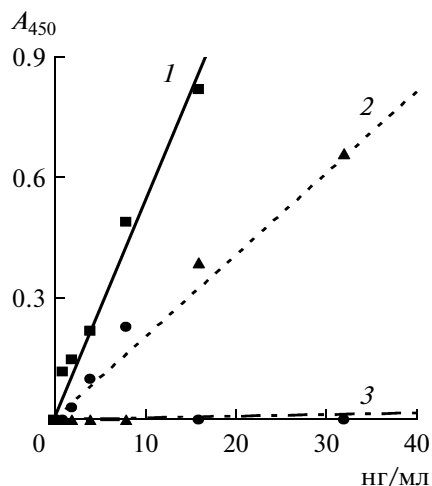


Рис. 1. Связывание биотинилированного белка р24 ВИЧ 1 (нг/мл) с моноклональными антителами различных клонов к белку р24, адсорбированными (3 мкг/мл) на поверхность полистироловых планшетов "MaxiSorp" при нейтральных значениях pH (7.5). Имобилизованы антитела клона (приведены уравнения кривых связывания): 1 – антитела клона P3, $y = 0.054x$; 2 – антитела клона P5, $y = 0.021x$; 3 – антитела клона P9, $y = 0.001x$.

ми к белку р24 ВИЧ 1 (для антител трех гибридом) приведены на рис. 1.

Эффективность связывания меченого антигена с иммобилизованными антителами можно охарактеризовать коэффициентом кривой связывания (то есть, тангенсом угла наклона линейного участка кривой к оси концентраций), что является принятым способом количественной характеристики чувствительности [19]*. Можно видеть, что иммобилизованные МКА P9 практически не связывают биотинилированный антиген (кривая 3, совпадает с осью концентраций). МКА P3 характеризовались относительно высокой способностью связывать биотинилированный антиген (кривая 1, $k = 0.05$). Несколько меньшей антигенсвязывающей активностью отличались антитела клона P6 (кривая 2,

$k = 0.02$). Сходным образом было проанализировано связывание меченых антигенов со всеми антителами нашей панели (кривые связывания не приведены). Было обнаружено, что половина исследованных антител (24 из 52) практически полностью утрачивали способность связывать антиген после адсорбции при pH 7.5 (остаточное связывание составляло менее 20% от максимального значения для панели МКА данной специфичности). После адсорбции на твердую фазу при pH 7.5 способность связывать антиген сохраняли десять МКА к HBsAg (62%), одиннадцать МКА к р24 ВИЧ1 (55%) и семь МКА к core-белку вируса гепатита С (44%) (таблица). Значения коэффициента кривых в этих случаях составляли 20–100% от максимального значения для панели МКА к данному антигену. Эти МКА использовали для анализа воздействия pH сорбции на антигенсвязывающую активность. Прочие антитела были исключены из рассмотрения, так как они не могли представлять практической ценности как сорбируемые при конструировании как конкурентных, так и сэндвич-методов.

Отобранные МКА адсорбировали на планшеты в кислом (pH 2.8), нейтральном (pH 7.5) и щелочном (pH 9.5) буферах и анализировали процесс сравнительного связывания меченых антигенов с иммобилизованными антителами. Некоторые кривые связывания адсорбированных антител с антигенами (р24 ВИЧ1, core-белок р23 вируса гепатита С и HBsAg), которые были получены в этих опытах, представлены на рис. 2. Сводные данные по воздействию pH адсорбции МКА на антигенсвязывающую активность антител приведены в таблице. Ни в одном из опытов не наблюдали увеличения антигенсвязывающей активности исследуемых МКА при pH-адсорбции 9.5 (по сравнению с адсорбцией при pH 7.5). Вместе с тем при адсорбции в кислом буфере (pH 2.8) антигенсвязывающая активность некоторых антител существенно возрастала: в серии опытов (3–4 эксперимента) для антител данного клона всякий раз наблюдалось увеличение коэффициента кривой связывания при pH 2.8 в сравнении с коэффици-

Влияние pH-сорбции антител на их биологическую активность

Антиген	Проанализировано антител (всего гибридом)	Сохранение биологической активности после сорбции при pH 7.5	Увеличение связывания меченого антигена с сорбированными антителами	
			pH 2.8	pH 9.5
р24 ВИЧ	20	11	3	не наблюдается
core-белок р23 вируса гепатита С	16	7	4	не наблюдается
HBs-антиген	16	10	3	не наблюдается

Примечание. Указанные антитела (3 мкг/мл) адсорбировали на поверхность полистироловых планшетов при pH 7.5 и тестировали на способность связывать антигены. Антитела, сохранявшие биологическую активность после сорбции при pH 7.5, дополнительно проверяли на способность взаимодействовать с антигенами после сорбции при pH 2.8 и pH 9.5 (см. "Методику").

* Коэффициенты кривых связывания меченых антигенов с сорбированными антителами приведены в подписях к рисункам 1, 2 и 3. Коэффициенты калибровочных кривых в сэндвич-методе приведены в подписи к рисунку 4.

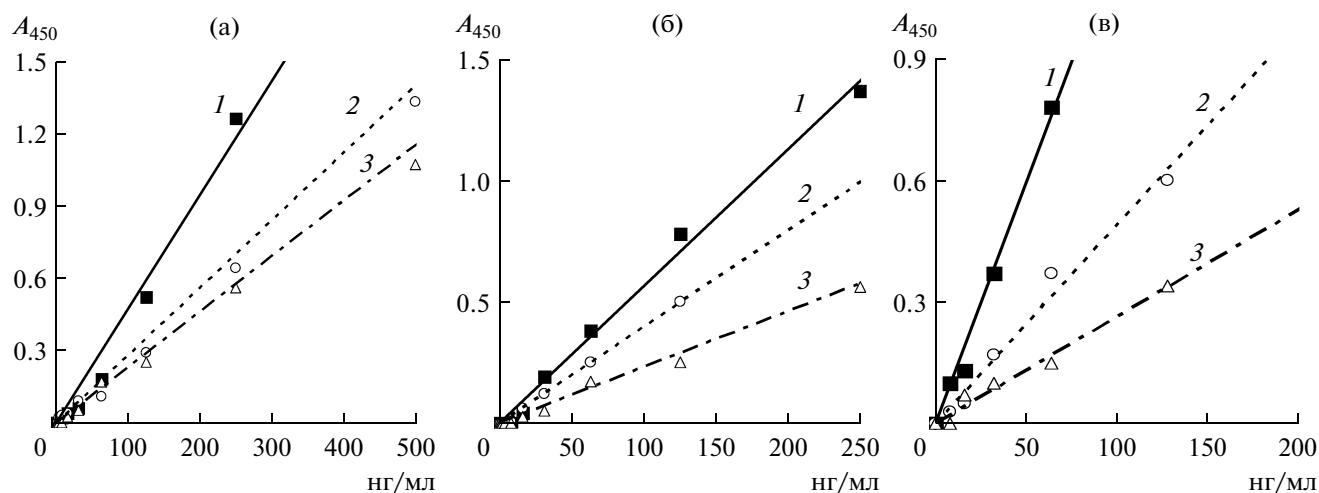


Рис. 2. Связывание меченых антигенов с моноклональными антителами, иммобилизованными на поверхности полистироловых планшетов (3 мкг/мл) при кислых – 2.8 (1), нейтральных – 7.5 (2) и щелочных – 9.5 (3) значениях pH.

а – связывание биотинилированного белка р24 ВИЧ1 с антителами клона Р6; уравнения кривых связывания: 1 – $y = 0.005x$; 2 – $y = 0.003x$; 3 – $y = 0.002x$.

б – связывание биотинилированного белка р23 к core-белку вируса гепатита С с антителами клона С11; уравнения кривых связывания: 1 – $y = 0.006x$; 2 – $y = 0.004x$; 3 – $y = 0.002x$.

в – связывание HBsAg, конъюгированного с пероксидазой хрена, с антителами клона 18С8; уравнения кривых связывания: 1 – $y = 0.012x$; 2 – $y = 0.005x$; 3 – $y = 0.002x$.

ентом кривой при pH 7.5. Так, в случае МКА к HBsAg эффект увеличения антигенсвязывающей активности наблюдали у трех из десяти проанализированных антител (таблица). Показательными в этом отношении были МКА 18С8, связывание которых после адсорбции при pH 2.8 увеличилось в 2.4 раза (по сравнению с pH 7.5), на рис. 2в, сравнить кривые 1 и 2. Сходные результаты были получены после сорбции МКА 18С8 в 0.1 М цитратном буфере pH 2.8, а также в 0.1 М глициновом буфере, pH 2.8, в присутствии 0.05 М–0.2 М NaCl (данные не приведены). Таким образом, наблюдаемый нами эффект связан со значениями pH буферного раствора, используемого для адсорбции антител, и не зависит от его состава и молярности.

При изучении антигенсвязывающей активности антител к core-белку вируса гепатита С ее увеличение, после адсорбции при pH 2.8, наблюдали у 4 из 7 тестированных МКА (таблица). Наиболее выраженный усиливающий эффект был получен с МКА клона С11 (связывание увеличилось в 1.4 раза), на рис. 2б, сравнить кривые 1 и 2. Для МКА к белку р24 ВИЧ 1 увеличение способности улавливать антиген после иммобилизации при низком значении pH наблюдали у 3 из 11 проанализированных антител (таблица). Наиболее показательными были опыты с МКА клона Р3: в этом случае наблюдали увеличение связывания в 1.7 раза: на рис. 2а сравнить кривые 1 и 2.

Феномен увеличения сигнала (чувствительность) в ИФА в результате адсорбции некоторых МКА при кислом значении pH может быть обусловлен различными причинами. Во-первых,

можно предположить, что адсорбция указанных “ацидофильных МКА” при кислом значении pH приводит к возрастанию поверхностной концентрации иммобилизованных антител на твердой фазе. В этой связи следует заметить, что согласно теоретическим расчетам (основанным на геометрических соображениях) на 1 см² полистироловых планшетов могло бы максимально разместиться 650 нг молекул иммуноглобулина G при условии, что все молекулы ориентированы вертикально [20]. Обычно для насыщения 96-луночных полистироловых планшетов белками (например, иммуноглобулинами) в каждую лунку добавляют по 100–200 мкл насыщающего раствора. При этом с насыщающим раствором соприкасается часть внутренней поверхности лунок площадью около 0.9–1.5 см², включая дно и стенки лунки [21, 22]. Таким образом, при достижении указанной максимально возможной поверхностной концентрации антител (650 нг/см²) в каждой лунке планшета “MaxiSorp” будет иммобилизовано около 600–900 нг антител (в зависимости от объема добавленного раствора). Если часть молекул находится в “лежащем” положении на твердой фазе, то максимально возможная поверхностная концентрация антител, в силу чисто геометрических соотношений, будет уже ниже [20]. На расположение молекул на твердой фазе могут влиять физико-химические характеристики пластика, использованного для изготовления планшетов, микрорельеф поверхности, условия насыщения (буферные системы) [20, 23]. Кроме того, в действительности, даже в условиях предельного на-

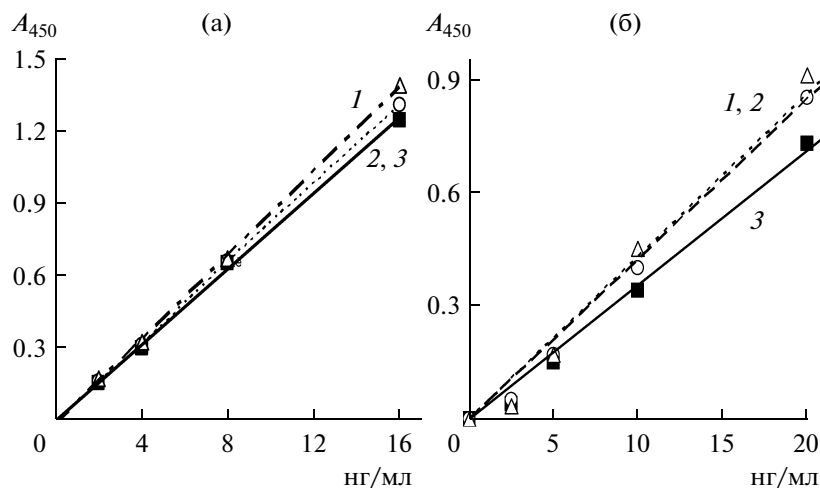


Рис. 3. Определение относительного количества антител клона 18С8, которые адсорбируются (3 мкг/мл) на поверхность иммунных планшетов при щелочных, (1), нейтральных (2) и кислых (3) значениях рН.

а – сорбировали биотинилированные антитела и тестировали связывание стрептавидин-пероксидазы (нг/мл) с иммобилизованными антителами; уравнения кривых связывания: 1 – $y = 0.079x$, 2 – $y = 0.082x$, 3 – $y = 0.086x$.

б – после адсорбции антител тестировали связывание конъюгата кроличьих антимышиных антител с пероксидазой хрена (нг/мл) с иммобилизованными антителами; уравнения кривых связывания: 1 – $y = 0.043x$, 2 – $y = 0.42x$, 3 – $y = 0.36x$.

сущения антитела, по-видимому, располагаются на поверхности полистирольных планшетов кластерами, не образуя сплошного монослоя [7, 23]. Согласно экспериментальным оценкам, ранее сделанным в работе Стивенса и Келсо [21], в каждой лунке 96-луночных полистирольных планшетов “Immulon 2” (“Dynatech”, США) при добавлении 100 мкл насыщающего раствора удавалось иммобилизовать около 300 нг крысиных или мышиных иммуноглобулинов G, что в пересчете на поверхностную концентрацию антител составляло 320 нг белка на см^2 . Эти данные, полученные с помощью биотинилированных антител, практически совпали с результатами работ Батлера с соавт. [7, 24], полученных с помощью другого подхода – использования ^{125}I меченых антител. Они также хорошо согласуются с теоретическими расчетами специалистов фирмы “Nunc” в отношении максимальной сорбирующей способности планшетов “MaxiSorp” (650 нг/ см^2) и “PolySorp” (220 нг/ см^2) для иммуноглобулина G [20].

Второе объяснение наблюдаемого нами усиливающего эффекта после адсорбции МКА в кислом буфере может заключаться в том, что поверхностная концентрация антител на твердой фазе (полистироловая поверхность) не изменяется (или даже уменьшается), однако при кислых значениях рН сорбции антигенсвязывающая активность МКА сохраняется в гораздо большей степени. Для определения относительного количества антител, которые иммобилизуются на твердой фазе при различных значениях рН, мы использовали два подхода. На поверхности планшетов сорбировали нативные и биотинилированные МКА 18С8 при кислых, нейтральных и щелочных

рН (рис. 3). В качестве параметра, характеризующего относительное количество нативных МКА, которые сорбировались на твердой фазе, использовали коэффициенты кривых связывания антимышиного конъюгата с иммобилизованными антителами (рис. 3а). Относительное количество сорбированных биотинилированных МКА оценивали по коэффициентам кривых связывания стрептавидин-пероксидазы с биотинилированными антителами (рис. 3б). Оба параметра прямо коррелировали с количеством антител, адсорбированных на твердой фазе.

Из результатов, представленных на рис. 3, следует, что кривые связывания антимышиного конъюгата с сорбированными антителами практически не зависят от рН сорбции антител – отклонение коэффициента кривой связывания от среднего значения не более 12% (рис. 3а). Кривые связывания стрептавидин-пероксидазы с биотинилированными МКА 18С8, иммобилизованными при рН 2.8; 7.5 и 9.5, практически совпадают: отклонение коэффициента кривой связывания от среднего значения не превышают 5% (рис. 3б). Эти данные позволяют заключить, что при нейтральных, кислых и щелочных рН на поверхности полистироловых планшетов сорбируется одинаковое количество молекул МКА. Вместе с тем молекулы антител, адсорбированные при кислом значении рН, в большей мере сохраняют антигенсвязывающую активность.

В целом наши данные согласуются с результатами, ранее полученными Батлером с соавт. на модели меченых ^{125}I МКА [7, 24]. По наблюдениям этих авторов, количество иммобилизованных на поверхности полистироловых планшетов мо-

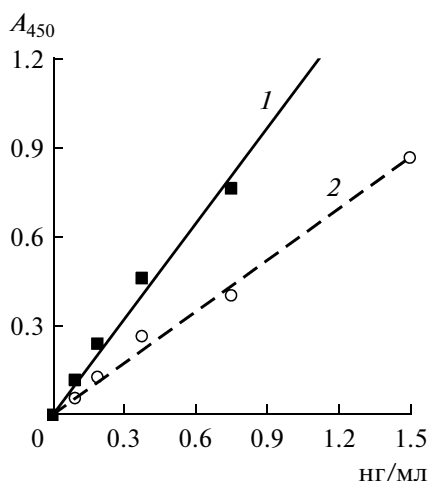


Рис. 4. Калибровочные кривые в сэндвич-методе тестирования HBsAg (сорбируемые антитела 18С8 – детектирующие антитела F4F3) при кислых – 2.8 (1) и нейтральных – 7.5 (2) значениях pH-адсорбции; уравнения калибровочных кривых: 1 – $y = 1.072x$; 2 – $y = 0.58x$.

лекул иммуноглобулина G (мышинные МКА) в условиях достижения насыщения не зависело от pH адсорбции (диапазон изменения составлял pH 4.5–9.6) [7]. Количество адсорбированных молекул антител было одинаковым для разных видов МКА: 300 нг/лунку (объем насыщающего раствора не указан) для использованных авторами планшетов Immulon 2 (“Dynatech”, Virginia) [24]. Биотинирование МКА не влияло на процесс их пассивной адсорбции на полистироловые планшеты [24]. Это хорошо согласуется и с определенным нами оптимумом концентрации сорбируемых антител 3 мкг/мл.

Антитела 18С8, адсорбированные при pH 2.8, были использованы для конструирования сэндвич-метода тестирования HBsAg. После иммобилизации при pH 2.8 эти антитела характеризовались максимальной антигенсвязывающей активностью в ряду всей панели МКА к HBsAg, адсорбированных при нейтральных, кислых и щелочных pH (данные не представлены). Для подбора эффективных детектирующих антител все антитела панели (16 МКА, включая антитела, которые инактивировались после адсорбции на твердую фазу) конъюгировали с пероксидазой хрена и строили калибровочные кривые с сорбируемыми при pH 2.8 антителами 18С8 и мечеными антителами (данные не приведены). Самый эффективный сэндвич-метод был получен с детектирующими МКА F4F3, мечеными пероксидазой. Результаты, представленные на рис. 4, показывают, что аналитическая чувствительность (коэффициент калибровочной кривой) данного сэндвич-метода при адсорбции МКА 18С8 при pH 2.8 (кривая 1) в 1.8 раза превышает таковую при адсорбции антител в буфере с pH 7.5 (кривая 2); прочие условия были одинаковы.

Для сконструированного сэндвич-метода определяли минимальную достоверно определяемую концентрацию антигена для $n = 5$ (превышение поглощения при тестируемой концентрации над поглощением, даваемым нулевым стандартом ± 3 среднеквадратичного отклонения). Указанный параметр измеряли после адсорбции МКА 18С8 при pH 7.5 и 2.8 с использованием трех независимо полученных конъюгатов МКА F4F3 с пероксидазой хрена. После адсорбции МКА 18С8 при pH 7.5 данный параметр составил: 0.1, 0.17 и 0.11 нг/мл (для трех различных препаратов конъюгата). В результате адсорбции антител при pH 2.8 этот показатель для тех же препаратов конъюгата уменьшился до 0.014, 0.017 и 0.013 нг/мл. Таким образом, очень простой методический прием – адсорбция антител на поверхность 96-луночных полистироловых планшетов при pH 2.8 позволил на порядок уменьшить минимальную достоверно определяемую концентрацию HBsAg.

Результаты анализа 28 МКА, секретируемых различными гибридами к трем вирусным антигенам, позволяют нам сделать вывод, что 36% данных антител (10 из 28) после их адсорбции при pH 2.8 сохраняют свою антигенсвязывающую активность значительно лучше, чем при других значениях pH (таблица). В противоположность этому, мы не наблюдали увеличения активности МКА после адсорбции антител в щелочном (pH 9.5) буфере по сравнению с антителами, иммобилизованными при pH 7.5 (см. таблицу).

Эффект неодинакового воздействия кислых значений pH на антигенсвязывающую активность МКА при их адсорбции на твердой фазе (полистироловая поверхность) может быть связан с различиями в заряде и степени гидрофобности варьируемых участков антител, что может определять ориентацию и конформационное состояние молекул антител, в зависимости от условий их адсорбции. Принято считать, что “правильная” ориентация иммуноглобулиновых молекул на твердой фазе – это ориентация, при которой антигенсвязывающие участки обращены в раствор, так как подобное расположение антител обеспечивает их максимальную биологическую активность [20, 25, 26].

Описанный в настоящей работе простой методический прием, заключающийся в использовании буферных растворов с низким значением pH для адсорбции антител на полистироловую поверхность планшетов, может быть рекомендован для оптимизации конкурентных и сэндвич-методов определения антигенов в твердофазном ИФА. По нашим данным, этот прием в немалом числе случаев может способствовать достижению более высокой поверхностной концентрации биологически активных антител, иммобилизованных на твердой фазе, что является важнейшим условием высокой аналитической чувствительности подобного рода тест-систем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
2. Gosling J.P. // Clin. Chem. 1990. V. 36. № 8. P. 1408–1427.
3. Portsmann T., Kiessig S.T. // J. Immunol. Methods. 1992. V. 150. № 1–2. P. 5–21.
4. Kricka L.J. // Clin. Chem. 1994. V. 40. № 3. P. 347–357.
5. Khan M.N., Findlay J.W.A. Ligand-binding assay: development, validation and implementation in the drug development arena / Eds. M.N. Khan, J.W.A. Findlay. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2010. 424 p.
6. Butler J.E. // Methods in Molecular Medicine. V. 94. Eds. J. Decker, U. Reischl. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2004. P. 333–372.
7. Butler J.E., Ni L., Nessler R., Joshi K.S., Suter M., Rosenberg B., Chang J., Brown W.R., Cantarero L.A. // J. Immunol. Methods. 1992. V. 150. № 1–2. P. 77–90.
8. Geerligs H.J., Weijer W.J., Bloemhoff W., Welling G.W., Welling-Wester S. // J. Immunol. Methods. 1988. V. 106. № 2. P. 239–244.
9. Craig J.C., Parkinson D., Goatley L., Knowles N. // J. Biol. Stand. 1989. V. 17. № 3. P. 281–289.
10. Bantroch S., Buhler T., Lam J.S. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1994. V. 1. № 1. P. 55–62.
11. Cuvelier A., Bourguignon J., Muir J.F., Martin J.P., Sessboue R. // J. Immunoassay. 1986. V. 17. № 4. P. 371–382.
12. Sponholtz D.K. // IVD Technol. Technical Bulletin. 1995. V. 1. № 3. P. 12–15.
13. Hashida S., Ishikawa S., Hashinaka K., Nishikata I., Oka S., Ishikawa E. // Clin. Diagn. Laboratory Immunol. 2000. V. 7. № 6. P. 872–881.
14. Лобзин Ю.В., Жданов К.В., Волжанин В.М., Гусев Д.А. Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение. СПб: ООО “Издательство Фолиант”, 2006. 192 с.
15. Massino Yu.S., Kizim E.A., Dergunova N.N., Vostrikov V.M., Dmitriev A.D. // Immunol. Lett. 1992. V. 33. № 3. P. 217–222.
16. Massino Y.S., Dergunova N.N., Kizim E.A., Smirnova M.B., Tereskina E.B., Kolyaskina G.I., Dmitriev A.D. // J. Immunol. Methods. 1997. V. 201. № 1. P. 57–66.
17. Nikulina V.A., Kizim E.A., Massino Y.S., Segal O.L., Smirnova S.P., Avilov V.V., Saprigin D.B., Smotrov S.P., Tichtchenko V.A., Kolyaskina G.I., Dmitriev A.D. // Clin. Chim. Acta. 2000. V. 299. № 1–2. P. 25–44.
18. Nakane P.K., Kawaoi A. // J. Histochem. Cytochem. 1974. V. 22. № 12. P. 1084–1091.
19. Pardue H.L. // Clinical Chemistry. 1997. V. 43. № 10. P. 1831–1837.
20. Esser P. // Thermo Sci. Nunc Bull. 1988. № 6. P. 1–5.
21. Stevens P.W., Kelso D.M. // J. Immunol. Methods. 1995. V. 178. № 1. P. 59–70.
22. Valimaa L., Laurikainen K. // J. Immunol. Methods. 2006. V. 308. № 1–2. P. 203–215.
23. Qian W., Yao D., Yu F., Xu B., Zhou R., Bao X., Lu Z. // Clin. Chem. 2000. V. 46. № 9. P. 1456–1463.
24. Suter M., Butler J.E. // Immunol. Letters. 1986. V. 13. № 6. P. 313–316.
25. Esser P. // Thermo Scientific Nunc Bulletin. 1990. № 11. P. 3–6.
26. Liu F., Dubey M., Takahashi H., Castner D.G., Grainger D.W. // Analyt. Chem. 2010. V. 82. № 7. P. 2047–2058.

Effect of Conditions of Monoclonal Antibody Adsorption on Antigen-Binding Activity

Yu. N. Tarakanova^a, D. A. Dmitriev^a, Yu. S. Massino^a, M. B. Smirnova^b, O. L. Segal^b,
O. V. Fartushnaya^a, D. A. Yakovleva^a, G. I. Kolyaskina^c, V. F. Lavrov^a, and A. D. Dmitriev^a

^a Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Academy of Sciences of Bashkortostan,
Ufa, Bashkortostan, 105064 Russia

^b Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5a, Moscow, Russia

^c Research Center for Mental Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

e-mail: add0547@yandex.ru

Received November 28, 2011

Abstract—The dependence of the antigen-binding activity of immobilized antibodies on pH of a saturating buffer has been investigated. We analyzed 28 monoclonal antibodies (MCAs) produced by various hybridomas to three virus antigens, i.e., the nuclear p23 protein of hepatitis C virus (C core protein p23), p24 protein of HIV 1, and the surface antigen of hepatitis B virus (HBsAg). Antibodies were adsorbed on the surfaces of immune plates in acidic (pH 2.8), neutral (pH 7.5), and alkaline (pH 9.5) buffers. The binding of labeled antigens, i.e., biotinylated or conjugated with horseradish peroxidase, with immobilized antigens was tested. It was shown that 10 out of 28 analyzed MCAs (36%) considerably better preserved their antigen-binding activity if their passive adsorption was carried out on the surface of polystyrene plates in an acidic buffer (pH 2.8). This approach allowed constructing a highly sensitive sandwich method for HBsAg assay with a minimal reliably determined antigen concentration of 0.013–0.017 ng/ml. The described approach may be recommended for the optimization of sandwich methods and solid-phase competitive methods.

УДК 543.544:547.913

СРАВНЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИОНОЛА, КОМПОНЕНТОВ СВЕЖЕГО ИМБИРЯ И ЕГО ЭКСТРАКТОВ

© 2012 г. Е. С. Алинкина, Т. А. Мишарина, Л. Д. Фаткуллина, Е. Б. Бурлакова

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва 119334

e-mail: tmish@rambler.ru

Поступила в редакцию 30.11.2011 г.

Изучены антирадикальные свойства трех препаратов из имбиря (*Zingiber officinale* R.): сока свежего корня имбиря, эфирного масла и экстракта (олеорезина) корня имбиря и сопоставлены со свойствами синтетического антиоксиданта – ионола. В качестве модельной системы использовали реакцию антиоксидантов со стабильным свободным 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил радикалом. Определены эквивалентные концентрации антирадикальных компонентов в препаратах имбиря, величины EC_{50} и величины антирадикальной эффективности АЕ. Полученные величины EC_{50} и АЕ для олеорезина имбиря и ионола были близки между собой и характерны для высокоактивных природных антиоксидантов, эти же величины для эфирного масла и сока имбиря были на 2 порядка меньше. По кинетическим параметрам препараты имбиря относятся к антирадикальным соединениям пролонгированного действия.

В результате воздействия различных вредных факторов окружающей среды, таких как ультрафиолетовое, радиационное или магнитное облучение, наличие добавок и загрязнителей в пищевых продуктах, питьевой воде, прием лекарств, попадание ксенобиотиков и др., в каждом живом организме постоянно образуются активные формы кислородных, пероксидных, гидропероксидных и других радикалов. Также значительное число активных свободных радикалов постоянно образуются в организме из эндогенных источников. Одновременно с образованием таких радикалов происходит их разрушение с помощью системы антиоксидантных ферментов. Превышение концентрации образующихся над концентрацией уничтоженных радикалов приводит к развитию окислительного стресса, который сопровождается повреждениями биологических молекул, окислением липидов, модификациями белков и ДНК [1–3]. В результате возникают различные заболевания, включая нарушение метаболизма, появление злокачественных образований, развитие сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, снижение иммунитета, более быстрое старение организма и т.д. Существенно уменьшить окислительный стресс и его последствия позволяет регулярный прием растительных антиоксидантов. В последние 10 лет этот класс природных веществ активно изучается, во многих работах доказана и установлена их польза и эффективность [4, 5].

Цель работы – изучение антирадикальных свойств одного из источников растительных антиоксидантов: сока свежего корня имбиря и продуктов его переработки – эфирного масла и олеорезина имбиря, а также синтетического антиоксиданта – ионола.

МЕТОДИКА

В работе использовали 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил радикал (ДФПГР) и ионол (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол), полученные из компании “Sigma-Aldrich” (США). Эфирное масло и олеорезин – произведены “Plant Lipids Ltd” (Индия). Свежий имбирь (Китай) приобретен в розничной сети.

Сок получали измельчением корня имбиря, добавлением равного по объему количества этанола (95%) и центрифугированием. Для исследований использовали прозрачный верхний слой, содержащий 50% сока натурального свежего имбиря.

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Анализ компонентов эфирного масла и летучих веществ в олеорезине имбиря проводили на приборе HP 5890/5980 (“Hewlett Packard”, США) с кварцевой капиллярной колонкой HP-1 (25 м × 0.30 мм, слой фазы 0.25 мкм) при программировании температуры от 50 до 250°C со скоростью 4°/мин. Температура инжектора и масс-детектора – 250°C, скорость газа-носителя гелия – 1.2 мл/мин. Масс-спектры получали в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70 эВ. Летучие вещества из олеорезина имбиря предварительно выделяли методом содистилляции с добавлением внутреннего стандарта n-тридекана, их содержание в олеорезине составляло 32.1%. Идентификацию компонентов осуществляли путем сравнения величин индексов удерживания и масс-спектров, полученных при анализах образцов, с индексами и спектрами стандартов, определенными нами на этой же колонке, а также взятыми из данных литературы [6, 7] и библиотек масс-спектров NBS и Wiley 275. Количественное содержание компо-

нентов определяли из площадей пиков (по полному ионному току) простой нормировкой. Состав компонентов эфирного масла и летучих веществ в олеорезине имбиря приведен в табл. 1.

Оценка антирадикальной активности. Измерение антирадикальной активности препаратов имбиря и ионола проведена по следующей методике. К 1 мл 200 мкМ метанолю раствора ДФПГР добавляли растворы антиоксидантов (ионол, эфирное масло, сок или олеорезин имбиря) до достижения выбранных концентраций и доводили суммарный объем до 2 мл метанолом. Полученные растворы, содержавшие 100 нмоль/мл (39.4 мкг/мл) радикала, помещали в кварцевые кюветы (10 мм) с плотно закрывающимися крышками. Оптическая плотность таких исходных растворов была около 1.0. Для получения кинетических кривых восстановления ДФПГР антиоксидантами регистрировали оптическую плотность модельных систем на спектрофотометре СФ-2000 (“ОКБ Спектр”, Россия) при 515 нм сразу же после смешивания (A_0) и в процессе выдерживания при комнатной температуре в темноте через каждые 5 мин в течение 120 мин. Математическая обработка результатов проведена с помощью программ Microsoft Excel 2007 и SigmaPlot 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Имбирь (*Zingiber officinale* R.), травянистое растение, популярно в качестве пряности в различных странах, особенно в Юго-Восточной Азии, Китае, Индии, Пакистане и др. В результате опыта длительного применения было установлено, что свежий и сухой имбирь могут не только улучшать вкус блюд, они имеют лечебное действие. В Полинезии с помощью имбиря лечат диабет, гипертензию, рак, ожирение и многие другие заболевания [8]. Он обладает терапевтическим действием, оказывает значительное влияние на различные патологические процессы, в том числе и на онкологические [4, 5, 9, 10]. Имбирь является важным источником натуральных фитохимических антиоксидантов, которые переходят из корневищ в экстракты имбиря – CO_2 -экстракты и олеорезины [11–13], а также в конденсированную фракцию летучих соединений – эфирное масло. Из свежего имбиря получают 0.3–0.5% эфирного масла и около 2% олеорезина. Известно, что эфирное масло имбиря обладает обезболивающим и антисептическим действием при простуде, ревматизме, ангине, головной боли [9, 10]. Продукты переработки имбиря – экстракты и эфирные масла являются более удобными в применении, так они, в отличие от свежего или сушеного имбиря, устойчивы к микробиологическому заражению.

Для определения антирадикальной активности мы использовали простой в исполнении и высокочувствительный метод на основе реакции со стабильным ДФПГР [14–16]. В основе реакции

Таблица 1. Состав летучих компонентов эфирного масла и олеорезина имбиря (*Zingiber officinale* Rosc)

Соединение	Содержание, % к сумме летучих веществ	
	эфирное масло	летучие вещества из олеорезина
α -Пинен	1.08	2.08
Камфен	3.24	6.41
Сабинен	0.60	0.20
β -Пинен	0.12	0.28
β -Мирицен	0.62	0.76
α -Фелландрен	0.10	0.20
Лимонен + 1.8-цинеол	4.88	9.63
α -Терпинолен	0.21	0.59
Линалоол	0.95	0.57
α -Терпинеол	0.45	0.59
Цитронеллол	0.38	0.19
Нераль	0.50	0.79
Гераниаль	0.46	0.55
Копаен	0.52	0.70
Кариофиллен	0.89	0.72
α -Куркумен	8.29	8.19
Зингиберен	32.26	31.02
Гингерон	0.87	0.64
Фарнезен	9.30	5.29
Бисаболен	8.17	7.24
Сесквифелландрен	16.53	12.71

лежит способность антиоксиданта отдавать протоны и восстанавливать ДФПГР. По мере восстановления ДФПГР происходит изменение его окраски от интенсивно фиолетового до соломенно-желтого. Это фиксируется спектрофотометрическим методом при длине волны 515–517 нм.

Мы исследовали четыре серии модельных реакций, в которых концентрации субстратов эфирного масла, олеорезина, сока имбиря и ионола варьировались в пределах, приведенных в табл. 2. Исходная концентрация ДФПГР во всех реакционных смесях составляла 1×10^{-4} М (39.4 мг/л), такие растворы имели оптическую плотность около 1.0. Для растворов ДФПГР в метаноле был построен график линейной зависимости оптической плотности от концентрации ДФПГР. По этому графику определили величину молярного коэффициента поглощения ϵ , который был равен 10010 л/моль см (толщина кюветы 1 см). По величине оптической плотности рассчитывали концентрацию остающегося радикала в модельных реакциях.

Для каждой серии изученных субстратов были получены кинетические кривые восстановления радикала компонентами субстратов в течение 2 ч (7200 с). По полученным данным построены графики зависимости степени восстановления ради-

Таблица 2. Кинетические и физико-химические характеристики процесса восстановления дифенилпикрилгид-разил-радикала ионолом, компонентами сока, эфирного масла и олеорезина корня имбиря

Кинетические и физико-химические параметры реакции	Сок имбиря	Эфирное масло имбиря	Олеорезин имбиря	Ионол
Молекулярная масса (Мм) соединений с антирадикальной активностью, Д	394 (эквивалентна МмДФПГР)	204	394 (эквивалентна МмДФПГР)	220
Вариации концентраций, мг/л	20–10000	20–8000	2–500	1–100
Уравнение 1 (рис. 2)	$y = 94.5 - 0.0843x$ $R^2 = 0.8759$	$y = 97.4 - 0.07x$ $R^2 = 0.9553$	$y = 95.2 - 0.0767x$ $R^2 = 0.8863$	$y = 99.82 - 0.03x$ $R^2 = 0.9997$
Уравнение 2 (рис. 2)	$y = 36.92 - 0.001x$ $R^2 = 0.9889$	$y = 39.4 - 0.0015x$ $R^2 = 0.9901$	$y = 32.27 - 0.001x$ $R^2 = 0.9695$	$y = 43.53 - 0.003x$ $R^2 = 0.9890$
Содержание антирадикальных соединений, эквивалентноеДФПГР, нмоль/мл	63.77	61.86	68.82	62.49
“Эффективная” концентрация компонентов с высокой АРА в образцах, ммоль/г	6.377×10^{-3}	3.093×10^{-3}	3.441	6.249
Содержание антирадикальных соединений с высокой АРА в образцах, мкг/мл	25.13	12.61*	27.12	13.75*
Навеска образца, мкг/мл	10000	2000	20	10
Концентрация компонентов с высокой АРА в образцах, %	0.25	0.63*	135.6	137.5*
Время окончания первой стадии, с	691	849	835	2077
EC ₅₀ , г/л	10	2	0.02	0.01
T ₅₀ , с	600	1200	750	2100
AE, л/г с	1.7×10^{-4}	4.2×10^{-4}	6.7×10^{-2}	4.8×10^{-2}

* Для соединений с Мм 204 и 220, соответственно.

кала за 30 мин от концентрации субстрата. Эти графики были линейны для всех субстратов, по ним определяли концентрацию субстрата, при которой степень восстановления радикала составляла 50% (EC₅₀), полученные величины приведены в табл. 2. Как видно, эти концентрации были близки для олеорезина и ионола и существенно больше для эфирного масла и сока имбиря. На рис. 1 даны кинетические кривые для каждого из субстратов при концентрации, близкой к найденной EC₅₀. Из кинетических кривых (рис. 1) видно, что реакция радикала с каждым образцом имела две фазы: первую – быструю, она заканчивалась тогда, когда самые активные антирадикальные компоненты полностью вступят в реакцию, и вторую медленную. Плавное уменьшение концентрации свободного радикала во второй фазе говорит о наличии в субстрате компонентов с низкой антирадикальной активностью. Если при наличии в системе свободных радикалов кинетическая кривая выходит на насыщение, это говорит о полном исчезновении антирадикальных веществ и о конце реакции, в этом случае можно рассчитать концентрацию активных соединений в изучаемом образце. Для других кривых, не выходящих на насыщение, концентрация антирадикальных веществ рассчитывается из их кинетической кривой по точке пересечения двух касательных – для быстрой и медленной фазы (рис. 2). Рассчитанные концентрации антиради-

кальных компонентов в образцах (в единицах, эквивалентных концентрации радикала), а также время окончания первой быстрой стадии реакции приведены в табл. 2. Как видно, для всех четырех субстратов быстрая стадия приводила к практически одинаковому расходованию радикала, при этом время достижения конца этой стадии реакции для препаратов из имбиря было близким и составляло 691–835 с, а для ионола оно было значительно большим – 2077 с. По принятой классификации, если время реакции для достижения EC₅₀ больше 5 мин, такие антиоксиданты относятся к “средне-быстрым” [14–16]. Теоретически реакция является стехиометрической и пропорциональна количеству атомов водорода, вступивших в реакцию сДФПГ радикалом, то есть можно ожидать, что количество восстановленного радикала будет пропорционально концентрации компонента (или компонентов в случае смеси нескольких антиоксидантов) с антирадикальной активностью. В реальных системах картина намного сложнее: могут быть несколько антиоксидантов с различающейся активностью, или одна молекула антиоксиданта может иметь более, чем один элиминируемый атом водорода, во всех случаях протекает не одна, а несколько реакций, в которых также могут принимать участие и образующиеся продукты реакций. Примером может быть реакцияДФПГР с индивидуальным соединением ионолом (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенолом), механизм

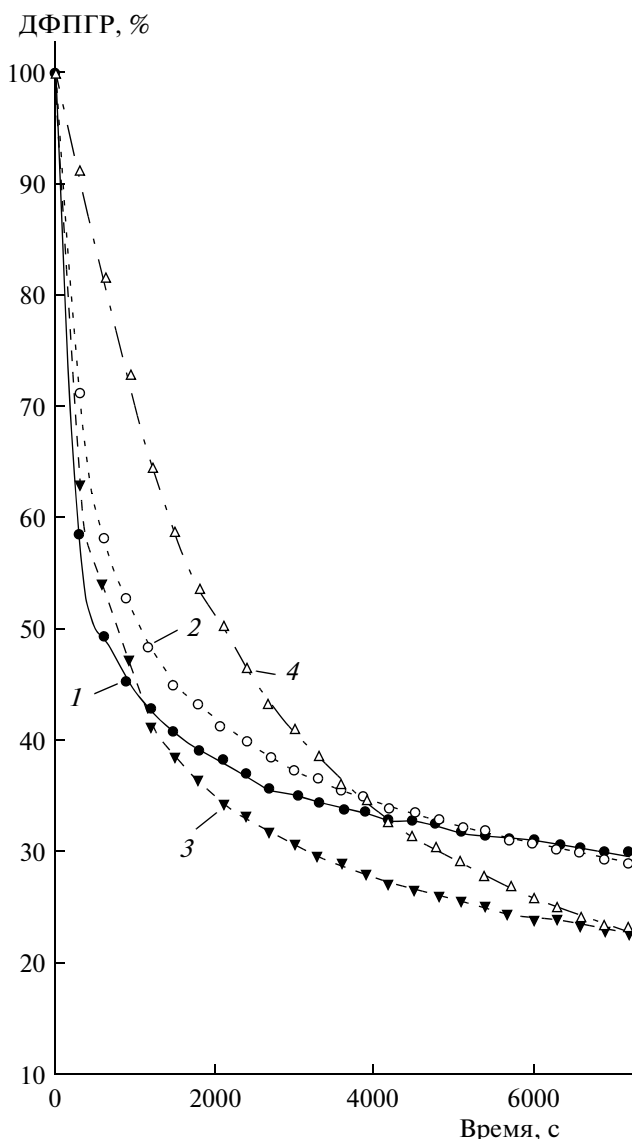


Рис. 1. Кинетические кривые восстановления дифенилпикрилгидразил-радикала компонентами сока 10 мг/мл (1), эфирного масла 2 мг/мл (2), олеорезина 20 мкг/мл (3), имбиря и ионолом 10 мкг/мл (4).

этой реакции подробно изучен в работе [14]. Было найдено, что одна молекула ионола может восстанавливать 2,8 молекул радикала, при этом образуются димеры ионола, молекулы со структурами хиноидов, продукты присоединения ионола к дифенилпикрилгидразилу и т.д. [14–16].

Для таких сложных систем, как экстракты растительного сырья, эфирные масла и олеорезины, имеющие многокомпонентный состав, молярное соотношение концентраций радикала и антиоксидантов является величиной не определяемой. При изучении свойств многокомпонентных смесей антиоксидантов суммарная картина становится очень сложной, поэтому практически невозможно определить кинетические и термодинамические параметры реакции каждого отдельного

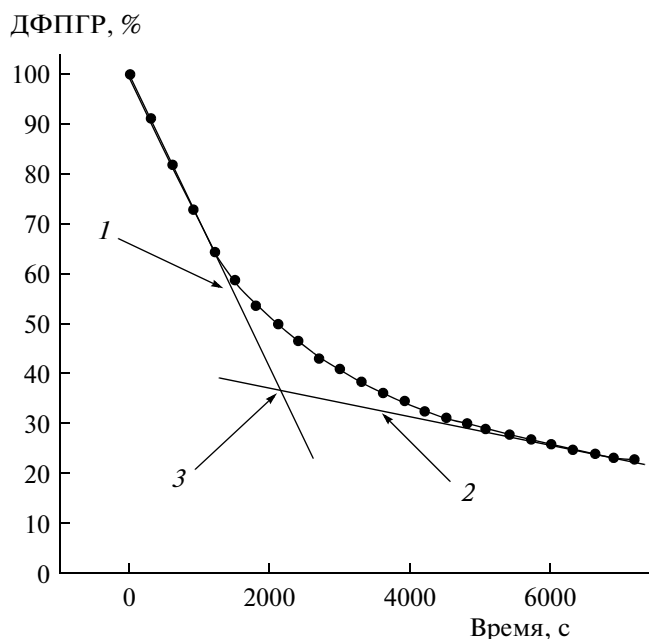


Рис. 2. Графическое определение концентрации антирадикальных компонентов в природных экстрактах по кинетической кривой восстановления дифенилпикрилгидразил-радикала. Прямая 1 описывается уравнением 1, прямая 2 – уравнением 2 (в табл. 2).

компонента, но можно сравнить свойства всей системы с каким-то известным хорошо изученным индивидуальным антиоксидантом, например, ионолом. Для ионола можно рассчитать реальную эффективную концентрацию, так как он является индивидуальным компонентом с молекулярной массой 220 Да. Для эфирного масла имбиря можно допустить, что средняя молекулярная масса его компонентов была 204 Да, так как масло состояло на 80% из сесквитерпеновых углеводородов. Полученные эквивалентные концентрации антирадикальных соединений для всех образцов в нМ, а также реальные для эфирного масла и ионола мы привели к абсолютной величине навески и определили эквивалентную или “эффективную” концентрацию соединений с высокой антирадикальной активностью в соке, эфирном масле и олеорезине имбиря, в ионоле, а также реальную в эфирном масле и ионоле при допущении, что 1 моль антирадикального компонента взаимодействует с 1 моль радикала (табл. 2). Расчет показал, что в соке имбиря содержится около 0.25% антирадикальных соединений, в эфирном масле – 0.63%, в олеорезине – 135.6%. Низкую концентрацию антирадикальных соединений в субстрате не следует отождествлять с его низкой антирадикальной активностью. Действительно, из кинетических кривых (рис. 1), а также из величин коэффициентов в уравнении 1 (табл. 2) видно, что скорости первой стадии реакции для всех трех имбирных образцов были практически одинаковы и в 2–2.5 раза больше, чем скорость

реакции ионола, то есть соединения, содержащиеся в имбире по своим антирадикальным свойствам превосходили ионол. Для ионола и олеорезина имбиря мы получили концентрацию антирадикальных компонентов более 100%, это подтверждает сложный механизм этих реакций, приведенный в работе [14].

Для сравнения антирадикальных свойств таких сложных по составу и по механизму реакций смесей антиоксидантов предложено использовать величину EC_{50} , которая эквивалентна количеству субстрата, содержащего компоненты с антирадикальной активностью, необходимому для восстановления половины радикала [14–16]. Для наших систем мы выразили эти величины в мг/л (табл. 2). Полученные величины EC_{50} для олеорезина имбиря и ионола близки между собой и характерны для высокоактивных природных антиоксидантов. Однако этот тест имеет недостаток — отсутствие связи со временем реакции, поэтому предложено использовать другой тест, объединяющий время восстановления половины радикала и требуемую для этого концентрацию субстрата. Это величина антирадикальной эффективности (АЕ), которая рассчитывается по формуле, предложенной в работе [16]:

$$AE = 1/(EC_{50} \times T_{EC50}).$$

В результате проведенных расчетов получены величины антирадикальной эффективности АЕ (табл. 2). Как видно, ионол и олеорезин имбиря имели близкие значения антирадикальной эффективности, эти величины были на два порядка больше, чем таковые для эфирного масла и сока имбиря.

Полученные данные о содержании веществ с антирадикальной активностью в препаратах из имбиря можно было бы использовать для расчета скорости и константы скорости реакции на первой стадии, однако следует помнить, что полученные значения содержания компонентов с антирадикальной активностью условны и могут значительно отличаться от реальности, если учитывать химическую природу веществ, входящих в состав этих субстратов. Параметр АЕ является достаточным и вполне успешно используется для сравнения антирадикальных свойств растительных препаратов и оценки содержания в них антиоксидантов [17].

Изученное эфирное масло имбиря содержало только летучие соединения и было природной смесью монотерпеновых углеводородов, спиртов, цитраля и сесквитерпенов (состав приведен в табл. 1). Как видно, основными компонентами масла были сесквитерпеновые углеводороды: куркумен, зингиберен, фарнезен, бисаболен и сесквифелландрен, — их содержание в масле составляло более 80% (табл. 1). ГХ анализ модельных систем, содержащих продукты реакции свободного радикала с эфирным маслом имбиря, показал, что через 2 ч в реакционной смеси полностью отсутствовал гингерон, который явля-

ется замещенным фенолом и, вероятно, именно он обеспечивал быструю первую фазу реакции. Более того, рассчитанная по кинетическим характеристикам этой фазы “эффективная” концентрация компонента с антирадикальной активностью (0.63%, табл. 2) была близка к концентрации гингерона в эфирном масле (0.87%, табл. 1). Более медленная фаза реакции, вероятно, проходила с участием зингиберена и других сесквитерпеновых углеводородов, содержание которых монотонно уменьшалось: через 72 ч после начала реакции содержание зингиберена в модельной системе уменьшилось в 5 раз. Способность зингиберена и других сесквитерпеновых углеводородов ингибировать автоокисление низших альдегидов в модельных системах было показано нами ранее [18]. Механизм этих реакций близок к механизму реакции γ -терпинена со свободным радикалом, который детально изучен в работе [19].

Олеорезин имбиря был получен экстракцией этилацетатом, в нем содержалось около 30% эфирного масла, состав которого приведен в табл. 1. Как видно из табл. 1, состав летучих веществ олеорезина имбиря соответствовал составу эфирного масла и содержащиеся в нем антиоксиданты участвовали в реакции с ДФПГР, но вклад этих соединений был незначителен. Около 70% веществ в олеорезине имбиря были нелетучие ди- и тритерпеноиды, стероиды, флавоноиды, замещенные метоксифенолы и другие соединения, состав которых полностью не известен [10]. В одной из последних работ [20] в корневище свежего имбиря найдено 42 соединения, большая часть которых относится к метоксифенолам с различными заместителями, их называют гингеролами и гингеронами. Эти метоксифенолы с боковыми углеводородными заместителями с 4–18 атомами углерода, одной или двумя спиртовыми или кетонными группами придают имбирю и его олеорезину жгучий вкус. Ранее сообщалось, что в метанольном экстракте корня имбиря содержалось около 4 мг/г флавоноидов и около 12 мг/г замещенных метоксифенолов [21]. В высушенном корне имбиря в зависимости от вида и условий выращивания найдено от 0.4 до 3.2 мг/г флавоноидов: кверцетин, эпикатехин, катехин, каемпферол, фисетин и морин [5]. Многие из этих веществ переходят в экстракты, поэтому олеорезин имбиря является очень сложной многокомпонентной смесью веществ, в том числе флавоноидов и метоксифенолов, которые, как известно, являются эффективными природными антиоксидантами. Наличие этих веществ в олеорезине имбиря обеспечивает ему высокую антирадикальную активность. Кроме того, эти соединения обладают также другими видами биологической активности, благотворно влияют на здоровье людей и на продолжительность их жизни.

Сок свежего имбиря содержал все компоненты эфирного масла и олеорезина имбиря, но в меньшей концентрации, поэтому суммарная кажущаяся

яся антирадикальная активность была невысокой. Из кинетических кривых для всех препаратов из имбиря видно, что скорость первой стадии реакции с радикалом была одинаковой, и она была больше, чем для ионола. Основное различие между препаратами имбиря и ионолом было во второй, медленной фазе реакции, которая выходила на плато только через 3–4 сут проведения реакции для имбиря и через 5 ч для ионола. Наличие длительного, то есть пролонгированного антирадикального действия, которое характерно для многих сложных по составу природных экстрактов с антиоксидантной активностью является с нашей точки зрения огромным достоинством таких препаратов. Одна из важнейших задач современной фармакологии как раз и состоит в разработке препаратов пролонгированного действия. Для этого изобретают специальные сложные формы лекарственных средств, способы сохранения, доставки и высвобождения действующих веществ, снижения их суточной дозы, обеспечения и поддержания постоянной концентрации в крови без пиковых колебаний, снижения побочного действия. Всеми такими качествами обладают многие растительные препараты, которые в то же время требуют тщательного изучения состава и свойств, восстановления опыта их использования в течение столетий и выявления новых полезных свойств.

На основании полученных в работе результатов можно сделать вывод, что среди натуральных природных продуктов можно найти большое число препаратов (экстрактов, эфирных масел), способных с успехом заменить синтетические антиоксиданты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gate L., Ba G.N., Tew K.D., Tapiero H. // Biomed. Pharmacother. 1999. V. 53. P. 169–180.
2. Namiki M. // Crit. Rev. Food Sci. Nutrition. 1990. V. 29. P. 273–300.
3. Mates M. // Toxicology. 2000. V. 153. P. 83–104.
4. Butt M.S., Sultan M.T. // Clin. Rev. Food Sci. Nutrition. 2011. V. 51. P. 383–393.
5. Rahman S., Salehin F., Iqbal A. // BMC Complementary and Alternative Medicine. 2011. V. 11. P. 76–83.
6. Jennings W., Shibamoto T. // Qualitative Analysis of the Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography. New-York: Acad. Press, 1980. P. 130–154.
7. Davies N.M. // J. Chromatogr. 1990. V. 503. № 1. P. 1–24.
8. Astley S.B. // Trends Food Sci. Technol. 2003. V. 14. P. 93–98.
9. Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability / Ed. R.G. Berger. New York: Springer Verlag, 2007. P. 43–116.
10. Funk J.L., Frye J.B., Oyarzo J.N., Timmermann B.N. // J. Nat. Prod. 2009. V. 72. № 3. P. 403–407.
11. Chen Ch., Kuo M., Wu Ch., Ho Ch. // J. Agric. Food Chem. 1986. V. 34. № 2. P. 477–480.
12. Kikuzaki H., Natakani N. // J. Food Sci. 1993. V. 57. P. 1407–1410.
13. Aruoma O.I., Spencer J.P., Warren D., Jenner P., Butler J., Halliwell B. // Food Chem. 1997. V. 60. P. 149–156.
14. Bondet V., Brand-Williams W., Berset C. // Lebensmittel. 1997. V. 30. P. 609–615.
15. Huang D., Ou B., Prior R.L. // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 6. P. 1841–1856.
16. Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. // J. Sci. Food Agric. 1998. V. 76. P. 270–276.
17. Волков В.А., Дорофеева Н.А., Пахомов П.М. // Химико-фармац. журнал. 2009. Т. 43. № 6. С. 27–31.
18. Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И. // Прикл. биохимия и микробиол. 2009. Т. 45. № 6. С. 710–716.
19. Foti M.C., Ingold K.U. // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 9. P. 2758–2765.
20. Feng T., Su J., Ding Z.-H., Zheng Y.-T., Li Y., Leng Y., Liu J.-K. // J. Agric. Food Chem. 2011. V. 59. № 21. P. 11690–11695.
21. Ghasemzadeh A., Jaafar H.Z.E., Rahmat A. // Molecules 2010. V. 15. P. 4324–4333.

Comparison of the Antiradical Activity of Ionol, Components of Fresh Ginger, and Its Extracts

E. S. Alinkina, T. A. Misharina, L. D. Fatkullina, and E. B. Burlakova

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

e-mail: tmish@rambler.ru

Received November 30, 2011

Abstract—The antiradical properties of three samples of ginger (*Zingiber officinale* R.)—juice from fresh rhizome, essential oil, and extracts (oleoresin)—were studied and compared with the properties of synthetic antioxidant ionol (butylatedhydroxy-toluene, BHT). Reaction antioxidants with stable free 2,2-diphenyl-1-picrylhydrozyl radicals were used as model systems. DPPH equivalents per gram of ginger sample, EC₅₀, and antiradical efficiency (AE) were determined. The EC₅₀ and AE values for ginger oleoresin and BHT were similar. They were the same as those of highly active natural antioxidants, and the values for essential oil and ginger juice were lower by two orders of magnitude. On the base of kinetic parameters, the ginger samples may belong to antiradical compounds with prolonged action.

УДК 543.07:579.22:543.9

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЦЕПТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ БИОСЕНСОРОВ ПРИ ДВУХ СПОСОБАХ ИММОБИЛИЗАЦИИ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ

© 2012 г. М. Г. Зайцев*, В. А. Арляпов*, В. А. Алфёров*, А. Н. Решетилов**

*Тульский государственный университет, г. Тула, 300600

** Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Московская обл., г. Пущино, 142290

e-mail: anaton@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 30.09.2011 г.

Рецепторные элементы биосенсора на основе дрожжевых клеток *Hansenula polymorpha* NCYC 495 In для определения этанола формировали, применяя два типа иммобилизации клеток: физическую адсорбцию на мембране из стекловолокон и пришивку на модифицированной нитроцеллюлозной мембране. Линейный диапазон определения этанола для биорецептора на основе дрожжей, адсорбированных на стекловолокне, составил 0.05–1.18 и 0.2–1.53 мМ для биорецептора на основе дрожжей, иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране. Рецепторные элементы на основе сорбированных клеток обладали в 2.5 раза более высокой долговременной стабильностью. Время отклика было в 1.5 раза меньше у клеток, иммобилизованных с помощью ДЭАЭ-декстрана и бензохинона. Результаты определения этилового спирта биосенсорами на основе иммобилизованных адсорбцией и пришивкой клеток, а также стандартным ареометрическим методом имели высокую корреляцию (0.998 и 0.997 соответственно для двух методов иммобилизации). Полученные результаты свидетельствуют о возможности рассматривать описанные модели рецепторных элементов биосенсоров как прототипы опытных образцов для выхода в практику.

Одной из важных аналитических задач является экспресс-определение содержания низших спиртов в образцах. Это определение выполняется в различных технологических процессах, например, в броидильном производстве этилового спирта, в процессах культивирования микроорганизмов при использовании спиртов в качестве источника углерода, при контроле качества спиртных напитков, в фармацевтической промышленности, в клиничко-токсикологических исследованиях [1]. Традиционные методы определения спиртов либо отличаются недостаточной точностью, либо трудоемки, дороги и характеризуются длительным временем анализа. Наиболее часто концентрацию спиртов определяют при помощи ареометра (спиртометра) или пикнометра [2, 3], однако этот метод не является селективным, так как наличие в растворе солей, углеводов и других примесей искажает результаты замера. Газовая хроматография, представляющая стандартный метод оценки спиртов [2, 3], является дорогостоящим методом и требует наличия квалифицированного персонала.

Актуальным направлением исследований является разработка метода анализа, который позволил бы упростить и удешевить процедуру определения указанных компонентов без потери точности и специфичности, а также обеспечить возможность их постоянного мониторинга в ре-

альных объектах. Перспективным подходом является развитие биосенсорной технологии [4]. К настоящему времени описано значительное количество моделей биосенсоров для детекции этанола и других алифатических спиртов, основанных на использовании ферментов [5, 6], в том числе алкогольоксидазы (АО). Источником АО, как правило, служат дрожжи *Candida boidini*, *Pichia pastories*, *Pichia angusta*, *Hansenula polymorpha* [7]. Наряду с использованием АО достаточно часто используются целые клетки микроорганизмов. Их применение имеет ряд преимуществ, к которым относятся существенное сокращение стоимости анализа, простота выполнения иммобилизационных процедур и возможность осуществлять многостадийные реакции, при этом не требуется введения дополнительных экзогенных факторов [8]. Так, не претендуя на полноту рассмотрения, отметим некоторые особенности клеточных биосенсоров на основе клеток микроорганизмов. Иммобилизованные адсорбцией микроорганизмы *Pichia angusta* рассмотрены в работе [9]. В исследовании применена иммобилизация адсорбцией на стекловолоконную мембрану и использован способ получения различной селективности биосенсорной детекции за счет изменения условий культивирования биомассы. Многоканальный биосенсор на основе микроорганизмов *Gluconobacter oxydans*, *Pichia angusta* и *Saccharomy-*

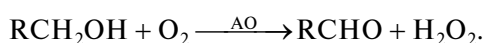
Ces bayanus позволял проводить анализ этанола в присутствии глюкозы, фруктозы и метанола [10]. Амперометрический биосенсор на основе клеток *Candida tropicalis*, иммобилизованных в желатин с использованием глутарового альдегида, имел широкий диапазон чувствительности и позволял проводить анализ этанола в диапазоне концентраций от 0.5 до 7.5 мМ [11]. Эти примеры, а также представленные в обзоре [8], свидетельствуют о возможности аналитического определения спиртов с помощью микробных биосенсоров. В настоящей работе представлялось важным ответить на вопрос о возможности иммобилизации именно микробных клеток на нитроцеллюлозную мембрану и произвести сравнительный анализ параметров полученных рецепторных элементов биосенсоров для различных вариантов иммобилизации.

Цель работы – создание и изучение характеристик амперометрического биосенсора для анализа этанола на основе клеток дрожжей, иммобилизованных различными способами: адсорбцией и иммобилизацией на химически модифицированной поверхности нитроцеллюлозной мембраны.

МЕТОДИКА

Биосенсорные измерения. Электрохимические измерения проводили с использованием гальванопотенциостата IPC 2L (“Кронас”, Россия), сопряженного с персональным компьютером под специализированным программным обеспечением IPC-micro той же фирмы для регистрации и обработки сигналов сенсоров. Средняя величина тока биосенсора в насыщенной окружающим воздухом дистиллированной воде, содержащей 9.2 мг/дм³ растворенного кислорода, при комнатной температуре составляла 30 нА при шуме преобразователя ±0.25 нА.

Измерения выполнены в кювете объемом 5 мл. Для измерений использовали натрий-калиевый фосфатный буфер, рН-7.6, концентрация солей – 60 мМ. Раствор перемешивали магнитной мешалкой (200 об/мин). Пробы вводили автоматическими микропипетками переменного объема 100–1000, 20–200 мкл (“GILSON”, Франция). Измеряемым параметром (откликом биосенсора) являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала биосенсора при добавлении субстратов (нА/с), определение проводили по изменению содержания кислорода в приэлектродном пространстве согласно биохимической реакции, катализируемой АО дрожжевых клеток:



После каждого измерения электрод промывали буферным раствором в течение 5–10 мин для восстановления концентрации кислорода в при-

электродном пространстве до первоначального уровня.

Культивирование дрожжевых микроорганизмов.

В работе были использованы 4 штамма метилотрофных дрожжей: *Pichia angusta* ВКМ Y-2559, *Pichia angusta* ВКМ Y-2518, *Pichia angusta* ВКМ Y-1397, *Hansenula polymorpha* NCYC 495 In. Все штаммы были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН (г. Пушкино). Клетки выращивали на минеральной среде (г/л): (NH₄)₂SO₄ – 2.5, MgSO₄ – 0.2, K₂HPO₄ – 0.7, NaH₂PO₄ – 3.0, дрожжевой экстракт – 0.5 г, DL-лейцин – 0.17, глицерин – 8.3 мл, микроэлементы – 1 мл. Собранную биомассу хранили при 4°C.

Иммобилизация биоматериала. В работе использовали два способа иммобилизации микроорганизмов – на мембране из стекловолокон и на химически модифицированной с помощью ДЭАЭ-декстрана и бензохинона нитроцеллюлозной мембране.

Иммобилизация микроорганизмов адсорбцией на мембране из стекловолокон Whatman GF/A. Дрожжевые клетки ресуспендировали в калий-натрий фосфатном буферном растворе, рН-7.6, затем отбирали небольшое количество клеток (50–100 мг осажденной биомассы), разбавляли этим же буфером в соотношении 1 : 16 (по массе). Полученную суспензию наносили в количестве 5 мкл на фрагмент стекловолоконного фильтра GF/A (“Whatman”, Великобритания) размером 3 × 3 мм² и высушивали в течение 5–10 мин на открытом воздухе. Содержание осажденной биомассы в конечном биорецепторном элементе составляло ~30 мкг/мм². Полученный биорецептор закрепляли на мембране кислородного электрода защитным нейлоновым колпачком.

Иммобилизация микроорганизмов с помощью ДЭАЭ-декстрана и бензохинона на нитроцеллюлозной мембране. 200 мкл раствора бензохинона (0.5 М) смешивали с 10 мг ДЭАЭ-декстрана, при этом бензохинон присоединялся к гидроксильной группе мономера ДЭАЭ-декстрана (рис. 1).

Для дальнейшей работы отделяли систему ДЭАЭ-декстран–бензохинон (система А) от свободного бензохинона. Для этого использовали колонку с сефадексом G-25. Объем собранной фракции составлял 3 мл. На следующем этапе смешивали 400 мкл системы А и 100 мг осажденной биомассы. Суспензию тщательно перемешивали, при этом положительно заряженные аминогруппы ДЭАЭ-декстрана связывались с отрицательными зарядами на поверхности клеток, обусловленными наличием на поверхности карбоксильных групп аминокислот.

После перемешивания в систему помещали несколько фрагментов нитроцеллюлозной мембраны размером 3 × 3 мм² и оставляли в холодиль-

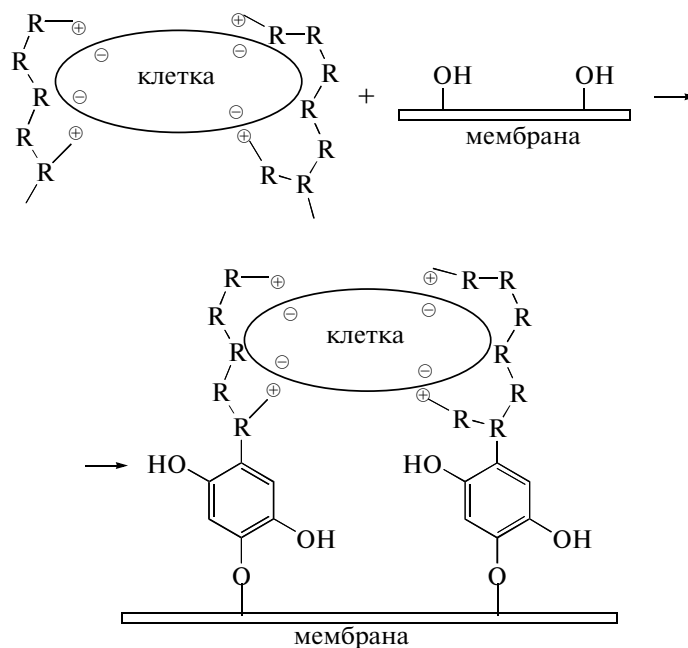


Рис. 2. Иммунизация клеток на поверхности модифицированной нитроцеллюлозной мембраны.

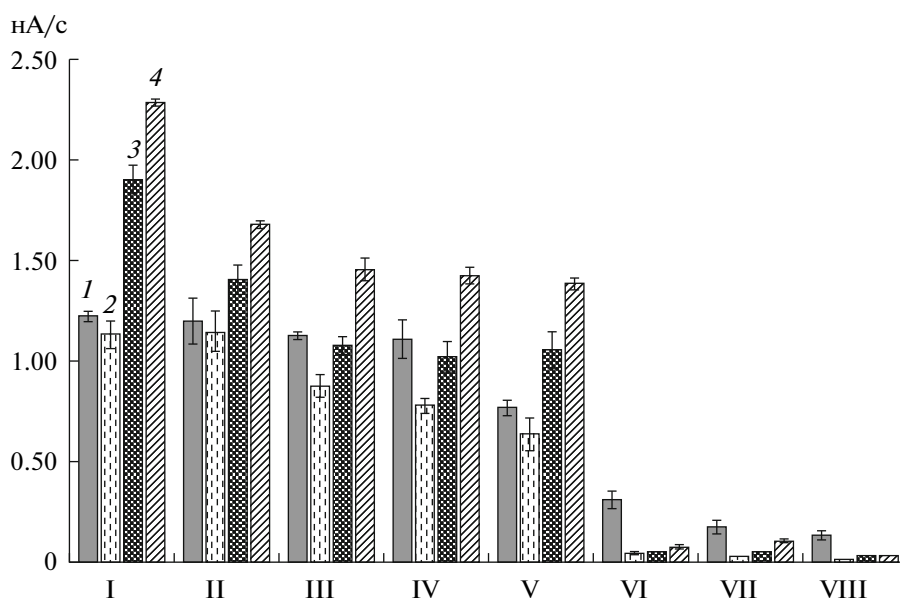


Рис. 3. Субстратная специфичность дрожжевых штаммов.

I – метанол, II – этанол, III – пропанол-1, IV – бутанол-1, V – метаналь, VI – глицерин, VII – глюкоза, VIII – фруктоза.

1 – *P. angusta* ВКМ Y-2518, 2 – *P. angusta* ВКМ Y-1397, 3 – *P. angusta* ВКМ Y-2559, 4 – *H. polymorpha* NCYC 495 ln. Приведены средние значения величины откликов биосенсора для трех последовательных измерений.

преждевременно, поскольку количество биокатализатора, иммобилизованных клеток на рецепторных элементах, которое вносит вклад в чувствительность элемента, не определяли, а оно может быть различным. В этой связи можно утверждать, что полученные описанным методом биорецепторные элементы имеют чувстви-

тельность, равную 1.01 и 0.319 нА/с мМ, для иммобилизации адсорбцией и встраиванием с помощью комплекса бензохинон–ДЭАЭ–декстран соответственно.

Для описания кинетики ферментативных реакций в гомогенных условиях использовали гиперболическое уравнение Хилла с двумя парамет-

рами для получения кажущихся значений характеристик ферментов, находящихся в клетках [14], которое имеет вид:

$$R = \frac{R_{\max}[S]^h}{K_M^h + [S]^h},$$

где R_{\max} – максимальная скорость потребления кислорода иммобилизованными микроорганизмами, достигаемая при $[S] \rightarrow \infty$, K_M – эффективная константа Михаэлиса, т.е. концентрация субстрата, при которой $R = R_{\max}/2$, h – параметр Хилла.

Следует отметить, что поскольку от концентрации биокатализатора, или количества иммобилизованных клеток, зависят параметры R и R_{\max} , то их сравнение между собой для двух способов иммобилизации также не производили.

Для практических целей измерения снижение ошибок анализа достигают, как правило, проведением измерений в диапазоне, соответствующем линейному участку градуировочной зависимости. Этот диапазон ограничен сверху константой K_M . Нижняя граница линейного участка соответствует нижней границе определяемых концентраций и рассчитывается статистическим методом, исходя из значения относительного стандартного отклонения результатов измерения ($S_r(C) < 0.33$ [15]). В табл. 1 приведены характеристики рецепторных элементов для двух способов иммобилизации дрожжей *H. polymorpha* NCYC 495 In.

Следует отметить, что отклики биосенсора с биорецепторами, полученными как первым способом иммобилизации, так и вторым, оставались стабильными на протяжении 15 последовательных измерений, при этом относительное стандартное отклонение не превышало 3%. Однако для биорецептора с клетками, адсорбированными на GF/A на 21 сут использования величина от-

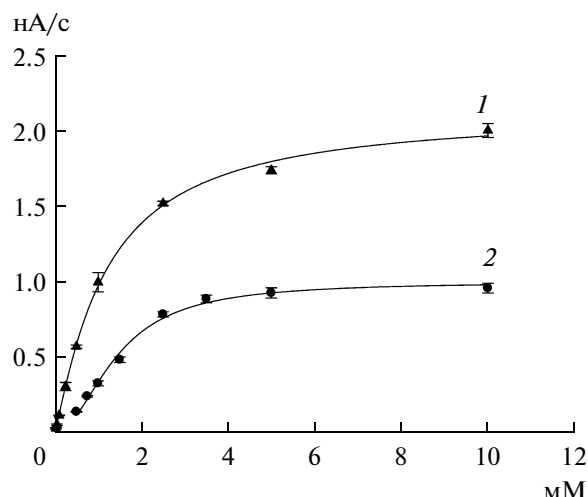


Рис. 4. Зависимость величины отклика биосенсора от концентрации этанола при использовании двух способов иммобилизации клеток метилотрофных дрожжей адсорбцией на GF/A (1) и иммобилизацией на нитроцеллюлозной мембране (2).

клика снижалась на 61% от первоначального значения, а для биорецептора с клетками, иммобилизованными на нитроцеллюлозной мембране величина отклика снижалась на 62% уже на 9 сут использования.

Важно отметить, что биорецепторный элемент на нитроцеллюлозной мембране обладал большей механической прочностью по сравнению с биорецептором на основе GF/A и его можно хранить отдельно от электрода, в то время как биорецептор с адсорбированными на GF/A микроорганизмами при снятии с электрода распадается на фрагменты. Такая особенность метода иммобилизации с использованием нитроцеллюлозной мембраны дает возможность поставлять пользователям готовые рецепторные элементы. Таким

Таблица 1. Сравнительная характеристика биосенсоров при использовании двух способов иммобилизации дрожжевых клеток

Характеристика биосенсора	Способ иммобилизации микроорганизмов	
	адсорбция на GF/A	иммобилизация на нитроцеллюлозной мембране
Нижняя граница определяемых концентраций, мМ	0.05	0.2
Верхняя граница определяемых концентраций, мМ	1.18	1.53
Коэффициент чувствительности, нА/с мМ	1.01	0.319
Повторяемость, отклонение от среднего значения за 15 измерений, %	3	3
Долговременная стабильность, сут	20	8
Время отклика, с	15–20	10–15
Время единичного измерения, с	350–400	250–300

Таблица 2. Определение содержания этанола в коммерчески доступных образцах алкогольной продукции

Анализируемый образец	Способ измерения концентрации этанола, об. %			
	биосенсор на основе клеток <i>H. polymorpha</i>		ареометр	заявленная производителем
	адсорбция на GF/A	иммобилизация на нитроцеллюлозной мембране		
Водка “Велес”	46 ± 2	44 ± 3	45.3 ± 0.5	40 ± 0.2
Вино “Рислинг”	12 ± 2	12 ± 2	10.0 ± 0.5	10.5
Вино “Ламбада”	11 ± 1	10 ± 1	10.0 ± 0.5	10.0
Портвейн “333”	18 ± 2	18 ± 1	17.5 ± 0.5	18

образом, оба способа иммобилизации имеют свои преимущества и могут быть использованы для разработки рецепторов биосенсоров на основе метилотрофных дрожжей для определения содержания низших спиртов. Биосенсорные анализаторы с разработанными биорецепторными элементами по аналитическим и метрологическим характеристикам не уступают зарубежным аналогам [12]. Нижняя граница определяемого содержания этанола с использованием разработанных рецепторных элементов почти в 100 раз ниже, чем нижняя граница концентраций, определяемых ареометрическим и пикнометрическим методами — 10 мМ, и в 1000 раз ниже нижней границы — 0.86 М, определяемой газохроматографическим методом [5].

При практическом тестировании полученных биорецепторных элементов определяли концентрацию этанола в образцах коммерческих алкогольных продуктов. В качестве реальных образцов спиртосодержащих жидкостей использовали несколько образцов вин и водку, изготовленную из спирта “Экстра”. Референтным методом определения этанола в анализируемом растворе был выбран ареометрический метод. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Результаты определения этилового спирта с помощью биосенсоров на основе иммобилизованных адсорбцией и пришивкой клеток и стандартным ареометрическим методом имели высокую корреляцию (0.998 и 0.997, соответственно для двух методов иммобилизации).

Исследованы методики формирования биорецепторных элементов, ранее хорошо зарекомендовавшие себя в работе с клетками рода *Gluconobacter* и ферментом алкогольоксидазой, с новым типом клеток, а именно, с метилотрофными дрожжами *H. polymorpha* 495 In. Биорецептор на основе этих клеток является основой для определения важного компонента многих процессов — этилового спирта. Показано, что биорецептор, полученный иммобилизацией клеток метилотрофных дрожжей сорбцией на мембране из стекловолокна, как и иммобилизацией этих же клеток

на нитроцеллюлозной мембране с помощью комплекса бензохинон–ДЭАЭ–декстран, позволяет получить рецепторные элементы, обладающие удовлетворительными параметрами — высокой чувствительностью, широким линейным диапазоном определения этанола в анализируемом образце, высокой долговременной стабильностью. Проведено определение спирта в реальных образцах спиртных напитков. Показано, что данные, полученные с использованием биосенсоров на основе микроорганизмов *H. polymorpha* 495In, иммобилизованных обоими способами, и стандартным ареометрическим методом характеризуются высоким значением коэффициента корреляции.

Полученные новые данные свидетельствуют о высокой степени сорбционного удерживания дрожжевых клеток мембраной из стекловолокна, а также о возможности фиксации клеток на поверхности нитроцеллюлозной мембраны. Решение практической задачи говорит о возможности применения разработанных биорецепторных элементов при создании недорогих и простых в обслуживании промышленных приборов для экспресс-анализа этанола в образцах алкогольной продукции и бродильных средах.

Работа выполнена при поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы”, Госконтракт № 16.740.11.0766, ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы ГК № 16.512.11.2126 и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук, договор № 16.120.11.4341-МК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сибирный В.А., Гончар М.В., Рябова О.В., Майдан М.М. // Микробиол. журн. 2005. Т. 67. № 4. С. 85–100.
2. Алфёров В.А., Арлянов В.А., Каманин С.С. // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2010. № 2. С. 247–255.

3. Арляпов В.А., Понаморева О.Н., Алфёров В.А. // Биотехнология. 2008. № 5. С. 84–91.
4. Terry L.A., White S.F., Tigwell L.J. // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 5. P. 1309–1325.
5. Azevedo A.M., Prazeres D.M., Cabral J.M., Fonseca L.P. // Biosens. Bioelectron. 2005. V. 21. № 2. P. 235–47.
6. Wen G., Zhang Y., Shuang S., Dong C., Choi M.M. // Biosens. Bioelectron. 2007. V. 23. № 1. P. 121–9.
7. Gonchar M., Maidan M., Korpan Y., Sibirny V., Kotylak Z., Sibirny A. // FEMS Yeast Research. 2002. V. 2. P. 307–314.
8. Liang S., Wenzhao J., Changjun H., Yu L. // Biosens. Bioelectron. 2011. V. 26. P. 1788–1799.
9. Voronova E.A., Iliasov P.V., Reshetilov A.N. // Analytical Letters. 2008. T. 41. № 3. P. 377–391.
10. Арляпов В.А., Понаморева О.Н., Алфёров С.В., Алфёров В.А., Решетиллов А.Н. // Сенсорные системы. 2011. Т. 25. № 4. С. 352–360.
11. Акылмаз Е., Динçкая Е. // Biosens. Bioelectron. 2005. V. 20. № 7. P. 1263–1269.
12. Зайцев М.Г., Алфёров В.А., Кузнецова Т.А., Рогова Т.В., Горячева А.А., Понаморов К.А., Решетиллов А.Н. // Изв. ТулГУ. Естественные науки. 2008. № 2. С. 200–207.
13. Алфёров В.А., Зайцев М.Г., Понаморева О.Н., Кузнецова Т.А., Рогова Т.В., Решетиллов А.Н. // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. № 12. С. 1322–1329.
14. Kurganov B.I., Lobanov A.V., Borisov I.A., Reshetilov A.N. // Analitica Chimica Acta. 2001. T. 427. № 1. P. 11–19.
15. Гармаш А.В. Метрологические основы аналитической химии. М.: Московский государственный университет, 2005. 34 с.

Receptor Elements for Biosensors in Two Ways of Methylotrophic Yeast Immobilization

M. G. Zaitsev^a, V. A. Arlyapov^a, V. A. Alferov^a, and A. N. Reshetilov^b

^a Tula State University, Tula, 300600 Russia

^b Institute of the Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 5, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

e-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

Received September 30, 2011

Abstract—Receptor elements for biosensors based on *Hansenula polymorpha* NCYC 495 In yeast cells for ethanol assay were developed using two ways of cell immobilization, i.e., physical adsorption on a glass fiber membrane and covalent binding on a modified nitrocellulose membrane. The linear diapason of ethanol assays for a biosensor based on yeast cells adsorbed on glass fiber was 0.05–1.18; for a biosensor based on yeasts immobilized on a nitrocellulose membrane, 0.2–1.53 mM. Receptor elements based on sorbed cells possessed 2.5 times higher long-term stability. The time response was 1.5 times less for cells immobilized using DEAE-dextran and benzochinone. The results of ethyl alcohol assays using biosensors based on cells immobilized via adsorption and covalent binding, as well as using the standard areometric method, had high correlation coefficients (0.998 and 0.997, respectively, for the two ways of immobilization). The results indicate the possibility to consider the described models of receptor elements for biosensors as prototypes for experimental samples for practical use.

Сдано в набор 26.04.2012 г.	Подписано к печати 29.06.2012 г.	Формат 60 × 88 ¹ / ₈	
Цифровая печать	Усл. печ. л. 14.0	Усл. кр.-отт. 1.7 тыс.	Уч.-изд. л. 14.0
	Тираж 116 экз.	Зак. 507	Бум. л. 7.0

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

Издатель: Академиздатцентр “Наука”, 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90
 Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”
 Отпечатано в ППП «Типография “Наука”», 121099 Москва, Шубинский пер., 6