

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА МОДЕЛЯХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК (ОБЗОР) <i>Лисицкая К.В., Николаев И.В., Торкова А.А., Попов В.О., Королёва О.В.</i>	581	0
<input type="checkbox"/>	ПОЛУЧЕНИЕ ГОМОГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗОФОРМ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ БАКТЕРИЙ <i>SRHAEROTILUS NATANS</i> ШТАММ Д-507 <i>Епринцев А.Т., Ву Т.Л., Селиванова Н.В., Хасан Хамад А.</i>	600	1
<input type="checkbox"/>	ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ РИЗОСФЕРНОГО ФИТОСИМБИОНТА <i>METHYLOBACTERIUM NODULANS</i> <i>Кузнецова Т.А., Бесчастный А.П., Понаморёва О.Н., Троценко Ю.А.</i>	606	2
<input type="checkbox"/>	КАТАЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ <i>Гоголева О.А., Немцева Н.В., Бухарин О.В.</i>	612	4
<input type="checkbox"/>	ХАРАКТЕРИСТИКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИОЦИНОВ, ОБРАЗУЕМЫХ <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i> 194-К <i>Устюгова Е.А., Тимофеева А.В., Стоянова Л.Г., Нетрусов А.И., Катруха Г.С.</i>	618	0
<input type="checkbox"/>	ДЕГРАДАЦИЯ ЭДТА И ЕГО КОМПЛЕКСОВ С МЕТАЛЛАМИ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ БАКТЕРИЙ <i>CHELATIVORANS OLIGOTROPHICUS</i> LPM-4 <i>Кувичкина Т.Н., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А., Решетилов А.Н.</i>	626	1
<input type="checkbox"/>	СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> К-4 НА ЭТАНОЛЕ В ПРИСУТСТВИИ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ <i>Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Долотенко Е.Ю.</i>	631	0
<input type="checkbox"/>	ОКИСЛЕНИЕ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ АБОРИГЕННЫМ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО СОЗДАННЫМ СООБЩЕСТВАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ <i>Пивоварова Т.А., Булаев А.Г., Рощупко П.В., Белый А.В., Кондратьева Т.Ф.</i>	640	1
<input type="checkbox"/>	PURIFICATION, CHARACTERISATION AND COAL DEPOLYMERISATION ACTIVITY OF LIGNIN PEROXIDASE FROM <i>LENZITUS BETULINA</i> MTCC-1183 <i>Yadav M., Singh S.K., Yadava S.</i>	646	0
<input type="checkbox"/>	РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОЙ ДЕТЕКЦИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДНОГО АНТИГЕНА И КЛЕТОК ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА <i>Бызова Н.А., Жердев А.В., Ескендинова С.З., Балтин К.К., Унышева Г.Б., Муканов К.К., Раманкулов Е.М., Дзантиев Б.Б.</i>	653	0
<input type="checkbox"/>	ПРОЛОНГИРОВАННОЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ХЛОРАМБУЦИЛА И ЭТОПОЗИДА ИЗ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА <i>Филатова Е.В., Яковлев С.Г., Бонарцев А.П., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Бонарцева Г.А.</i>	662	0
<input type="checkbox"/>	SCANNING ASSAY OF β-GALACTOSIDASE ACTIVITY <i>Li W., Zhao X., Zou S., Ma Y., Zhang K., Zhang M.</i>	668	0

УДК 576.5, 543.9

АНАЛИЗ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА МОДЕЛЯХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК (ОБЗОР)

© 2012 г. К. В. Лисицкая, И. В. Николаев, А. А. Торкова, В. О. Попов, О. В. Королёва

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

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

Поступила в редакцию 19.03.2012 г.

Представлен анализ современных данных по исследованию функциональных свойств биологически активных веществ в модельных системах на основе культивируемых клеток человека. Систематизированы сведения о практическом использовании клеточных культур для оценки различных функциональных свойств биологически активных веществ: антиоксидантных, иммуномодулирующих, про- и пребиотических, химиопротективных. Рассмотрены наиболее перспективные направления использования культивируемых клеток для исследования функциональных свойств, а также трехмерных клеточных моделей.

В последние годы резко возрос интерес к разработке технологий получения биологически активных веществ, способных снижать риск развития заболеваний, сохранять и улучшать здоровье. Развитие этого направления привело к созданию термина “функциональное питание”, которое подразумевает использование биологически активных веществ (БАВ) и композиций, обогащенных биологически активными добавками с целью придания им функциональных свойств (табл. 1).

Одной из центральных проблем применения БАВ является оценка их биологической активности. Клинические исследования и исследования на лабораторных животных высокоинформативны, но являются дорогостоящими и сопряжены с этическими проблемами. Кроме того, различия ряда биохимических реакций у лабораторных животных и человека не позволяют полностью экстраполировать на человека результаты, полученные в экспериментах на животных моделях. В связи с этими, все возрастающую роль в доклинической оценке биологической активности приобретают исследования *in vitro*, в том числе проводимые на культивируемых клетках человека. Использование клеточных моделей имеет ряд преимуществ, так как дает возможность сопоставлять полученные результаты с данными протеомного и геномного анализа; проводить сравнение изменения метаболизма в присутствии и отсутствии БАВ; устранить влияние различных факторов, в том числе пола, возраста, индивидуальных особенностей организма на получаемые результаты оценки биологической активности исследуемых соединений.

Культуральные модели *in vitro* широко распространены для исследования различных характе-

ристик БАВ: цитотоксичности, биодоступности, антиоксидантной, иммуномодулирующей активности и др. Результаты данных исследований нашли отражение в многочисленных работах, посвященных роли отдельных тест-систем в оценке биологической активности.

Цель обзора – суммировать данные различных источников по использованию моделей на основе культивируемых клеток человека для исследования функциональных свойств БАВ и продуктов на их основе.

***In vitro* модели для оценки антиоксидантных свойств БАВ.** Свободнорадикальное окисление (СРО) играет важнейшую роль в развитии различных хронических заболеваний, включая сердечно-сосудистые патологии, сахарный диабет, катаракту, а также опухолевые процессы. Интенсивность СРО в организме модулируется целым рядом антиоксидантов – соединений, которые способны блокировать СРО в концентрациях, сопоставимых с таковыми для окисляемых молекул-мишеней [1]. Антиоксиданты снижают интенсивность СРО важнейших макромолекул клеток – липидов, белков и ДНК, приводящего к их повреждению.

К настоящему времени описано несколько десятков соединений, относящихся к антиоксидантам, объединенных в различные классы. К ним относятся витамины (А, С, Е), макро- и микроэлементы (медь, марганец, цинк, селен, железо), каротиноиды, флавоноиды, нефлавоноидные фенольные соединения и др. [2].

Антиоксиданты характеризуются различными механизмами действия: прямое гашение свободных радикалов, основанное на восстановлении

Таблица 1. Некоторые биологически активные компоненты и их влияние на функции организма человека и профилактику развития заболеваний

Пищевые компоненты	Функциональное свойство	Роль в организме
Лактобактерии, бифидобактерии, олигосахариды	Пре- и пробиотическая активность	Улучшение функций желудочно-кишечного тракта и иммунной системы
Витамин А, С, Е, флавоноиды, каротиноиды, микроэлементы	Антиоксидантные	Защита от окислительного стресса
Витамин С, Е, полифенолы, каротиноиды, кофермент Q10	Антиоксидантные Антигипертензивные	Снижение риска сердечно-сосудистых заболеваний
Витамин С, Е, полифенолы, каротиноиды	Химиопрофилактические	Снижение риска развития онкологических заболеваний
Витамин А, С, D, Е, цинк, селен, аминокислоты, ω -3 полиненасыщенные жирные кислоты	Иммуномодуляторные	Иммуномодулирующая функция

свободных радикалов антиоксидантами, связывание ионов металлов переменных валентностей, катализирующих свободнорадикальные реакции, повышение активности эндогенных антиоксидантных систем. При анализе антиоксидантных свойств необходимо учитывать многообразие механизмов антиоксидантного действия соединений, входящих в их состав.

Исследования антиоксидантной активности интенсифицировались в середине 1990-х годов, когда были разработаны различные *in vitro* методики определения антиоксидантной активности БАВ. В настоящее время существует множество таких методик определения антиоксидантной емкости соединений, при этом центральная роль отводится экспериментам, проводимым *in vitro*.

Несмотря на многообразие методик оценки антиоксидантной активности соединений в культуре клеток, они включают воздействие инициатора СРО и методику оценки активности радикалов в клетке.

В качестве инициаторов радикальных и окислительно-восстановительных процессов в культивируемых клетках используются, как правило, перекись водорода и азо-соединения (например, ААПГ – 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорид), которые при термическом распаде в присутствии кислорода продуцируют пероксильные радикалы.

Оценку антиоксидантных эффектов на культуральных тест-моделях проводят как по активности свободных радикалов непосредственно в культивируемых клетках, так и по окислительному повреждению структур клетки, вызываемому свободными радикалами: накопление продуктов окислительной модификации макромолекул (нуклеиновых кислот, липидов, белков), уровню эндогенных антиоксидантных ферментов и молекул, участвующих в апоптозе, и. т.д.

Для оценки активности СРО непосредственно в культивируемых клетках используются различные флуорохромы: дихлорофлуоресцеин ацетат, родамин, гидроэтидин и др. Использование флуоресцентных красителей для детекции СРО основано на их способности проникать в живые клетки, где под действием клеточных ферментативных систем из нефлуоресцирующих соединений происходит образование флуоресцентных продуктов.

Дихлорофлуоресцеин диацетат (ДХФДА) является наиболее распространенным соединением для детекции свободных радикалов. Он проникает в клетки и аккумулируется в цитозоле, где под действием эстераз клетки деацетируется в дихлорофлуоресцеин (ДХФ) [3]. Свободные радикалы (пероксильный радикал, радикал NO_2 , карбонат-радикал, гидроксил-радикал) конвертируют нефлуоресцентное соединение в флуорохром с пиком флуоресценции около 525 нм при длине волны возбуждающего света 498 нм. Данный метод получил широкое распространение в связи с относительной простотой, достаточно высокой чувствительностью и воспроизводимостью результатов.

Дигидрородамин (ДГР) является флуоресцентным красителем для детекции различных свободных радикалов в клетке (гидроксил-радикал, радикал NO_2 , пероксинитрит), но реагирует в меньшей степени с супероксид-радикалом, пероксидом водорода и монооксидом азота. ДГР окисляется в родамин 123 с пиком флуоресценции около 536 нм при длине волны возбуждающего света 500 нм [3].

Гидроэтидин (ГЭ) после проникновения в клетку окисляется преимущественно супероксид-радикалом в флуоресцентный продукт этидин, который, в свою очередь, интеркалирует в ДНК клеток и флуоресцирует с пиком около 600 нм при длине волны возбуждающего света 500–530 нм.

К недостаткам флуорохрома можно отнести его способность спонтанно окисляться, а также вступать в реакцию с феррицитохромом *c* [3], в связи с чем его применение ограничено.

Луминол и люцигенин используются для детекции продукции свободных радикалов в активированных фагоцитах, но также используются в других типах клеток. В настоящее время использование данных флуорохромов ограничено в связи с их низкой специфичностью [3].

Элисия и Киттс [4] определяли антиоксидантную активность антоцианинов из ежевики на культуре клеток Сасо-2 с использованием ДХФДА. СРО в клетках индуцировали добавлением азонициатора ААПГ. Кроме того, определяли жизнеспособность клеток после воздействия на клетки ААПГ в присутствии или в отсутствии раствора антоцианинов. Было показано, что антоцианины обладают антиоксидантными свойствами, выражающимися в дозо-зависимом снижении ААПГ-индуцированного окисления. Также отмечено цитопротективное действие антоцианинов при ААПГ-индуцированном оксидативном стрессе.

Самаранаяка с соавт. [5] показали защитное действие белкового гидролизата тихоокеанского хека от ААПГ-индуцированного внутриклеточного окисления на культуре клеток Сасо-2 с использованием флуорохрома ДХФДА. Отмечено, что белковый гидролизат значительно снижает интенсивность СРО в клетках по сравнению с таковым уровнем в клетках, инкубированных в отсутствие гидролизата.

Опосредованное действие свободных радикалов на клетки оценивают по образованию различных биомаркеров – продуктов перекисного окисления макромолекул в клетке. Так, свободные радикалы индуцируют перекисное окисление липидов (ПОЛ), приводящее к образованию различных конечных продуктов: малонового диальдегида (МДА), F2-изопростанов, конъюгированных Шиффовых оснований, диеновых конъюгатов [6, 7]. ПОЛ в клетке приводит к нарушению функций клеточной мембраны, инактивации связанных с мембраной рецепторов, повреждению ДНК.

МДА является наиболее изученным продуктом ПОЛ [6]. Он представляет собой альдегид, образующий ковалентные связи с ДНК и обладающий токсичным, мутагенным и атерогенным действием на клетки. МДА является важным маркером уровня перекисного окисления липидов. Отмечено, что его уровень в плазме достоверно повышается при воздействии неблагоприятных факторов – алкоголя и табака [8].

Методика определения МДА основывается на спектрофотометрическом определении продук-

тов его реакции с тиобарбитуровой кислотой. Вместе с тем, взаимодействие тиобарбитурата с МДА неспецифично, и может наблюдаться завышение результатов вследствие его взаимодействия с другими карбонил-содержащими соединениями. Описаны более чувствительные и воспроизводимые методики определения МДА посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в крови и тканях, а также в культивируемых клетках [9].

Методом ВЭЖХ Хванг и Боуэн [10] исследовали антиоксидантный и химиопрофилактический эффекты ликопина и экстракта томатной пасты на культуре клеток рака простаты линии LNCaP. Показано, что при добавлении низких концентраций ликопина достоверно снижается уровень продукта реакции МДА и тиобарбитурата в клетках.

Ши с соавт. [11] исследовали антиоксидантный эффект полифенолов яблок при воздействии окислителя на клетки печени. Было отмечено, что уровень МДА в культуральной среде первичной культуры гепатоцитов мыши значительно превышает таковой при инкубации клеток с полифенолами яблок.

F(2)-изопростаны являются структурно близкими к простагландинам соединениями, образующимися в результате перекисного окисления ахаридоновой кислоты [12]. Имеются данные об уровне F(2)-изопростанов в различных биологических жидкостях: плазме крови, моче, цереброспинальной и бронхоальвеолярной жидкостях. Данные об уровне F(2)-изопростанов в культивируемых клетках немногочисленны и к настоящему времени имеют только исследовательский интерес.

Так, описана методика анализа F(2)-изопростанов методом двумерного электрофореза с последующей масс-спектрометрией, пригодная для культивируемых клеток [13]. Также описана методика определения уровня F(2)-изопростанов в первичной культуре астроцитов мыши с использованием радиоизотопной метки с последующей газовой хроматографией и масс-спектрометрией [13].

Лоук с соавт. [14] определяли уровень F(2)-изопростанов в линии клеток ТНР-1 при ААПГ-индуцированном оксидативном стрессе в норме и при добавлении в культуральную среду антиоксиданта аскорбиновой кислоты. Отмечено, что аскорбиновая кислота снижает уровень гибели клеток и содержание F(2)-изопростанов.

Повреждение молекул ДНК в результате их непосредственного взаимодействия с гидроксильным радикалом играет ключевую роль в гибели клеток, индуцированной активными формами кислорода (АФК). Отмечено, что АФК вызывают необратимые повреждения хроматина, включая

Таблица 2. Изменения в клетках, происходящие при апоптозе, и методы их оценки

Структуры клетки	Характерные изменения	Методики оценки
Клетка	Изменение морфологии клеток	Микроскопия
	Повышение проницаемости мембраны	Окраска клеток красителями (пропидий йодид) Высвобождение аннексина V
Ядро и ДНК	Изменение морфологии ядер	Микроскопия
	Фрагментация ДНК	<i>In situ</i> гибридизация, Гель-электрофорез Флуоресцентные красители
Цитоплазма	Активация белков, участвующих в апоптозе	Активность каспаз и транскляминаз
Митохондрии	Целостность мембраны	Потенциал митохондриальной мембраны Высвобождение цитохрома c
	Метаболическая активность	Активность цитратсинтазы

фрагментацию молекул ДНК, приводящие в апоптозу и некрозу клеток [15].

Методики для выявления фрагментации ДНК в культивируемых клетках при воздействии индукторов СРО многочисленны, и наибольшее распространение среди них нашла нерадиоактивная методика с бромдезоксисуридином (**БрДУ**). Данная методика основана на интеркаляции в ДНК аналога тимидина. Меченые таким образом фрагментированные молекулы ДНК детектируются методом иммуноферментного анализа (**ИФА**) в цитозоле (апоптотическая гибель клеток) и в культуральной среде (некроз клеток).

Миллер с соавт. [16] определяли антиоксидантную активность отваров зеленого чая и *Uncaria guianensis* на культивируемых клетках эпителия желудка человека линии AGS и эпителия кишечника мыши линии IEC-18. Было показано, что отвары достоверно снижают по сравнению с контролем фрагментацию ДНК, меченной БрДУ, индуцированную в клетках линии AGS окислителем пероксинитритом.

Повышение уровня свободных радикалов или снижение активности детоксикационных механизмов в клетке приводит к увеличению клеточного редокс-потенциала и повреждению внутриклеточных макромолекул в результате их окисления, что, в конечном счете, вызывает апоптоз клеток.

Способность пероксида водорода индуцировать апоптоз клеток была показана еще в 1991 г. [17]. Позднее индукция апоптоза свободными радикалами была продемонстрирована на различных типах клеток. К настоящему моменту известны некоторые из путей реализации апоптотических каскадных процессов. Одной из центральных ролей при этом отводят митохондриям, снижение целостности мембран которых приводит к высвобождению цитохрома c и активации эффекторных каспаз [18].

Способность антиоксидантов снижать уровень апоптоза, и, таким образом, риск развития различных заболеваний, была показана на различных клеточных культурах [19]. Методы детекции апоптоза в культивируемых клетках многочисленны и могут быть классифицированы на основании биологического эффекта, вызываемого свободными радикалами в клетке (табл. 2) [20].

Среди методик, основанных на определении морфологии клеток, широкое распространение в *in vitro* исследованиях приобрел метод окрашивания ядер красителем Hoechst 33342, который связывается с конденсированным хроматином апоптотических клеток, в меньшей степени — с хроматином нормальных клеток. Интенсивность окрашивания клеток при этом детектируют по флуоресценции красителя.

По уровню апоптоза клеток Кук с соавт. [21] определяли антиоксидантный эффект кверцетина на клеточной линии RPE пигментного эпителия сетчатки. При окрашивании клеток Hoechst 33342 и МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) показано, что кверцетин снижает оксидативный стресс и гибель клеток, индуцированную пероксидом водорода. Кроме того, отмечено снижение уровня каспазы-3, участвующей в индукции апоптоза.

Целостная митохондриальная мембрана живых клеток обладает электрическим градиентом, генерируемым протонной помпой электронно-транспортной цепи митохондрий и выражающимся в величине потенциала митохондриальной мембраны. Увеличение проницаемости митохондриальной мембраны приводит к высвобождению из митохондрий цитохрома c и активации каспаз, что является одним из главных маркеров клеточной гибели [22].

Оценка потенциала митохондриальной мембраны проводится посредством окрашивания различными флуоресцентными красителями. Катионные флуорохромы в живых клетках за счет разности потенциалов проникают сквозь митохондриальную мембрану, а изменение флуоресценции детектируется на флуориметре [23].

Так, краситель JC-1 является членом цианинового семейства флуорохромов и обладает различными спектрами флуоресценции: мономеры – зеленой, агрегаты – красной. При этом в нормальных клетках происходит накопление красителя в митохондриях с образованием агрегатов, а митохондрии клеток в состоянии апоптоза содержат только мономеры красителя.

Помимо увеличения проницаемости митохондриальных мембран маркером запрограммированной клеточной гибели является повышение экспрессии проапоптотических белков на фоне снижения экспрессии антиапоптотических. Важнейшими регуляторами процесса апоптоза являются каспазы и белки семейства Bcl. Экспрессию проапоптотических белков используют как маркер оксидативного стресса, вызываемого окислителями. Наиболее важными маркерами при этом являются белки семейства Bcl-2, играющие ключевую роль в регуляции апоптоза (Bcl-2, Bax, Bcl-xL), митоген-активированные протеинкиназы (p42/44MAPK, p38MAPK) и другие протеинкиназы (phospho-Chk2), каспазы 2,3,7 и 12.

Чен с соавт. [24] исследовали антиоксидантные свойства куркумина на клеточной линии HepG2 при индукции СРО перекисью водорода. Отмечено, что куркумин снижает интенсивность СРО и экспрессию Bax, Bcl-2, Bcl-xL, и p38MAPK, повышает уровень phospho-p38MAPK, p42/44MAPK и phospho-p42/44MAPK и не оказывает достоверного влияния на митохондриальный потенциал клеток при окрашивании клеток красителем JC-1 и фрагментацию ДНК. В совокупности эти данные свидетельствуют об антиоксидантном и антиапоптотическом действии куркумина.

Гибель клеток приводит к высвобождению в культуральную среду цитозольных белков. Одним из маркеров клеточной гибели является цитозольный фермент лактатдегидрогеназа (ЛДГ), уровень которого в культуральной среде определяется спектрофотометрически широко доступными промышленными наборами [25].

Рубиоло и Вега [26] определяли антиоксидантную активность резвератрола на первичной культуре гепатоцитов крысы. Было показано, что резвератрол достоверно снижает клеточную гибель и выброс ЛДГ в культуральную среду по сравнению с контролем, где использовалось воздействие на клетки гидропероксида.

Эндогенные антиоксидантные ферменты клетки защищают биомолекулы от повреждающего действия свободных радикалов [27]. Так, фермент супероксиддисмутаза превращает супероксиданион кислорода в менее реакционно способный и более гидрофобный пероксид водорода. Каталазы и глутатионзависимые пероксидазы катали-

зируют превращение пероксида водорода в молекулу воды.

Повышение уровня эндогенных антиоксидантных ферментов является одним из важнейших маркеров СРО [28]. При этом важен баланс между скоростью генерации АФК и способностью системы антиоксидантной защиты их эффективно обезвреживать. Генерация ряда АФК протекает с участием прооксидатных ферментов (НАДФ-оксидаза, ксантиноксидаза, индуцибельная NO-синтетаза, миело- и лактопероксидаза и др.) При этом показано, что уровень прооксидантных ферментов повышается в крови пациентов при различных заболеваниях [29].

Мендис с соавт. [30] определяли антиоксидантную активность ферментированного гидролизата желатина из кожи рыб на культивируемых клетках гепатомы человека линии Hep3В. После воздействия на культуру различными концентрациями гидролизата получали клеточные лизаты, в которых определяли активность каталазы, глутатион пероксидазы, супероксиддисмутазы. Показано, что гидролизаты обладают антиоксидантной активностью, выражающейся в повышении уровней активностей ферментов системы антиоксидантной защиты.

Глутатион-S-трансферазы представляют собой семейство изоферментов, играющих важнейшую роль как в метаболизме ксенобиотиков, так в процессе антиоксидантной защиты, катализируя реакцию превращения пероксида водорода в воду. Глутатион-S-трансфераза является одним из маркеров оксидативного стресса. Показано снижение ферментов в образцах крови и тканях при различных заболеваниях [31].

Джанг с соавт. [32] изучали антиоксидантные свойства изокверцитина из растения *Thuja orientalis* при воздействии перекиси водорода на клеточную линию ганглиев сетчатки линии RGC-5. Показано, что изокверцитин снижает уровень глутатиона, каталазы и глутатионпероксидазы-1 в культуральной среде по сравнению с таковой без воздействия изокверцитина.

Супероксид-анион радикал активирует NO-синтазу, которая образует в тканях нитрозил-радикал, обладающий широким спектром биологических эффектов, важнейшим из которых является регуляция сокращения стенок кровеносных сосудов. Нитрозил-радикал является токсичным для клеток и способен индуцировать апоптоз, что продемонстрировано на макрофагах и астроцитах [33].

Уровень нитрозил-радикала является биомаркером СРО в клетке, и определяется по концентрации продуктов его реакции с кислородом и супероксид-радикалом в клетке – нитритов и нитратов. Разработан целый ряд методов для

Таблица 3. Некоторые клеточные модели для оценки антиоксидантного действия биологически активных соединений

Клеточная модель	Оцениваемый параметр	Источник	Антиоксидант	Источник
Сасо-2 рак кишечника	Ингибирование СРО	Красные апельсины	Фенольные соединения, вит. С, антоцианины	[81]
MRC5 фибробласты человека	Снижение оксидативно- го повреждения ДНК	—	Ресвератрол	[82]
3Т3 (NIH) мышинные эмбриональные фибробласты	Снижение уровня апоптоза клеток при воздействии индукторов СРО	Экстракт <i>Spirulina platensis</i>	Фикоцианин, β-каротин, то- коферол, γ-линоленовая кис- лота, фенольные соединения	[83]
HPF-1 фибробласты человека	Снижение уровня апоптоза клеток при воздействии индукторов СРО	Экстракт чая пу-эр	Полифенолы	[84]
MCF-7 рак молочной железы	Снижение уровня апоптоза клеток при воздействии индукторов СРО	Экстракт черного тмина <i>N. sativa</i> L.	Не идентифицированы	[85]

определения уровня нитритов и нитратов, включая колориметрический (реакция Грисса), хроматографический (ВЭЖХ) и флуоресцентный анализы. Среди них наибольшее распространение нашла реакция Грисса, которая позволяет определять концентрацию нитрита в различных биологических жидкостях, клеточных экстрактах и культуральной среде [34].

Эгучи с соавт. [35] проводили оценку антиоксидантной активности экстрактов моркови, имбиря, лука и чеснока на культивируемых клетках линии RAW264.7 по продукции оксида азота, индуцированной липополисахаридом и гамма-интерфероном. Показано, что многие БАВ обладают ингибиторным действием на продукцию нитрита в клетках, причем экстракт моркови обладал дозозависимым эффектом. Авторы заключают, что данная методика является удобной модельной системой для оценки антиоксидантного эффекта композиций, содержащих БАВ.

Некоторые культуральные тест-системы и методы оценки СРО в культуре приведены в табл. 3.

В заключение раздела необходимо сказать, что использование культуральных тест-систем является весьма перспективной областью и в настоящее время широко используется для оценки антиоксидантных свойств БАВ. Вместе с тем, результаты, получаемые на культуральных тест-системах, необходимо интерпретировать с осторожностью и в сочетании с данными, полученными в результате проведения других *in vivo* и *in vitro* исследований, что обусловлено различными причинами.

Во-первых, рост клеток в культуре сопровождается повышением оксидативного стресса. Так, описано, что так называемый “предел Хейфлика” для фибробластов в значительной степени обу-

словлен повышением интенсивности оксидативного стресса в культуре [36]. Наряду с этим, в ряде работ отмечено, что культивируемые клетки могут подавлять генерацию свободных радикалов в среде [3].

Во-вторых, клетки культивируют в среде, которая может оказывать собственное действие как на биохимические процессы в клетке, так и на исследуемое вещество. Так, многие авторы отмечают, что исследование антиоксидантного эффекта аскорбиновой кислоты и полифенолов (например, флавоноидов) может приводить к артефактам в результате окисления данных соединений в культуральной среде [37]. Кроме того, в культуральных средах DMEM, McCoy’s 5A и RPMI-1640 показано образование пероксида водорода при добавлении в них флавоноидов, галловой кислоты, катехинов, кверцетина [37].

В-третьих, к настоящему моменту не существует идеального маркера СРО в клетках. Методики оценки антиоксидантных свойств соединений на культивируемых клетках многочисленны и при выборе конкретной методики в каждом отдельном случае необходимо учитывать механизм антиоксидантного действия исследуемых соединений и ограничения используемого метода. Кроме того, необходимо принимать во внимание, что многие БАВ, включая и те, что обладают функциональными свойствами, подвергаются гидролизу в ЖКТ и метаболизму под действием печеночных ферментов, таким образом, могут изменяться их биологические свойства.

В обзоре Лотито и Фрай [38] отмечается, что биодоступность наиболее интенсивно изучаемой группы антиоксидантов – флавоноидов из растительных источников – достаточно низкая, так же как и их концентрация в крови после добавления в диету богатой флавоноидами пищи. Кроме того,

большинство флавоноидов подвергается интенсивному метаболизму под действием микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), что может значительно изменять их антиоксидантные свойства [38]. Таким образом, важным этапом изучения свойств БАВ в качестве потенциальных компонентов функциональных пищевых продуктов является определение их биодоступности и модификации свойств при переваривании в ЖКТ и метаболизме.

Кроме того, зачастую БАВ при употреблении внутрь попадают в кровь в достаточно малых концентрациях. Так, показано, что биодоступность антиоксиданта куркумина в ЖКТ человека достаточно низкая, а после приема внутрь в плазме крови детектируется не само соединение, а его метаболиты – глюкурониды и сульфаты куркумина, которые обладают более низкой противовоспалительной активностью, а также неактивный метаболит гексагидрокурукумин [39, 40]. Кроме того, показано, что куркумин не детектируется в крови при приеме доз ниже 4 г в сутки. При этом концентрация его метаболитов через час после приема внутрь 3.6 г составила всего 10 нМоль/л [41].

Подводя итоги вышесказанному, необходимо отметить, что использование культуральных моделей для оценки БАВ может предоставлять большой объем информации об их биологическом действии непосредственно на клетки млекопитающих и человека, но результаты данных исследований должны быть интерпретированы в совокупности с другими методами оценки антиоксидантной активности.

Иммуномодулирующая активность. Важнейшую роль в поддержании здоровья организма играет нормальное функционирование иммунной системы. Это становится особенно очевидным в последние два десятилетия, когда в развитых и развивающихся странах отмечается все возрастающее количество иммуно-опосредованных заболеваний, таких как рассеянный склероз, диабет 1 типа, различные аллергические заболевания [42]. Эти изменения обусловлены, в первую очередь, негенетическими факторами, такими как неблагоприятные изменения в окружающей среде и диете, а также побочными эффектами медикаментозной терапии.

В то же время, рост распространенности таких патологий, как астма и аллергические заболевания, в последнее время связывают с резким снижением контактов человека с микроорганизмами, что ведет к неполноценности иммунной системы человека [42]. В связи с этим все большее внимание привлекают биологически активные компоненты, корректирующие состав микрофлоры кишечника (про- и пребиотики) и нарушения

в иммунном статусе, обладающие мягким воздействием и способные к неспецифической защите организма.

Данная концепция привела к появлению термина “иммунопитание” (“immunonutrition”), обозначающего специфические компоненты пищи, обладающие иммуномодуляторным действием, например, специфические аминокислоты (аргинин, глутамин), витамины А, С, D, Е, металлы (цинк, селен), нуклеотиды, ω -3 полиненасыщенные жирные кислоты и полисахариды [42].

Иммуномодулирующие компоненты могут влиять как на врожденный, так и на приобретенный иммунитет. Врожденный иммунитет обеспечивается функционированием фагоцитарных (нейтрофилы, макрофаги), воспалительных (базофилы, тучные клетки), дендритных клеток и естественных киллеров (NK-клетки), барьерной резистентностью кожи и слизистых оболочек, а также синтезом многообразных про- и противовоспалительных цитокинов, факторов комплемента и белков острой фазы.

Приобретенный иммунитет выражается в пролиферации различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток – Т- и В-лимфоцитов, обеспечивающих клеточный иммунный ответ [43]. В настоящее время отмечена иммуномодулирующая активность у различных БАВ и микроорганизмов, входящих в состав пищевых продуктов. Так, иммуномодулирующая активность была показана для коровьего β -лактоглобулина и α -лактальбумина, входящих в состав коровьего молока, выражающаяся в стимуляции синтеза *de novo* IL-1Ra нейтрофилами человека и высвобождении некоторых других противовоспалительных молекул [44]. Целая группа иммуномодулирующих белков описана в грибах (иммуномодулирующие грибные белки – ИГБ), включая *Flammulina velutipes*, *Volvariella volvacea* и др. Кроме того, показан иммуномодулирующий эффект различных β -глюканов, выделенных из бактерий, грибов, морских водорослей и хлебных злаков, вероятно, в результате их воздействия на макрофаги и NK-клетки [42].

Для анализа иммуномодулирующей активности используются многообразные *in vivo* и *in vitro* модели, включая лабораторных животных и культивируемые клетки человека и млекопитающих.

Для тестирования иммуномодулирующей активности широко используют *in vivo* модели – иммунизированных лабораторных мышей, которым в рацион вводят тестируемые БАВ. От животных получают культуру спленоцитов для оценки уровня продукции специфических антител (реагиновые антитела IgE-изотипа) и цитокинов [45].

Таблица 4. Наиболее распространенные *in vitro* модели для оценки иммуномодулирующей активности, использующие культивируемые клетки

Клеточная линия	Биологически активные соединения/композиции	Метод оценки	Источник
RAW264.7	Диоскорин из ямса (<i>Dioscorea alata</i> L.)	Генерация оксида азота, синтез ИЛ-6, ИЛ-1 β и ФНО- α	[86]
THP-1	Полисахариды из грибов <i>Agaricus bisporus</i> и <i>A. brasiliensis</i>	Продукция ИЛ-1 β , ФНО- α , циклооксигеназы-2	[87]
U937	Бычий гликомакропептид	Пролиферация клеток, фагоцитарная активность	[88]
HL-60	Тимопентин (пептид из 5 а.о.)	Ингибирование пролиферации клеток	[89]
J774A.1	Экстракт прополиса и его флавоны (кризин, галангин, кемпферол, кверцетин)	Экспрессия мРНК ИЛ-1 β , индуцибельной NO-синтазы (iNOS), продукция оксида азота	[90]
JURKAT E6-1	Кампестерол (стерол растительного происхождения)	Продукция ИЛ-2, 4, 10, ИФН- γ	[91]
HEK293	Бактериальные и синтетические олигонуклеотиды	Экспрессия рецептора TLR9	[92]
Mono Mac 6	Фракция с массой более 20 кДа из натурального меда	Продукция ИЛ-6	[93]

Таблица 5. Методики определения иммуномодулирующей активности *in vitro* на культивируемых клетках

Оцениваемый параметр	Метод	Методика определения
Оценка пролиферативного ответа	БрдУ	Определение количества пролиферирующих клеток методом ИФА по инкорпорации дромдезоксигуанидина в ДНК
	МТТ, ХТТ	Определение количества метаболически активных клеток по метаболизму растворимых солей формазана в клетке
	CFSE	Пролиферация Т-хелперов (CD4+ cells) методом проточной цитометрии
Дифференцировка клеток и цитокиновый ответ	ELISPOT	Распознавание и подсчет антиген-специфических Т-лимфоцитов (Th1, Th2) методом проточной цитометрии
	ICS	Выявление цитокин-продуцирующих клеток методом проточной цитометрии
	ИФА (ELISA)	Определение уровня про- и противовоспалительных цитокинов в культуральной жидкости
	СВА (Cytometric Bead Array)	Определение экспрессии цитокинов (ИФН- γ /ИЛ-2/ИЛ-4/ИЛ-5/ИЛ-10/ФНО- α) методом проточной цитометрии

Традиционными *in vitro* моделями для тестирования иммуномодулирующих свойств являются одноклеточные макрофаги периферической крови, выделенные из крови человека и млекопитающих [46]. Из периферической крови получают одноклеточные клетки, которые культивируют в присутствии исследуемого вещества. Параметры, по которым оценивают иммуномодулирующий эффект, включают продукцию цитокинов, а также активацию различных иммунокомпетентных клеток — естественных киллеров (CD56+), Т-лимфоцитов (CD3+), цитотоксических Т-клеток (CD8+) и CD4+ Т-клеток. Активацию регуляторных Т-лимфоцитов (Treg) определяют по внутриклеточному содержанию белка Foxp3, являющегося

маркером клеток с данным типом дифференцировки.

Для оценки иммуномодуляторной активности разработаны многочисленные культуральные модели, использующие культивируемые макрофаги и лимфоциты человека и мыши, как правило, опухолевого происхождения (табл. 4).

Иммуномодуляторная активность, изучаемая на *in vitro* клеточных моделях, базируется на оценке пролиферативного и метаболического ответа клеток иммунной системы и экспрессии цитокинов (табл. 5). Пролиферативный ответ оценивают как прямым подсчетом клеток в гемоцитометре, так и посредством наборов, определяющих количество метаболически активных клеток (тесты с МТТ (3-

(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) или ХТТ (внутренняя соль 2,3-бис(2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-2*H*-тетразолий-5-карбоксамид)) и интенсивности синтеза ДНК в клетках и др. Активацию иммунных клеток оценивают по экспрессии цитокинов: интерлейкинов (ИЛ-1 β , 6, 8, 10), ФНО- α , а также синтезу оксида азота.

Уровень экспрессии различных цитокинов играет ключевую роль в развитии иммунных реакций. Так, ИЛ-1 β участвует в воспалительных реакциях, врожденном иммунитете, иммуномодуляции; ИЛ-6 играет ключевую роль в иммунном ответе, в том числе, синтезе белков острой фазы, поддержании гомеостаза, и действует как про- и противовоспалительный цитокин. ИЛ-12 является фактором, стимулирующим созревание наивных Т-лимфоцитов в Т-хелперы, а также индуцирует продукцию гамма-интерферонов (ИФН- γ), фактора некроза опухолей- α (ФНО- α) из Т-лимфоцитов и НК-клеток.

Моноцитами, макрофагами и нейтрофилами генерируется оксид азота, который имеет ключевое значение при иммунном ответе. Различные изоформы NO-синтазы катализируют образование оксида азота, активируемое липополисахаридами и различными цитокинами Т-хелперов, включая ИФН- γ и ФНО- α . Снижение индуцируемой липополисахаридами продукции NO в культуральной среде клеток под действием исследуемых БАВ, определяется с использованием реагента Грисса и является маркером иммуномодулирующего действия [47].

Линия клеток RAW264.7 макрофагов крысы является удобной моделью для оценки иммунного ответа. С использованием данной модели Лиу с соавт. [48] было показано, что экзополисахариды некоторых штаммов пробиотических бактерий *Lactobacillus* обладают иммуномодулирующим эффектом, выражающимся в дозо-зависимом повышении экспрессии цитокинов ИЛ-6, ФНО- α и ИЛ-1 β .

В заключение раздела необходимо отметить, что, несмотря на то, что использование культуральных тест-систем для оценки иммуномодулирующего действия БАВ играет лишь второстепенную роль, их применение представляется весьма перспективным, поскольку они позволяют выявлять действие на отдельные пути иммунного ответа, например, на синтез отдельных цитокинов. Несмотря на это, анализ результатов данных исследований необходимо проводить во взаимосвязи с результатами исследований *in vivo*, поскольку иммунный ответ представляет собой сложный многокомпонентный процесс, обеспечиваемый функционированием разнообразных иммунокомпетентных клеток с вовлечением целого кас-

када цитокинов с обратными связями, не сводящийся только к активации или подавлению синтеза различных субпопуляций лимфоцитов.

Оценка пре- и пробиотической активности. В связи с высокой распространенностью воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в последнее десятилетие особое внимание исследователей привлекают про- и пребиотики. Пробиотики (лактобактерии, бифидобактерии) и пребиотики (олигосахариды) активно используются для создания продуктов, имеющих направленное благотворное действие на пищеварительную систему и снижающих частоту воспалительных желудочно-кишечных заболеваний.

Согласно ВОЗ, термин “пробиотик” определяет “живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах оказывают положительное влияние на здоровье организма хозяина”. Основные регулирующие руководящие принципы для тестирования пробиотической активности были разработаны ВОЗ в 2002 г. Согласно им, пробиотик должен быть устойчивым к воздействию желудочного сока и желчных кислот, адгезироваться к слизи и/или эпителиальным клеткам человека и ингибировать рост и колонизацию болезнетворными микроорганизмами [49].

Изучение одного из главных свойств пробиотиков – устойчивость к воздействию желудочного сока и желчных кислот, проводят на разнообразных *in vitro* моделях. Такие *in vitro* модели позволяют проводить оценку устойчивости бактерий к действию соляной кислоты желудка и желчных кислот в условиях, имитирующих желудочное содержимое (рН 1–3, длительная инкубация до 3 ч, инкубация с пепсином) или содержимое тонкой кишки (рН 7, инкубация с панкреатином, тауродезоксихолевой кислотой) [50].

Несмотря на широкое использование, *in vitro* модели кишечника имеют и несомненные недостатки, в том числе, невозможность моделировать разнообразные биологические реакции в ходе переваривания питательных веществ [51]. Развитие культуральных моделей кишечника позволило преодолеть некоторые из ограничений *in vitro* моделей и позволило расширить возможности *in vitro* исследований про- и пребиотиков.

Типичные культуральные *in vitro* модели представляют собой культивируемые клетки эпителия кишечника, чаще всего, опухолевого происхождения. Наиболее частыми *in vitro* моделями являются культуральные клеточные модели, использующие линии эпителиальных клеток кишечника человека Caco-2, HT-29, HT29-MTX и свиньи I-407, IPES-J2 (табл. 6) [49]. Они позволяют определять такие важнейшие характеристики новых потенциальных пробиотиков, как адгезию и колонизацию,

Таблица 6. Основные свойства пробиотиков и некоторые *in vivo* и *in vitro* модели для их оценки

Свойство пробиотика	Модель		Оцениваемый параметр	Источник
Устойчивость к действию кислот	<i>in vitro</i>		Количество жизнеспособных клеток после инкубации при кислых и щелочных значениях pH, с пепсином и панкреатином с желчными кислотами	[94]
Адгезия и колонизация	<i>in vivo</i>	Гнотобиотические свиньи	Колонизация кишечника <i>E. coli</i> после предварительной колонизации <i>Lactobacillus</i>	[95]
	<i>in vitro</i>	Сасо-2 (линия аденокарциномы кишечника человека)	Количество адгезировавшихся бактерий после инкубации с исследуемыми штаммами <i>Lactobacillus</i> и последующей отмывки	[96]
Подавление роста патогенной микрофлоры	<i>in vitro</i>		Ингибирование суспензией роста <i>H. pylori</i> при культивировании на агаризованной среде	[97]
	<i>in vitro</i>	C2BBe1 (линия аденокарциномы кишечника человека)	Ингибирование адгезии <i>E. coli</i> на клетках после преинкубации с штаммами <i>Lactobacillus</i>	[98]
Иммуномодуляторные	<i>in vivo</i>	Лабораторные мыши, в рацион которых вводили <i>Lactobacillus</i> из ферментированной растительной пищи	Увеличение популяции Т- и В-лимфоцитов, продукция цитокинов	[99]
	<i>in vitro</i>	Мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК) от больных с аллергией на пыльцу	Снижение продукции ИЛ-12, ИФН- γ , ФНО- α при инкубации клеток с штаммами <i>Lactobacillus</i>	[100]
	<i>in vitro</i>	RAW264.7	Ингибирование штаммами <i>Lactobacillus</i> экспрессии ИЛ-6 в клетках после стимуляции липополисахаридом	[101]

подавление роста патогенной микрофлоры, а также иммуномодуляторную активность.

Адгезия к слизи, гликопротеинам и эпителиальным клеткам, а также колонизация в ЖКТ хозяина является основополагающими характеристиками микроорганизмов, обладающих пробиотическими свойствами. *In vivo* оценку адгезии и колонизации проводят на гнотобиотических лабораторных крысах и свиньях. Животным добавляют в рацион исследуемые штаммы бактерий и оценивают колонизацию различных отделов кишки [52].

Адгезию бактерий в клеточной модели оценивают по стандартной методике, включающей культивирование клеток в культуральной среде, содержащей известное количество колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизма (как правило, около 1–2 ч), с последующей аспирацией среды и отмывкой клеток от неадгезированных бактерий и подсчетом адгезировавшихся на клетках микроорганизмов по отношению к первоначальной численности микроорганизмов. В качестве положительного контроля адгезии, как правило, используют штаммы *E. coli*, связывание которых с эпителиальными клетками достигает значения 50%.

Мараккоудакиза с соавт. [50] определяли адгезивные свойства различных штаммов пробиотических лактобактерий из молочных продуктов к клеткам Сасо-2. Была показана высокая адгезивная способность некоторых штаммов, в том числе *L. plantarum* ACA-DC 146, достигающая 25.5%, в то время как адгезия штамма *E. coli* TG-1 составила 48.3% [50].

Важным свойством пробиотических бактерий является ингибирование роста патогенных микроорганизмов. Методика оценки ингибирования роста штамма в культивируемых клетках эпителия кишечника, среди которых наибольшее распространение имеет Сасо-2, включает предварительную инкубацию клеток с исследуемым штаммом, их отмывку и последующую инкубацию со штаммом патогенного микроорганизма (*E. coli*, *S. typhimurium*, *H. pylori* и др.). Подсчет количества адгезировавшихся патогенов оценивают по сравнению с контролем – клетками, не инкубированными с исследуемыми пробиотическими микроорганизмами.

Лиин с соавт. [53] определяли бактерицидное действие на *Helicobacter pylori* десяти штаммов лактобактерий, выделенных из различных пищевых продуктов, на культуре клеток желудочного

Таблица 7. Классы пребиотиков и их эффекты

Пребиотик	Доказанный эффект	Источник
Олигосахариды		
Фруктоолигосахариды (ФОС) Фруктоолигосахариды Олигофруктоза Инулин	Бифидогенность Подавление патогенной флоры	[102]
Галактоолигосахариды	Бифидогенность Подавление патогенной флоры	[103]
Олигосахариды сои	Бифидогенность	[104]
Олигосахариды неусвояемые, но ферментируемые в кишечнике Лактулоза	Бифидогенность Подавление патогенной флоры	[105]
Олигосахариды неусвояемые, но ферментируемые в кишечнике Лактосукроза Глюкоолигосахариды Ксилоолигосахариды Изомальтоолигосахариды Мальтоолигосахариды Циклодекстрины	Бифидогенность Бифидогенность Бифидогенность Бифидогенность Подавление патогенной флоры Бифидогенность	
Хитоолигосахариды	Антимикробный	
Полисахариды		
Крахмал, гемицеллюлоза, пектины	Бифидогенность	[106]

эпителия линии AGS [53]. Антагонистическую активность супернатанта культуры лактобактерий определяли по содержанию органических кислот методом HPLC. Кроме того, бактерицидную активность супернатанта на клеточной линии AGS определяли по снижению адгезии *H. pylori* на клетках. Авторами показано, что органические кислоты, выделяемые некоторыми штаммами лактобактерий, обладают ингибирующим действием на адгезию *H. pylori* к клеткам эпителия желудка.

Способность пребиотиков снижать проницаемость эпителия кишечника для патогенных микроорганизмов легла в основу разработанного Клинбергом с соавт. [54] метода для оценки пробиотической активности. Данный метод основывается на измерении трансэпителиального сопротивления (ТЭС) поляризованного монослоя клеток Caco-2 после воздействия пребиотика. Авторами было отмечено, что штаммы *Lactobacillus plantarum* MF1298 и *Lactobacillus salivarius* DC5 вызывают наибольшее повышение значения ТЭС, в то время как патоген *L. monocytogenes* снижает данную величину. Таким образом, измерение ТЭС может быть удобным методом оценки способности пребиотика повышать межклеточные контакты, предотвращающие проникновение патогенов в кровеносное русло [54].

В настоящее время известно, что пробиотические микроорганизмы обладают иммуномодулирующим действием, обеспечиваемым различными механизмами [49]. Пробиотические микроорганизмы методом трансцитоза проникают через кишечный эпителий и захватываются макрофагами и дендритными клетками, вызывая индукцию иммунного ответа и секрецию различных цитокинов, включая IL-10, 12 и ФНО- α . Способствуют развитию гуморального иммунитета хозяина.

Оценку иммуномодулирующего эффекта пребиотиков проводят с использованием как *in vivo*, так и *in vitro* моделей. Так, Матсумото с соавт. показали, что некоторые штаммы *Lactobacillus* ингибируют липополисахарид-индуцированную экспрессию ИЛ-6 в клеточной линии RAW264.7 [55].

Термин “пребиотик” характеризует БАВ, которые вызывают специфические изменения в составе и/или активности желудочно-кишечной микрофлоры, что оказывает благотворное влияние на самочувствие и здоровье хозяина [56]. На основании данного определения пробиотическим, или бифидогенным, действием может обладать БАВ со следующими свойствами.

1) Неусвояемость в ЖКТ: отсутствие изменений в структуре соединения под действием желудочного сока и ферментов ЖКТ. Для оценки данных свойств используются как *in vitro*, так и *in vivo*

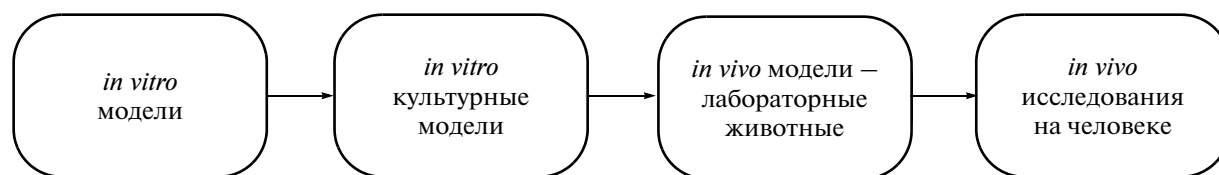


Рис. 1. Стратегия исследований про- и пребиотической активности БАВ.

модели, включая крыс после антибиотикотерапии, проктоколэктомии, илеостомии для выявления непереваренных пребиотиков в кале, дистальном отделе подвздошной кишки или содержанием тонкой кишки, соответственно [49].

2) Ферментация под действием кишечной микрофлоры. Для оценки данной характеристики используются *in vitro* модели, в которых под действием бактерий происходит ферментирование исследуемого углевода, и *in vivo* модели — лабораторные крысы, в кишечник которых заселяют микрофлору, по составу приближенную к микрофлоре кишечника человека. Пребиотик в составе питья или корма добавляют в рацион питания лабораторных животных, а получаемое кишечное содержимое и кал исследуют на состав микрофлоры [49].

3) Селективная стимуляция роста и активности кишечных бактерий. Данные параметры достаточно сложно оценить в *in vitro* экспериментах, поскольку состав кишечной микрофлоры характеризуется сложностью и вариациями в течение времени. Наилучшей *in vitro* моделью для оценки данных параметров является количественный подсчет бактерий в образце фекалий до и после кормления пребиотиком. Основные классы пребиотиков и их доказанные свойства суммированы в табл. 7.

Оценка пребиотического действия БАВ на *in vitro* клеточных моделях имеет к настоящему времени лишь фундаментальное значение для изучения механизмов антиадгезивной, ингибирующей рост бактерий и иммуномодулирующей активности пребиотиков и является перспективным направлением для дальнейшего развития.

Шоав с соавт. [57] исследовали способность коммерчески доступных пребиотиков к ингибированию связывания энтеропатогенных штаммов *E. coli* на двух клеточных моделях. Связывание *E. coli* с рецепторами на клетках HEp-2 и Caco-2 в присутствии фруктоолигосахаридов, инулина, галактоолигосахаридов (ГОС), лактулозы и раффинозы оценивали методом подсчета колоний при микроскопии. Было отмечено, что ГОС обладают наиболее выраженным дозо зависимым ингибирующим эффектом на связывание *E. coli* с клетками HEp-2 и Caco-2, снижая взаимодействие бак-

терий на 65 и 70%, соответственно. Кроме того, показано выраженное снижение количества бактерий в колониях (с 14 до 4 на колонию). Таким образом, было предположено, что модуляция роста и активности кишечной микрофлоры, оказываемые пребиотиками, вероятно, связаны с их антиадгезивной активностью и их способностью к конкурентному взаимодействию с сайтами связывания патогенов на поверхности эпителиальных клеток кишечника.

К настоящему времени отмечено, что пребиотики играют важнейшую роль в снижении воспалительных реакций ЖКТ. Этот иммуномодулирующий эффект, вероятно, имеет бактериальное происхождение. Существуют, однако, предположения, что этот эффект может быть реализован непосредственно олигосахаридами.

Ценхом с соавт. [58] исследовали противовоспалительный эффект двух олигосахаридов (α 3-сиаиллактозы и ФОС), обладающих пребиотическим действием, на клеточной модели Caco-2. Противовоспалительный эффект определяли по уровню экспрессии генов белков PGlyRP3 и PPAR γ , интерлейкинов и ядерного фактора NF- κ B в культивируемых клетках. Отмечено, что данные олигосахариды имеют противовоспалительный эффект, выражающийся в снижении синтеза белка IL-12 и экспрессии генов, кодирующих IL-12p35, IL-8, ФНО- α и NF- κ B. Данные олигосахариды также индуцируют продукцию PGlyRP3 и PPAR.

Таким образом, несмотря на активное совершенствование *in vitro* моделей, к настоящему времени не представляется возможным полностью заменить *in vivo* исследования потенциальных про- и пребиотиков на исследования *in vitro*. Исследования на лабораторных животных остаются альтернативой исследованиям на человеке. Тем не менее, остается дискуссионным вопрос об экстраполяции результатов исследований, полученных на лабораторных животных, на человека из-за физиологических различий метаболизма животных и человека. В то же время, проведение исследований на человеке ограничено социальными и этическими аспектами, и, как правило, включает только копрологический анализ.

Исследование функциональных свойств про- и пребиотиков должно включать комбинацию *in*

Таблица 8. Некоторые культуральные модели для оценки химиопрофилактического действия биологически активных веществ

Заболевание	Клеточные модели	Химиопрофилактическое соединение	Механизм действия и некоторые молекулярные мишени	Источник
Рак печени	HepG2	Фукоксантин	Активация апоптоза, антипролиферативный эффект ↑p53, ↑Bax, ↓Bcl-2, ↓COX-2, ↓STAT1,3,5 ↓AKT, ↓CyclinD1	[107]
Рак молочной железы	MCF-7 AMCF-7/TH	Фитоэстрогены	Активация апоптоза, антипролиферативный эффект ↑p53, ↓COX-2, ↓Bcl-2, ↓CyclinE, ↓IL-1,6,8, ↑Caspases	[108]
Рак кишечника	HT-29 HCT116 SW480	Фронданол А5 из <i>Cucumaria frondosa</i>	Активация апоптоза, антипролиферативный эффект ↓Cdc25c, ↑p21, фосфорилирование H2AX	[109]
Рак легкого	A549 H1299 NCI-H209	Апигенин	Ингибирование ангиогенеза ↓AKT, ↓p70S6K1, ↓VEGF	[110]
Миелоидная лейкемия	HL-60	Кверцетин	Активация апоптоза ↑Bax, фосфорилирование Bcl-2, фрагментация ДНК	[67]

in vitro и *in vivo* методик, каждая из которых позволяет получать определенные результаты и, при совместном использовании, позволяет всесторонне изучить биологические характеристики исследуемого объекта. Схематически стратегия данного анализа представлена на рис. 1.

Химиопрофилактические свойства. Опухолевые заболевания в структуре смертности в развитых странах занимают 3 место после ишемической болезни сердца и цереброваскулярных заболеваний. По данным статистики РФ за 2010 г., смертность от злокачественных новообразований составляет 14.4% от всех причин. В связи с этим поиск новых методов профилактики онкозаболеваний приобретает важное медико-социальное значение [59].

Под химиопрофилактическим действием (англ. “chemoprevention”) понимают использование натуральных или синтетических соединений для замедления или остановки процесса канцерогенеза до того, как опухолевые клетки инвазируют окружающие ткани и/или дадут метастазы в отдаленные органы [59]. Химиопрофилактические соединения предотвращают трансформацию клеток в опухолевые за счет остановки молекулярных каскадов, которые, в конечном счете, активируют канцерогенез. Эффект химиопрофилактических агентов на опухолевые клетки или клетки в предопухолевом состоянии включает супрессию трансформации и пролиферации, а также индукцию апоптоза клеток [60].

По данным Долла и Пето, в среднем, 35% всех смертей от опухолевых заболеваний ассоциировано с алиментарными факторами [61]. Эпидемиологические исследования, показывающие снижение риска развития различных онкологических заболеваний при употреблении в пищу некоторых фруктов и овощей, способствовали активному изучению входящих в них химиопрофилактических соединений. К настоящему времени различные химиопрофилактические соединения и их молекулярные мишени установлены для пищевых ингредиентов и лекарственных растений [62]. Национальным институтом злокачественных новообразований США (National Cancer Institute) отмечено около 35 растений, употребляемых в пищу, которые содержат БАВ с химиопрофилактическим действием: чеснок, соевые бобы, имбирь, лук, томаты, брюссельская капуста и др. [63].

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый за последние десятилетия в изучении химиопрофилактических соединений, поиск новых БАВ остается весьма актуальным. Химиопрофилактические агенты должны удовлетворять следующим требованиям: низкая токсичность для нормальных клеток; высокая эффективность действия против различных опухолевых клеток; пригодность для приема внутрь; известный механизм действия; низкая стоимость; признание широкими массами людей [64].

Механизм действия некоторых соединений уже открыт, других – продолжает активно изучаться. Уже известно, что химиопрофилактические

ский эффект является результатом аддитивного действия множества различных молекулярных процессов: снижения СРО, противовоспалительной активности, подавления пролиферации и индукции апоптоза и др. (табл. 8).

Для исследования новых химиопрофилактических агентов проводят анализ эпидемиологических данных и эксперименты на лабораторных животных. Однако, поиск и характеристика молекулярных мишеней химиопрофилактических соединений неразрывно связаны с развитием клеточных *in vitro* моделей. Применение моделей культивируемых опухолевых клеток позволяет не только оценивать эффективность и токсичность БАВ, но и определять молекулярные каскады их биологического действия (табл. 8).

Различные культивируемые клетки опухолевого происхождения используются для определения химиопрофилактических свойств, среди которых наибольшее распространение получила линия клеток НерG2 [65]. Выбор данной клеточной модели определяется тем, что метаболизм поступающих с пищей ксенобиотиков происходит в гепатоцитах. Линия клеток НерG2, имеющая печеночное происхождение, сохраняет многие характеристики гепатоцитов, включая индукцию ферментов фаз I и II и метаболизм ксенобиотиков [66]. Таким образом, данная модель позволяет оценивать не только эффекты различных соединений на клетки, но и оценивать происходящие с ними изменения в ходе метаболизма печеночными клетками.

В связи с различными молекулярными мишенями и механизмами действия химиопрофилактических соединений на клетки методики оценки биологических свойств на культуральных моделях многочисленны. Химиопрофилактическое действие изучают на уровне клеток (подавление пролиферации, индукция апоптоза, арест клеточного цикла), белков (экспрессия противовоспалительных, проапоптотических белков, белков клеточного цикла и репарации ДНК) и нуклеиновых кислот (изменение экспрессии генов). Примеры использования культуральных тест-систем для оценки химиопрофилактического действия пищевых компонентов представлены в табл. 8.

Так, для кверцетина, флавонола из различных растительных источников, показано химиопрофилактическое действие на различных клеточных моделях — линиях рака кишечника (HT-29, SW480), молочной железы (MCF-9), предстательной железы (LNCaP, PC-3), легкого (A549, H1299). Показано, что кверцетин повышает экспрессию и в клетках проапоптотических белков и белков клеточного цикла (Вах, p53, p21, p27), снижает экспрессию антиапоптотических белков

(Bcl-2), что, в конечном итоге, приводит к аресту клеточного цикла, инициации апоптоза, ингибированию пролиферации клеток [67].

В целом, тест-системам, использующим культивируемые опухолевые клетки человека, принадлежит ключевая роль в оценке на доклиническом этапе новых потенциальных химиопрофилактических соединений. Показано, что многие из экспериментов *in vitro* подтверждаются в дальнейших клинических испытаниях. Так, Вольтер с соавт. [68] исследовали химиопрофилактическое действие резвератрола на культуре клеток аденокарциномы кишечника человека линии Сасо-2. Было показано, что резвератрол характеризуется дозо-зависимым ингибирующим эффектом на рост опухолевых клеток. Данные исследования согласуются с данными Шнайдер с соавт. [69] на мышцах линии Min, генетически предрасположенных к развитию опухолей кишечника за счет наличия мутации в гене Арс. При введении мышам в рацион этанольного экстракта резвератрола в течение семи недель было показано, что у опытной группы по сравнению с контрольной на 70% снижается риск возникновения опухолей кишечника.

Таким образом, исследования, проводимые на культивируемых клетках, позволяют не только отбирать из большого количества потенциально значимых веществ наиболее биологически активные, но и определять мишени их биологических эффектов, что дает ключ к пониманию механизма их химиопрофилактического действия.

Трехмерные клеточные модели. Используемые в настоящее время клеточные культуры представляют собой двумерные модели (2D модели), которые извлечены из естественных условий — живой ткани. В то же время, клетки в ходе своего роста и дифференцировки *in vivo* приобретают их естественную трехмерную структуру, которая оптимальна для их нормального роста и выполнения функций. Кроме того, клетки поддержаны сложной трехмерной внеклеточной матрицей, которая облегчает взаимодействие между клетками посредством как прямых контактов, так и в результате экспрессии цитокинов и ростовых факторов.

Многие из этих факторов изменяются при извлечении клеток из живых тканей и создании 2D моделей. При этом способность клеток приобретать естественную морфологию или взаимодействовать между собой резко снижается. Так, известно, что форма клетки и межклеточные контакты влияют на цитоскелет, который, в свою очередь, может регулировать экспрессию белков и, следовательно, функции клетки. Таким образом, общепризнанным является тот факт, что отсутствие естественных трехмерных взаимодей-

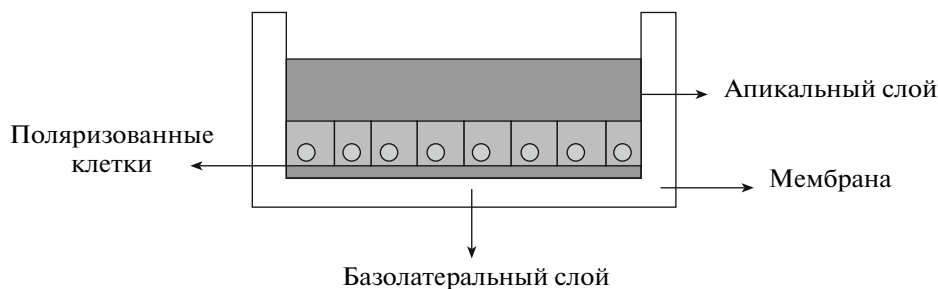


Рис. 2. Трехмерная модель кишечной стенки для изучения биодоступности БАВ.

ствий влияет на результаты исследований, полученных на 2D клеточных моделях [70].

В связи с этим все большее внимание в настоящее время привлекают трехмерные клеточные модели (3D), представляющие собой двумерные культуры, растущие в трехмерном пространственном микроокружении. Имеются работы, которые показывают преимущество растущих в 3D культуральных условиях клеток по сравнению с обычными 2D культурами [71]. Так, было отмечено, что рост и функция клеток в трехмерных структурах существенно отличаются от характеристик роста 2D культур. Кроме того, разработка микроокружения культивируемых клеток для создания условий роста, которые более адекватно моделируют естественные условия тканей, является существенным шагом для того, чтобы улучшить точность прогнозов тест-систем при исследовании биологических эффектов различных препаратов.

В настоящее время предполагается, что создание трехмерного пространственного микроокружения клеток позволит преодолеть некоторые ограничения, возникающие при проведении экспериментов на 2D моделях. Такие модели учитывают сложные взаимодействия между несколькими типами клеток и являются более адекватными для изучения биологических эффектов БАВ.

Как следствие, существенные усилия в настоящее время направлены на развитие технологий, позволяющих создавать трехмерное пространство для роста клеток, которое объединит 2D модель с ее микроокружением.

3D модели на основе культивируемых клеток разнообразны и могут быть классифицированы на органотипические культуры, клеточные сфериды (гомотипические — представленные только одним клеточным типом, и гетеротипические — состоящие из различных типов клеток одной ткани), клетки, растущие на микроносителях (так называемые “microcarrier cell cultures”), тканевые модели, полученные методом инженерии [70].

В настоящее время наиболее широкое распространение приобретают клеточные модели, растущие на матрице. Они позволяют создать макропористые структуры, которые используются для поддержания роста трехмерных моделей из клеточных культур [72].

В качестве матрицы используются натуральные материалы, полусинтетические и синтетические полимеры. Для создания натуральных матриц используют соли альгиновой кислоты — полисахарида, полученного из водоросли, который используется в качестве естественной основы для роста клеток [73]. Другим широко распространенным материалом, используемым для поддержания роста 3D моделей из клеток различного происхождения, является гидрогель [74]. Он изготавливается из натуральных материалов, таких как агароза, коллаген, фибрин или гиалуроновая кислота. Гидрогели создают трехмерную матрицу и, кроме того, в них можно включать различные молекулы для изменения физических параметров матрицы, таких как проницаемость.

Синтетические матрицы представляют собой микропористые мембраны, изготавливаемые из инертных недеградируемых материалов, таких как полистирол. Матрицы из полистирола обладают такими преимуществами, как простота производства и дешевизна, что делает их удобными для создания 3D клеточных культур [70].

Одной из широко применяемых 3D моделей при исследовании БАВ является модель эпителия кишечной стенки, которая представляет собой культуру клеток эпителия кишечника, растущую на пористой синтетической матрице (рис. 2). В ходе роста клеток происходит поляризация клеток с формированием апикального и базолатеральной поверхностей, имитирующих эпителий кишечной стенки. Данная модель активно используется для определения биодоступности БАВ из кишечника [75].

Активно разрабатываются 3D модели для изучения взаимодействия между клетками, например, вклада стромальных клеток при канцероген-

незе эпителиальных опухолей [76], взаимодействия патогенов с организмом хозяина [77]. Также разрабатываются 3D культуральные модели для экспериментов в области токсикологии [78], химиопрофилактики [79], биодоступности и иммуномодулирующих свойств [75].

Уже разработаны 3D модели, в которых наряду с эпителиальными клетками представлены лимфоидные клетки, имитирующие лимфоидную ткань эпителиальной стенки кишечника, к которым возможно добавить кишечные бактерии. В целом, такие 3D культуры полностью моделируют процессы *in vivo* [75].

Суммируя все вышесказанное, можно сказать, что трехмерные клеточные культуры являются перспективными моделями, которые по сравнению с двумерными более полно отражают процессы *in vivo*. Вместе с тем, технология создания 3D моделях находится на начальном этапе своего развития, и еще только предстоит оценить воспроизводимость и сопоставимость результатов тестирования на 3D моделях с *in vivo* условиями. Трехмерные модели имеют широкое поле для дальнейшего применения, включая биотехнологию функциональных продуктов питания.

Современные тенденции и актуальность использования культуральных моделей для характеристики БАВ.

Перспективность исследований в области культуральных моделей в промышленности функциональных пищевых продуктов можно продемонстрировать библиометрическим анализом научных публикаций за период 2001–2011 гг. с использованием базы данных Thompson Scientific (www.isiknowledge.com). В период с 2001 по 2011 гг. отмечено двукратное увеличение числа публикаций в области применения культуральных моделей для тестирования биологически активных веществ и функциональных пищевых продуктов. Одним из главных направлений развития в области культуральных клеточных моделей являются 3D модели. О перспективности исследований в области 3D культуральных клеточных моделей свидетельствует более чем шестикратное увеличение числа публикаций по данной тематике в период с 2001 по 2011 гг. При этом рост публикационной активности в сфере применения культуральных моделей для тестирования БАВ сопровождается стремительным увеличением числа цитирований с практически 0 в 2001 г. до почти 6000 в 2011 г.

Возрастающий интерес к 3D моделям вполне объясним, поскольку они могут использоваться для решения широкого круга задач, в том числе, при производстве функциональных продуктов питания. Примером применения данной техно-

логии являются 3D модели опухолей человека и предопухолевых состояний для исследования потенциальных химиопрофилактических свойств, как например, полученная Чу с соавт. [80] 3D модель гиперплазии простаты, растущей на полимерной матрице.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного контракта № 02.522.11.2143 от 01 марта 2011 года “Разработка методов создания функциональных продуктов и кормов для домашних животных из малоценного сырья животного происхождения” в рамках ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Waris G., Ahsan H.* // J. Carcinog. 2006. V. 5. P. 14.
2. *Ames B.N.* // Science. 1983. V. 221. № 4617. P. 1256–1264.
3. *Halliwel B.* // FEBS Lett. 2003. V. 540. P. 3–6.
4. *Elisia I., Kitts D.D.* // Mol. Cell. Biochem. 2008. V. 312. P. 139–145.
5. *Samaranayaka A.G., Kitts D.D., Li-Chan E.C.* // J. Agric. Food. Chem. 2010. V. 58. № 3. P. 1535–1542.
6. *Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N.* // Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 2005. V. 15. № 4. P. 316–328.
7. *Montuschi P., Barnes P.J., Roberts L.J.* // FASEB J. 2004. V. 18. P. 1791–1800.
8. *Nielsen F., Mikkelsen B.B., Nielsen J.B., Andersen H.R., Grandjean P.* // Clin. Chem. 1997. V. 43. P. 1209–1214.
9. *Mendes R., Cardoso C., Pestana C.* // Food Chem. 2009. V. 112. P. 1038–1045.
10. *Hwang E.S., Bowen P.E.* // Biofactors. 2005. V. 23. № 2. P. 97–105.
11. *Shi S., Zhang Z., Zhu Z., Zhang M.* // J. Med. Plant. Res. 2011. V. 5. № 6. P. 885–889.
12. *Milne G.L., Musiek E.S., Morrow J.D.* // Biomarkers. 2005. V. 10 Suppl. 1. S. 10–23.
13. *Milatovic D., Yin Z., Gupta R.C., Sidoryk M., Albrecht J., Aschner J.L., Aschner M.* // Toxicol. Sci. 2007. V. 98. № 1. P. 198–205.
14. *Loke W.M., Proudfoot J.M., McKinley A.J., Croft K.D.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. V. 345. № 3. P. 1039–1043.
15. *Higuchi Y.* // Biochem. Pharmacol. 2003. V. 66. № 8. P. 1527–1535.
16. *Miller M.J., Angeles F.M., Reuter B.K., Bobrowski P., Sandoval M.* // BMC Complement. Altern. Med. 2011. V. 1. P. 11.
17. *Pierce G.B., Parchment R.E., Lewellyn A.L.* // Differentiation. 1991. V. 46. P. 181–186.
18. *Simon H.U., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F.* // Apoptosis. 2000. V. 5. № 5. P. 415–418.

19. *Watson W.H., Cai J., Jones D.P.* // *Annu. Rev. Nutr.* 2000. V. 20. P. 485–505.
20. *Willingham M.C.* // *J. Histochem. Cytochem.* 1999. V. 47. № 9. P. 1101–1109.
21. *Kook D., Wolf A.H., Yu A.L., Neubauer A.S., Priglinger S.G., Kampik A., Welge-Lüssen U.C.* // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008. V. 49. № 4. P. 1712–1720.
22. *Gottlieb E., Armour S.M., Harris M.H., Thompson C.B.* // *Cell Death Differ.* 2003. V. 10. P. 709–717.
23. *Cottet-Rousselle C., Ronot X., Lerverve X., Mayol J.F.* // *Cytometry A.* 2011. V. 79. № 6. P. 405–425.
24. *Chen X., Zhong Z., Xu Z., Chen L., Wang Y.* // *Pharmacol. Rep.* 2011. V. 63. № 3. P. 724–732.
25. *Haslam G., Wyatt D., Kitos P.A.* // *Cytotechnol.* 2000. V. 32. № 1. P. 63–75.
26. *Rubiolo J.A., Vega F.V.* // *Biomed. Pharmacother.* 2008. V. 62. № 9. P. 606–612.
27. *Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J.* // *Free Radic. Biol. Med.* 1994. V. 17. P. 235–248.
28. *Naito Y., Lee M.C., Kato Y., Nagai R., Yonei Y.* // *Anti-Aging Med.* 2010. V. 7. № 5. P. 36–44.
29. *Buczynski A., Wachowicz B., Kedziorakornatowska K., Tkaczewski W., Kedziora J.* // *Atherosclerosis.* 1993. V. 100. P. 223–228.
30. *Mendis E., Rajapakse N., Kim S.-K.* // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53. № 3. P. 581–587.
31. *Noeman S.A., Hamooda H.E., Baalash A.A.* // *Diabetol. Metab. Syndr.* 2011. V. 3. № 1. P. 17.
32. *Jung S.H., Kim B.J., Lee E.H., Osborne N.N.* // *Neurochem. Int.* 2010. V. 57. № 7. P. 713–721.
33. *Albina J.E., Cui S., Mateo R.B., Reichner J.S.* // *J. Immunol.* 1993. V. 150. № 11. P. 5080–5085.
34. *Egami F., Taniguchi S., Bergmeyer H.U.* *Methods of Enzymatic Analysis* / Ed. H.U. Bergmeyer. N.Y.: Acad. Press, 1974. 2260 p.
35. *Eguchi A., Murakami A., Ohigashi H.* // *Free Radic. Res.* 2005. V. 39 № 12. P. 1367–1375.
36. *Wright W.E., Shay J.W.* // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. № 7. P. 682–688.
37. *Long L.H., Clement M.V., Halliwell B.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 273. № 1. P. 50–53.
38. *Lotito S.B., Frei B.* // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. V. 41. № 12. P. 1727–1746.
39. *Lao C.D., Ruffin M.T. 4th, Normolle D., Heath D.D., Murray S.I., Bailey J.M., Boggs M.E., Crowell J.* // *BMC Complement. Altern. Med.* 2006. V. 6. P. 10.
40. *Ireson C., Orr S., Jones D.J., Verschoyle R., Lim C.K., Luo J.L., Howells L., Plummer S.* // *Cancer Res.* 2001. V. 61. № 3. P. 1058–1064.
41. *Sharma R.A., Euden S.A., Platton S.L., Cooke D.N., Shafayat A., Hewitt H.R., Marczylo T.H., Morgan B.* // *Clin. Cancer Res.* 2004. V. 10. № 20. P. 6847–6854.
42. *Wichers H.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. V. 395. № 1. P. 37–45.
43. *El-Gamal Y.M., Elmasry O.A., El-Ghoneimy D.H., Soliman I.M.* // *Egypt J. Pediatr. Allergy Immunol.* 2011. V. 9. № 1. P. 3–13.
44. *Rusu D., Drouin R., Pouliot Y., Gauthier S., Poubelle P.E.* // *J. Nutr.* 2009. V. 140. № 2. P. 382–391.
45. *Kyo E., Uda N., Kasuga S., Itakura Y.* // *J. Nutr.* 2001. V. 131. 1075S–9S.
46. *Friberg D., Bryant J., Shannon W., Whiteside T.L.* // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1994. V. 1. № 3. P. 261–268.
47. *Amano F., Noda T.* // *FEBS Lett.* 1995. V. 368. P. 425–428.
48. *Liu C.F., Tseng K.C., Chiang S.S., Lee B.H., Hsu W.H., Pan T.M.* // *J. Sci. Food Agric.* 2011. V. 91. № 12. P. 2284–2291.
49. *Dicks L.M., Botes M.* // *Benef. Microbes.* 2010. V. 1. № 1. P. 11–29.
50. *Maragkoudakisa P.A., Zoumpopoulou G., Miarisa C., Kalantzopoulou G., Potb B., Tsakalidou E.* // *Int. Dairy J.* 2006. V. 16. № 3. P. 189–199.
51. *Payne A.N., Zihler A., Chassard C., Lacroix C.* // *Trends Biotechnol.* 2012. V. 30. № 1. P. 17–25.
52. *Kabir A.M., Aiba Y., Takagi A., Kamiya S., Miwa T., Koga Y.* // *Gut.* 1997. V. 41. № 1. P. 49–55.
53. *Lin W.H., Lin C.K., Sheu S.J., Hwang C.F., Ye W.T., Hwang W.Z., Tsen H.Y.* // *J. Food Sci.* 2009. V. 74. № 6. P. 225–230.
54. *Klingberg T.D., Pedersen M.H., Cencic A., Budde B.B.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 11. P. 7528–7530.
55. *Matsumoto S., Hara T., Hori T., Mitsuyama K., Nagaoaka M., Tomiyasu N., Suzuki A., Sata M.* // *Clin. Exp. Immunol.* 2005. V. 140. № 3. P. 417–426.
56. *Roberfroid M., Gibson G.R., Hoyles L., McCartney A.L., Rastall R., Rowland I., Wolvers D., Watzl B.* // *Br. J. Nutr.* 2010. V. 104. Suppl. S2.
57. *Shoaf K., Mulvey G.L., Armstrong G.D., Hutkins R.W.* // *Infect. Immun.* 2006. V. 74. № 12. P. 6920–6928.
58. *Zenhom M., Hyder A., de Vrese M., Heller K.J., Roeder T., Schrezenmeir J.* // *J. Nutr.* 2011. V. 141. № 5. P. 971–977.
59. *Sporn M.B., Suh N.* // *Carcinogenesis.* 2000. V. 21. № 3. P. 525–530.
60. *D'Agostini F., Izzotti A., Balansky R.M., Bencicelli C., De Flora S.* // *Mutat. Res.* 2005. V. 591. P. 173–186.
61. *Doll R., Peto R.* // *J. Natl. Cancer Inst.* 1981. V. 66. P. 1191–1308.
62. *de Kok T.M., van Breda S.G., Manson M.M.* // *Eur. J. Nutr.* 2008. V. 47 Suppl. 2. P. 51–59.
63. *Surh Y.J.* // *Nat. Rev. Cancer.* 2003. V. 3. № 10. P. 768–780.
64. *Aziz M.H., Kumar R., Ahmad N.* // *Int. J. Oncol.* 2003. V. 23. № 1. P. 17–28.
65. *Goya L., Martin M.A., Ramos S., Mateos R., Bravo L.* // *Curr. Nutr. Food Sci.* 2009. V. 5. № 1. P. 56–64.
66. *Cai J., Wang M., Li B., Wang C., Chen Y., Zuo Z.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2009. V. 22. P. 1582–1587.

67. Duraj J., Zazrivcova K., Bodo J., Sulikova M., Sedlak J. // *Neoplasma*. 2005. V. 52. № 4. P. 273–279.
68. Wolter F., Akoglu B., Clausnitzer A., Stein J. // *J. Nutr.* 2001. V. 131. P. 2197–2203.
69. Schneider Y., Duranton B., Gosse F., Schleiffner R., Seiler N., Raul F. // *Nutr. Cancer*. 2001. V. 39. P. 102–107.
70. Haycock J.W. // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 695. P. 1–15.
71. Sun T., Jackson S., Haycock J.W., MacNeil S. // *J. Biotechnol.* 2006. V. 122. № 3. P. 372–381.
72. Carletti E., Motta A., Migliaresi C. // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 695. P. 17–39.
73. Frampton J.P., Hynd M.R., Shuler M.L., Shain W. // *Biomed. Mater.* 2011. V. 6. № 1. P. 1–16.
74. Tibbitt M.W., Anseth K.S. // *Biotechnol. Bioeng.* 2009. V. 103. № 4. P. 655–663.
75. Langerholc T., Maragkoudakis P.A., Wollgast J., Gradisnik L., Cencik A. // *Trends Food Sci. Technol.* 2011. V. 22. Supl. 1. P. S11–S20.
76. Li L., Lu Y. // *J. Cancer*. 2011. V. 2. P. 458–66.
77. Barrila J., Radtke A.L., Crabbé A., Sarker S.F., Herbst-Kralovetz M.M., Ott C.M., Nickerson C.A. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. V. 8. P. 791–801.
78. Leite S.B., Teixeira A.P., Miranda J.P., Tostões R.M., Clemente J.J., Sousa M.F., Carrondo M.J., Alves P.M. // *Toxicol. In Vitro*. 2011. V. 25. № 4. P. 825–832.
79. Hudson E.A., Fox L.H., Luckett J.C., Manson M.M. // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2006. V. 21. № 2. P. 204–214.
80. Chu J.H., Yu S., Hayward S.W., Chan F.L. // *Prostate*. 2009. V. 69. № 4. P. 428–442.
81. Tarozzi A., Hrelia S., Angeloni C., Morroni F., Biagi P., Guardigli M., Cantelli-Forti G., Hrelia P. // *Eur. J. Nutr.* 2006. V. 45. № 3. P. 152–158.
82. Giovannelli L., Pitozzi V., Jacomelli M., Mulinacci N., Laurenzana A., Dolara P., Mocali A.J. // *Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2011. V. 66. № 1. P. 9–18.
83. Chu W.L., Lim Y.W., Radhakrishnan A.K., Lim P.E. // *BMC Complement. Altern. Med.* 2010. V. 10. P. 53.
84. Jie G., Lin Z., Zhang L., Lv H., He P., Zhao B. // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54. № 21. P. 8058–8064.
85. Farah I.O. // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2005. V. 2. P. 411–419.
86. Liu Y.W., Shang H.F., Wang C.K., Hsu F.L., Hou W.C. // *Food Chem. Toxicol.* 2007. V. 45. № 11. P. 2312–2318.
87. Smiderle F.R., Ruthes A.C., van Arkel J., Chanput W., Iacomini M., Wichers H.J., Van Griensven L.J. // *BMC Complement. Altern. Med.* 2011. V. 11. P. 58.
88. Li E.W., Mine Y. // *J. Agric. Food Chem.* 2004. V. 52. № 9. P. 2704–2708.
89. Fan Y.Z., Chang H., Yu Y., Liu J., Zhao L., Yang D.J., Wang R. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. V. 1763. № 10. P. 1059–1066.
90. Blonska M., Bronikowska J., Pietsz G., Czuba Z.P., Scheller S., Krol W. // *J. Ethnopharmacol.* 2004. V. 91. № 1. P. 25–30.
91. Aherne S.A., O'Brien N.M. // *Mol. Nutr. Food Res.* 2008. V. 52. № 6. P. 664–673.
92. Kandimalla E.R., Bhagat L., Li Y., Yu D., Wang D., Cong Y.P., Song S.S., Tang J.X. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 19. P. 6925–6930.
93. Timm M., Bartelt S., Hansen E.W. // *Cytokine*. 2008. V. 42. № 1. P. 113–120.
94. Maragkoudakisa P.A., Zoumpopoulou G., Miarisa C., Kalantzopoulou G., Potb B., Tsakalidou E. // *Int. Dairy J.* 2006. V. 16. № 3. P. 189–199.
95. Bomba A., Nemcová R., Kastel R., Herich R., Pataky J., Cízek M. // *Vet. Med. (Praha)*. 1996. V. 41. № 5. P. 155–158.
96. Gaudana S.B., Dhanani A.S., Bagchi T. // *Br. J. Nutr.* 2010. V. 103. № 11. P. 1620–1628.
97. Rokka S., Pihlanto A., Korhonen H., Joutsjoki V. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2006. V. 43. № 5. P. 508–513.
98. Hirano J., Yoshida T., Sugiyama T., Koide N., Mori I., Yokochi T. // *Microbiol. Immunol.* 2003. V. 47. № 6. P. 405–409.
99. Won T.J., Kim B., Oh E.S., Bang J.S., Lee Y.J., Yoo J.S., Yu H., Yoon J. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2011. V. 89. № 6. P. 429–434.
100. Vissers Y.M., Snel J., Zuurendonk P.F., Kleerebezem M., Wichers H.J., Savelkoul H.F. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011. V. 61. № 1. P. 28–40.
101. Matsumoto S., Hara T., Hori T., Mitsuyama K., Nagaoka M., Tomiyasu N., Suzuki A., Sata M. // *Clin. Exp. Immunol.* 2005. V. 140. № 3. P. 417–426.
102. Sabater-Molina M., Larqué E., Torrella F., Zamora S. // *J. Physiol. Biochem.* 2009. V. 65. № 3. P. 315–328.
103. Sangwan V., Tomar S.K., Singh R.R., Singh A.K., Ali B. // *J. Food. Sci.* 2011. V. 76. № 4. P. R103–11.
104. Smiricky-Tjardes M.R., Grieshop C.M., Flickinger E.A., Bauer L.L., Fahey G.C. Jr. // *J. Anim. Sci.* 2003. V. 81. № 10. P. 2535–2545.
105. Ketabi A., Dieleman L.A., Gänzle M.G. // *J. Appl. Microbiol.* 2011. V. 110. № 5. P. 1297–1306.
106. Ramnani P., Chitarrari R., Tuohy K., Grant J., Hotchkiss S., Philp K., Campbell R., Gill C., Rowland I. // *Anaerobe*. 2012. V. 18. № 1. P. 1–6.
107. Das S.K., Hashimoto T., Kanazawa K. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. V. 1780. № 4. P. 743–749.
108. Waite K.A., Sinden M.R., Eng C. // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. № 11. P. 1457–1463.
109. Janakiram N.B., Mohammed A., Zhang Y., Choi C.I., Woodward C., Collin P., Steele V.E., Rao C.V. // *Cancer. Prev. Res. (Phila)*. 2010. V. 3. № 1. P. 82–91.
110. Liu L.Z., Fang J., Zhou Q., Hu X., Shi X., Jiang B.H. // *Mol. Pharmacol.* 2005. V. 68. № 3. P. 635–643.

Analysis of Functional Properties of Biologically Active Substances Using Eukaryotic Cell Models (Review)

K. V. Lisitskaya, I. V. Nikolaev, A. A. Torkova, V. O. Popov, and O. V. Koroleva

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

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

Received March 19, 2012

Abstract—This work presents an analysis of current data on the investigation into the functional properties of biologically active substances in model systems based on cultivated human cells. The knowledge regarding the practical application of cell cultures for the analysis of functional properties of bioactive substances is summarized, including antioxidant, immunomodulating, pro- and prebiotics, and chemoprevention properties. The most promising directions in cell culture model development for the investigation of functional properties, including three-dimensional models, are discussed.

УДК 577.152.1:579.08

ПОЛУЧЕНИЕ ГОМОГЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗОФОРМ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ БАКТЕРИЙ *Sphaerotilus natans* ШТАММ Д-507

© 2012 г. А. Т. Епринцев, Т. Л. Ву, Н. В. Селиванова, А. Хасан Хамад

Воронежский государственный университет, Воронеж, 394006,

e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 26.01.2012 г.

Из бесцветных серных бактерий *Sphaerotilus natans* Д-507, культивируемых органотрофно, получены ферментные препараты двух изоформ СДГ с удельной активностью 22.00 Е/мг белка и 14.75 Е/мг белка. Выявлено, что обе формы сукцинатдегидрогеназы являются гетеротетрамерами с молекулярной массой субъединиц 70.8; 35.0; 31.8 и 16.2 кДа. Значения K_m для первой и второй изоформ составили 0.615 и 0.531 мМ соответственно, а оптимальное значение рН 7.2. Установлено, что активирующий эффект на активность СДГ проявляет ион Cl^- , что может быть объяснено специфической химической модификацией белковой молекулы фермента. Полученные результаты позволяют предположить, что выделенные формы фермента входят в состав разных мультиферментных комплексов, обеспечивающих функционирование цикла трикарбоновых кислот и глюконеогенеза. Препараты СДГ могут использоваться для регенерации нуклеотидных коферментов при исследовании других ферментных систем или при моделировании *in vitro* надмолекулярных структур клетки.

Изучение механизмов регуляции метаболических процессов, осуществляемых в живых организмах, является важнейшим направлением биохимических исследований. Среди множества проблем данной области науки важное место занимает изучение ферментных систем, их физиолого-биохимической роли и механизмов действия [1].

Знание структуры и характеристики ферментных комплексов, механизмов регуляции их активности имеет как фундаментальное, так и практическое значение.

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ, КФ 1.3.99.1) представляет собой мультифункциональный фермент и по этой причине имеет практически универсальное распространение среди живых организмов. Данный фермент занимает ключевое положение в регуляции аэробного дыхания. Кроме того, СДГ является мембраносвязанным ферментом, что обуславливает его полифункциональность — участие в функционировании ЦТК и работе электрон-транспортной цепи (комплекс II) [2]. Для СДГ выявлено множество модулирующих ее активность веществ. Активирующими агентами считаются изоцитрат, β -оксимасляная кислота, α -глицерофосфат, ионы K^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , Vg^- и Cl^- . Ингибиторами СДГ являются щавелевоуксусная кислота, оксалаты, 2-оксоглутарат, дикарбоновые кислоты, пирофосфаты, хиноны, бикарбонат-ионы [3].

Ферменты из бактерий представляют особый интерес, несмотря на то, что СДГ из разных объ-

ектов хорошо изучена. Условия обитания прокариот более разнообразны, чем эукариот, что обусловлено значительной гибкостью их метаболизма, выражающейся в способности использовать большое число различных соединений, а также переходить с одного типа питания на другой [4].

Бактерии рода *Sphaerotilus* — это образующие маты бесцветные нитчатые граммотрицательные прокариоты, способные к органотрофному и миксотрофному росту. Типичные местообитания *S. natans* — это медленно текущие пресные воды, сильно загрязненные стоками сельскохозяйственного производства [5]. Предпочтительный рост данных организмов при пониженном содержании кислорода в среде и способность к утилизации большого количества органических источников углерода объясняют их массовое развитие в соответствующих антропогенных экосистемах [6].

Определенный интерес представляет исследование структурной организации сукцинатдегидрогеназной ферментной системы из *S. natans* в различных условиях культивирования. В настоящее время показано, что при органотрофном росте у данных бактерий функционирует полный ЦТК, тогда как при миксотрофном культивировании — глиоксилатный цикл. При переходе от одного типа питания к другому в метаболизме бактериальных клеток происходит изменение соотношения роли цикла трикарбоновых кислот и глиоксилатного цикла [7].

СДГ находит широкое применение в исследовательской практике, являясь удобным объектом

для изучения структуры активных центров оксидоредуктаз, регуляции ферментативной активности и решения других актуальных проблем энзимологии и молекулярной биологии [8, 9]. Гомогенные препараты изоформ СДГ могут быть применены для регенерации нуклеотидных коферментов при исследовании других ферментных систем или при моделировании *in vitro* надмолекулярных структур клетки. Кроме того, СДГ может быть использована в иммуноферментном анализе некоторых антигенов в качестве фермента-маркера; фермент находит применение при диагностике болезней [9, 10]. Поэтому остается актуальным поиск источника получения СДГ. В нашей работе для получения гомогенного препарата СДГ использовали серобактерии *S. natans* штамм Д-507.

Цель работы – получение гомогенных препаратов изоформ СДГ из бесцветных серобактерий *S. natans* и изучение их свойств.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили образующие маты бактерии рода *S. natans* штамм Д-507, выращенные в условиях органотрофного роста. Бактерии выделены из термальных источников Краснодарского края. Для культивирования использовали питательную среду следующего состава (мг/л): NH_4Cl – 300; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 34.4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 22.5; CaCl_2 – 27.5; KH_2PO_4 – 8.5; K_2HPO_4 – 21.5; пептон – 500; дистиллированная вода; рН среды 7.5 [7]. Перед посевом в среды вносили раствор микроэлементов и витаминов – 1 мл/л. Суспензию клеток получали путем центрифугирования культуры при 8000 г и 4°C в течение 10 мин. Клетки отмывали 0.1 М калий-фосфатным буфером (рН 7.5).

Активность фермента измеряли на СФ-2000 (“ЛОМО”, Россия) спектрофотометрическим методом, основанным на использовании искусственных акцепторов электронов с соответствующим редокс-потенциалом [11]. Содержание белка в пробе определяли по методу Лоури.

Для получения гомогенных препаратов СДГ была использована пятистадийная схема очистки. Все операции проводили при температуре 0–4°C. Культуры клеток разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т (НПП “Укрросприбор”, Украина) при мощности 500 Вт и частоте 22 кГц в течение 2.5 мин в ледяной бане с последующим добавлением Тритона X-100 4.02% (0.002% к объему гомогената). Супернатант получали после центрифугирования клеточных экстрактов при 5000 г в течение 4 мин. Фракционирование белков супернатанта осуществляли сульфатом аммония (20–60% насыщения). Полученный раствор центрифугировали 30 мин при 12000 г.

Гель-фильтрацию проводили на колонке (1.5 × 20 см), заполненной сефадексом G-25 (“Pharmacia”, Швеция) для освобождения от низкомолекулярных примесей. Ионообменную хроматографию проводили на колонке (1.5 × 12 см) с ДЭАЭ-целлюлозой (“Whatman”, Англия). Элюцию осуществляли линейным градиентом концентрации KCl от 20 до 150 мМ.

Для выявления четвертичной структуры и молекулярной массы нативной СДГ использовали гель-хроматографию на колонке (2 × 40 см) с сефадексом G-200 (“Pharmacia”, Швеция) [12]. Свободный объем колонки определяли с помощью голубого декстрана (“Serva”, ФРГ). Молекулярную массу изучаемого фермента рассчитывали из соотношения, полученного из калибровочного графика:

$$\lg M_r = 6.698 - 0.987(V_e/V_{cb}),$$

где M_r – молекулярная масса изучаемого фермента; V_e – объем элюции фермента, мл; V_{cb} – свободный объем колонки, мл.

Na-ДДС-ПААГ (додецилсульфат натрия – полиакриламидный гель) электрофорез осуществляли при концентрации полиакриламидного геля 12.5% по методике Лэммли [13]. Каждый образец содержал 3–5 мкг белка. Для построения калибровочной кривой использовали стандартные маркерные белки (“Sigma”, США) (кДа): целлюлаза – 94.6, бычий сывороточный альбумин – 66.2, овальбумин – 45, карбоангидраза – 31.0, ингибитор трипсина – 21.5, лизоцим – 14.4.

Электрофоретические исследования белков проводили в 7.5%-ном полиакриламидном геле модифицированным методом Дэвиса [14]. Универсальное окрашивание белков осуществляли по методике с нитратом серебра, для специфической идентификации СДГ использовали тетразолиевый метод со средой следующего состава: калий-фосфатный буфер – 0.1 М (рН 7.5), 0.1 М сукцинат натрия, 0.5 мг/мл нитросинего тетразолия и 1 мг/мл феназинметасульфата [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью электрофореза в 7.5%-ном ПААГ с последующим специфическим окрашиванием на активность СДГ в бесцветных серобактериях были обнаружены две изоформы фермента с различной электрофоретической подвижностью (рис. 1). Множественные формы СДГ были описаны ранее, по крайней мере для эукариот [9].

Для получения гомогенных препаратов изоформ СДГ из *S. natans* штамм Д-507 была использована 5-стадийная очистка, результаты которой представлены в таблице. После элюции белков с ДЭАЭ-целлюлозы линейным градиентом концентрации KCl (20–150 мМ) удельная активность

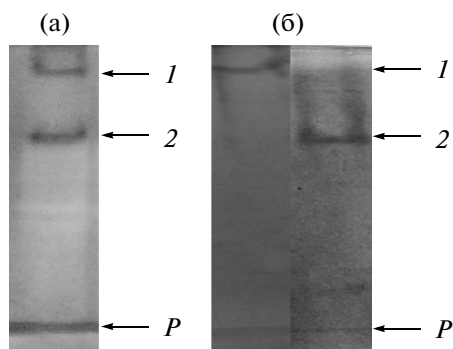


Рис. 1. Электрофореграммы препаратов СДГ из *S. natans* Д-507, а – специфическое проявление, б – окрашивание изоформ нитратом серебра, 1 – белковая полоса с $R_f=0.10$ (СДГ-1), 2 – белковая полоса с $R_f=0.34$ (СДГ-2), P – фронт красителя.

для одной изоформы фермента (СДГ-1) равнялась 22 Е/мг белка, при этом степень очистки составила 81.48 раз, выход – 15.5%. Для второй изоформы (СДГ-2) значение удельной активности было 14.75 Е/мг белка, а степень очистки и выход – 54.63 раз и 10.41% соответственно.

Электрофоретический анализ очищенных препаратов показал, что при универсальном окрашивании на белки обнаруживалось по одной белковой полосе (рис. 1).

Таким образом, было установлено, что у бесцветных серных бактерий *S. natans* штамм Д-507 присутствуют две формы фермента, имеющие разную электрофоретическую подвижность: СДГ-1 с $R_f=0.10$ и СДГ-2 с $R_f=0.34$.

Молекулярные массы выделенных изоформ СДГ методом гель-фильтрации на сефадексе G-200 составили 201.1 и 199.2 кДа соответственно. Значение молекулярных масс субъединиц, определенные в ходе Na-ДДС-ПААГ-электрофореза, оказались равны 70.8, 35.0, 31.8 и 16.2 кДа соответственно (рис. 2). Следовательно, обе формы СДГ являются гетеротетрамерами. Известно, что сукцинатдегидрогеназа в различных организмах состоит из трех или четырех субъединиц с общей

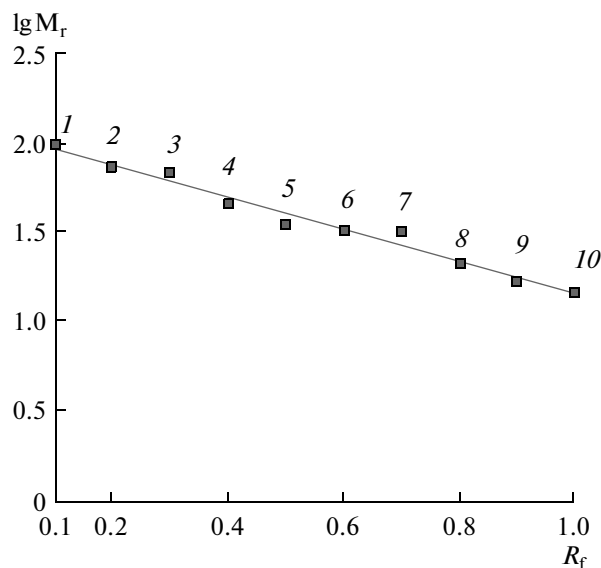


Рис. 2. Определение молекулярной массы субъединицы СДГ из *S. natans* Д-507 методом Na-ДДС-электрофореза: калибровочная кривая. 1 – целлюлаза, 2, 5, 6, 9 – СДГ, 3 – БСА, 4 – овальбумин, 7 – карбоангидраза, 8 – ингибитор трипсина, 10 – лизоцим.

молекулярной массой ферментного комплекса ~90–141 кДа [16]. По данным Бриана [17], молекулярные массы субъединиц составляют 65–79 кДа (СДГА), 25–37 кДа (СДГВ), 14–32 кДа (СДГС) и 12–17 кДа (СДГД).

Получение гомогенных препаратов СДГ позволило провести сравнение их кинетических характеристик. Определение K_m показало, что обе изоформы фермента подчиняются закону Михаэлиса–Ментен. Значение K_m для первой и второй изоформ составило 0.615 мМ и 0.531 мМ соответственно (рис. 3). Полученные результаты позволяют заключить, что выделенные и очищенные до гомогенного состояния формы обладают разным сродством к субстрату, а именно СДГ-1 обладает большим сродством к сукцинату, чем СДГ-2. Аналогичные исследования кинетических свойств на гомогенных препаратах сукцинатдегидрогена-

Очистка сукцинатдегидрогеназы из бактерий ($n=3, p<0.05$)

Стадия очистки	Объем, мл	Общая активность, Е	Общий белок, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки, раз
Гомогенат	4	5.67	21.36	0.27	100	1
Супернатант	3.4	2.45	14.60	0.17	43.21	0.63
Фракционирование сульфатом аммония	3.5	5.01	10.80	0.46	88.36	1.70
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	2	5.06	10.03	0.50	89.24	1.85
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	1	2	0.88	0.04	22	81.48
	2	2	0.59	0.04	14.75	10.41

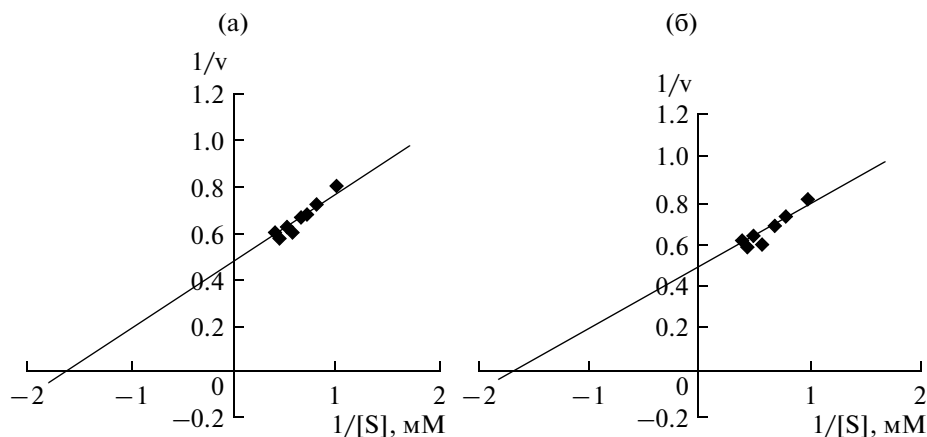


Рис. 3. Определение значений K_M по сукцинату для СДГ из *S. natans* Д-507: а – первая изоформа, б – вторая изоформа.

зы из различных организмов показали, что фермент также подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен, но значения K_M варьируют, так K_M СДГ из *Sulfolobus acidocaldarius* составляет 1.42 мМ [18], а из *Rhodothermus marinus* – 0.165 мМ [19].

Вторым важным фактором, влияющим на активность ферментов, является значение pH. Разные ферменты максимально активны при неодинаковых величинах pH; при pH выше и ниже оптимальных значений их активность снижается. Из данных, приведенных на рис. 4, видно, что значение оптимума pH изоформы СДГ-1 и СДГ-2 находится в пределах, близких к нейтральной среде – 7.2, т.е. совпадает с физиологической величиной pH живой клетки *S. natans* [20].

Полученные нами результаты коррелируют с данными литературы. Известно, что pH оптимум для СДГ из различных организмов находится в диапазоне 7.0–7.5 [9].

Фермент СДГ – крайне лабилен [2], поэтому одним из факторов, влияющих на стабильность данного фермента, является температура. В ходе экспериментов показано, что через 25 ч инкубирования при комнатной температуре исследуемый фермент был полностью инактивирован, при 4°C также наблюдалось значительное (83.8%) снижение активности СДГ. Хранение сукцинатдегидрогеназы при –20 и –70°C мало влияло на ее функционирование (потеря активности составила 10.7%).

Было изучено действие различных солей на активность сукцинатдегидрогеназы, что также может играть важную роль в регуляции активности данного фермента. Для СДГ активирующими агентами считаются изоцитрат, ионы K^+ , Ca^{2+} , SO_4^{2-} , Br^- , Cl^- . Степень активации анионами растворимой СДГ уменьшается в ряду Cl^- , SO_4^{2-} , Br^- , CH_3COO^- [9].

Так, из данных, представленных на рис. 5, следует, что активатором работы СДГ, выделенной из бактерии *S. natans*, является KCl. В присутствии этой соли в среде активность фермента возросла в 2 раза относительно контрольного уровня. Такие соли, как NaCl, NH_4Cl , K_2SO_4 , Na_2SO_4 , $Mg(CH_3COO)_2$ не вызвали значительного изменения в функционировании СДГ. Анализ действия различных солей на каталитическую активность СДГ позволяет говорить о том, что активирующее действие на фермент проявляет ион Cl^- , поскольку он входит в состав всех солей, присутствующих в среде где происходила интенсификация работы фермента. Увеличение активности сукцинатдегидрогеназы в присутствии ионов Cl^- можно объяснить специфической химической модификацией белковой молекулы фермента [21]. Катионы Zn^{2+} и Mn^{2+} инактивировали фермент.

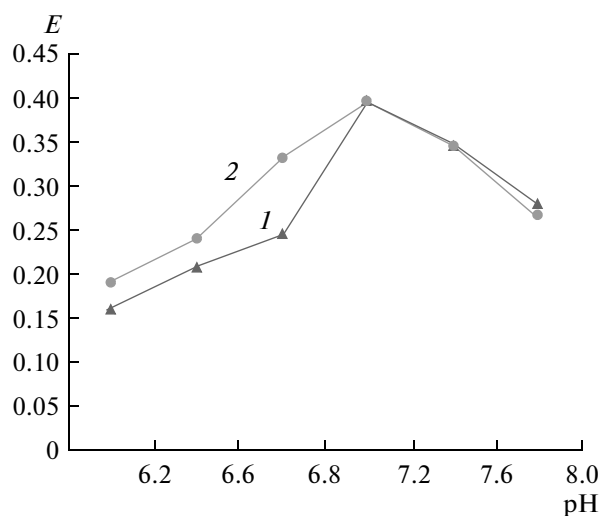


Рис. 4. Зависимость скорости реакции от pH среды для СДГ. 1 – СДГ-1, 2 – СДГ-2.

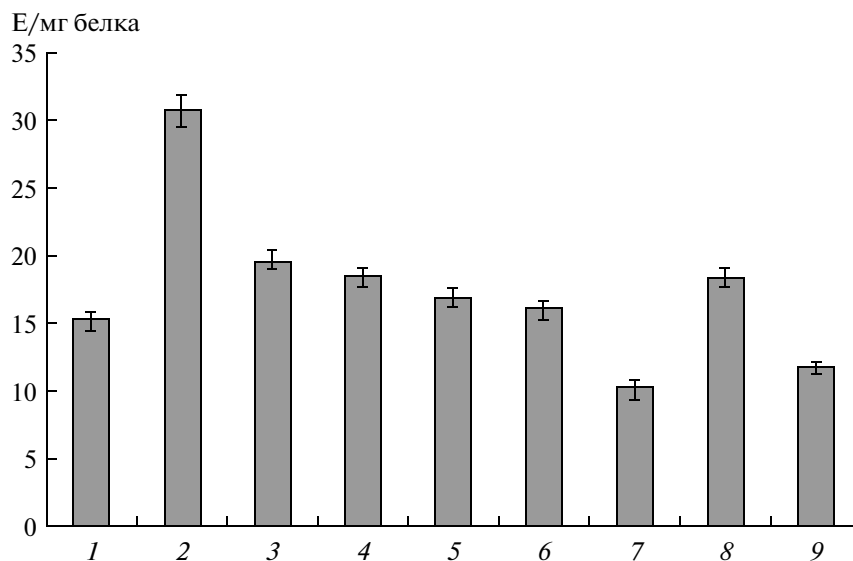


Рис. 5. Влияние солей на активность очищенной СДГ (Е). 1 – активность гомогенного препарата СДГ, 2 – KCl, 3 – NaCl, 4 – NH₄Cl, 5 – K₂SO₄, 6 – Na₂SO₄, 7 – Zn(CH₃COO)₂, 8 – Mg(CH₃COO)₂, 9 – Mn(CH₃COO)₂.

Таким образом, с помощью разработанной нами многостадийной очистки получены гомогенные препараты изоформ СДГ из бактерий *S. natans*. Можно предположить, что выделенные формы фермента входят в состав разных мультиферментных комплексов, обеспечивающих функционирование цикла трикарбоновых кислот и глюконеогенеза, в утилизации сукцината, образующегося как конечный продукт глиоксилатного цикла.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пине́йру де Корвалью М.А.А., Землянухин А.А., Епринцев А.Т. Малатдегидрогеназа высших растений. Воронеж: ВГУ, 1991. 216 с.
2. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Анвар Ахмад Дж., Попов В.Н. // Изв. РАН. Сер. биол. 2010. № 3. С. 268–276.
3. Землянухин А.А., Землянухин Л.А. Метаболизм органических кислот растений. Воронеж: изд-во Воронеж. ун-та, 1995. 152 с.
4. Епринцев А.Т., Фалалеева М.И., Грабович М.Ю., Парфенова Н.В., Каширская Н.Н., Дубинина Г.А. // Микробиология. 2004. Т. 73. № 4. С. 437–442.
5. Siering P.L., Ghiorse W.C. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1996. V. 46. № 1. P. 173–182.
6. Takeda M., Iohara K., Shinmaru S., Suzuki I., Koizumi J.-I. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 11. P. 4998–5004.
7. Епринцев А.Т., Фалалеева М.И., Арабцева М.А., Лавриченко И.А., Парфенова И.В., Гречкина М.В., Абуд Ф.С. // Изв. РАН. Сер. биол. 2011. № 4. С. 397–402.
8. Виноградов А.Д. // Биохимия. 1986. Т. 51. №12. С. 1944–1973.
9. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. Сукциналдегидрогеназа высших растений // Воронеж: Центр. черн. книжное изд-во, 2010. 184 с.
10. Епринцев А.Т., Попов В.Н., Шевченко М.Ю. Глиоксилатный цикл: универсальный механизм адаптации? М.: ИКЦ “Академкнига”, 2007. 228 с.
11. Попов В.Н., Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Леонова Ю.А. // J. Stress Physiol. Biochem. 2005. V. 1. № 1. P. 30–36.
12. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул. М.: Мир, 1983. 297 с.
13. Laemmly U.K. // Nature. 1970. V. 77. № 4. P. 680–683.
14. Davis B.J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1994. V. 121. P. 404–427.
15. Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Селиванова Н.В., Ву Т.Л., Махмуд А.С., Попов В.Н. // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 3. С. 332–340.
16. Suraveratun N., Krungkrai S.R., Leangaramgul P., Prapunwattana P., Krungkrai J. // Mol. Biochem. Parasitol. 2000. V. 105. № 2. P. 215–22.
17. Brian A. Crowe, P. Owen // J. Bacteriol. 1983. V. 153. № 3. P. 1493.
18. Moll R., Schafer G. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 201. № 3. P. 593–600.
19. Fernandes A.S., Konstantinov A.A., Teixeira M., Pereira M.M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 330. № 2. P. 565–70.
20. Pellegrin I V., Juretschko S., Wagner M., Cottenceau G. // Appl. Microbiol. 1999. V. 65. № 1. P. 156–162.
21. Pas-Panja K., Jonnalagadda V.S., Jonnalagadda S. // Indian J. Biochem. Biophys. 1998. V. 35. № 5. P. 255–259.

Obtaining Homogenous Preparations of Succinate Dehydrogenase Isoforms from the D-507 Strain of *Sphaerotilus natans*

A. T. Eprintsev, T. L. Wu, N. V. Selivanova, and A. Khasan Khamad

Voronezh State University, Voronezh, 394006 Russia

e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Received January 26, 2012

Abstract—Enzymatic preparations of two isoforms of succinate dehydrogenase (SDG) with specific activity of 22.00 E/mg of protein were obtained from the colorless sulfur bacterium *Sphaerotilus natans* D-507 cultured organotrophically. Both SDG forms were shown to be heteromers with subunit molecular masses of 70.8, 35.0, 31.8, and 16.2 kDa. The K_m values for the first and the second forms of SDG were evaluated as 0.615 and 0.531 mM, respectively, with an optimal pH value of 7.2. It was found that the Cl^- ion has an activating effect on the SDG activity that can be explained by the specific chemical modification of the enzyme molecule. The results suggest that the isolated enzyme forms are included in different multienzyme complexes, which provide the functioning of the tricarboxylic acid cycle, and SDG preparations can be used for the investigation of other enzyme systems or in vitro modeling of supramolecular cellular structures.

УДК 579.22

ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ РИЗОСФЕРНОГО ФИТОСИМБИОНТА *Methylobacterium nodulans*

© 2012 г. Т. А. Кузнецова**, А. П. Бесчастный*, О. Н. Понаморёва**, Ю. А. Троценко*

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

** Тульский государственный университет, Тула, 300600

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 05.05.2012 г.

Метанолдегидрогеназа (МДГ) факультативно-метилотрофного ризосферного фитосимбионта *Methylobacterium nodulans* впервые очищена до электрофоретически гомогенного состояния и охарактеризована. Молекулярная масса нативного белка ~70 кДа и состоит из большой (60 кДа) и малой (6 кДа) субъединиц. Очищенный белок имел спектр идентичный с пирролохинолинхинон (ПХХ) – содержащими МДГ, рI – 8.7, рН-оптимум в пределах 9–10. Фермент неактивен в отсутствие аммония или метиламина, проявлял широкую субстратную специфичность по отношению к C₁–C₅ спиртам, наибольшее сродство к метанолу (K_M = 70 мкМ), но не окислял бензиловый и вторичные спирты. Кажущиеся значения K_M к первичным спиртам возрастали с длиной углеродной цепи. Фермент характеризовался высокой стабильностью даже в отсутствие субстрата. Иммуобилизованный фермент был использован для амперометрической детекции метанола.

Methylobacterium nodulans – факультативный метилотроф, выделенный из корневых клубеньков трех видов бобовых рода *Crotalaria*: *C. podocarpa*, *C. glaucoides* и *C. perrottetii*, обладает способностью к азотфиксации и нодуляции в процессе симбиоза с представителями рода *Crotalaria*. Показано, что *M. nodulans* растет на метаноле в качестве источника углерода и энергии, имеет ген *mxaF*, кодирующий большую субъединицу МДГ, идентичную на 88% МДГ *M. extorquens* и *M. organophilum* [1]. Инактивация этого гена инсерционным мутагенезом приводила к неспособности *M. nodulans* расти на метаноле и негативно отражалась на развитии *C. podocarpa* при симбиозе с таким мутантом [2, 3]. Секвенирование генома *M. nodulans* (Refseq/GenBank NC_011894/CP001349) выявило присутствие нескольких гомологичных *mxaF* генов, а в экстрактах, выросших на метаноле клеток *M. nodulans*, были обнаружены активности ферментов первичного метаболизма метанола и, в частности, активируемая аммонием МДГ [4]. Однако фермент не был очищен и охарактеризован.

Как известно, МДГ (КФ 1.1.2.7) грамотрицательных метиловых бактерий – периплазматический растворимый белок. Наиболее эффективно фермент катализирует окисление метанола до формальдегида (K_M ~ 20 мкМ), передавая электроны в клетках на специфический кислый цитохром c₁. Кроме метанола, МДГ окисляет первичные спирты и альдегиды, используя искусственные акцепторы электронов, такие как феназинметосульфат (ФМС) и феназинэтосульфат (ФЭС). Рентгено-

структурный анализ показал, что белок является гетеротетрамером (α₂β₂). В больших α-субъединицах, кодируемых геном *mxaF*, находится активный центр с нековалентно связанной простетической группой – пирролохинолинхиноном (ПХХ) и Ca²⁺. Функции малой β-субъединицы, кодируемой геном *mxaI*, не ясны [5–7]. Несмотря на то, что МДГ исследована у многих бактерий [8–14], в последние годы повысился интерес к изучению новых форм этого фермента и свойств у разных видов метилотрофов из необычных мест обитания [15–17]. Это обусловлено как ключевой ролью в метаболизме C₁-соединений, так и перспективами использования фермента в биокатализе. Окислительно-восстановительные свойства, независимость от кислорода и специфичность МДГ являются основой для создания высокочувствительных биосенсоров и эффективных биотопливных элементов [18, 19].

Цель работы – очистка и характеристика основных свойств МДГ из ризосферного фитосимбионта *M. nodulans* для последующего использования в амперометрическом биосенсоре.

МЕТОДИКА

Объект и условия культивирования. *M. nodulans* ORS2060T (CNCM I 2342T = LMG 21967T), полученный от С.Дж. Маркса (Гарвардский университет, США), выращивали, как описано ранее, с 0.5% (по объему) метанола в качестве единственного источника углерода и энергии [4]. Клетки в

конце экспоненциальной фазы роста (3 сут) осаждали при 10000 g 20 мин на центрифуге Beckman J2-21 (США). Биомассу промывали 50 мМ трис-НСl буфером, рН 7.5, и хранили при -20°C .

Энзимологические исследования. Активность МДГ определяли спектрофотометрически при 600 нм ($\epsilon = 1.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) при 30°C по методу [20] с незначительной модификацией реакционной смеси. Стандартная реакционная смесь содержала: 100 мМ трис-НСl, рН 9.0, 15 мМ NH_4Cl , 2 мМ КСN, 10 мМ CH_3OH , 87 мкМ 2.6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ), 1.1 мМ ФМС. Реакцию начинали внесением фермента, измеряя начальную скорость в пределах 15–30 с. За единицу активности принимали количество МДГ, которое катализирует восстановление 1 мкмоль ДХФИФ за 1 мин. Если не указано особо, кинетические константы рассчитывали методом нелинейной регрессии с аппроксимацией экспериментальных данных к уравнению Михаэлиса–Ментен, используя программу “SigmaPlot 8.0”.

Электрофорез проводили в градиенте (10–20%) ПААГ в присутствии ДДС-Na по методу Лэмли. Гели окрашивали Кумасси R250 “Serva” (Германия). Для калибровки гелей использовали набор стандартных белков S8445 “Sigma–Aldrich” (США). Молекулярную массу нативного белка определяли гель-фильтрацией на колонке Bio-Sil TSK 250 “Bio-Rad Laboratories Inc.” (США), откалиброванной с помощью стандартных белков MWGF200 S8445 “Sigma–Aldrich” (США). Элюирующий буфер – 0.1 М калий фосфатный буфер (КФБ), рН 7.0. Скорость – 0.5 мл/мин. Белок определяли методом Брэдфорд, в качестве стандарта использовали БСА.

Изоэлектрофокусирование проводили в ПААГ, используя амфолины рН 3.5–10 “LKB” (Швеция) по рекомендациям фирмы. Для калибровки геля использовали набор стандартных белков 17-0471-01 “GE Healthcare” (Швеция).

Очистка МДГ. Клетки (20 г) ресуспендировали в 80 мл 0.1 М трис-НСl буфере (рН 7.5), содержащем 0.2 мг/мл лизоцима и 1 мМ ЭДТА и дезинтегрировали на установке “MSE” (Англия) при 150 Вт и 20 кГц и 4°C (30 с \times 16 с интервалами по 30 с). Полученный гомогенат центрифугировали при 15000 g 30 мин на “J2-21 “Beckman” (США). Все стадии очистки проводили при 4°C . Экстракт высаливали сульфатом аммония, получая фракцию от 40 до 60% от его насыщения. Осадок растворяли в 10 мМ трис-НСl буфере, рН 8.0, и обессоливали на колонке (1.6 \times 12 см) с сефадексом G-25, уравновешенной тем же буфером. Для удаления балластных белков и нуклеиновых кислот препарат пропускали со скоростью 0.8 мл/мин через колонку (16 \times 120 мм) с DEAE-Sepharose FF “GE Healthcare” (Швеция), уравновешенную тем же буфером. В этих условиях МДГ на колонке не

сорбировалась и препарат сразу наносили (0.5 мл/мин) на колонку (16 \times 50 мм) с гидроксипатитом HA-Ultrogel “LKB” (Швеция), используя тот же буфер. Колонку промывали тремя объемами 0.2 М NaCl в 25 мМ КФБ, рН 7.0, и элюировали МДГ градиентом 0.025–0.25 М КФБ с рН 7.0 (120 мл). Активные фракции объединяли, концентрировали на ультрафильтрационной мембране YM10 (“Amicon”). Обессоливание и замену буфера проводили, разбавляя образец в 20 раз 20 мМ 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислотой – NaOH (МЭС-NaOH) рН 5.5, и повторяли ультрафильтрацию трижды. В заключение проводили катионно-обменную ВЭЖХ на хроматографе LC-20 Prominence “Shimadzu” (Япония). Далее образец наносили на колонку (8 \times 75 мм) Protein Pak Glass SP-5PW “Waters” (США), уравновешенную 20 мМ буфером МЭС-NaOH, рН 5.5. После промывки колонки исходным буфером (15 мл) МДГ элюировали линейным градиентом 0–0.25 М NaCl (60 мл) при скорости 1 мл/мин. Активные фракции объединяли, затем концентрировали и переводили в 20 мМ КФБ, рН 7.0, ультрафильтрацией, как указано выше. Препарат хранили при -70°C .

Электрохимические измерения. Формирование рабочего электрода и электрохимические измерения проводили по описанной методике [21]. Электрод заполняли графитовой пастой, содержащей 10% ферроцена и 30% гидроксипатита (по массе). Фермент (0.26 ед.) наносили на поверхность электрода, подсушивали 30 мин. Буфер для измерений – 50 мМ КФБ, рН 8.0, с добавлением 15 мМ NH_4Cl . Электрод хранили при 4°C в 50 мМ КФБ, рН 7.0, содержащем 2.0 мМ КСN.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одностадийная очистка МДГ *M. nodulans* катионообменной хроматографией не привела к получению гомогенного препарата, как было показано для фермента из *Methylobacterium extorquens* AM1 [13]. Проведение хроматографии анионно-обменной и на гидроксипатите перед катионообменной также не приводило к получению гомогенного препарата, поэтому бесклеточный экстракт предварительно фракционировали сульфатом аммония благодаря чему, несмотря на потери, достигалась очистка в 6 раз. Так как фракции, полученные при насыщении сульфата аммония менее 40% и выше 60% содержали в совокупности не более 10% от суммарной активности МДГ, потери, по-видимому, были вызваны денатурацией белка. Использование разработанной схемы очистки позволило получить электрофоретически гомогенный препарат фермента (рис. 1). Результаты очистки МДГ представлены в табл. 1. После заключительной хроматографии на катионообменнике и концентрирования фермент был очищен в 18.2 раза с удельной активностью 3.8 ед./мг белка.

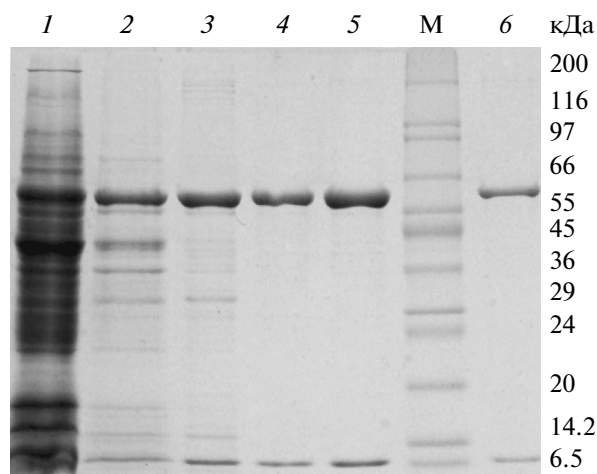


Рис. 1. ПААГ-электрофорез МДГ на разных стадиях очистки. 1 – гомогенат, 2 – 40–60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 – ДЭАЭ-сефароза, 4 – HA-Ultrogel и ультрафильтрация, 5, 6 – SP-5PW, М – маркеры.

Из этого следовало, что содержание МДГ в клетках *M. nodulans* составляло около 5% от общего растворимого белка, тогда как у других метиловых бактерий >10% [5]. Возможно, это связано с синтезом *M. nodulans* белков, необходимых для фотосинтеза.

ДДС-ПААГ-электрофорез очищенного белка выявил присутствие большой и малой субъединиц с молекулярными массами около 60.5 кДа и 6.5 кДа соответственно (рис. 1). Значения, рассчитанные на основании транслированных нуклеотидных последовательностей генов *mxaF* (Mnod_8040) большой (62548 Да) и малой *mxaI* (Mnod_8037) субъединиц (5838 Да) за вычетом сигнальных пептидов незначительно отличались от полученных данных. Молекулярная масса нативного белка, определенная методом гель-фильтрации в 0.1 М КФБ, рН 7.0, составляла около 70 кДа, что соответствовало гетеродимеру ($\alpha\beta$), состоящему из большой и малой субъединиц. Причем белковый пик на хроматограмме соответствовал пику активности МДГ. Увеличение ион-

ной силы буфера не отражалось на положении пика. Ранее аналогичным методом было показано существование мономерной формы МДГ у некоторых метилотрофов, по-видимому, из-за трудности детектирования β -субъединицы [22], хотя для большинства позднее доказана $\alpha_2\beta_2$ структура [5–7]. Изоэлектрическая точка находилась около рН 8.7, как и у большинства ранее изученных МДГ грамотрицательных бактерий [9, 11, 13].

В спектре поглощения МДГ *M. nodulans* наблюдали максимум при 350 нм и широкое плечо абсорбции до 410 нм. Такой спектр идентичен спектрам ПХХ-зависимых МДГ метилотрофных бактерий и свидетельствует о присутствии в белке восстановленной формы ПХХ. Именно в таком виде находится данная простетическая группа в чистых препаратах изученных ранее МДГ [23, 24].

Фермент *M. nodulans* характеризовался высокой стабильностью при хранении в отсутствие метанола относительно других белков. Очищенный препарат в 20 мМ КФБ (рН 7.0) при 4°C терял приблизительно 20% активности в течение недели и 40% при –20°C в течение месяца. При –70°C активность не изменялась в течение двух месяцев. В отличие от большинства МДГ фермент *M. nodulans* обладал стабильностью в широком диапазоне рН даже в отсутствие стабилизаторов, таких, как цианид и метанол (рис. 2). Подобной стабильностью обладал также фермент *Methylobacterium extorquens* [13]. МДГ *M. nodulans* в 0.1 М КФБ, рН 6.0, при концентрации белка 0.4 мг/мл сохраняла активность в течение 20 мин при 50°C, тогда как при 60°C потеря составляла 35%.

Зависимость активности МДГ от рН определяли в стандартной инкубационной смеси с различными 0.1 М буферами с рН от 6 до 10 (рис. 3). Максимальную активность фермент проявлял в диапазоне рН 9.0–10.0. Выше рН 10 активность не удалось измерить из-за неустойчивости ФМС и ДХФИФ. Оптимум рН- в щелочной области при 9 и выше характерен для всех исследованных МДГ в системе с искусственными акцепторами электронов, такими как ФМС [5–7].

Таблица 1. Очистка МДГ из *M. nodulans*

Стадия очистки	Удельная активность, ед./мг	Белок, мг/мл	Общая активность, ед.	Общий белок, мг	Выход, %	Степень очистки, раз
Экстракт	0.21	11.1	227.0	1080	100	1
40–60% насыщения сульфатом аммония	1.23	23.3	107.3	87.4	47	5.9
ДЭАЭ-сефароза	2.53	1.0	77.2	30.5	34	12.1
HA-Ultrogel	3.68	0.34	72.4	19.7	32	17.6
Ультрафильтрация	3.78	0.75	62.5	14.3	28	18
SP-5PW	3.82	1.38	52.7	13.8	23	18.2

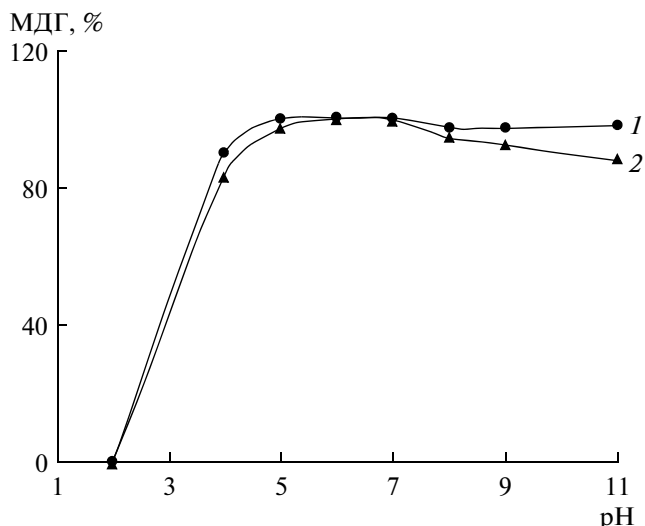


Рис. 2. Стабильность препарата МДГ (70 мкг/мл) при различных значениях рН и 30°С в течение 40 мин (1), 80 мин (2) в 0.1 М буферах: рН 2 – цитрат-NaOH; рН 4–5 – ацетат-NaOH; рН 6–7 – $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$; рН 8–9 – трис-HCl; рН 11 – $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$.

Активность МДГ в 0.1 М трис-HCl буфере, рН 9.0, в стандартной реакционной смеси линейно возрастала с увеличением температуры от 20 до 50°С. При более высоких температурах получить достоверные значения активности не удалось из-за неферментативных реакций ФМС и ДХФИФ.

Аналогично другим ПХХ-МДГ [5–7], активность *M. nodulans* с искусственными акцепторами электронов *in vitro* зависела от присутствия активатора – NH_4^+ . В отсутствие NH_4Cl , с метанолом и с эндогенным субстратом реакций не наблюдалось. Половина максимальной скорости достигалась при его концентрации 1.2 ± 0.3 мМ, когда акцептором являлся ФМС. Кроме аммония, стимулирующим действием на фермент *M. nodulans*, обладал метиламин, но при концентрации 40 мМ в реакционной смеси активность составляла только 26% от активности с 15 мМ NH_4Cl . Гидрохлориды диметиламина, триметиламина и этиламина не являлись активаторами МДГ *M. nodulans*.

Одной наиболее известной особенностью чистых препаратов ПХХ-МДГ является способность восстанавливать ФМС или ФЭС без метанола за счет не идентифицированного эндогенного субстрата [20]. Фермент *M. nodulans* с эндогенным субстратом проявлял активность при насыщающей концентрации метанола, делая невозможным непосредственное определение кинетических констант. Цианид ингибирует эту реакцию, являясь конкурентным ингибитором фермента при использовании в качестве субстрата метанола [23]. Используя метод Диксона, были рассчитаны кажущаяся ве-

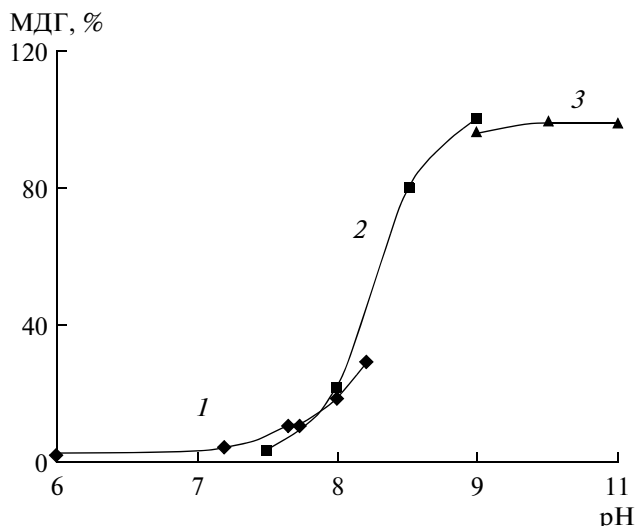


Рис. 3. Активность МДГ в зависимости от рН реакционной смеси. 1 – $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$; 2 – трис-HCl; 3 – глицин-NaOH. Все буферы 0.1 М.

личина K_M в отсутствие KCN – 70 мкМ и константа ингибирования K_i – 0.65 мМ.

Зависимости обратных значений начальных скоростей МДГ *M. nodulans* от обратных концентраций метанола при фиксированных концентрациях ФМС в присутствии 2 мМ KCN (рис. 4) представляли серию параллельных прямых, характерных для Ping-Pong механизма, что согласуется с данными литературы [5–7].

Кинетические константы, рассчитанные по методу Дальзиела в соответствии с уравнением: $\frac{E}{v} = \phi_0 + \frac{\phi_A}{[A]} + \frac{\phi_B}{[B]}$, составляли: $K_{M[\text{CH}_3\text{OH}]}$ = 0.37 мМ;

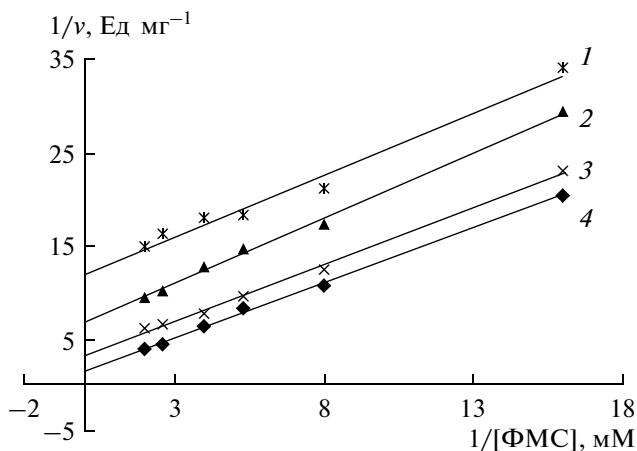


Рис. 4. Зависимость начальной скорости МДГ от концентрации ФМС при фиксированных концентрациях метанола (мМ): 1 – 0.025; 2 – 0.05; 3 – 0.08; 4 – 0.5.

Таблица 2. Субстратная специфичность МДГ *M. nodulans*

Субстрат	Кажущиеся K_M , мМ	Активность, %
Метанол	0.23 ± 0.01	100
Этанол	0.61 ± 0.06	93
Бутанол-1	1.9 ± 0.2	88
Амиловый спирт	1.4 ± 0.1	89
Формальдегид	7.2 ± 0.8	96
Ацетальдегид	14.9 ± 0.6	50
ФМС*	0.91 ± 0.02	100
ФЭС*	1.52 ± 0.11	80

* Субстрат – 10 мМ метанол.

Таблица 3. Влияние различных соединений на активность МДГ

Вещество	Концентрация, мМ	Активность, %
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1	71
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	53
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	88
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.1	0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1	96
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	102
NaN_3	1	99
NaCl	500	90
п-Хлормеркурибензоат	0.1	74
Этилендиаминтетраацетат	1	110
$\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$	0.1	88
Дитиотреитол	0.1	100
2-Оксоглутарат	1	77
D-Трегалоза	5%	82
D-Сорбит	5%	67
Полиэтиленимин	0.1%	115
Поливинилпирролидон	0.5%	61
ДСН	0.1%	47
Бридж 35	0.1%	73

K_M [ФМС] = 0.96 мМ; $V_{\text{макс}} = 7.1$ мкмоль/мг белка. Аналогичные значения K_M к донору и акцептору электронов в присутствии 1 мМ KCN были получены для МДГ *Hyphomicrobium X* [25].

Подобно другим МДГ [5–7], исследуемый фермент проявлял широкую субстратную специфичность относительно первичных спиртов, но не окислял вторичные и бензиловый спирт (табл. 2). Фермент обладал наибольшим сродством к метанолу. В целом, с увеличением длины углеродной цепи первичных спиртов возрастало кажущееся значение K_M фермента, тогда как максимальная скорость реакции изменялась незначительно.

Субстратами являлись также формальдегид и ацетальдегид, которые при высоких концентрациях ингибировали МДГ. ФМС оказался более эффективным акцептором электронов, чем ФЭС, что было показано для МДГ *Hyphomicrobium X* [23].

Действие различных соединений на активность фермента *M. nodulans in vitro* (табл. 3) было аналогично изученным МДГ [8, 11, 14]. Фермент также нечувствителен к ЭДТА и относительно устойчив к сульфгидрильному реагенту, п-хлормеркурибензоату. Катионы меди, железа и особенно марганца – сильные ингибиторы описанных МДГ [11, 13], за исключением МДГ *Methylosinus* sp. WI 14 [12]. На активность фермента негативно влияли детергенты, поливинилпирролидон и сорбит. Вместе с тем белок устойчив к NaCl, ДТТ, NaN_3 , D-трегалозе и полиэтиленимину. Гидроксиламин – конкурентный ингибитор по отношению к метанолу для МДГ *Hyphomicrobium X* [25], незначительно подавлял активность изучаемого фермента.

Таким образом, высокая стабильность и сродство к метанолу делает МДГ *M. nodulans* одним из наиболее перспективных ферментов для создания амперометрического биосенсора. Очищенный препарат МДГ был иммобилизован на поверхность графитово-пастового электрода, содержащего медиатор электронного транспорта – ферроцен. Для улучшения адсорбции гидрофильного фермента на поверхности гидрофобного электрода в графитовую пасту добавляли гидроксипатит. При этом отклик биосенсора увеличивался в 10 раз и улучшалась операционная стабильность. Среднее значение для полученных откликов биосенсора на 0.25 мМ метанола для электрода, модифицированного гидроксипатитом, составило 1400 ± 100 нА. Относительное стандартное отклонение для 15 последовательных измерений – 7.6%, тогда как без гидроксипатита относительное стандартное отклонение составило 83%. Линейный диапазон определяемых концентраций метанола 0.0135–0.5 мМ, предел обнаружения – 4.5 мкМ CH_3OH , длительность единичного измерения – 10 мин; при хранении электрода в течение 20 сут сохранялось 75% активности. Подбор оптимальных условий использования и хранения электрода, концентраций гидроксипатита, ферроцена и, возможно, более эффективных медиаторов электронного транспорта требует дополнительных исследований.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 11-04-97544-р_центр_a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sy A., Giraud E., Jourand P., Garcia N., Willems A., de Lajudie P., Prin Y., Neyra M., Gillis M., Boivin-Masson C., Dreyfus B. // J. Bacteriol. 2001. V. 183. № 1. P. 214–220.

2. Jourand P., Renier A., Rapior S., Miana de Faria S., Prin Y., Galiana A., Giraud E., Dreyfus B. // *Mol. Plant-Microbe Interactions*. 2005. V. 18. № 10. P. 1061–1068.
3. Renier A., De Faria S.M., Jourand P., Giraud E., Dreyfus B., Rapior S., Prin Y. // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. № 10. P. 3693–3697.
4. Капарулина Е.Н., Быкова Т.В., Федоров Д.Н., Дорошина Н.В., Троценко Ю.А. // *Микробиология*. 2001. Т. 80. № 6. С. 847–849.
5. Anthony C. // *Adv. Microb. Physiol.* 1986. V. 27. P. 113–210.
6. Anthony C., Williams P. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2003. V. 1647. P. 18–23.
7. Anthony C. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2004. V. 428. № 1. P. 2–9.
8. Ghosh R., Quayle J.R. // *Biochem. J.* 1981. V. 199. № 1. P. 245–250.
9. Соколов А.П., Говорухина Н.И., Троценко Ю.А. // *Биохимия*. 1989. Т. 54. № 5. С. 811–815.
10. Duine J.A., Frank J., Westerling J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1978. V. 524. № 2. P. 277–287.
11. Grosse S., Wendlandt K.D., Kleber H.P. // *J. Basic Microbiol.* 1997. V. 37. № 4. P. 269–279.
12. Grosse S., Voigt C., Wendlandt K.D., Kleber H.P. // *J. Basic Microbiol.* 1998. V. 38. № 3. P. 189–196.
13. Liu Q., Kirchhoff J.R., Faehnle C.R., Viola R.E., Hudson R.A. // *Protein Expr. Purif.* 2006. V. 46. № 2. P. 316–320.
14. Kim H.G., Kim S.W. // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2006. V. 11. P. 134–139.
15. Chang A.K., Lim C.Y., Kim S.W., You H.J., Hahm K.S., Yoon S.M., Park J.K., Lee J.S. // *J. Basic Microbiol.* 2002. V. 42. № 2. P. 238–245.
16. Kalyuzhnaya M.G., Hristova K.R., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. № 11. P. 3817–3823.
17. Schmidt S., Christen P., Kiefer P., Vorholt J.A. // *Microbiology*. 2010. V. 156. P. 2575–2586.
18. Karube I., Yokoyama K., Kitagawa Y. *Principles and Applications of Quinoproteins* / Ed. V.L. Davidson. New York: Marcel Dekker, 1992. P. 429–446.
19. Ikeda T., Kano K. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2003. V. 1647. № 1–2. P. 121–126.
20. Day D.J., Anthony C. // *Methods Enzymol.* 1990. V. 188. P. 210–216.
21. Babkina E., Chigrinova E., Ponamoreva O., Alferov V., Reshetilov A. // *Electroanalysis*. 2006. V. 18. № 19–20. P. 2023–2029.
22. Duine J.A., Jongejan J.A. // *Annu. Rev. Biochem.* 1989. V. 58. P. 403–426.
23. Frank J., Duine J.A. // *Methods Enzymol.* 1990. V. 188. P. 202–209.
24. Richardson I.W., Anthony C. // *Biochem. J.* 1992. V. 287. P. 709–715.
25. Duine J.A., Frank J. // *Biochem. J.* 1980. V. 187. № 1. P. 213–219.

Purification and Characteristics of Methanol Dehydrogenase of *Methylobacterium nodulans* Rhizosphere Phytosymbionts

T. A. Kuznetsova^b, A. P. Beschastnyi^a, O. N. Ponamoreva^b, and Yu. A. Trotsenko^a

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

^b *Tula State University, Tula, 300600 Russia*

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Received May 5, 2012

Abstract—Methanol dehydrogenase (MDG) of the facultative methylotrophic phytosymbiont *Methylobacterium nodulans* has been purified for the first time to an electrophoretically homogeneous state and characterized. The native protein with a molecular mass of 70 kDa consists of large (60 kDa) and small (6 kDa) subunits. The purified protein displayed a specter identical to that of pyrocinolinchinon (PCC)-containing MDGs (pI 8.7, pH optimum in the range 9–10). The enzyme was inactive in the absence of ammonium or methylamine and exhibited a wide substrate specificity with regard to C₁–C₂ alcohols with the highest affinity to methanol ($K_M = 70$ mM), but it did not oxidize benzyl and secondary alcohols. The apparent values of K_M to primary alcohols increased with the length of the carbonic chain. The enzyme was characterized by a high stability level even in the absence of a substrate. An immobilized enzyme was used for amperometric methanol detection.

УДК 57.083.133

КАТАЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ

© 2012 г. О. А. Гоголева, Н. В. Немцева, О. В. Бухарин

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН,

г. Оренбург, 460000, olik-g@yandex.ru, ikvs@mail.esoo.ru

Поступила в редакцию 21.11.2011 г.

Изучена динамика каталазной активности углеводородоокисляющих бактерий *Gordona terrae*, *Rhodococcus rubropertinctus* и *Rhodococcus erythropolis* в процессе деструкции нефтепродуктов. Экспериментально установлена прямая зависимость между снижением каталазной активности углеводородоокисляющих микроорганизмов и интенсивностью деструкции нефтепродуктов. Найденная зависимость позволяет рассматривать каталазную активность бактерий в качестве индикатора начального этапа окисления нефтепродуктов и может найти применение при выборе штаммов-деструкторов с целью создания биопрепаратов, пригодных для ремедиации природных экосистем.

Наиболее распространенными и опасными загрязнителями окружающей среды являются нефть и продукты ее переработки, которые, попадая в водную среду, подвергаются действию физических, химических и биологических факторов. Образующиеся при этом продукты окисления могут быть токсичнее исходного вещества. В результате угнетается жизнедеятельность гидробионтов, что отрицательно сказывается на структуре водных сообществ и экосистем [1, 2]. Поэтому исследование способов биодegradации углеводородов имеет большое экологическое значение.

Многие аэробные и анаэробные микроорганизмы, различающиеся набором ферментных систем, а также метаболическими путями потребления углеводородов, способны использовать нефть и нефтепродукты в качестве источника углерода и энергии. При этом скорость и полнота разрушения нефтяных углеводородов зависит от ряда факторов, в частности от температуры, pH среды, содержания кислорода в воде и т.п. [3]. Для аэробных микроорганизмов важнейшим фактором успешного окисления нефти и нефтепродуктов является достаточное содержание растворенного кислорода, необходимое для преобразования нефтяных фракций [4]. Образующиеся при этом пероксиды ускоряют процессы окисления. Одним из ферментов антиоксидантной защиты является каталаза [5], роль которой в процессе деструкции нефти недостаточно изучена.

Цель работы – оценка каталазной активности углеводородоокисляющих бактерий и ее динамики в процессе деструкции нефти и нефтепродуктов.

МЕТОДИКА

Были отобраны чистые культуры углеводородоокисляющих бактерий: *Gordona terrae* (Tsukamura 1971) Stackebrandt et al. 1989 ИКВС № 19, *Rhodo-*

coccus rubropertinctus (Hefferan 1904) Tsukamura 1974 ИКВС № 15, *Rhodococcus erythropolis* (Grey and Thornton 1928) Goodfellow and Alderson 1979 ИКВС № 11, выделенные нами ранее из природной среды и содержащиеся в лабораторных условиях.

Для выращивания культур использовали модифицированную агаризированную среду Чапека [6]. Культуры выращивали в чашках Петри при 25–27°C, в течение 48 ч. Через 48 ч из выросших культур готовили взвесь по стандарту мутности БАК-5 (ГНИСК им. Л.А. Тарасевича).

Поллитровые флаконы заполняли средой Раймонда [6] в объеме 250 мл, в которые вносили микробную взвесь в количестве 1 см³ так, чтобы конечная концентрация бактерий составила 10⁶ кл./см³. В качестве единственного источника углерода в среду добавляли 1 см³ дизельного топлива, при этом конечная концентрация во флаконе составляла 610 мг/дм³. Эксперимент проводили в течение 35 сут, инкубацию осуществляли в термостатируемой комнате при 25–27°C в условиях естественного освещения.

В процессе эксперимента рост численности бактерий учитывали чашечным методом. Подсчет выросших на чашках колоний осуществляли в автоматическом режиме с помощью счетчика колоний ProtoCOL HR (“Synoptics Ltd”, Великобритания).

Содержание нефтепродуктов в опытных образцах определяли в аккредитованном испытательном центре Федерального государственного учреждения здравоохранения “Центр гигиены и эпидемиологии в Оренбургской области” с помощью флуориметрического метода на жидкостном анализаторе Флюорат – 02 (“Люмэкс”, Россия). Для этого 100 мл культуральной жидкости переносили в делительную воронку, отбирали 10 мл

гексана и ополаскивали им сосуд, в котором находилась проба, затем гексан помещали в делительную воронку. Смесь перемешивали 30 с, отстаивали до появления прозрачного верхнего слоя, который отделяли, помещали в кювету и измеряли концентрацию нефтепродуктов в экстракте. Водную фазу отбирали в цилиндр и точно фиксировали ее объем.

Концентрацию нефтепродукта рассчитывали по формуле:

$$X_{\text{пр}} = \frac{X_{\text{изм}} V_r K_1}{V_{\text{пр}}}$$

где $X_{\text{пр}}$ – концентрация нефтепродуктов в пробе воды, мг/мл; $X_{\text{изм}}$ – концентрация нефтепродуктов в растворе гексана, измеренная на приборе, мг/л; V_r – объем гексана, взятый для экстракции, мл; $V_{\text{пр}}$ – объем пробы, мл; K_1 – степень разбавления экстракта.

Содержание нефтепродуктов в исследуемом образце выражали в процентах от исходной концентрации.

Наличие и уровень каталазной активности углеводородоокисляющих бактерий определяли фотометрически по методике Бухарина О.В. с соавт. [7]. Для этого исследуемые штаммы высевали из опытных образцов на твердую питательную среду Чапека, не содержащую нефтепродукты. Посевы инкубировали в течение 3 сут при 25°C, затем из выросших колоний приготавливали взвесь с оптической плотностью 0.2 усл. ед. (при длине волны 492 нм). К 0.2 мл полученной взвеси исследуемого штамма добавляли 1 мл свежеприготовленного 0.0125 М раствора пероксида водорода и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, реакцию разложения пероксида водорода каталазой останавливали добавлением 5 капель 2 н. раствора соляной кислоты. Затем добавляли 1 мл свежеприготовленного 0.025 М раствора йодида калия, тщательно перемешивали и осаждали клетки исследуемого штамма центрифугированием в течение 15 мин при 3000 g. Через 10 мин после центрифугирования измеряли поглощение света образовавшегося в надосадочной жидкости комплекса йод–йодид калия (при длине волны 492 нм в плоскодонном полистироловом 96-луночном планшете с ячейкой объемом 0.25 мл на фотометре “ИФА-ОЭП” (ТОО “Оптоэлектронные приборы”, Россия).

Расчет активности каталазы проводили по формуле:

$$A_{\text{кат}} = \frac{12.500(1 - \text{ОП}_0 / \text{ОП}_k)}{T \times \text{ОП}_m}$$

где $A_{\text{кат}}$ – активность каталазы, микромоль/мин · ОП; ОП_0 – оптическая плотность комплекса йод–йодид калия в опыте; ОП_k – оптическая плот-

ность комплекса йод–йодид калия в контроле, полученном путем смешивания исходных объемов растворов пероксида водорода, йодида калия и соляной кислоты; T – время инкубации исследуемой культуры с пероксидом водорода; ОП_m – оптическая плотность микробной взвеси, взятой для определения каталазной активности.

Каталазную активность исследуемой культуры бактерий выражали в процентах от исходного уровня.

Количество пероксидов, образующееся в процессе деструкции, регистрировали в опытных образцах по реакции окисления люминола (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион), сопровождающейся хемилюминесценцией в присутствии пероксида водорода и пероксидазы [8]. Для этого использовали культуральную среду, отобранную из опытных флаконов с исследуемыми штаммами и нефтепродуктами. Интенсивность хемилюминесценции измеряли на хемилюминомере ХЛ-003 (“УГАТУ”, Россия). В камеру прибора помещали кювету с раствором, содержащим 10 мл калий-фосфатного буфера (0.01 М $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 1 мМ KCl , рН 6.5), 2 мл раствора пероксидазы хрена (“Merck”, Германия, конечная активность 15 ед./мл), приготовленного на калий-фосфатном буфере, 2 мл люминола (“Merck”, Германия, 0.05 мг/мл), растворенного в дистиллированной воде, и 0.5 мл культуральной среды. Камеру закрывали и при непрерывном помешивании с равномерной скоростью в кювету вносили еще 0.5 мл культуральной среды. Наличие пероксида водорода оценивали по вспышке хемилюминесценции.

Данные, полученные в результате проведенных исследований, были подвергнуты статистической обработке [9] с помощью программы MS Excel 2007. Определялся коэффициент корреляции Пирсона, статистическая значимость коэффициента корреляции оценивалась с помощью критерия Стьюдента при уровне значимости $p = 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика численности микроорганизмов при деструкции дизельного топлива. В экспериментальных условиях при росте на минеральной среде с добавлением дизельного топлива наблюдали увеличение численности клеток исследуемых культур микроорганизмов, кривые роста которых представлены на рис. 1. Как видно из представленных данных, у штамма *G. terrae* отмечено увеличение численности клеток на два порядка в течение первых 6 сут культивирования. Начиная с 7 сут, наблюдали снижение численности бактерий. У *R. rubropertinctus* увеличение численности зарегистрировано на один порядок, максимальные значения отмечали на 6–12 сут. К 23 сут численность бактерий снижалась и продолжала па-

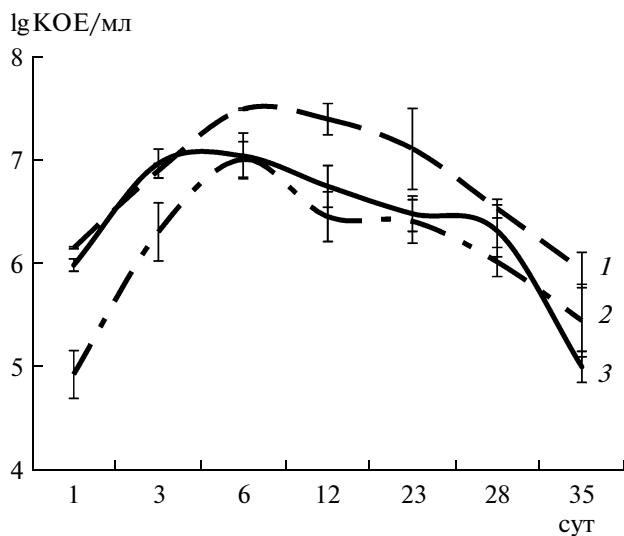


Рис. 1. Динамика численности микроорганизмов в процессе деструкции дизельного топлива 1 – *R. rubropertinctus* ИКВС № 15, 2 – *G. terrae* ИКВС № 19, 3 – *R. erythropolis* ИКВС № 11.

дать вплоть до конца эксперимента. У *R. erythropolis* увеличение численности на протяжении первых суток было незначительным и, к концу эксперимента, количество клеток у этого штамма было ниже исходного уровня.

Полученные данные свидетельствуют о разной интенсивности роста исследуемых культур на среде с дизельным топливом, что можно объяснить различной интенсивностью потребления нефтепродукта.

Потребление микроорганизмами дизельного топлива. В процессе исследования было проведено определение интенсивности потребления нефтепродукта исследуемыми культурами микроорганизмов. Первоначальная концентрация дизельного топлива составляла 610 ± 0.5 мг/л, что соответствовало 100% содержанию нефтепродукта в исходной среде. Максимальное потребление дизельного топлива отмечено у *G. terrae* – содержание нефтепродукта в среде к 6 сут составило $4.4 \pm 1.83\%$. У *R. rubropertinctus* потребление нефтепродукта нарастало постепенно и к 23 сут содержание дизельного топлива в среде составило $62 \pm 4.13\%$. По результатам химического анализа снижение концентрации дизельного топлива в питательной среде при росте *R. erythropolis* было сопоставимо с естественным испарением нефтепродукта, регистрируемым в контроле (рис. 2). Исходя из полученных данных, штамм *R. erythropolis* не использовал дизельное топливо в качестве источника углерода.

В результате проведенных исследований установлено, что максимум углеводородокисляющей активности штаммов приходился на 6–12 сут экс-

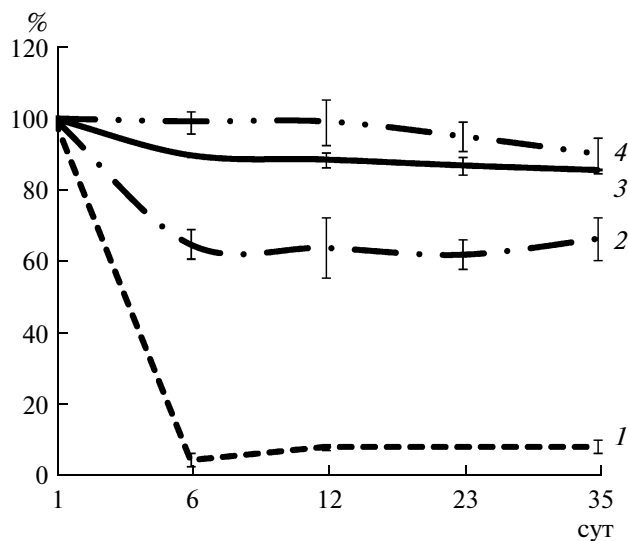


Рис. 2. Изменение количества дизельного топлива в процессе микробной деструкции 1 – *G. terrae* ИКВС № 19, 2 – *R. rubropertinctus* ИКВС № 15, 3 – *R. erythropolis* ИКВС № 11, 4 – контроль.

перимента. В этот же период отмечен рост численности клеток штаммов *G. terrae* и *R. rubropertinctus*.

Установлено, что в условиях использования дизельного топлива в качестве единственного источника углерода и энергии исследуемые микроорганизмы *G. terrae* и *R. rubropertinctus* способны к потреблению углеводов, в отличие от *R. erythropolis*.

Определение гидропероксидов в среде при деструкции дизельного топлива. Известно, что на начальном этапе деструкции происходит окисление субстрата молекулярным кислородом с участием ферментных систем, следствием этого процесса является образование пероксидов и гидропероксидов. Данные соединения выявляются в реакции окисления люминола, сопровождающейся хемолюминесценцией. При этом, как правило, наблюдается интенсивная хемилюминесценция, что свидетельствует о высокой концентрации образующихся гидропероксидов [10].

Исходя из данных, представленных на рис. 3, наиболее низкие значения интенсивности хемилюминесценции, по сравнению с контролем, наблюдали в опыте с *G. terrae*. Максимальная интенсивность хемилюминесценции в опыте с *G. terrae* была отмечена на 6 сут. К 12 сут кривая этих показателей резко снижалась и находилась на нулевой отметке вплоть до окончания эксперимента (35 сут). В опыте с *R. rubropertinctus* отмечена более интенсивная и продолжительная хемилюминесценция по сравнению с предыдущим штаммом. Максимальные значения регистрировали на 6 сут эксперимента, после чего интенсивность хемилюминесценции постепенно снижалась вплоть

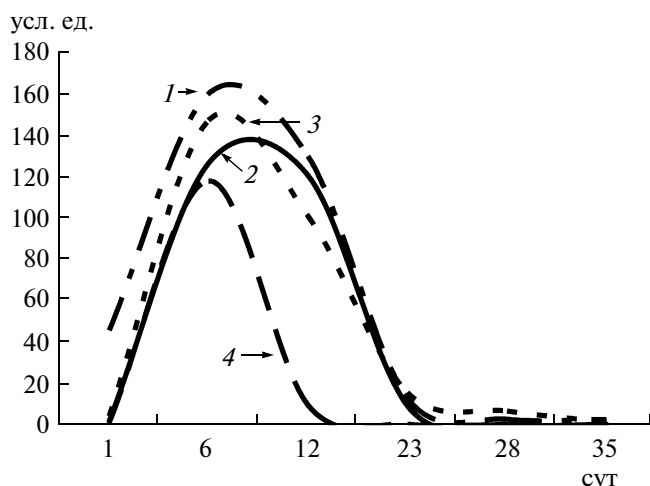


Рис. 3. Интенсивность хемилюминесценции при микробной деструкции дизельного топлива 1 – контроль, 2 – *R. rubropertinctus* ИКВС № 15, 3 – *R. erythropolis* ИКВС № 11, 4 – *G. terrae* ИКВС № 19.

до 23 сут, и этот период совпадал с постепенным истощением нефтепродукта в среде (рис. 3).

В эксперименте с *R. erythropolis* интенсивность хемилюминесценции среды была более выражена, чем в экспериментах со штаммами *G. terrae* и *R. rubropertinctus*. Исходя из результатов химического анализа нефтепродуктов, свидетельствующего об отсутствии потребления субстрата штаммом *R. erythropolis*, снижение интенсивности хемилюминесценции в этом случае можно объяснить естественными процессами, связанными с выбросом из отмирающих бактериальных клеток высокомолекулярных соединений, которые могут служить ловушками для гидропероксидов и свободных радикалов, а также снижать интенсивность хемилюминесценции среды [11]. Отмечено, что интенсивность хемилюминесценции среды в контроле, не содержащем бактерий, снижалась после 12 сут (рис. 3). Происходящее явление, вероятно, связано с процессами автоокисления, протекающими за счет свободных радикалов, а также гидропероксидов, изначально содержащихся в нефтепродукте [12]. Условия эксперимента (рассеянный свет, температура) не способствовали поддержанию процесса автоиницированного окисления, что приводило к постепенному уменьшению гидропероксидов в контроле и снижению интенсивности хемилюминесценции.

Таким образом, деструкция углеводов бактериями сопровождается образованием гидропероксидов.

Динамика каталазной активности микроорганизмов в процессе деструкции дизельного топлива. В процессе деструкции дизельного топлива выявлено снижение каталазной активности бактерий по мере увеличения потребления нефтепродукта,

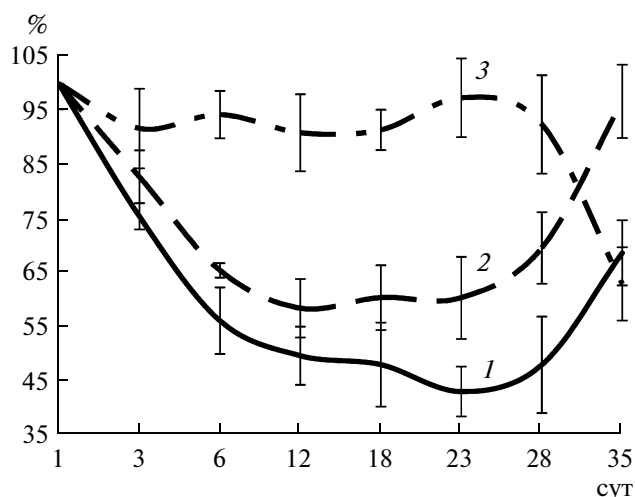


Рис. 4. Динамика каталазной активности штаммов в процессе деструкции дизельного топлива 1 – *G. terrae* ИКВС № 19, 2 – *R. rubropertinctus* ИКВС № 15, 3 – *R. erythropolis* ИКВС № 11.

наиболее выраженное у *G. terrae* и *R. rubropertinctus* (рис. 4).

Исходная каталазная активность *G. terrae* составляла 3.05 ± 0.06 усл. ед., что соответствовало 100%. К 6 сут каталазная активность снизилась на $43.6 \pm 6.14\%$, к 12 сут – на $50.1 \pm 5.36\%$, а к 35 сут эксперимента отмечено увеличение каталазной активности бактерий.

Исходная каталазная активность *R. rubropertinctus* составляла 4.4 ± 0.22 усл. ед., что соответствовало 100%. К 6 сут каталазная активность штамма снизилась на $17.1 \pm 1.33\%$, к 23 сут – на $36.8 \pm 7.58\%$, после чего наблюдалось восстановление уровня каталазной активности до исходного уровня (рис. 4).

У *R. erythropolis* зарегистрировано незначительное снижение каталазной активности только к 35 сут эксперимента, что было связано с отмиранием бактериальной массы (рис. 4).

Таким образом, в процессе проведенных исследований отмечено, что у штамма, не использующего нефтепродукт, численность бактерий и каталазная активность практически не менялись в процессе эксперимента, оставаясь на уровне, близком к исходному. В то же время, для бактерий – активных деструкторов нефтепродуктов характерно увеличение численности бактерий и снижение каталазной активности. Оценка корреляционной зависимости между снижением каталазной активности (% от исходного уровня) и снижением концентрации нефтепродукта (% от исходного уровня) показала сильную положительную связь между этими показателями для *G. terrae* ($r = 0.98$; $p = 0.01$) и *R. rubropertinctus* ($r = 0.93$; $p = 0.05$). Напротив, у штамма *R. erythropolis* эта связь отсутствовала ($r = 0.02$).

Полученные данные позволяют выделить в процессе микробной деструкции 2 стадии. В первую стадию наблюдается высокая интенсивность хемилюминесценции культуральной среды, что свидетельствует об образовании активных форм кислорода в результате окисления субстрата с участием оксигеназ бактерий. При этом регистрируется интенсивное увеличение численности бактерий с одновременным снижением их каталазной активности. Вторая стадия деструкции сопровождается снижением интенсивности хемилюминесценции среды и наступает после потребления большей части субстрата. В эту стадию регистрируется увеличение каталазной активности бактерий на фоне снижения их численности.

Представляет интерес снижение каталазной активности бактерий при одновременном увеличении их численности, наблюдаемое в условиях накопления активных форм кислорода. По-видимому, подобная противофазная динамика указывает на включение альтернативных механизмов клеточной защиты от активных форм кислорода. В условиях окислительного стресса ферментная защита бактериальной клетки с помощью каталазы менее эффективна вследствие быстрой инактивации ферментов и длительного периода времени, необходимого для их повторного накопления [13]. Инактивация каталазы кислородными радикалами и избытком гидропероксидов ранее была показана в работах Н.М. Эмануэля [14]. В нашем исследовании удалось обнаружить еще один механизм снижения каталазной активности в процессе деструкции углеводов, заключающийся в уменьшении экспрессивности этого свойства у бактерий, выделенных из среды с дизельным топливом на твердой питательной среде (без нефтепродуктов). Это свидетельствует о внутривнутрипопуляционных перестройках, направленных на снижение общепопуляционного уровня каталазной активности бактерий. В таких условиях возрастает роль альтернативных антиоксидантов — полисахаридов, трегалозы и миколатов трегалозы [15]. Можно предположить, что в определенные периоды деструкции углеводов бактериями неферментные антиоксиданты осуществляют эффективную защиту от активных форм кислорода, позволяя бактериям не расходовать питательные вещества и энергию на синтез антиоксидантных ферментов, в частности каталазы.

Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что снижение каталазной активности углеводородокисляющих бактерий можно рассматривать, поясняя к сказанному, как индикатор интенсивности процесса деструкции нефти и нефтепродуктов. Установленная закономерность была использована для разработки способа выбора штаммов-деструкторов нефти и нефтепродуктов, основанного на снижении каталазной активности бактерий при потреблении углеводов

[16]. С применением данного способа был выделен новый штамм, активно окисляющий нефть и нефтепродукты *G. terrae* ВКПМ Ас-1741 [17].

Таким образом, выявленная закономерность снижения каталазной активности микроорганизмов-деструкторов в процессе деструкции углеводов позволяет рассматривать каталазную активность бактерий в качестве индикатора начального этапа окисления нефтепродуктов, что имеет практическое значение и может использоваться для выбора штаммов-деструкторов с целью создания биопрепаратов, пригодных для ремедиации природных экосистем.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Живая природа” (проект № 12-П-4-1039) и гранта УрО РАН (№ 12-И-4-2034).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Миронов О.Г. // Гидробиол. журн. 2000. Т. 36. № 1. С. 82–96.
2. Пельшенко В.И., Савицкий В.Н., Стецько Н.С., Михайленко В.П. // Гидробиол. журн. 1991. Т. 27. № 6. С. 54–59.
3. Коронелли Т.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 1996. Т. 32. № 6. С. 579–585.
4. Миронов О.Г. // Морской эколог. журн. 2002. Т. 1. № 1. С. 56–66.
5. Современная микробиология. Прокариоты. Т. 1. / Ред. Й. Ленгелер, Г. Древис, Г. Шлегель. М.: Мир, 2005. 656 с.
6. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 288 с.
7. Бухарин О.В., Черкасов С.В., Сгибнев А.В., Забирова Т.М., Иванов Ю.Б. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2000. Т. 130. № 7. С. 80–82.
8. Хайруллин Р.М., Ахметова И.Э. // Биохимия. 2001. Т. 66. № 3. С. 349–353.
9. Глац С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
10. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. // Усп. соврем. биол. 1993. № 4(113). С. 442–455.
11. Петров А.А. Углеводороды нефти. М.: Наука, 1984. С. 264.
12. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. // Усп. соврем. естествознания. 2006. № 7. С. 29–36.
13. Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. // Усп. соврем. биол. 1993. Т. 113. № 4. С. 456–469.
14. Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. М.: Наука, 1965. С. 370.
15. Феофилова Е.П. // Микробиология. 1992. Т. 61. № 5. С. 741–755.
16. Патент РФ. 2011. № 2426781.
17. Патент РФ. 2010. № 2396340.

Catalase Activity of Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria

O. A. Gogoleva, N. V. Nemtseva, and O. V. Bukharin

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, 460000 Russia
e-mail: olik-g@yandex.ru, ikvs@mail.ru.esoo.ru

Received November 21, 2011

Abstract—The dynamics of catalase activity of the hydrocarbon-oxidizing bacteria *Cordona terrae*, *Rhodococcus rubropertinctus*, and *Rhodococcus erythropolis* during petroleum product destruction has been studied. A direct relationship between decreasing catalase activity of hydrocarbon-oxidizing microorganisms and the intensity of petroleum product destruction has been established experimentally. The revealed dependence allows one to consider the catalase activity of bacteria as an indicator of the initial stage of petroleum product oxidation and may be used for choosing destructor strains to construct biopreparations suitable for natural ecosystem remediation.

УДК 579.66

ХАРАКТЕРИСТИКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИОЦИНОВ, ОБРАЗУЕМЫХ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К

© 2012 г. Е. А. Устюгова*, А. В. Тимофеева**, Л. Г. Стоянова*,
А. И. Нетрусов*, Г. С. Катруха***

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва 119992

** Научно-исследовательский институт физико-химической биологии

им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва 119991

***ФГБУ научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков

им. Г.Ф. Гаузе РАН, Москва 119021

e-mail: ustyugova.katya@mail.ru, stoyanovamsu@mail.ru

Поступила в редакцию 26.01.2012 г.

Установлено, что штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К обладал способностью к образованию двух бактериоцинов, один из которых был идентифицирован как известный лантибиотик низин А, а другой бактериоцин 194-Д представлял собой полипептид с молекулярной массой 2589 Да и состоял из 20 аминокислотных остатков. Оба бактериоцина в различном соотношении образовывались на всех изученных питательных средах, поддерживающих рост продуцента. В зависимости от среды культивирования содержание низина А в культуральной жидкости штамма 194-К было в 380–1123 раз меньше, чем пептида 194-Д. Бактериоцин 194-Д в отличие от низина А обладал широким спектром антибактериального действия и подавлял рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Показано, что оптимальной средой для синтеза бактериоцина 194-Д была ферментационная среда, содержащая глюкозу, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина и фосфат калия. Биосинтез бактериоцина 194-Д штаммом 194-К на этой среде происходил параллельно росту продуцента, а максимальное накопление его в культуральной жидкости наблюдали к 14–20 ч роста штамма.

В последние годы большое внимание уделяется поиску новых антимикробных пептидов — бактериоцинов, продуцируемых молочнокислыми бактериями (МКБ). Бактериоцины МКБ находят широкое применение в пищевой промышленности в качестве консервантов [1, 2]. Их основные преимущества заключаются в том, что они безопасны, так как легко расщепляются ферментами пищеварительного тракта, термостабильны, а также обладают относительно широким спектром антимикробного действия [3, 4]. По химической природе бактериоцины представляют собой катионные пептиды, которые синтезируются на рибосомах и в зависимости от структуры и аминокислотной последовательности подразделяются на 4 класса: I — лантибиотики, содержащие модифицированные аминокислоты (лантионин и метиллантионин); II — бактериоцины, содержащие белковые аминокислоты (IIa подкласс), либо IIb подкласс — дипептидные бактерицины [5]. III и IV — классы бактериоцинов включают крупные (с молекулярной массой более 30 кДа) термолабильные белки [6].

Известными продуцентами бактериоцинов среди МКБ являются бактерии вида *Lactococcus lactis*, которые образуют широко используемый в пищевой промышленности бактериоцин низин

А. Однако частое и бесконтрольное применение низина привело к появлению резистентных к нему патогенных бактерий. Кроме этого, низин подавляет развитие только грамположительных бактерий, что ограничивает область его применения [7, 8]. Поэтому поиск новых бактериоцинов с более широким спектром действия является актуальной проблемой.

На кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова из коровьего молока Бурятии был выделен штамм *L. lactis* subsp. *lactis* 194-К, который обладал широким спектром антимикробного действия, включая и фунгицидное [9, 10]. Было установлено, что за антимикробную активность штамма отвечает антибиотический комплекс, состоящий из пяти отдельных компонентов 194-(А, В, С, D, Е), которые различались по химической природе и спектру антимикробного действия. Ранее были выделены антибиотики 194-А и 194-В, изучены их биологические и физико-химические свойства [11]. Природу антибиотических компонентов 194-С и 194-Е не удалось установить из-за их неустойчивости. Не был изучен антибиотик пептидной природы 194-Д.

Синтез биологически активных метаболитов во многом определяется составом ферментаци-

онной среды. Известно, что бактерии рода *Lactococcus* являются ауксотрофами, требовательными к составу питательных сред, оказывающих большое влияние на их рост и синтез бактериоцинов [12, 13]. В связи с этим в нашей работе было проведено изучение влияния состава ферментационной среды на биосинтез антимикробных пептидов штаммом *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К.

Цель работы – выделение и идентификация антимикробных пептидов, образуемых *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К, а также изучение влияния среды культивирования на их биосинтез.

МЕТОДИКА

Объекты, среды и условия ферментации. В работе использовали природный штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К, выделенный из коровьего молока Бурятии [9]. Лактококки, хранившиеся в оборте (обезжиренное молоко), культивировали при 28°C в течение 20–24 ч в стационарных условиях в посевной среде, приготовленной на водопроводной воде с дрожжевым экстрактом и глюкозой по 10 г/л, pH 6.8–7.0. Затем культуру из посевной среды вносили в количестве 5% в ферментационные среды разного состава и культивировали в тех же условиях. Состав питательных сред приведен ниже: **среда 1** (г/л): глюкоза – 20, гидролизат казеина – 20, дрожжевой экстракт – 10, K_2HPO_4 – 30; **среда 2** (г/л): меласса – 20, дрожжевой экстракт – 20, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 20, K_2SO_4 – 10; **среда 3** (г/л): меласса – 20, дрожжевой экстракт – 20, K_2HPO_4 – 20; **среда 4** (г/л): пептон – 4.5, сахароза – 10, дрожжевой экстракт – 10, K_2HPO_4 – 28.4, MgSO_4 – 0.2, NaCl – 2 [14]; **среда 5** (г/л): глюкоза – 25, пептон – 10, дрожжевой экстракт – 10, ацетат натрия – 15, цитрат Na – 15, K_2HPO_4 – 5, Na_2SO_4 – 10 [1]; **среда 6** (г/л): сахароза – 20.0, дрожжевой экстракт – 20.0, K_2HPO_4 – 10.0, NaCl – 2.0, MgSO_4 – 0.2 [9]; **среда 7** (г/л): сахароза – 20, гидролизат казеина – 10, дрожжевой экстракт – 5, K_2HPO_4 – 2, ацетат натрия – 5, MgSO_4 – 0.2, MnSO_4 – 0.5 [15]; **среда 8** (г/л): сахароза – 26.8, триптон – 5, дрожжевой экстракт – 10, твин-80 – 3.0, MgSO_4 – 0.2, NaCl – 8.1, K_2HPO_4 – 1.91 [16]. Во всех средах устанавливали pH на уровне 6.5–6.8. Определяли рост продуцента, накопление антимикробных пептидов и их соотношение на разных средах.

Выделение антимикробных пептидов, образуемых *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К. Культуральную жидкость штамма 194-К обрабатывали избытком метанола для получения порошка, содержащего биологически активный компонент 194-D [11]. Выделение пептидного компонента 194-D из порошка проводили методом препаративного изоэлектрофокусирования (ИЭФ) на приборе для камерного электрофореза [17]. Для

этого порошок массой 3 г растворяли в 0.5 н. уксусной кислоте, полученный раствор вносили в ячейку № 7 камеры для электрофореза. Остальные ячейки заполнялись 0.5 н. раствором уксусной кислоты, после чего камеру подключали к источнику постоянного тока на 24 ч. Напряжение в приборе изменяли следующим образом: 1 ч – 200 В, 4 ч – 400 В, следующие 19 ч – 250 В. По окончании процесса содержимое ячеек собирали и упаривали на ротаторном испарителе “Rotavapor-R Büchi” (Швейцария). Сухой остаток растворяли в 0.1%-ной трифторуксусной кислоте (ТФУ). Антибактериальную активность полученных фракций определяли дисковым методом, используя в качестве тест-организма *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Биологически активные фракции ИЭФ-11 и ИЭФ-15 (из 11 и 15 ячеек соответственно) обессоливали с использованием 0.1%-ного раствора ТФУ на колонках, заполненных Sephadex G-25 (“Pharmacia Fine Chemicals”, Швеция). Затем очистку продолжали на картриджах С-16 (ЗАО “БиоХимМак СТ”, Россия), используя градиент концентрации от 0 до 100% ацетонитрила в 0.1% ТФУ. После обессоливания фракции ИЭФ-11 и ИЭФ-15 анализировали методом электрофореза на бумаге с последующей биоавтографией и обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ).

Электрофорез проводили на бумаге Filtrak F-14 на V-образном приборе Durguma [18], изготовленном на химическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова, при 550 В в течение 150 мин в 2н. уксусной кислоте с pH 2.5. Электрофоретическую подвижность определяли по величине смещения вещества (см) от линии старта к катоду. Биоавтографию выделенных антибиотиков проводили по методике [19] с использованием в качестве тест-организма *B. subtilis* ATCC 6633. В качестве контрольного препарата использовали нинзин А.

ОФ-ВЭЖХ анализ проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе Милихром А-02 (ЗАО “Эконова”, Россия), термостатируемым при 35°C с колонками из нержавеющей стали (размером 2.0 × 75.0 мм), заполненных сорбентом Prontosil 120-5C18AQ (“Macherey-Nagel”, Германия). В работе использовали линейный градиент подвижной фазы, создаваемый элюентом А (0.1%-ный раствор ТФУ в воде) и элюентом В (0.1%-ный раствор ТФУ в ацетонитриле) при скорости потока 100 мкл/мин. Реагенты готовили с применением воды высшей степени очистки (18.1 Мом/см), полученную на установке Milli-Q® Plus (“Millipore”, Франция). Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил фирмы “Sigma-Aldrich” (Германия). Детектирование разделяемых веществ осуществляли при двух длинах волн 214 и 270 нм в градиенте концентрации элюента В (от 0

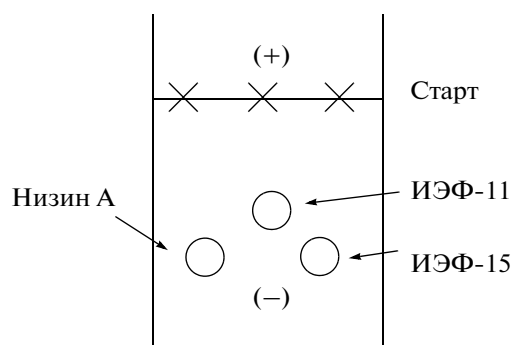


Рис. 1. Биоавтография электрофореза фракций ИЭФ-11 и ИЭФ-15, антибиотика, образуемого *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К (тест-организм *Bacillus subtilis*).

до 80%); время анализа составляло 20–25 мин для каждой пробы. Объем вводимых проб фракции ИЭФ-11 и ИЭФ-15 составлял 15 мкл. Контрольным образцом был низин А, растворенный в 0.1%-ной ТФУ с концентрацией 1 мг/мл. Объем вводимой пробы – 10 мкл.

Полученные в ходе ОФ-ВЭЖХ-анализа фракции, соответствующие отдельным пикам, были собраны. Спектр антимикробного действия выделенных из фракций веществ определяли дисковым методом, используя в качестве тест-организмов грамположительные бактерии: *Bacillus coagulans* 429, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. mycoides* 537, *Micrococcus luteus* NCTC 8340; а также грамотрицательные бактерии: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Comamonas terrigena* ATCC 8461. Тест-организмы выращивали и культивировали, как описано в работе [11].

Фракции, содержащие антибиотик, анализировали масс-спектрометрически. Масс-спектры антибиотиков получены на приборе Ultraflex II MALDI ToF/ToF “Bruker Daltonics” (Германия), оснащенный УФ лазером 355 нм (Nd) в режиме получения положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность измеренных масс составляла 0.001%. На мишени смешивали по 1 мкл раствора образца и 0.3 мкл раствора 2.5-дигидроксибензойной кислоты с концентрацией 10 мг/мл в 20%-ном ацетонитриле с 0.5%-ной ТФУ. Полученную смесь высушивали на воздухе.

Аминокислотный состав веществ, содержащихся во фракциях, собранных в ходе ОФ-ВЭЖХ, определяли методом ионообменной хроматографии на аминокислотном анализаторе “Hitachi L-8800” (Япония) после полного кислотного гидролиза при следующих условиях: $\text{HCl}_{\text{конц}}$: ТФУ (2 : 1) с добавлением 0.01%-ного раствора β-меркаптоэтанола в течение 1 ч при 155°C. Объем вводимой пробы на колонку 95 мкл.

Исследование биосинтеза антимикробных пептидов, продуцируемых *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К, при росте культуры на средах разного состава. По 50 мл 23-часовой культуры *L. lactis* subsp. *lactis* 194-К, выращенной на вышеуказанных средах, центрифугировали при 2240 g в течение 30 мин. Таким образом были получены осадок (клетки) массой 3–4 г и нативные растворы (НР) объемом 50 мл. Клетки дважды промывали фосфатным буфером, pH 5.5, после чего их обрабатывали 5 мл смеси: ацетон–вода–уксусная кислота (4 : 5 : 1). В результате был получен клеточный экстракт (КЭ) объемом 5 мл. Фракции культуральной жидкости (КЭ и НР) анализировали с помощью ОФ-ВЭЖХ в условиях, как описано

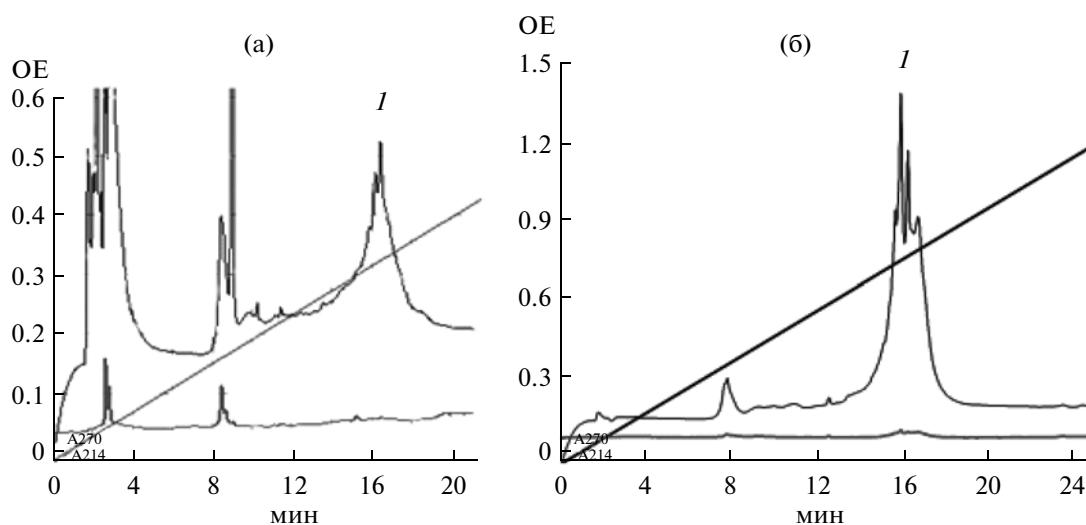


Рис. 2. ОФ-ВЭЖХ анализ антибиотика, образуемого *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К. а – фракция ИЭФ-15; б – стандарт (антибиотик низин А).

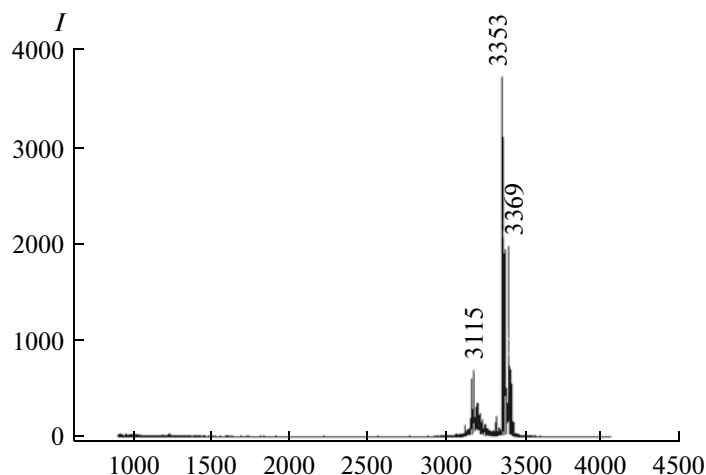


Рис. 3. Масс-спектр антибиотика, образуемого *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К, содержащегося в пике 1 фракции ИЭФ-15.

выше. Предварительно КЭ и НР центрифугировали, используя микроцентрифугу фирмы “BECKMAN COULTER” (™Microfuge® 18 Centrifuge, США) при 5564 g. Объем вводимых проб составлял для НР – 3 мкл и для КЭ – 15 мкл. Полученные в ходе ОФ-ВЭЖХ анализа фракции, содержащие отдельные пики, были собраны и антимикробную активность веществ в пиках определяли, как описано выше. Фракции, содержащие антибиотик, были также анализированы методом масс-спектрометрического анализа.

Количественное содержание бактериоцинов в НР и КЭ определяли по высоте пика и выражали в оптических единицах в мл культуральной жидкости. Динамику образования антимикробного пептида 194-D изучали на наиболее оптимальной для его биосинтеза среде (среда 1). Отбор проб культуральной жидкости проводили каждые 3 ч в течение 30 ч роста культуры.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе [11] было показано, что наряду с антибиотиками гидрофобной природы штамм *L. lactis* subsp. *lactis* 194-К образует антимикробное вещество пептидной природы 194-D. Пептидная природа вещества 194-D была подтверждена положительной реакцией с нингидрином и миграцией к катоду в слабокислой среде. Ранее на примере лактококцина В и педиоцина РА-1 было показано, что для выделения небольших катионных пептидов можно успешно применять метод препаративного изоэлектрофокусирования [20]. Поэтому данный метод в модификации [17] был использован в нашей работе для выделения антибиотика 194-D, содержащегося в порошке, полученном из культуральной жидкости штамма-продуцента.

В результате препаративного изоэлектрофокусирования было установлено, что порошок содержит два биологически активных вещества, которые были распределены в ячейках 11 и 15 ИЭФ соответственно. После обессоливания содержимого ячеек были получены фракции ИЭФ-11 и ИЭФ-15, биоавтография которых после электрофореза на бумаге представлена на рис. 1. Из схемы видно, что во фракции ИЭФ-15 содержится вещество, сопоставимое по электрофоретической подвижности (R_f) с низином А ($R_f = 6.5$), а во фракции ИЭФ-11 содержится вещество с $R_f = 5.1$, отличное по подвижности от низина А.

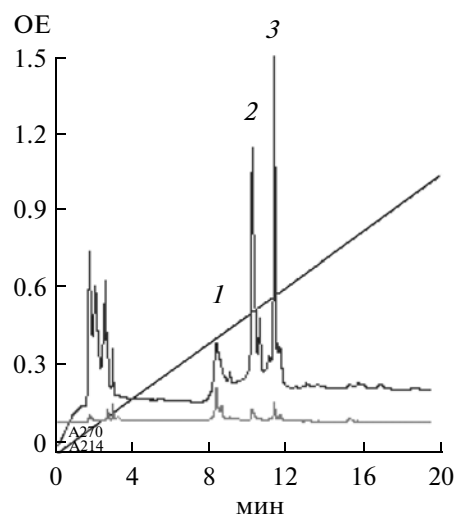


Рис. 4. ОФ-ВЭЖХ анализ фракции ИЭФ-11, содержащий антибиотик, образуемый *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К.

Пики 1 и 3 – биологически неактивные вещества; пик 2 – антимикробный полипептид 194-D.

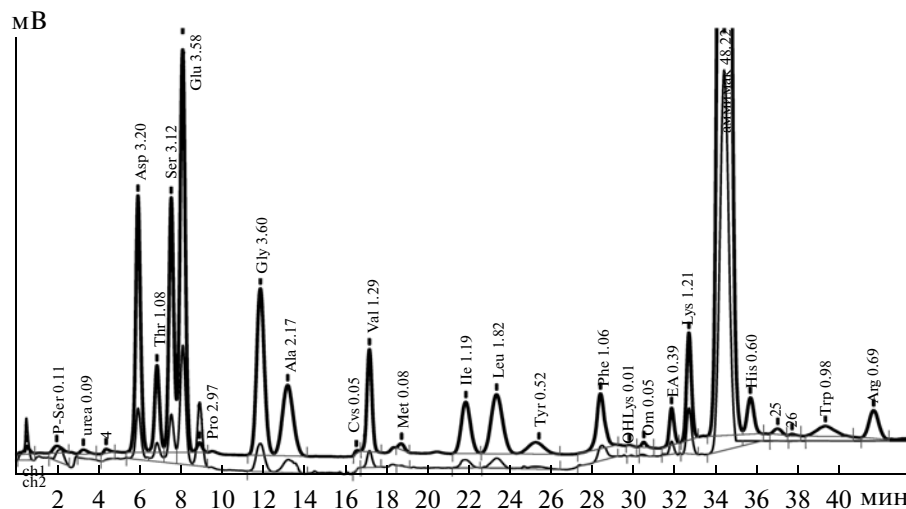


Рис. 5. Хроматограмма кислотного гидролизата полипептида 194-D, содержащегося в пике 2 фракции ИЭФ-11 антибиотика, образуемого *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K. (Числа в максимумах пиков соответствуют количеству аминокислоты, в пробе, нМ).

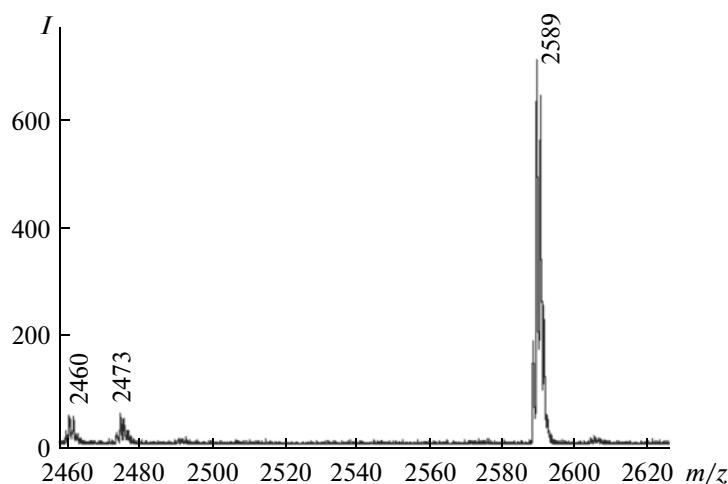


Рис. 6. Масс-спектр полипептида 194-D, содержащегося в пике 2 фракции ИЭФ-11 антибиотика, образуемого *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K.

ОФ-ВЭЖХ анализ показал, что вещество, содержащееся во фракции ИЭФ-15 (пик 1, рис. 2а) по времени выхода (16.2 мин) совпадает с пиком содержащим бактериоцин низин А (пик 1, рис. 2б). С помощью масс-спектрометрического анализа было установлено, что молекулярная масса вещества, содержащегося в пике 1, равна 3353 Да (рис. 3), что идентично массе низина А [21]. Из полученных результатов можно сделать вывод, что фракция ИЭФ-15 содержала вещество, которое было идентифицировано, как известный бактериоцин низин А (основной компонент коммерческого препарата “Nisaplin”).

Анализ фракции ИЭФ-11 с помощью ОФ-ВЭЖХ (рис. 4) показал, что в ней содержатся два вещества (пик 2 со временем выхода 10.2 мин и пик 3 — время выхода 11.7 мин). Вещества, содержащиеся в пиках 2 и 3, были препаративно собраны и методом дисков установлено, что антимикробной активностью обладало вещество, содержащееся в пике 2. Для подтверждения пептидной природы вещества из пика 2 фракции ИЭФ-11 был проведен аминокислотный анализ этого соединения (рис. 5). Из данных аминокислотного анализа, представленных на рис. 5, следует, что вещество содержало следующие аминокислоты: Асп, Тре, Сер, Глу, Про, Гли, Ала, Вал, Иле, Лей, Фен, Лиз,

Трп в количественном соотношении 2 : 1 : 2 : 4 : 2 : 2 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1 : 1. Полученные данные аминокислотного и масс-спектрометрического анализа свидетельствуют о том, что выделенное из фракции ИЭФ-11 биологически активное вещество представляет собой полипептид с молекулярной массой m/z 2589 (рис. 6), который был нами обозначен, как 194-D.

Полипептид 194-D, в отличие от низина А [2], обладал широким спектром антимикробного действия и подавлял развитие как грамположительных (*B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. mycoides*, *Micrococcus luteus*), так и грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *Comamonas terrigena*), что является не характерным свойством для бактериоцинов, синтезируемых бактериями *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Для идентификации выделенного бактериоцина по имеющимся физико-химическим характеристикам был проведен поиск аналогов по компьютерной базе данных BNPD [22, 23]. На данном этапе работы аналогов бактериоцину 194-D не было выявлено.

Поскольку известно, что на синтез бактериоцинов большое влияние оказывают условия культивирования штамма-продуцента, в особенности состав питательных сред, был изучен синтез двух бактериоцинов (низина А и 194-D) штаммом 194-К в зависимости от состава среды культивирования. Было установлено, что при росте на разных средах к 23 ч количество бактериоцина 194-D в культуральной жидкости значительно превышало количество низина А (таблица). В клеточных экстрактах на всех средах присутствовали оба антимикробных пептида (рис. 7б, таблица), в то время как в нативном растворе культуральной жидкости

Количественное содержание бактериоцинов (194-D, низина А) в культуральной жидкости *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К к 23 ч в зависимости от среды культивирования

Среда культивирования	Количественное содержание бактериоцинов, ОЕ/мл*			
	нативный раствор		клетки	
	194-D,	низин А	194-D	Низин А
1	1683 ± 117	—	2.2 ± 0.05	1.5 ± 0.05
2	543 ± 103	—	2.6 ± 0.05	2.0 ± 0.24
3	465 ± 49	—	1.2 ± 0.14	1.90 ± 0.09
4	687 ± 65	—	1.6 ± 0.05	1.7 ± 0.09
5	813 ± 75	—	2.1 ± 0.19	1.2 ± 0.05
6	456 ± 39	—	—	1.2 ± 0.03
7	933 ± 34	—	1.3	0.93 ± 0.02
8	758 ± 19	—	2.4 ± 0.09	1.2 ± 0.09

* ОЕ/мл — оптические единицы в 1 мл культуральной жидкости; “—” — не обнаружено.

был обнаружен только бактериоцин 194-D (рис. 7а, таблица). На среде № 6, содержащей сахарозу и дрожжевой экстракт, бактериоцин 194-D выделялся в среду культивирования, а в клетках присутствовал только низин А (таблица).

На средах 2, 4 соотношение низина А и полипептида 194-D в клетках было практически равным, на средах 5, 8 низин А было в два раза меньше. При культивировании штамма на среде 3, содержащей KH_2PO_4 , мелассу и дрожжевой экстракт, в клеточном экстракте низина А было на 58%

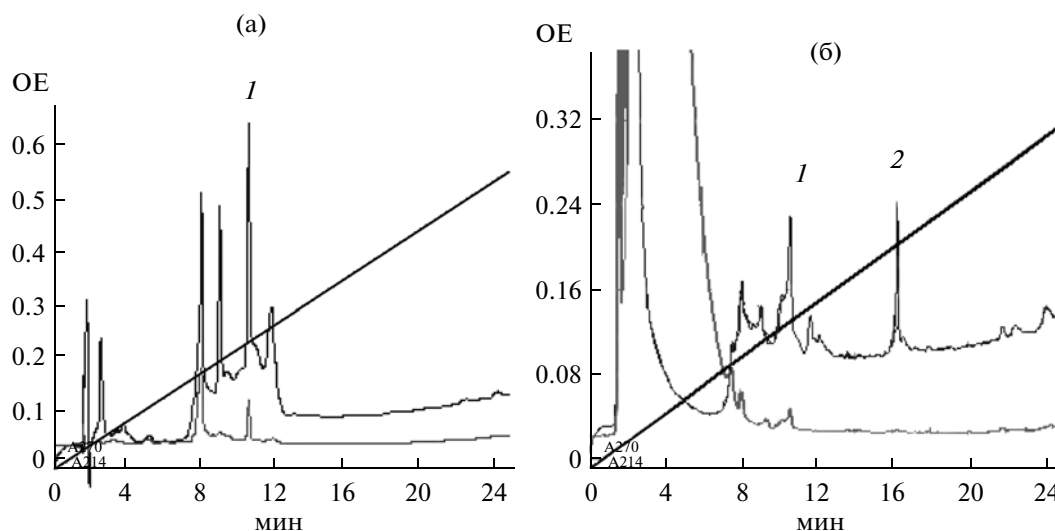


Рис. 7. ОФ-ВЭЖХ анализ нативного раствора (а) и клеточного экстракта (б) 23-часовой культуры *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-К при росте на среде 4 с пептоном, сахарозой и дрожжевым экстрактом. Пик 1 — полипептид 194D, пик 2 — низин А.

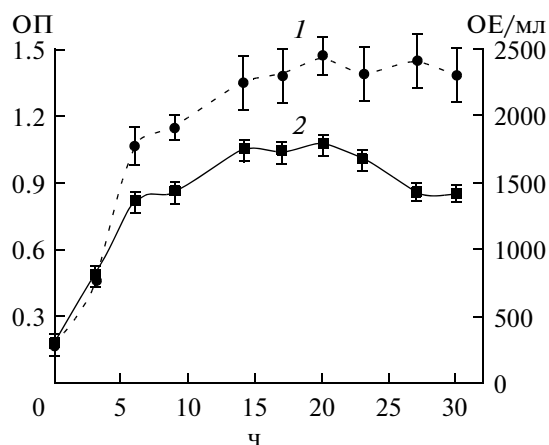


Рис. 8. Динамика образования бактериоцина 194-D при выращивании штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K на среде 1 с глюкозой, гидролизатом казеина, дрожжевым экстрактом и фосфатом калия: 1 — рост штамма; 2 — продукция бактериоцина.

больше, чем полипептида 194-D (таблица). Наибольший выход полипептида 194-D наблюдался при росте культуры на среде 1 с глюкозой, дрожжевым экстрактом, гидролизатом казеина и фосфатом калия. На этой среде количество антибиотика 194-D в культуре штамма 194-K превышало содержание низина А в 1123 раза. Это говорит о том, что низин А — минорный бактериоцин, а среда № 1 является оптимальной для биосинтеза нового бактериоцина 194-D.

Результаты исследований по культивированию штамма-продуцента на оптимальной для образования пептида 194-D среде (среда 1) показали, что его биосинтез происходит параллельно росту штамма 194-K (рис. 8). Это свидетельствует о том, что, возможно, биосинтез пептида 194-D протекает на рибосомах клетки, поэтому его можно считать бактериоцином. Как видно из рис. 8, максимальное количество бактериоцина 194-D присутствовало в среде к 14–20 ч роста культуры. К 30 ч происходит уменьшение количества полипептида на 21%, что можно объяснить его лабильностью.

В результате проведенного исследования было установлено, что штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K наряду с нейтральными гидрофобными антибиотиками ароматической природы [11] способен продуцировать два биологически активных вещества полипептидной природы. Одно из них по молекулярной массе и ОФ-ВЭЖХ анализу было идентифицировано как низин А, относящийся к классу лантибиотиков. Другое вещество, обозначенное как полипептид 194-D, состояло из 20 аминокислот и обладало молекулярной массой 2589 Да. Исходя из того, что 194-D имеет

пептидную природу, и синтез его в процессе культивирования штамма 194-K происходил параллельно росту продуцента, то можно считать, что данное вещество является бактериоцином.

В отличие от низина А бактериоцин 194-D имел более широкий спектр действия и обладал способностью подавлять рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Синтез бактериоцинов происходит на всех средах, поддерживающих рост данного штамма. Содержание бактериоцина 194-D в зависимости от среды культивирования было в 380–1123 раза больше, чем низина А. Это говорит о том, что низин А в культуре *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K образуется в незначительных количествах. Установлено, что оптимальной для синтеза антимикробного пептида 194-D является среда 1, содержащая глюкозу, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина и фосфат калия.

Авторы приносят благодарность Хряповой Е.В. (Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН) за масс-спектрометрический анализ выделенных антибиотиков и Ксенофонтову А.Л. (Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского) за проведение аминокислотного состава пептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hirsh A. // J. Gen. Microbiol. 1951. V. 5. P. 208–221.
- Delves-Broughton J., Blackburn P., Evans R.J., Hugenholtz J. // Antonie Leeuwenhoek. 1996. V. 69. № 2. P. 193–202.
- Galvez A., Abriouel H., Lopez R., Omar N. // J. Food Microbiol. 2007. V. 120. № 1–2. P. 51–70.
- Nes I., Yoon S.-S., Diep D.B. // Food Sci. Biotechnol. 2007. V. 16. № 5. P. 675–690.
- Nissen-Meyer J., Oppegard C., Rogne P., Haugen H.S., Kristiansen E. // Probiotics & Antimicro. Prot. 2010. V. 2. № 2. P. 52–60.
- Oscariz J.C., Pisabarro A.G. // Int. Microbiol. 2001. V. 4. № 1. P. 13–19.
- Mantovani H., Russell J. // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. № 2. P. 808–813.
- Стоянова Л.Г., Сульимова Т.Д., Нетрусов А.И. // Вестн. Моск. ун., сер. Биология. 2003. Т. 16. № 4. С. 17–22.
- Стоянова Л.Г., Сульимова Т.Д., Ботина С.Г., Нетрусов А.И. // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 5. С. 560–568.
- Stoyanova L.G., Ustyugova E.A., Sultimova T.D., Bilanenko E.N., Fedorova G.B., Khatruxha G.S., Netrusov A.I. // Amer. Agricult. Biol. Sci. 2010. V. 5. № 4. P. 477–485.
- Устюгова Е.А., Фёдорова Г.Б., Камруха Г.С., Стоянова Л.Г. // Микробиология. 2011. Т. 80. № 5. С. 644–650.

12. Jensen P., Hammer K. // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. № 12. P. 4363–4366.
13. Стоянова Л.Г., Левина Н.В. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 3. С. 286–291.
14. Li C., Bai J., Cai Z., Ouyang F. // J. Biotechnol. 2002. V. 93. № 1. P. 27–34.
15. de Man J.D., Rogosa M., Sharpe M.E. // J. Appl. Bact. 1960. V. 23. № 1. P. 130–135.
16. Zhou X., Pan Y.-J., Wang Y.-B., Li W.-F. // J. Food Sci. 2008. V. 73. № 6. P. 245–249.
17. Sova O. // Electrophoresis. 1990. V. 11. № 11. P. 963–966.
18. Durrum E.L. // Science. 1951. V. 113. № 2925. P. 66–68.
19. Haese A., Keller U. Genetics of actinomycin C production in *Streptomyces chrysomallus* // J. Bacteriol. 1988. V. 170. № 3. P. 1360–1368.
20. Venema K., Chikindas M., Seegers M., Haandrikman J., Leenhouts K.J., Venema G., Kok J. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 1. P. 305–309.
21. Zendo T., Yoneyama F., Sonomoto K. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 88. № 1. P. 1–9.
22. Berdy J. // J. Antibiot. 2005. V. 58. № 1. P. 1–26.
23. Bostian M., McNitt K., Aszalos A., Bérdy J. // J. Antibiot. 1977. V. 30. № 1. P. 633–634.

Characteristics and Identification of Bacteriocins Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K

E. A. Ustyugova^a, A. V. Timofeeva^b, L. G. Stoyanova^a, A. I. Netrusov^a, and G. S. Katrukha^c

^a Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

^b Science Park, Belozerskii Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^c Gauze Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 119021 Russia

e-mail: ustyugova.katya@mail.ru, stoyanovamsu@mail.ru

Received January 26, 2012

Abstract—The *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 194-K strain has been established to be able to produce two bacteriocins, one of which was identified as the known lantibiotic nisin A, and the other 194-D bacteriocin represents a polypeptide with a 2589-Da molecular mass and comprises 20 amino acid residues. Both bacteriocins were produced in varying proportions in all of the studied nutrient media, which support the growth of the producer. Depending on the cultivation medium, the nisin A content was 380- to 1123-fold lower in the 194-K strain culture fluid than that of the 194-D peptide. In comparison to nisin A Bacteriocin 194-D possessed a wide range of antibacterial activity and suppressed the growth of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. An optimal medium for 194-D bacteriocin synthesis was shown to be a fermentation medium which contained yeast extract, casein hydrolysate, and potassium phosphate. The biosynthesis of bacteriocin 194-D by the 194-K strain in these media occurred parallel to producer growth, and its maximal accumulation in the culture fluid was observed at 14–20 h of the strain's growth.

УДК 579.222

ДЕГРАДАЦИЯ ЭДТА И ЕГО КОМПЛЕКСОВ С МЕТАЛЛАМИ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ БАКТЕРИЙ

Chelativorans oligotrophicus LPM-4

© 2012 г. Т. Н. Кувичкина, Е. Н. Капаруллина, Н. В. Доронина, Ю. А. Троценко, А. Н. Решетилов

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН

Пушино, Московская область, 142290, e-mail: kuv@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 28.11.2011 г.

Рассмотрена ферментативная окислительная деградация ЭДТА и его комплексов с металлами, осуществляемая иммобилизованными клетками облигатного деструктора *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4. Полярографическим методом зарегистрировано потребление кислорода клетками. Впервые показано, что комплексы Cd-ЭДТА и Ni-ЭДТА подвергаются деградации изучаемыми бактериями.

Этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) является хелатирующим агентом группы аминокислотных кислот. Благодаря способности образовывать стабильные водорастворимые комплексы (хелаты) с ионами двух- и трехвалентных металлов ЭДТА широко применяется в промышленных процессах для удаления ионов металлов [1, 2]. Он используется в производстве бытовой химии, в том числе синтетических моющих средств, в виде стабилизатора в процессах полимеризации, при производстве каучука [3]. В сельском хозяйстве ЭДТА используется как стимулятор фиторемедиации почв, так как способствует десорбции тяжелых металлов (медь, цинк, кадмий) из почвы. ЭДТА переводит их в растворимую форму и делает доступными для поглощения растениями [3]. Промышленное производство ЭДТА начато в Германии в 1939 г. В 2000 г. суммарное производство ЭДТА достигло 200000 т. Показано, что до 80% потребленного ЭДТА поступает в окружающую среду [3]. В настоящее время ЭДТА считается одним из наиболее распространенных антропогенных загрязнителей в мире [4]. Известно, что накопление ЭДТА в грунтовых водах приводит к ухудшению качества питьевой воды, а также переводу в растворенное состояние ионов тяжелых и токсичных металлов [3].

Известны два способа разрушения ЭДТА: физико-химический и микробиологический. Физико-химический способ представляет собой фотохимическое разложение комплекса Fe(III)-ЭДТА под воздействием ультрафиолета на поверхности естественных водоемов [5]. Этот процесс зависит от климатических условий, освещенности, сезона и не может рассматриваться, как существенный фактор разрушения ЭДТА в природе [6]. Микробиологический способ разрушения ЭДТА происходит под действием микроорганизмов-деструк-

торов. В результате исследований, ведущихся более 40 лет, выделено лишь несколько чистых культур бактерий-деструкторов ЭДТА [7–11]. Из очистных сооружений г. Пушино выделен новый штамм бактерий, разлагающих ЭДТА (LPM-4). Штамм является облигатным деструктором, обладающим специфической потребностью в ЭДТА как единственном источнике углерода, азота и энергии [12]. На основании хемо- и генотаксономических данных штамм отнесен к группе α -Proteobacteria, к новому роду и виду *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4 (VKMB2395^T = DSM19276^T) [11]. Известно, что у факультативного деструктора *Chelativorans multitrophicus* DSM 9103 первый этап деградации ЭДТА катализирует ЭДТА-монооксигеназа, которая окисляет ЭДТА до этилендиаминтриацетата (ЭДЗА) и глиоксилата с потреблением молекулярного кислорода [8, 10]. Ферментативные и полярографические исследования, а также анализ продуктов разложения показали, что у облигатного деструктора *C. oligotrophicus* LPM-4 первый этап разложения ЭДТА катализирует ЭДТА-монооксигеназа, подобная той, которая обнаружена ранее у факультативного деструктора *C. multitrophicus* DSM 9103 [8, 13].

Цель работы – изучение ферментативной окислительной деградации ЭДТА и его комплексов с металлами иммобилизованными клетками облигатного деструктора *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4 полярографическим методом, позволяющим регистрировать потребление кислорода клетками.

МЕТОДИКА

Материалы и реактивы. В качестве источника углерода, азота и энергии и использовали ЭДТА (ч.д.а. “ДиаЭМ”, Германия). Соли для пригото-

ления питательной среды и для приготовления комплексов металлов с ЭДТА были аналитической чистоты (“Реахим”, Россия). Агаризованные среды готовили с бакто-агаром Type USA (“Difco”, США). Для определения субстратной специфичности использовали реактивы производства фирмы “Sigma” (США).

Объект исследования. В работе использовали штамм *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4 облигатный деструктор ЭДТА, выделенный в лаборатории физиологии микроорганизмов ИБФМ РАН из активного ила городских очистных сооружений г. Пущино [11].

Среды и условия культивирования. Культуру поддерживали на минеральной агаризованной (2%) среде следующего состава (г/л): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1.0, KH_2PO_4 – 0.26, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0.40, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ – 0.83, Na_2EDTA – 1.0. Микроэлементы (мг/л): $FeCl_3 \cdot 4H_2O$ – 1.5, H_3BO_3 – 0.06, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0.1, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0.12, $ZnCl_2$ – 0.07, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0.025, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0.015, Na_2MoCl_4 – 0.025. Использовали смесь следующих витаминов (мг/л): пиридоксин·HCl – 0.1, тиамин·HCl – 0.05, рибофлавин – 0.05, никотиновая кислота – 0.05, кальций пантотенат – 0.05, Р – аминобензойная кислота – 0.05, липоевая кислота – 0.05, никотинамид – 0.05, витамин B_{12} – 0.05, биотин – 0.02, фолиевая кислота – 0.02. Витамины и микроэлементы готовили в виде концентрированных стерильных растворов и добавляли в среду перед посевом в количестве 1 и 2 мл/л соответственно (начальное значение pH составляло 7.0).

Музейную культуру штамма *C. oligotrophicus* LPM-4 пересевали на скошенный ЭДТА-агар и выдерживали в термостате при 28°C в течение 5 сут. Смыв со свежей культуры в количестве 1–2 мл переносили в стерильные колбы Эрленмейера объемом 750 мл со 100 мл среды. Для выращивания биомассы использовали жидкую среду того же состава. Периодическое культивирование бактерий проводили на качалке 150 об/мин при 28°C в течение 5–7 сут.

Биомассу (конец экспоненциальной фазы роста) отделяли центрифугированием при 5000 g в течение 30 мин, +4°C, ресуспензировали в 60 мл свежей среды с ЭДТА. Клеточную суспензию хранили в холодильнике при +4°C.

Иммобилизация клеток. Для иммобилизации аликвоту клеточной суспензии центрифугировали при 10000 g в течение 3 мин при комнатной температуре. Клетки отмывали дважды 30 мМ НЕРЕС-буфером, pH 7.4. Иммобилизацию клеток *C. oligotrophicus* LPM-4 осуществляли методом физической адсорбции. Для этого клеточную суспензию, содержащую 10 мкл НЕРЕС-буфера (pH 7.4) с 2 мг сырой биомассы, наносили на полосу хроматографической стеклобумаги (“What-

man GF/A”, Великобритания), формируя пятно диаметром 3 мм. Пятно подсушивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Подготовленный распознающий элемент (биорецептор) на основе иммобилизованных клеток (ИМК) *C. oligotrophicus* LPM-4 фиксировали на измерительной поверхности кислородного электрода типа Кларка (“Кронас”, Россия) с помощью нейлоновой сетки.

Условия измерений. Измерения проводили в 30 мМ НЕРЕС-буфере (pH 7.4), насыщенном кислородом, при 30–32°C в открытой кювете объемом 2 мл с помощью потенциостата IPC-Micro (“Кронас” (Россия)). Для управления прибором и регистрации измерений использовался персональный компьютер, присоединенный через стандартное последовательное подключение RS-232. Потенциостат IPC-Micro управлялся программой, позволяющей регистрировать отклик распознающего элемента. Регистрируемым параметром являлась максимальная скорость изменения выходного сигнала dI/dt (нА/с), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации потребленного кислорода (отклик). Для обработки полученных результатов использовали компьютерную программу для нелинейной регрессии (Программа Sigma Plot 11). Объем пробы субстрата – 100 мкл. Время отклика не превышало 30 ± 10 с, время регенерации составляло 300 с. Длительность однократного измерения – 6–8 мин.

Приготовление комплексов ЭДТА с металлами. Водные растворы комплексов ЭДТА с металлами (Me-ЭДТА) готовили, смешивая эквимольные концентрации водных растворов ЭДТА и соответствующей соли металла за 24 ч до начала эксперимента. Использовали 40 мМ стоковые растворы.

Построение зависимостей отклика распознающего элемента от значений pH. Для измерения pH-зависимости использовали 30 мМ НЕРЕС-буфер, со значениями pH 6.8, 7.2, 7.4, 7.8, 8.2. В качестве субстрата использовали 2 мМ Mg-ЭДТА. Все исследования проверялись в трех повторностях. Вариация данных не превышала 5%.

Построение зависимостей отклика распознающего элемента от концентрации NaCl. Для исследования зависимости откликов распознающего элемента от ионной силы буферного раствора использовали концентрации растворов NaCl в диапазоне 30–200 мМ. pH полученных растворов доводили до 7.4. В качестве субстрата использовали 2 мМ Mg-ЭДТА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях эксперимента были использованы нерастущие культуры, для которых следует ожидать стабильные стехиометрические соотноше-

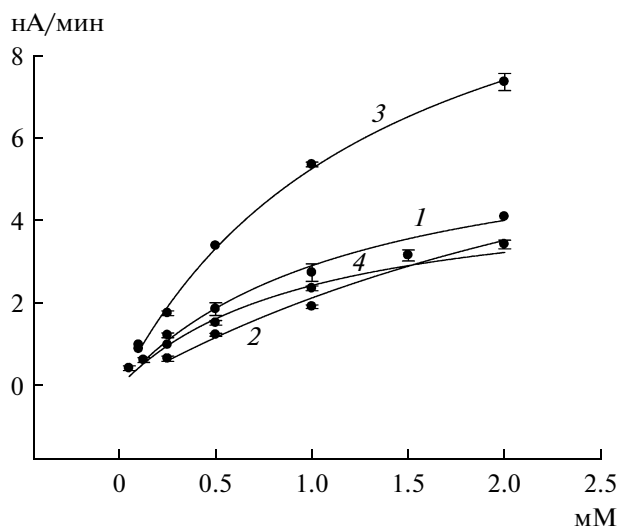


Рис. 1. Градуировочные кривые зависимости откликов распознающего элемента на основе ИмК штамма *C. oligotrophicus* LPM-4 от концентрации субстратов ЭДТА (1) и комплексов ЭДТА с элементами главной подгруппы II группы Ba-ЭДТА(2), Mg-ЭДТА (3), Ca-ЭДТА (4).

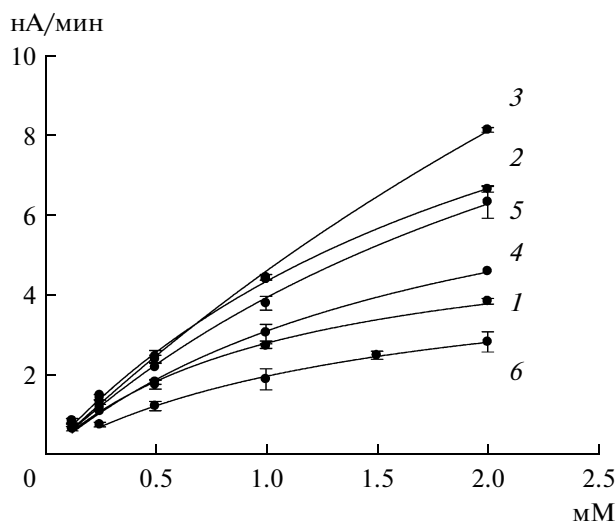
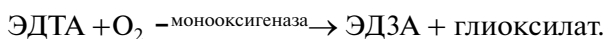


Рис. 2. Градуировочные кривые зависимости откликов распознающего элемента на основе ИмК штамма *C. oligotrophicus* LPM-4 от концентрации комплексов ЭДТА с ионами металлов переходных элементов Mn-ЭДТА (1), Co-ЭДТА (2), Cd-ЭДТА (3), Zn-ЭДТА (4), Ni-ЭДТА (5), Cu-ЭДТА (6).

ния между количеством потребленного кислорода и ЭДТА:



Кинетические константы скорости потребления кислорода и деградации ЭДТА идентичны. Максимальные скорости обоих процессов взаимно пропорциональны. Сравнение значений скорости потребления кислорода является обоснованным для подобного параметра деградации ЭДТА. Для изучения влияния концентраций Me-ЭДТА на потребление кислорода ИмК концентрации субстратов варьировали от 0.125 до 2.000 мМ. На рис. 1 представлены градуировочные кривые зависимости отклика от концентрации ЭДТА (1) и комплексов ЭДТА с ионами металлов главной подгруппы II группы периодической системы элементов (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}) Ba-ЭДТА (2), Mg-ЭДТА (3), Ca-ЭДТА (4). На рис. 2 приведены градуировочные кривые зависимости для комплексов ЭДТА с ионами металлов переходных элементов Mn-ЭДТА (1), Co-ЭДТА (2), Cd-ЭДТА (3), Zn-ЭДТА (4), Ni-ЭДТА (5), Cu-ЭДТА (6). Для всех изученных субстратов скорость деградации ЭДТА росла по мере повышения концентрации ЭДТА. В случае *C. oligotrophicus* LPM-4 показано, что комплексы Co-ЭДТА и Cu-ЭДТА подвергались разложению (рис. 2, кривые 2, 6). Кроме того, показано, что комплексы Cd-ЭДТА и Ni-ЭДТА также подвергались деградации, хотя в имеющейся литературе отсутствуют сведения о биодеградации названных комплексов бактериями [14].

Известно, что ферментный комплекс ЭДТА-монооксигеназа факультативных деструкторов ЭДТА состоит из двух субъединиц [8, 10]. Это дает основание предполагать, что при окислении возможно наблюдение кооперативного эффекта. Однако в условиях нашего эксперимента коэффициент Хилла (h) был близок к единице, что свидетельствовало об отсутствии кооперативного эффекта. Используя кривые субстратной зависимости (градуировочная зависимость) и компьютерную программу для нелинейной регрессии, вычислили значения максимальной скорости потребления кислорода ИмК ($V_{\text{макс}}$) и кажущиеся константы сродства к субстрату ($K_{\text{M(каж)}}$) для ЭДТА и его комплексов с ионами металлов по уравнению Михаэлиса-Ментен (рис. 1, 2).

$$v = V_{\text{макс}} / (1 + K_{\text{M(каж)}} / C),$$

где C – концентрация ЭДТА-субстрата, мМ.

Среди комплексов ЭДТА с ионами металлов главной подгруппы II группы периодической системы элементов (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}) самую высокую скорость деградации наблюдали для Mg-ЭДТА. Эти данные согласуются с результатами, полученными для этого же облигатного деструктора как в опыте с отмытыми клетками [14], и с данными, полученными с использованием биосенсорной методики для ИмК факультативного деструктора *C. multitrophicus* DSM 9103 [13]. Сравнение максимальных скоростей потребления кислорода ($V_{\text{макс}}$) у факультативного [14] и облигатного деструкторов (таблица) показало, что облигатный деструктор характеризовался более высокой ско-

Кинетические константы штамма *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4 в процессе разложения ЭДТА-содержащих субстратов

ЭДТА-содержащий субстрат	Максимальная скорость потребления кислорода ($V_{\text{макс}}$), нА/мин	Кажущаяся константа сродства к субстрату ($K_{\text{M(каж)}}$), мМ	Чувствительность, нА мМ/мин
ЭДТА	6.43 ± 0.39	1.20 ± 0.14	4.33
Ba-ЭДТА	10.43 ± 0.02	3.88 ± 0.01	2.38
Mg-ЭДТА	12.48 ± 0.45	1.37 ± 0.09	7.82
Ca-ЭДТА	4.79 ± 0.04	1.03 ± 0.02	4.39
Mn-ЭДТА	5.85 ± 0.26	1.09 ± 0.09	4.25
Co-ЭДТА	14.35 ± 0.64	2.30 ± 0.16	5.56
Cd-ЭДТА	33.89 ± 4.80	6.37 ± 1.14	5.11
Zn-ЭДТА	8.76 ± 0.43	1.83 ± 0.15	4.16
Ni-ЭДТА	15.56 ± 1.93	2.95 ± 0.55	4.82
Cu-ЭДТА	4.96 ± 0.52	1.51 ± 0.30	2.39

ростью потребления кислорода и, следовательно, большей скоростью деградации ЭДТА и его комплексов с ионами Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} .

Оценку субстратной специфичности распознающего элемента на основе штамма *C. oligotrophicus* LPM-4 провели по следующим 7 субстратам: Mg-ЭДТА и промежуточным продуктам деградации ЭДТА (N,N'-этилендиаминдиацетат, иминодиацетат, глиоксилат), ацетат натрия, кроме этого использовали глюкозу и пировиноградную кислоту. ИмК давали отклики на Mg-ЭДТА, N,N'-этилендиаминдиацетат, иминодиацетат, глиоксилат, а также пировиноградную кислоту. На глюкозу и ацетат натрия откликов с поглощением кислорода не наблюдали.

Изучена зависимость ответов распознающего элемента от ионной силы в диапазоне от 30 до 200 мМ концентрации NaCl. Зависимость носила монотонно убывающий характер. Максимальные отклики наблюдались в области 30 мМ раствора NaCl.

Значение pH среды является одним из факторов, влияющих на активность клеточных ферментов распознающего элемента. Для измерения pH-зависимости использовали 30 мМ HEPES-буфер в диапазоне значений pH 6.8–8.2. Максимальный отклик ИмК *C. oligotrophicus* LPM-4 наблюдался при pH 7.4.

Данное исследование, проведенное с ИмК *C. oligotrophicus* LPM-4 при помощи полярографического метода, позволило получить новые результаты по сравнению с ранее известным методом изучения деградации ЭДТА этим штаммом [14]. Нами впервые показано, что комплексы Cd-

ЭДТА и Ni-ЭДТА подвергаются деградации бактериальным штаммом *C. oligotrophicus* LPM-4. Использованный способ основан на работе с ИмК и представлял собой, по сути, модель биосенсора. В этой связи отметим, что данную систему можно рассматривать и в применении к решению биосенсорных задач, например, для определения ЭДТА и комплексов ЭДТА с металлами в исследовательских лабораториях.

Исследование было частично поддержано грантами Программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы ГК № 16.740.11.0020 и “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы”, ГК 16.512.11.2126.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Egli T., Weilenmann H.U., El-Banna T., Auling G. // Syst. Appl. Microbiol. 1988. V. 10. № 2. P. 297–305.
2. Weilenmann H.U., Engeli B., Bucheli-Witshel M., Egli T. // Biodegradation. 2004. V. 15. № 5. P. 289–301.
3. Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Минкевич И.Г. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. 2007. № 2. С. 40–49.
4. Дедюхина Э.Г., Салмов Н., Чистякова Т.И., Минкевич И.Г., Вайнштейн М.Б. // Вода: химия и экология. 2008. № 2. С. 31–34.
5. Bucheli-Witshel M., Egli T. // FEMS Microbiol. Rev. 2001. V. 25. № 1. P. 69–106.
6. Wolf K., Gilbert P.A., Hatzinger O. // The handbook of Environmental Chemistry. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1992. V. 3. P. 243–259.

7. Noertemann B. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 2. P. 671–676.
8. Witschel M., Nagel S., Egli T. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 22. P. 6937–6943.
9. Сатрутдинов А.Д., Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Минкевич И.Г., Ерошин В.К. // Микробиология. 2003. Т. 72. № 1. С. 97–102.
10. Chistyakova T.I., Belikova V.L., Satroutdinov A.D., Dedyukhina E.G., Eroshin V.K. // Word J. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 19. № 6. P. 977–980.
11. Doronina N.V., Kaparullina E.N., Trotsenko Y.A., Noertemann B., Bucheli-Witschei M., Weilenmann H.-U., Egli T. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. № 5. P. 1044–1051.
12. Noertemann B. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 2. P. 671–676.
13. Eroshin V.K., Satroutdinov A.D., Minkevich I.G., Dedyukhina E.G., Chistyakova T.I., Reshetilov A.N. // Proc. Biochem. 2002. V. 38. № 2. P. 151–154.
14. Сатрутдинов А.Д., Чистякова Т.И., Дедюхина Э.Г., Капаруллина Е.Н., Ерошин В.К. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 5. С. 535–540.

Degradation of the EDTA and EDTA Complexes with Metals by Immobilized Cells of *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4 Bacteria

T. N. Kuvichkina, E. N. Kaparullina, N. V. Doronina, Yu. A. Trotsenko, and A. N. Reshetilov

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

e-mail: kuv@ibpm.pushchino.ru

Received November 28, 2011

Abstract—Enzymatic oxidative degradation of EDTA and EDTA complexes with metals has been investigated using immobilized cells of *Chelativorans oligotrophicus* LPM-4. A polarographic method, which makes it possible to register oxygen consumption by cells, has been used. For the first time, it has been indicated that the Cd-EDTA and Ni-EDTA complexes undergo degradation by the bacteria under study.

УДК 759.873.088.5:661.185

СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 НА ЭТАНОЛЕ В ПРИСУТСТВИИ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

© 2012 г. Т. П. Пирог*, Т. А. Шевчук*, А. Д. Конон**, Е. Ю. Долотенко**

*Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, 03680

**Национальный университет пищевых технологий, Киев, 01601

e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Поступила в редакцию 19.09.2011 г.

Изучено влияние фумарата (C_4 -дикарбоновая кислота, предшественник глюконеогенеза) и цитрата (регулятор синтеза липидов) на образование поверхностно-активных веществ (ПАВ) при культивировании *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на этаноле. Установлено, что одновременное внесение фумарата и цитрата (0.01–0.02%) в конце экспоненциальной фазы роста штамма К-4 на среде с этанолом (2% по объему) сопровождалось увеличением условной концентрации ПАВ* на 45–55% по сравнению с показателями синтеза на среде без органических кислот.

Повышение синтеза ПАВ в присутствии фумарата и цитрата обусловлено увеличением в 1.7–7 раз активности ферментов биосинтеза гликолипидов (фосфоенолпируватсинтетаза и трегалозофосфатсинтаза) и аминоклипидов (НАДФ⁺-зависимая глутаматдегидрогеназа), а также одновременным функционированием двух анаплеротических путей (глиоксилатный цикл и фосфоенолпируваткарбоксилазная реакция).

В предыдущих исследованиях нами было показано, что штамм *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, изолированный из загрязненных нефтью образцов почвы, синтезирует поверхностно-активные вещества (ПАВ) при выращивании на гидрофильных и гидрофобных субстратах [1]. Установлены условия культивирования штамма К-4 на этаноле, обеспечивающие максимальные показатели синтеза ПАВ.

Недавно [2] появилось одно из первых сообщений о способности представителей рода *Acinetobacter* синтезировать низкомолекулярные ПАВ, однако на основе гидрофобных субстратов. До недавнего времени в литературе была информация о синтезе бактериями рода *Acinetobacter* лишь высокомолекулярных эмульгаторов (комплексы внеклеточных липо-, полисахаридов и белков), но не низкомолекулярных поверхностно-активных веществ [3–7].

Одним из подходов к интенсификации технологий микробного синтеза является внесение экзогенных предшественников в среду культивирования продуцента.

Отметим, что на сегодняшний день термин “предшественники биосинтеза” не имеет четкого определения. Это понятие по-разному трактуют

микробиологи, биохимики, молекулярные биологи и биотехнологи. Так, согласно терминологии микробиологов и биохимиков предшественники биосинтеза — это интермедиаты центральных метаболических путей (цикл трикарбоновых кислот, гликолиз/глюконеогенез, пентозофосфатный цикл), являющиеся исходными для процессов конструктивного метаболизма [8, 9]. В биотехнологии предшественниками принято называть соединения, близкие по структуре к определенным фрагментам молекулы целевого продукта [10]. Так, например, для повышения синтеза поверхностно-активных манозилэритритоллипидов в качестве предшественников использовали маннозу (глюкозу) и эритритол, входящие в состав гликолипидов [11–13].

В биотехнологии вторичных метаболитов (например, антибиотики) как предшественники биосинтеза рассматриваются низкомолекулярные соединения (чаще всего аминокислоты), образующиеся в первичном метаболизме и стимулирующие синтез вторичных метаболитов [14–16].

В работах [17, 18] в качестве липидных предшественников поверхностно-активных софоролипидов авторы использовали неуглеводные субстраты (гексадекан, соевое и подсолнечное масло), вносимые в среду с глюкозой для повышения синтеза ПАВ. В некоторых статьях [18] эти же неуглеводные субстраты названы “вторичными источниками углерода”. Различные растительные масла, используемые в качестве ростовых субстратов для образования поверхностно-активных рамнолипидов, также определяют как предшественники биосинтеза [19]. Экзогенные ненасыщенные жирные кислоты рассматриваются в ка-

честве предшественников биосинтеза этиловых эфиров у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [20], а мевалонат – предшественника каротиногенеза у рекомбинантного штамма *Escherichia coli* [21].

Эти примеры свидетельствуют о необходимости уточнения термина “предшественники биосинтеза”. Мы придерживаемся мнения большинства исследователей, что предшественники биосинтеза – это промежуточные продукты метаболизма ростового субстрата (первичные метаболиты), являющиеся исходными соединениями для процессов конструктивного метаболизма либо используемые в качестве регуляторов (индукторы) синтеза целевого продукта.

Так, ранее нами было показано, что внесение 0.2% фумарата (предшественник глюконеогенеза) и 0.1% цитрата (регулятор синтеза липидов) в начале стационарной фазы роста *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на этаноле сопровождалось увеличением показателей синтеза ПАВ на 40–100% по сравнению с выращиванием бактерий на среде без фумарата и цитрата [22]. Повышение синтеза ПАВ в таких условиях культивирования штамма ЭК-1 обусловлено усилением глюконеогенеза, что подтверждалось увеличением в 1.5 и 3.5 раза активности изоцитратлиазы и фосфоенолпируват(ФЕП)-синтетазы (ключевые ферменты гликоциклического цикла и глюконеогенетической ветви обмена веществ соответственно), а также синтеза липидов, о чем могло свидетельствовать снижение в 1.5 раза активности изоцитратдегидрогеназы [22].

Увеличение в 1.5–1.7 раза концентрации ПАВ при внесении в среду культивирования *R. erythropolis* ЭК-1 с н-гексадеканом 0.2% фумарата и 0.1% цитрата обусловлено интенсификацией синтеза трегалозомиколатов, что подтверждалось повышением в 3–5 раз фосфоенолпируватсинтетазы и трегалозофосфатсинтетазы соответственно [23].

Цель работы – исследование возможности интенсификации синтеза ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на этаноле в присутствии фумарата и цитрата.

МЕТОДИКА

Объект исследования. Исследовали штамм *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, зарегистрированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины под номером ИМВ В-7241.

Состав сред и условия культивирования *A. calcoaceticus* К-4. Бактерии выращивали на модифицированной нами среде Мюнца [1] (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0.3, NaCl – 1.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0.6, KH_2PO_4 – 0.14, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, pH 6.8–7.0. В среду культивирования дополнительно

вносили дрожжевой автолизат – 0.5% (по объему) и раствор микроэлементов [1].

В качестве источника углерода и энергии использовали этанол в концентрации 2% (по объему).

В качестве предшественников синтеза ПАВ использовали цитрат натрия и фумарат натрия в концентрации 0.01–0.5%. Соли органических кислот вносили в среду в виде 10%-ных растворов в начале процесса культивирования, а также в конце экспоненциальной фазы роста.

Поскольку цитрат и фумарат являются дополнительными источниками углеродного питания и при добавлении их в среду меняется не только концентрация углерода, но и соотношение С/Н, в контрольных вариантах осуществляли коррекцию содержания основного источника углеродного питания (этанол). Цель коррекции – ввести эквивалентное количество углерода для обеспечения стабильности оптимального соотношения углерод/азот в среде культивирования продуцента.

В одном из вариантов культивирования 1–2 раза в 1 сут осуществляли нейтрализацию культуральной жидкости 10%-ным раствором NaOH .

Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 30°C в течение 24–120 ч.

В качестве посевного материала использовали культуру в экспоненциальной фазе роста (48 ч) в концентрации 5% от объема среды.

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на сухую массу клеток по калибровочному графику.

Определение показателей синтеза ПАВ. Способность к синтезу ПАВ оценивали по показателям: поверхностное натяжение (σ_s) свободной от клеток культуральной жидкости, условная концентрация ПАВ (ПАВ*, безразмерная величина), индекс эмульгирования (E_{24} , %) культуральной жидкости, которые определяли, как описано в наших предыдущих работах [1, 22, 23]. Количество синтезированных внеклеточных ПАВ (г/л) определяли весовым методом после экстракции из супернатанта культуральной жидкости модифицированной нами смесью Фолча [1]. Для получения супернатанта культуральную жидкость центрифугировали при 5000 г в течение 20 мин. Выделение внеклеточных ПАВ осуществляли, как описано ниже.

В цилиндрическую делительную воронку объемом 500 мл помещали 100 мл супернатанта, добавляли 20 мл 1 М раствора HCl , воронку закрывали шлифованной пробкой и встряхивали 3 мин, затем добавляли еще 15 мл 1 М раствора HCl и 65 мл смеси хлороформа и метанола (2 : 1) и встряхивали (экстрагирование липидов) в течение 5 мин. Полученную после экстракции смесь

оставляли в делительной воронке для разделения фаз, после чего нижнюю фракцию сливали (органический экстракт 1), а водную фазу подвергали повторной экстракции. При повторной экстракции к водной фазе добавляли 35 мл 1 М раствора HCl и 65 мл смеси хлороформа и метанола (2 : 1) и экстрагировали липиды в течение 5 мин. После разделения фаз сливали нижнюю фракцию, получая органический экстракт 2. На третьем этапе к водной фазе добавляли 100 мл смеси хлороформа и метанола (2 : 1) и осуществляли экстракцию, как описано выше, получая органический экстракт 3. Экстракты 1–3 объединяли и упаривали на ротаторном испарителе ИР-1М2 (Россия) при 50°C и абсолютном давлении 0.4 атм до постоянной массы.

Получение бесклеточных экстрактов. Бактериальную суспензию, полученную после культивирования *A. calcoaceticus* K-4 в жидкой минеральной среде, центрифугировали (4000 g, 15 мин, 4°C). Осадок клеток дважды отмывали от остатков среды 0.05 М K⁺-фосфатным буфером (pH 7.0), центрифугируя (5000 g, 20 мин, 4°C). Отмытые клетки ресуспендировали в 0.05 М K⁺-фосфатном буфере (pH 7.0) и разрушали ультразвуком (22 кГц) 4 раза по 40 с при 4°C на аппарате УЗДН-1 (Россия). Дезинтеграт центрифугировали (12000 g, 30 мин, 4°C), осадок отбрасывали, надосадочную жидкость использовали в качестве бесклеточного экстракта.

Для получения бесклеточных экстрактов использовали клетки, находящиеся в начале экспоненциальной и стационарной фазы роста (24 и 72 ч культивирования соответственно).

Анализ ферментов. Анализировали активность изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1), изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42), 2-оксоглутаратдегидрогеназы (КФ 1.2.4.2), фумаратгидратазы (КФ 4.2.1.2), малатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.37, КФ 1.1.1.82), глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2.), ФЕП-синтетазы (КФ 2.7.9.2), ФЕП-карбоксикиназы (КФ 4.1.1.49), ФЕП-карбоксилазы (КФ 4.1.1.31), как описано в работе [24], активность трегалозофосфатсинтазы (КФ 2.4.1.15) – в работе [23].

При исследовании влияния катионов натрия на активность ФЕП-синтетазы, ФЕП-карбоксикиназы, НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы и ФЕП-карбоксилазы отмывание клеток, ультразвуковую обработку и определение активности ферментов осуществляли в 0.05 М трис-фосфатном буфере (pH 7.0). Концентрация катионов в реакционной смеси составляла 25 и 50 мМ. Катионы вносили в реакционную смесь в виде 20%-ного раствора NaCl.

Содержание белка в бесклеточных экстрактах рассчитывали по Бредфорд [25]; активность ферментов определяли при 28–30°C – температуре, оптимальной для роста *A. calcoaceticus* K-4.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано в работе [26]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущих исследованиях предположение о положительном влиянии на синтез ПАВ *R. erythropolis* ЭК-1 цитрата (регулятор синтеза липидов) и C₄-дикарбоновых кислот – предшественников глюконеогенетической ветви обмена веществ, функционирующей при росте микроорганизмов на неуглеводных субстратах, было сделано, исходя из химической природы поверхностно-активных веществ (комплекс глико-, фосфо- и нейтральных липидов) [22, 23]. Так как ПАВ, синтезируемые *A. calcoaceticus* K-4 в оптимальных условиях культивирования на этаноле, представляют собой комплекс глико-, amino- и нейтральных липидов [1], мы предположили, что и в этом случае добавление в среду фумарата и цитрата может сопровождаться повышением эффективности процесса биосинтеза ПАВ.

Определение оптимальных концентраций и момента внесения органических кислот в среду культивирования *A. calcoaceticus* K-4. На первом этапе, аналогично исследованиям, проведенным с *R. erythropolis* ЭК-1 [22, 23], изучали влияние предшественников (0.1–0.5%) на синтез ПАВ при внесении их в среду с этанолом в конце экспоненциальной – начале стационарной фазы роста *A. calcoaceticus* K-4 (табл. 1). Как видно из представленных в табл. 1 данных, эффект от внесения 0.1–0.3% цитрата практически отсутствовал (условная концентрация ПАВ* не отличалась от таковой в контрольном варианте и составляла 4.0–4.2), а для таких же концентраций фумарата оказался незначительным (повышение показателя ПАВ* на 20% при концентрации фумарата 0.1%). Кроме того, по мере увеличения концентрации органических кислот до 0.5% наблюдали снижение показателя условной концентрации ПАВ*.

В связи с этим на следующем этапе исследований концентрацию фумарата и цитрата снижали до 0.01–0.04% и осуществляли внесение органических кислот в среду с этанолом как в начале процесса культивирования *A. calcoaceticus* K-4, так и в конце экспоненциальной фазы роста (табл. 2). Представленные в табл. 2 данные свидетельствуют о том, что добавление фумарата или цитрата в концентрации 0.02% в конце экспоненциальной фазы роста сопровождалось повышением показателя ПАВ* на 48–51%. Отметим, что в таких условиях культивирования индекс эмульгирования культуральной жидкости увеличивал-

Таблица 1. Влияние органических кислот на синтез ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на этаноле

Органическая кислота	Концентрация кислоты, %	ПАВ*
Цитрат	0.1	4.2 ± 0.21
	0.2	4.2 ± 0.21
	0.3	4.2 ± 0.21
	0.4	3.0 ± 0.15
	0.5	2.5 ± 0.12
Фумарат	0.1	4.8 ± 0.24
	0.2	4.5 ± 0.22
	0.3	4.1 ± 0.21
	0.4	3.8 ± 0.19
	0.5	3.6 ± 0.18
Контроль (без органических кислот)	0	3.9 ± 0.19

Примечание. Внесение цитрата и фумарата осуществляли в конце экспоненциальной фазы роста (48 ч).

ся незначительно (на 15–18%). Эти данные могут свидетельствовать об усилении в присутствии фумарата или цитрата синтеза штаммом К-4 метаболитов именно с поверхностно-активными свойствами.

Таким образом, оптимальная концентрация фумарата и цитрата, обеспечивающая повышение синтеза ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на среде с этанолом, оказалась на порядок ниже, чем для *R. erythropolis* ЭК-1 [22, 23]. Для обоих штаммов существенное увеличение показателей синтеза ПАВ наблюдали только в случае внесения органических кислот в конце экспоненциальной – начале стационарной фазы роста.

Синтез ПАВ *A. calcoaceticus* К-4 при одновременном внесении в среду с этанолом фумарата и цитрата. В последующих экспериментах в среду культивирования *A. calcoaceticus* К-4 с этанолом одновременно добавляли фумарат и цитрат в оптимальных концентрациях (по 0.02%). Внесение органических кислот осуществляли как в начале процесса культивирования, так и в конце экспоненциальной фазы роста (табл. 2). Однако эффект от совместного внесения фумарата и цитрата оказался незначительным: условная концентрация ПАВ* составляла 4.6 и 5.7 при внесении органических кислот в начале процесса и в конце экспоненциальной фазы роста соответственно и практически не отличалась от таковой в присутствии только цитрата или только фумарата (табл. 2). Отметим, что внесение органических кислот не сопровождалось повышением уровня биомассы по сравнению с культивированием штамма К-4

на среде без фумарата и цитрата. В обоих случаях концентрация биомассы составляла 1.4–1.5 г/л.

C₂-метаболизм при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на этаноле в присутствии органических кислот. Для выяснения причин незначительного повышения синтеза ПАВ в присутствии фумарата и цитрата анализировали активность ферментов, с помощью которых эти органические кислоты вовлекаются в метаболизм (табл. 3), и активность некоторых ферментов биосинтеза ПАВ (табл. 4).

Как видно из представленных в табл. 3 данных, при внесении фумарата и цитрата в конце экспоненциальной фазы роста наблюдали увеличение в 1.5–2.5 раза активности всех исследуемых ферментов, за исключением изоцитратлиазы, активность которой повышалась всего в 1.2 раза. Эти данные свидетельствуют об ассимиляции органических кислот штаммом К-4.

Дальнейшие исследования активности ферментов показали, что при культивировании на этаноле у *A. calcoaceticus* К-4 функционирует неполный цикл трикарбоновых кислот (отсутствует активность 2-оксоглутарат-дегидрогеназы), а в качестве анаэробного пути – глиоксилатный цикл и ФЕП-карбоксилазная реакция (табл. 3 и 4). Отметим, что реакция карбоксилирования фосфоенолпирувата (как и карбоксилирование пирувата) является анаэробной при выращивании микроорганизмов на углеводных субстратах [8, 9]. Мы предположили, что физиологическая роль ФЕП-карбоксилазы при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на среде, содержащей мочевины в качестве источника азотного питания, состоит в обезвреживании высоких концентраций углекислого газа, образующегося при гидролизе мочевины в уреазной реакции [27], т.е. ФЕП-карбоксилазная реакция является своеобразным стоком избыточного CO₂ в клетках этих бактерий. Кроме того, в результате функционирования ФЕП-карбоксилазы не только снижается концентрация углекислого газа, но и повышается содержание C₄-дикарбоновых кислот, являющихся предшественниками глюконеогенеза. Таким образом, физиологическое значение ФЕП-карбоксилазы при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на среде с этанолом и мочевиной может состоять также в усилении глюконеогенеза и, следовательно, повышении синтеза поверхностно-активных гликолипидов. Об этом свидетельствуют и результаты наших предыдущих исследований по определению оптимальных условий культивирования штамма К-4: наиболее высокие показатели синтеза ПАВ отмечались при использовании в качестве источника азота именно мочевины [1].

Данные, приведенные в табл. 4, свидетельствуют о том, что в присутствии фумарата и цитрата происходит усиление синтеза гликолипидов,

Таблица 2. Синтез ПАВ в зависимости от концентрации органических кислот и времени их внесения в среду культивирования *A. calcoaceticus* K-4

Внесение органической кислоты	Фумарат, %	Цитрат, %	ПАВ*	E ₂₄ , %
Начало процесса культивирования	0.01	0	4.5 ± 0.22	65 ± 3
	0.02	0	4.8 ± 0.24	68 ± 3
	0.03	0	4.7 ± 0.23	70 ± 3
	0.04	0	4.2 ± 0.21	69 ± 3
	0	0.01	4.2 ± 0.21	73 ± 3
	0	0.02	4.5 ± 0.22	75 ± 4
	0	0.03	4.1 ± 0.21	73 ± 3
	0	0.04	4.0 ± 0.20	69 ± 3
	0.02	0.02	4.6 ± 0.23	72 ± 3
В конце экспоненциальной фазы роста	0.01	0	5.3 ± 0.26	73 ± 3
	0.02	0	5.9 ± 0.29	79 ± 4
	0.03	0	5.0 ± 0.25	71 ± 3
	0.04	0	4.9 ± 0.24	68 ± 3
	0	0.01	5.2 ± 0.26	78 ± 4
	0	0.02	5.8 ± 0.29	77 ± 4
	0	0.03	5.1 ± 0.25	80 ± 4
	0	0.04	4.8 ± 0.24	77 ± 4
	0.02	0.02	5.7 ± 0.29	69 ± 3
Контроль (без фумарата)	0	0	3.9 ± 0.19	68 ± 3

Примечание. Индекс эмульгирования определяли для неразбавленной культуральной жидкости.

причем независимо от момента внесения органических кислот в среду культивирования *A. calcoaceticus* K-4. Подтверждением этому является увеличение в таких условиях культивирования

активности ФЕП-карбоксилазы и ФЕП-синтетазы. Отметим, что в присутствии фумарата и цитрата наблюдали (в отличие от ФЕП-синтетазы) снижение активности другого ключевого фермента глюконеогенеза – ФЕП-карбоксикиназы (табл. 4). Увеличение активности изоцитратдегидрогеназы и НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы, а также отсутствие 2-оксоглутаратдегидрогеназы при культивировании штамма K-4 на этаноле в присутствии фумарата и цитрата может свидетельствовать об усилении синтеза амфилипидов (табл. 3 и 4).

Таким образом, анализы активности ферментов (в отличие от показателя условной концентрации ПАВ*) свидетельствовали о повышении биосинтеза ПАВ при одновременном внесении в среду с этанолом фумарата и цитрата.

Интенсификация синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* K-4 в присутствии органических кислот. Мы предположили, что наблюдаемое явление может быть обусловлено использованием в качестве критерия синтеза ПАВ показателя условной концентрации поверхностно-активных веществ, поскольку график зависимости поверхностного натяжения от логарифма разведения свободной от клеток культуральной жидкости штамма K-4 отличался от таковых для других продуцентов ПАВ наличием не одной, а нескольких точек повышения поверхностного натяжения с последующим снижением при увеличении разведения. В связи с этим в качестве показателя синтеза использовали концентрацию внеклеточных ПАВ (г/л), определяемую весовым методом после экстракции органическими растворителями (табл. 5). Действительно, такой показатель оказался корректнее, и данные ростовых экспериментов (табл. 5) коррелировали с результатами анализа активности ферментов (табл. 4). Оказалось неожиданным,

Таблица 3. Активность ферментов, обеспечивающих вовлечение фумарата и цитрата в метаболизм при культивировании *A. calcoaceticus* K-4 на этаноле в присутствии органических кислот

Внесение органической кислоты	Органическая кислота	Активность, нмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹ белка				
		НАДФ ⁺ -зависимая изоцитратдегидрогеназа	изоцитратлиаза	фумаратгидратаза	НАД ⁺ -зависимая малатдегидрогеназа	НАДФ ⁺ -зависимая малатдегидрогеназа
В начале процесса культивирования	Цитрат	581 ± 29	243 ± 12	210 ± 10	124 ± 6	219 ± 11
	Фумарат	881 ± 44	273 ± 13	225 ± 11	204 ± 10	88 ± 4
	Цитрат + фумарат	602 ± 30	309 ± 15	204 ± 10	201 ± 10	120 ± 6
В конце экспоненциальной фазы роста	Цитрат	676 ± 33	280 ± 14	575 ± 28	90 ± 4	45 ± 2
	Фумарат	602 ± 30	309 ± 15	781 ± 39	161 ± 8	361 ± 18
	Цитрат + фумарат	944 ± 47	298 ± 14	769 ± 38	215 ± 10	258 ± 12
Контроль (без органических кислот)		601 ± 30	266 ± 13	326 ± 16	129 ± 6	129 ± 6

Примечание. Концентрация фумарата и цитрата составляла 0.02%, активность ферментов определяли для клеток, находящихся в стационарной фазе роста (72 ч).

Таблица 4. Активность ферментов биосинтеза ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на этаноле в присутствии органических кислот

Внесение органической кислоты	Органическая кислота	Активность, нмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹ белка			
		ФЕП-синтаза	ФЕП-карбок-сикаиназа	НАДФ ⁺ -зависимая глутаматдегидрогеназа	ФЕП-карбоксилаза
В начале процесса культивирования	Цитрат	166 ± 8	166 ± 8	375 ± 18	563 ± 28
	Фумарат	440 ± 22	264 ± 13	307 ± 15	491 ± 24
	Цитрат + фумарат	402 ± 20	120 ± 5	301 ± 15	925 ± 46
В конце экспоненциальной фазы роста	Цитрат	225 ± 11	225 ± 11	Н.о.	Н.о.
	Фумарат	281 ± 14	160 ± 8	Н.о.	Н.о.
	Цитрат + фумарат	472 ± 23	172 ± 8	390 ± 20	1205 ± 60
Контроль (без органических кислот)		172 ± 8	215 ± 10	242 ± 12	727 ± 36

Примечание. Концентрация фумарата и цитрата составляла 0.02%; активность ферментов определяли для клеток, находящихся в стационарной фазе роста (72 ч); Н.о. – не определяли.

что наиболее высокие показатели синтеза ПАВ наблюдались при одновременном внесении фумарата и цитрата в концентрации 0.01%, а не 0.02%, как было установлено ранее (табл. 2). Так, добавление 0.01% органических кислот в среду с этанолом в конце экспоненциальной фазы роста *A. calcoaceticus* К-4 сопровождалось увеличением концентрации синтезированных ПАВ почти в 3 раза (с 1.7 до 5.0 г/л) по сравнению с культивированием бактерий на среде без фумарата и цитрата (табл. 5). При внесении органических кислот в концентрации 0.02% наблюдали повышение синтеза ПАВ до 3.2 г/л (почти в 2 раза выше, чем на среде без органических кислот). Отметим, что в отличие от *R. erythropolis* ЭК-1 [22, 23], при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 как на этаноле, так и этаноле в присутствии фумарата и цитрата,

Таблица 5. Синтез ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на этаноле в присутствии различных концентраций фумарата и цитрата

Органическая кислота, %	ПАВ, г/л	E ₂₄ , % (1 : 49)
Цитрат, 0.01	2.6 ± 0.13	91 ± 4
Цитрат, 0.02	2.6 ± 0.13	100 ± 5
Цитрат, 0.1	1.9 ± 0.10	87 ± 4
Фумарат, 0.01	2.8 ± 0.14	100 ± 5
Фумарат, 0.02	2.5 ± 0.12	87 ± 4
Фумарат, 0.1	2.1 ± 0.10	88 ± 4
Цитрат, 0.01 + фумарат, 0.01	5.0 ± 0.25	89 ± 4
Цитрат, 0.02 + фумарат, 0.02	3.2 ± 0.16	79 ± 4
Цитрат, 0.1 + фумарат, 0.1	2.8 ± 0.14	88 ± 4
Контроль (без органических кислот)	1.7 ± 0.09	88 ± 4

Примечание. Внесение цитрата и фумарата осуществляли в конце экспоненциальной фазы роста (48 ч культивирования).

индекс эмульгирования культуральной жидкости практически не изменялся.

Ранее [28] нами было показано, что наиболее подходящими критериями, позволяющими корректно оценить содержание синтезируемых *R. erythropolis* ЭК-1 метаболитов с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами, являются показатель условной концентрации поверхностно-активных веществ (ПАВ*) и индекс эмульгирования культуральной жидкости, определяемый для ряда последовательных разведений. Полученные ранее сведения [28] и результаты данной статьи свидетельствуют о необходимости и важности правильного выбора корректных критериев оценки синтеза не только поверхностно-активных веществ, но и других продуктов микробного синтеза. Что же касается поверхностно-активных веществ, то в зависимости от конкретного продуцента и химической природы синтезируемых метаболитов объективные показатели синтеза ПАВ могут оказаться различными.

Отметим также, что показатель условной концентрации ПАВ* является экспресс-методом оценки количественного содержания ПАВ в культуральной жидкости и позволяет достаточно быстро осуществить анализ и иметь представление о ходе процесса биосинтеза. Определение количества ПАВ (г/л) весовым методом является более трудоемким и длительным методом анализа.

Вместе с тем из литературы известно, что некоторые бактерии рода *Acinetobacter* синтезируют не обладающие поверхностной активностью липиды, которые экстрагируются смесью Фолча [29–32]. Так, в условиях лимитирования азотом воска и ацилглицериды образует *Acinetobacter* sp. M-1 [31], *Acinetobacter* sp. ADP1 [32], *Acinetobacter* sp. HO1-N [29], *A. calcoaceticus* BD413 [30]. Однако способность к синтезу таких липидов обнаружена при культивировании штаммов на гидрофобных

Таблица 6. Влияние фумарата (0.01%) и цитрата (0.01%) на активность ферментов C₂-метаболизма при культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на этаноле

Внесение фумарата и цитрата	Активность, нмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹ белка								ПАВ*
	НАДФ ⁺ -зависимая изоцитратдегидрогеназа	изоцитратлиаза	фумаратгидратаза	ФЕП-синтетаза	ФЕП-карбоксикиназа	НАДФ ⁺ -зависимая глутаматдегидрогеназа	ФЕП-карбоксилаза	трегалозофосфатсинтаза	
В начале процесса	600 ± 30	250 ± 12	339 ± 17	543 ± 27	220 ± 11	250 ± 12	1015 ± 51	33 ± 2	4.4 ± 0.22
В конце экспоненциальной фазы	720 ± 36	260 ± 13	600 ± 30	1267 ± 63	232 ± 12	400 ± 20	1768 ± 88	48 ± 3	5.9 ± 0.29
В конце экспоненциальной фазы (нейтрализация)	800 ± 40	270 ± 14	580 ± 29	900 ± 45	162 ± 8	290 ± 14	1300 ± 65	33 ± 2	4.0 ± 0.20
Контроль (без органических кислот)	587 ± 29	255 ± 12	314 ± 15	180 ± 9	206 ± 10	239 ± 12	697 ± 35	15 ± 1	3.8 ± 0.19

Примечание. Активность ферментов определяли для клеток, находящихся в стационарной фазе роста (72 ч).

субстратах, а сами липиды локализованы преимущественно внутри клеток. Внеклеточные воски и ацилглицериды в концентрации 0.3–0.4 г/л синтезируют на среде с гексадеканолом *Acinetobacter* sp. НО1-N [29]. Не исключено, что исследуемый нами штамм *A. calcoaceticus* К-4, кроме поверхностно-активных, образует также и не обладающие поверхностной активностью внеклеточные липиды, синтез которых может усиливаться в присутствии фумарата и цитрата. Выяснению этого вопроса будут посвящены наши дальнейшие исследования. Отметим, однако, что поверхностное натяжение супернатанта культуральной жидкости *A. calcoaceticus* К-4 составляло 43–45 мН/м, а после экстракции из супернатанта препарата ПАВ и растворения его в воде (до исходного объема супернатанта) этот показатель снижался до 29–31 мН/м. После выделения препарата ПАВ из супернатанта последний терял поверхностно-активные свойства. Эти результаты позволяют утверждать, что синтезируемые штаммом К-4 внеклеточные метаболиты являются эффективными ПАВ.

Механизмы повышения синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* К-4 в присутствии фумарата и цитрата. Анализировали активность ферментов биосинтеза ПАВ при внесении в среду с этанолом органических кислот в концентрации 0.01% (табл. 6). Установленные закономерности в целом оказались аналогичными использованию фумарата и цитрата в концентрации 0.02% (табл. 3 и 4), однако более существенным было повышение активности ФЕП-синтетазы и ФЕП-карбоксилазы (бо-

лее чем в 7 и 2.4 раза по отношению к контролю соответственно, в то время как при внесении 0.02% органических кислот активность этих ферментов увеличивалась в 2.7 и 1.7 раза) (табл. 6). Эти результаты могут свидетельствовать об усилении синтеза в таких условиях культивирования штамма К-4 именно поверхностно-активных гликолипидов. Подтверждением этому было повышение более чем в 3 раза активности трегалозофосфатсинтазы – ключевого фермента биосинтеза трегалозомиколоатов. Отметим, что при более высоких концентрациях органических кислот активность этого фермента несущественно отличалась от контрольного варианта.

Влияние pH на синтез ПАВ при культивировании штамма К-4 на среде с этанолом и органическими кислотами. При культивировании *A. calcoaceticus* К-4 на среде с этанолом уже на 2 сут наблюдали снижение pH культуральной жидкости до 5.5–5.7, а к концу процесса – до 4.5–5.0. Поскольку у большинства бактерий соли органических кислот транспортируются в клетки вместе с протоном [33] и оптимальным для этого является нейтральное значение pH, мы предположили, что нейтрализация культуральной жидкости в процессе роста штамма К-4 (а также перед внесением органических кислот) будет сопровождаться повышением синтеза ПАВ. Однако эксперименты показали, что при нейтрализации наблюдалось некоторое снижение показателей образования ПАВ, которое коррелировало со снижением активности ферментов их биосинтеза (табл. 6).

Таблица 7. Влияние катионов натрия на активность некоторых ферментов биосинтеза ПАВ *A. calcoaceticus* К-4

Na ⁺ в реакционной смеси, мМ	Активность, нмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹ белка			
	ФЕП-синтетаза	ФЕП-карбоксикиназа	НАДФ ⁺ -зависимая глутаматдегидрогеназа	ФЕП-карбоксилаза
0	1833 ± 92	741 ± 37	833 ± 42	617 ± 31
25	1333 ± 67	Н.о.	167 ± 8	Н.о.
50	1000 ± 50	741 ± 37	167 ± 8	370 ± 19

Примечание. Активность ферментов определяли для клеток, находящихся в начале экспоненциальной фазы роста (24 ч); Н.о. — не определяли.

Вполне вероятно, что наблюдаемое явление может быть обусловлено ингибирующим влиянием на активность некоторых ферментов биосинтеза ПАВ катионов натрия, поскольку для нейтрализации культуральной жидкости в процессе выращивания *A. calcoaceticus* К-4 использовали раствор NaOH. Для проверки этого предположения анализировали активность ферментов в присутствии катионов натрия (табл. 7). Как видно из представленных в табл. 7 данных, Na⁺ в концентрации 25–50 мМ является ингибитором ферментов биосинтеза поверхностно-активных гликолипидов (ФЕП-синтетазы и ФЕП-карбоксилазы), а также аминокислот (НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы). Полученные результаты следует учитывать при разработке биотехнологии поверхностно-активных веществ, в частности.

Установленные нами закономерности по влиянию предшественников на образование ПАВ *A. calcoaceticus* К-4 отличаются от таковых для *R. erythropolis* ЭК-1 [22]: во-первых, оптимальная концентрация фумарата и цитрата для штамма К-4 в 10 раз ниже; во-вторых, в присутствии органических кислот происходит усиление синтеза *A. calcoaceticus* К-4 только поверхностно-активных веществ; в-третьих, эффект от совместного внесения органических кислот в среду культивирования штамма К-4 с этанолом более существенен — концентрация ПАВ увеличивается почти в 3 раза, в то время как для *R. erythropolis* ЭК-1 — всего в 2 раза.

Результаты наших исследований отличаются также и от известных данных литературы: в литературе описано увеличение синтеза ПАВ при наличии в среде только цитрата, который вносили в начале процесса культивирования [34], оптимальная концентрация цитрата при этом составляла 0.5–1.0%. При такой концентрации цитрат можно рассматривать не как регулятор синтеза липидов, а как дополнительный ростовой субстрат.

Отметим также, что нам не удалось обнаружить в литературе сведений о повышении синтеза ПАВ в присутствии как цитрата, так и C₄-дикарбоновых кислот.

Таким образом, в процессе проведенной работы показана возможность интенсификации образования ПАВ *A. calcoaceticus* К-4 при внесении в среду с этанолом предшественников биосинтеза метаболитов липидной и углеводной природы. Установлены оптимальные концентрации цитрата и фумарата (0.01–0.02%), внесение которых в конце экспоненциальной фазы роста обеспечивает повышение на 45–55% показателя условной концентрации ПАВ*.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности регуляции процессов биосинтеза у *A. calcoaceticus* К-4 и изменения их направленности в сторону образования ПАВ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 3. С. 304–310.
2. Zhao Z., Wong J.W.C. // Environ. Technol. 2009. V. 30. № 3. P. 291–299.
3. Rosenberg E., Rubinovitz C., Legmann R., Ron E.Z. // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. № 2. P. 323–326.
4. Rosenberg E., Ron E.Z. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 52. № 2. P. 154–162.
5. Toren A., Navon-Venezia S., Ron E.Z., Rosenberg E. // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. № 3. P. 1102–1106.
6. Walzer G., Rozenberg E., Ron E.Z. // Environ. Microbiol. 2006. V. 8. № 6. P. 1026–1032.
7. Dams-Kozłowska H., Mercaldi M.P., Panilaitis B.J., Kaplan D.L. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 81. № 2. P. 201–210.
8. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. М.: Мир, 1982. 310 с.
9. Современная микробиология. Прокариоты / Ред. Й. Ленгелер, Г. Дреус, Г. Шлегель. М.: Мир, 2005. Т. 1. 654 с.
10. Квесутадзе Г.И., Безбородов А.Н. Введение в биотехнологию. М.: Наука, 2002. 284 с.
11. Konishi M., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Kakugawa K., Kitamoto D. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 78. № 1. P. 37–46.
12. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. // J. Biosci. Bioeng. 2007. V. 104. № 1. P. 78–81.

13. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. // *J. Biosci. Bioeng.* 2008. V. 105. № 5. P. 493–502.
14. Demain A.L. // *Int. Microbiol.* 1998. V. 1. № 4. P. 259–264.
15. Khetan A., Malmberg L.H., Kyung Y.S., Sherman D.H., Hu W.S. // *Biotechnol. Prog.* 1999. V. 15. № 6. P. 1020–1027.
16. Powell A., Al Nakeeb M., Wilkinson B., Micklefield J. // *Chem. Commun.* 2007. V. 14. № 26. P. 2683–2685.
17. Davila A.M., Vandecasteele R., Marsha J.P. // *J. Ind. Microbiol.* 1994. V. 13. № 1. P. 249–257.
18. Hu Y., Ju L.K. // *Enz. Microb. Technol.* 2001. V. 21. № 1. P. 593–601.
19. Raza Z.A., Khan M.S., Khalid Z.M., Rehman A. // *Biotechnol. Lett.* 2006. V. 28. № 20. P. 1623–1631.
20. Saerens S.M.G., Delvaux F., Verstrepen K.J., Van Dijk P., Thevelein J.M., Delvaux F.R. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. № 2. P. 454–461.
21. Yoon S.H., Park H.M., Kim J.E., Lee S.H., Choi M.S., Kim J.Y., Oh D.K., Keasling J.D., Kim S.W. // *Biotechnol. Prog.* 2007. V. 23. № 3. P. 599–605.
22. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.А. // *Микробиология.* 2009. Т. 77. № 6. С. 749–757.
23. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. № 6. С. 651–658.
24. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. // *Микробиология.* 2003. Т. 72. № 4. С. 459–465.
25. Bradford M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254.
26. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
27. Mobely H.L.T., Island M.D., Hausinger R.P. // *Microbiol. Rev.* 1995. V. 59. № 3. P. 451–479.
28. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2004. Т. 40. № 5. С. 544–550.
29. Singer M.E., Tyler S.M., Finnerty W.R. // *J. Bacteriol.* 1985. V. 162. № 1. P. 162–169.
30. Reiser S., Somerville C. // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. № 9. P. 2969–2975.
31. Ishige T., Tani A., Sakai Y., Kato N. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. № 8. P. 3481–3486.
32. Stoveken T., Kalscheuer R., Malkus U., Reichelt R., Steinbuechel A. // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. № 4. P. 1369–1376.
33. Ивановский Р.Н. Биоэнергетика и транспорт субстратов у бактерий. М.: МАКСПресс, 2001. 46 с.
34. de Roubin M.R., Mulligan C.N., Gibbs B.F. // *Can. J. Microbiol.* 1989. V. 35. № 9. P. 854–859.

Production of Surfactants by *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 Grown on Ethanol with Organic Acids

T. P. Pirog^a, T. A. Shevchuk^a, A. D. Konon^b, and E. Yu. Dolotenko^b

^a Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 03680 Ukraine

^b National University of Food Technologies, Kiev, 01601 Ukraine

e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Received September 19, 2011

Abstract—The effect of fumarate (C₄-dicarboxylic acid, a gluconeogenesis precursor) and citrate (a lipid synthesis regulator) on the production of surfactants by *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 grown on ethanol has been studied. Simultaneous addition of fumarate and citrate to concentrations of 0.01–0.02% at the end of the log phase of K-4 growth in a medium with 2 vol % ethanol increases the nominal surfactant concentration by 45–55% in comparison with a culture without organic acids. The increased level of surfactant production in the presence of fumarate and citrate is determined by the increase in the activities of enzymes involved in the production of glycolipids (phosphoenolpyruvate synthase and trehalose phosphate synthase) and aminolipids (NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase) by factors of 1.7–7, as well as by the simultaneous operation of two anaplerotic pathways: the glyoxylate cycle and the reaction catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxylase.

УДК 579.8.017

ОКИСЛЕНИЕ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ АБОРИГЕННЫМ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО СОЗДАННЫМ СООБЩЕСТВАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2012 г. Т. А. Пивоварова*, А. Г. Булаев*, П. В. Рощупко*, А. В. Белый**, Т. Ф. Кондратьева*

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

e-mail: Kondr@inmi.ru

**ЗАО “Полюс”, Красноярск

Поступила в редакцию 26.01.2012 г.

Исследовано аборигенное и экспериментальное сообщество ацидофильных хемолитотрофов, созданное на основе чистых культур микроорганизмов. Наблюдали окисление элементарной серы, тиосульфата натрия и тетрагидрата калия в качестве единственных источников энергии. У экспериментального сообщества окисление протекало с большей скоростью, чем у аборигенного сообщества, выделенного из флотоконцентрата пирротинсодержащей пиритно-арсенопиритной золотомышьяковой сульфидной руды. Степень окисления S-субстратов экспериментальным сообществом микроорганизмов составила 17.91, 68.30 и 93.94%, аборигенным сообществом – 10.71, 56.03 и 79.50% соответственно. Степень окисления сульфидных форм серы в флотоконцентрате руды аборигенным сообществом микроорганизмов составила 59.15%, а экспериментальным сообществом микроорганизмов – 49.40%. Несмотря на более высокую скорость окисления S-субстратов в качестве единственных источников энергии экспериментальным сообществом микроорганизмов, аборигенное сообщество с большей скоростью окисляло S-субстраты во флотоконцентрате пирротинсодержащей пиритно-арсенопиритной золотомышьяковой сульфидной руды, из которого оно было выделено. Из сульфидных минералов в процессе бактериально-химического окисления флотоконцентрата аборигенным сообществом микроорганизмов извлечено дополнительно 32.3% золота, что на 5.7% больше, чем в случае применения экспериментального сообщества микроорганизмов.

Важнейшим фактором среды, влияющим на видовое разнообразие сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов (АХМ), как в природных условиях, так и в биогеотехнологических процессах окисления сульфидного минерального сырья, является характеристика энергетического субстрата [1].

Одним из кислоторастворимых сульфидных минералов, входящих в состав сульфидных руд, является пирротин. В кислых условиях пирротин растворяется с потреблением протонов, что приводит к нежелательному повышению pH. При этом в среду выделяется большое количество ионов двухвалентного железа, которое, с одной стороны, является субстратом для микроорганизмов, но, с другой стороны, снижает окислительно-восстановительный потенциал среды, что может замедлять процесс окисления сульфидов. Из сульфидной серы пирротина через сероводород и полисульфиды образуется элементарная сера [2].

Самым распространенным кислотонерастворимым сульфидным минералом на Земле является пирит, который входит в состав большинства сульфидных руд. Его окисление микроорганизмами идет по пути, который основан на окислительной атаке Fe^{3+} . Здесь главным промежуточ-

ным соединением является тиосульфат [3]. При низких значениях pH химическое окисление пирита контролируется Fe^{3+} -ионами, а не кислородом, так как гидратированные ионы Fe^{3+} , в отличие от растворенного кислорода, связываются с поверхностью пирита. Это приводит к переносу электронов от атомов серы кристаллической решетки на ионы железа Fe^{3+} [4]. В цикле бактериально-химического окисления пирита образуются три-, тетра- и пентатионаты.

Генетическая гетерогенность техногенных сообществ АХМ позволяет адаптироваться к изменениям характеристик энергетического субстрата, т.е. к изменениям соотношения сульфидных минералов и химических элементов во флотоконцентратах сульфидных руд. Однако при высоком содержании в окисляемом субстрате пирротина (и в меньшей степени арсенопирита) происходит накопление избытка элементарной серы, которую микроорганизмы часто не успевают полностью окислить [5]. Поэтому одной из проблем извлечения золота при биоокислении таких субстратов является высокое содержание в твердых остатках (биокеки) большого количества серы, которая обладает высокой сорбционной активностью по отношению к цианиду [6]. Сера значительно по-

вышает расход цианида и снижает извлечение благородных металлов, что приводит к необходимости вводить в технологию дополнительные этапы для доокисления серы перед цианированием (обработку биокеков кислородом, окисление при 50–90°C азотной кислотой, электрохимическую обработку и т.д.) [5, 7]. Кроме того, осаждение гидрофобной серы на поверхности сульфидных минералов препятствует процессу их дальнейшего биоокисления [8]. Поэтому присутствие в минеральном концентрате большого количества пирротина, считающегося легкоокисляемым, представляет собой большую проблему в биогидрометаллургии благородных металлов.

Так как многие технологические приемы обработки биокеков перед цианированием значительно увеличивают затраты, то одной из важнейших задач биогидрометаллургии является снижение содержания в них серы путем оптимизации процесса биоокисления.

Одним из возможных путей может являться использование термофильных архей, с большой скоростью окисляющих серу. При ведении процесса биоокисления термофильными микроорганизмами (*Sulfolobus metallicus*) происходит снижение содержания серы в биокеке, однако данные микроорганизмы более чувствительны по сравнению с мезофильными к мышьяку, поэтому не подходят для переработки концентратов, содержащих арсенопирит [9, 10]. Необходимо искать пути оптимизации процессов биоокисления таких субстратов, протекающих в мезофильных условиях.

Цель работы – изучение скорости окисления аборигенным и экспериментально созданным сообществами ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов S-субстратов (S^0 , тиосульфат и тетрагидрат) как единственных источников энергии в среде и сульфидных форм серы во флотоконцентрате золотомышьяковой пирротинсодержащей пиритно-арсенопиритной руды.

МЕТОДИКА

Сообщества микроорганизмов и условия выращивания. Аборигенное сообщество ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов было создано на основе накопительной культуры, полученной при внесении в 100 мл среды Сильвермана и Люндгрена 9К [11] с 1 г/л элементной серы, 2 г навесок флотоконцентрата пирротинсодержащей пиритно-арсенопиритной золотомышьяковой сульфидной руды. Исходный pH среды довели до 5 М H_2SO_4 до 2.0. Колбы помещали на качалку со 150 об/мин в термостат при 35–37°C. В состав сообщества аборигенных микроорганизмов были включены также бактерии и археи, выделенные ранее из флотоконцентратов той же руды: *Acidithiobacillus ferrooxidans* OL10-01, *Leptospirillum*

ferriphilum OL10-02, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* OL10-03, *Ferroplasma acidiphilum* OL-4, *Alicyclobacillus tolerans* OL10-05 [12].

В состав экспериментального сообщества микроорганизмов были включены, помимо вышеперечисленных бактерий и архей, следующие штаммы микроорганизмов, хранящиеся в музее чистых культур лаборатории хемолитотрофных микроорганизмов ИНМИ РАН: *S. olympiadicus* OL-6; *S. thermosulfidooxidans* OL-7; *S. thermosulfidooxidans* (штаммы Ser, P, M); *L. ferriphilum* (штаммы, выделенные из руд Кючусского и Олимпиадинского месторождений); *F. acidiphilum* – флотоконцентрата руды Кючусского месторождения; штамм *A. thiooxidans* N (Армения); штамм *A. caldus* R; штамм *S. thermosulfidooxidans* HT-3.

Сообщества микроорганизмов поддерживали на среде с флотоконцентратом при 5%-ной плотности, пересевая 1 раз в месяц.

Окисление S-субстратов (S^0 , $S_2O_3^{2-}$, $S_4O_6^{2-}$) сообществами микроорганизмов. Опыты проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл со 100 мл среды [11] без добавления двухвалентного железа. В среду в качестве единственного источника энергии добавляли стерильные субстраты: элементную серу в количестве 10 г/л, или тиосульфат натрия ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) в количестве 3 г/л, или тетрагидрат калия ($K_2S_4O_6$) в количестве 3 г/л. Серу стерилизовали автоклавированием при 0.5 атм, 3%-ные растворы тиосульфата натрия или тетрагидрата калия в минеральной среде стерилизовали фильтрованием через мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Значение pH среды довели до 5 М H_2SO_4 до 2.5. В качестве инокулята использовали уравненные по числу клеток суспензии сообществ микроорганизмов. Колбы помещали на качалку со 150 об/мин, выращивание проводили при 35–37°C. Контрольные эксперименты проводили в колбах со стерильной средой и серными субстратами, не инокулируя их микроорганизмами.

Окисление флотоконцентрата. В состав флотоконцентрата входило (%) Fe_S – 20.37, $S_{общ}$ – 18.33, S_S – 17.84, $S_{эл}$ – 0.8, As_S – 6.69, $Ca_{общ}$ – 4.97 и $C_{общ}$ – 3.58. Окисление флотоконцентрата проводили в полунепрерывных условиях культивирования в отъемно-доливном режиме в трех биореакторах объемом 2500 мл с 600 мл среды [11] без двухвалентного железа в каждом, при плотности пульпы (суспензии концентрата руды в жидкой среде) 16.6%, исходном значении pH 1.9–2.0, температуре 35–37°C, перемешивании верхнеприводной мешалкой (“RW20 digital IKA”, Германия) при скорости вращения 430 об/мин и скорости протока 0.004 ч⁻¹.

Методы анализа. Значения pH определяли на pH-метр-иономере Эксперт-001 (“Эконикс-Экс-

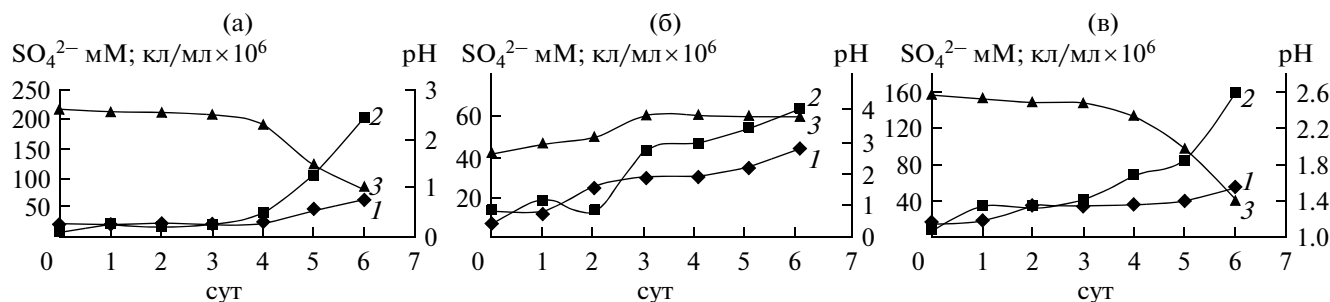


Рис. 1. Окисление аборигенным сообществом микроорганизмов элементарной серы (а), тиосульфата натрия (б), тетра-тионата калия (в).

1 – SO_4^{2-} (мМ), 2 – число клеток ($\text{кЛ/мл} \times 10^6$), 3 – значение pH.

перг”, Россия), Eh – на Microprocessor pH Meter pH 213 (“Hanna”, Германия), количество SO_4^{2-} – по методу [13], число клеток – методом прямого счета в световом микроскопе Ampival (“Carl Zeiss”, Германия) с фазово-контрастной приставкой.

Количественный анализ элементного состава флотоконцентрата проводили в аналитической лаборатории Центрального научно-исследовательского геологоразведочного института цветных и благородных металлов (ЦНИГРИ) по методикам исполнителя. Содержание золота и серебра в твердых остатках биоокисления (биокеках) определяли пробирным анализом. Степень извлечения золота – сорбционным цианированием биокеков. Цианирование проводили в следующих условиях: плотность пульпы – 30% (в/о), pH 10.2–10.5, 1.0 г/л цианида натрия (70% времени), продувание воздухом 25 л/ч, 8% сорбента (carbon Norit 3515), 20°C в течение 48 ч. Уровень адсорбции золота на сорбенте 99–100%.

Определение степени окисления S-субстратов.

Для определения степени окисления S-субстратов сообществами микроорганизмов в качестве единственных источников энергии было рассчитано возможное количество SO_4^{2-} , образованного при их полном окислении. Из 10 г S^0 может быть образовано 312.5 мМ SO_4^{2-} . Из 3 г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.774 г S^0 , что соответствует 24.2 мМ SO_4^{2-} . Из 3 г $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ – 1.27 г S^0 , что соответствует 39.7 мМ SO_4^{2-} . Исходя из расчетов, с минеральными солями в среду было внесено 24.7 мМ SO_4^{2-} . Таким образом, в опытах с S^0 в результате полного окисления могло образоваться 337.2 мМ SO_4^{2-} , с $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 48.9 мМ SO_4^{2-} , с $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ – 64.4 мМ SO_4^{2-} .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Окисление S-субстратов в качестве единственных источников энергии. При инкубировании сте-

рильных контрольных колб в течение 8 сут не наблюдалось накопления в среде сульфатов, что свидетельствовало о том, что использованные серные субстраты практически не окислялись кислородом воздуха без участия микроорганизмов.

При окислении элементарной серы аборигенным сообществом микроорганизмов число клеток в 1 сут роста увеличилось от 0.65×10^7 до 2.04×10^7 , логарифмическая фаза наступила только после 4 сут, и к 6 сут число клеток достигло 20.35×10^7 (рис. 1а). Снижение значения pH коррелировало с ростом клеток и окислением серы. За период наблюдения значение pH снизилось от 2.59 до 0.98, в среде накопилось 58.1 мМ SO_4^{2-} .

Тиосульфат является одним из основных продуктов, образующихся при окислении пирита [2]. Он нестабилен в кислой среде, при pH ниже 4.0 разлагается на сульфит и серу. При взаимодействии с серной кислотой из тиосульфата образуется сульфат и серноватистая кислота ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$), которая разлагается с образованием SO_2 , S^0 и H_2O . В контрольном эксперименте без инокулята pH стерильной среды за 6 сут повышался от 2.65 до 3.44–3.52.

При окислении тиосульфата натрия аборигенным сообществом микроорганизмов число клеток в 1 сут роста увеличилось от 0.65×10^7 до 1.85×10^7 (рис. 1б). При этом количество SO_4^{2-} в среде осталось без изменений. Возможно, этот прирост биомассы был обязан гетеротрофной составляющей сообщества за счет использования органического вещества, внесенного с инокулятом. Затем с увеличением значения pH число клеток снизилось, а после 2 сут опять начало увеличиваться, однако достигло через 6 сут только 6.29×10^7 . Вторая логарифмическая фаза, возможно, была связана с изменениями в соотношении микроорганизмов в сообществе, в пользу более устойчивых к повышению значения pH, которое через 6 сут

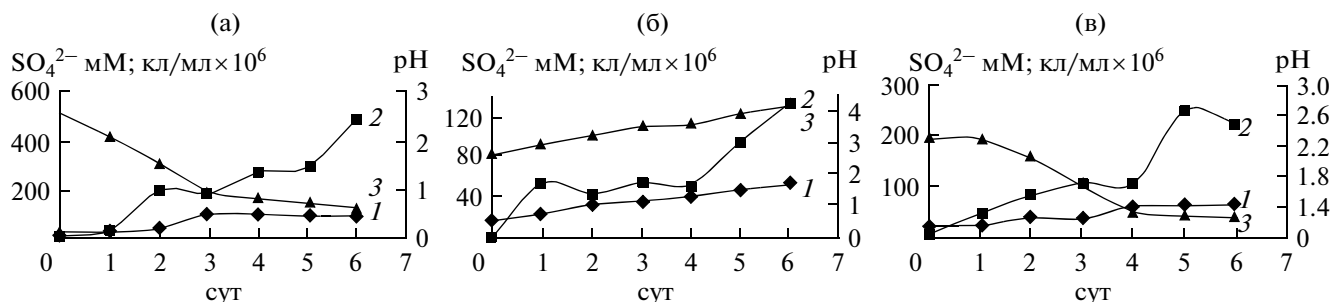
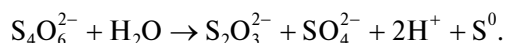


Рис. 2. Окисление экспериментальным сообществом микроорганизмов элементарной серы (а), тиосульфата натрия (б), тетрагидрата калия (в).

1 – SO_4^{2-} (мМ), 2 – число клеток ($\text{клеток/мл} \times 10^6$), 3 – значение pH.

возросло от 2.65 до 3.86. В среде за это время накопилось $40.9 \text{ мМ } \text{SO}_4^{2-}$.

Метаболизм тетрагидрата калия идет через гидролиз с образованием серы, тиосульфата и сульфата:



При окислении тетрагидрата калия аборигенным сообществом микроорганизмов число клеток в 1 сут роста увеличилось от 0.65×10^7 до 3.33×10^7 , достигая через 6 сут 15.91×10^7 (рис. 1в). Значение pH при этом снизилось от 2.58 до 1.41. Особенно интенсивное снижение pH среды наблюдали после 4 сут роста, когда шло интенсивное увеличение числа клеток. В среде накопилось за 6 сут $51.2 \text{ мМ } \text{SO}_4^{2-}$.

Как видно из рис. 1а–1в, в первые 4 сут роста на среде с тетрагидратом было более высокое число клеток, чем на средах с элементарной серой и тиосульфатом в качестве источников энергии, и накапливалось больше SO_4^{2-} . Через 5 сут роста аборигенное сообщество микроорганизмов на среде с элементарной серой перегнало по числу клеток сообщество на среде с тетрагидратом. При этом наблюдалось более активное снижение pH до 1.46 и 1.97 и большая скорость накопления SO_4^{2-} : 41.5 и 37.7 мМ соответственно. Рост на среде с тиосульфатом был существенно хуже, чем на двух других субстратах, при этом наблюдалось повышение значения pH от 2.65 до 3.82 и меньшее накопление SO_4^{2-} – 33.0 мМ.

При окислении элементарной серы экспериментальным сообществом микроорганизмов число клеток в первые сутки роста увеличилось от 0.65×10^7 до 3.33×10^7 (рис. 2а). Однако экспериментальному сообществу микроорганизмов не потребовалось длительной лаг-фазы, в отличие от аборигенного, для окисления элементарной серы. После 1 сут была отмечена первая логарифмическая фаза. После 2 сут наблюдали снижение скорости роста, возможно, из-за значения pH, неоптимального для

микроорганизмов, доминирующих в сообществе в первые 2 сут роста. В сообществе микроорганизмов в этот период происходило замещение доминирующих видов, устойчивых к низким значениям pH, который при этом снизился от 2.62 до 0.75. После 5 сут наступила вторая лог-фаза. И число клеток достигло 51.62×10^7 . На 3 сут эксперимента в среде накопилось $96.1 \text{ мМ } \text{SO}_4^{2-}$.

При окислении тиосульфата натрия экспериментальным сообществом микроорганизмов число клеток в первые сутки роста увеличилось больше, чем на других S-субстратах, от 0.65×10^7 до 5.36×10^7 (рис. 2б). В период 1–4 сут по мере повышения pH скорость роста снижалась. Однако после 4 сут число клеток резко возросло, и на 6 сут составило 13.32×10^7 . В экспериментальном сообществе микроорганизмов, более богатом по разнообразию включенных в его состав бактерий и архей, чем аборигенное сообщество, присутствуют штаммы, которые даже при увеличении pH после периода адаптации начинают активно размножаться за счет органических соединений, накопленных в среде в результате лизиса клеток ацидофильных микроорганизмов, неустойчивых к значению pH выше 3.0. При этом окисление тиосульфата продолжалось с низкой скоростью, но немного более высокой, чем в процессе с аборигенным сообществом микроорганизмов: в среде через 6 сут роста накопилось $48.4 \text{ мМ } \text{SO}_4^{2-}$.

При окислении тетрагидрата калия экспериментальным сообществом микроорганизмов число клеток в 1 сут роста увеличилось от 0.65×10^7 до 4.81×10^7 , достигая через 5 сут 24.98×10^7 (рис. 2в). После 3 сут культура переходила в стационарную фазу роста, значение pH при этом продолжало снижаться, содержание SO_4^{2-} возросло: в отсутствие прироста клеток процесс окисления продолжался. После 4 сут наблюдалась вторая логарифмическая фаза, которая при низких значениях pH не была связана с окислением тетрагидрата, так

Таблица 1. Степень окисления S-субстратов двумя сообществами микроорганизмов, %

S-субстрат	Сообщество микроорганизмов, %	
	аборигенное	экспериментальное
S ⁰	10.71	17.91
S ₂ O ₃ ²⁻	56.03	68.30
S ₄ O ₆ ²⁻	79.50	93.94

как количество SO₄²⁻ в среде в это время оставалось на одном уровне. В экспериментальном сообществе микроорганизмов более широко представлены миксотрофные сульфобациллы, чем в аборигенном сообществе. Возможно, вторичная логарифмическая фаза вызвана вспышкой роста этих микроорганизмов за счет использования в качестве энергетических субстратов органических веществ. В среде к концу эксперимента накопилось 60.5 мМ SO₄²⁻.

В 1 сут роста наибольшее число клеток у экспериментального сообщества наблюдалось на среде с тиосульфатом, однако уже на 2 сут экспериментальное сообщество на среде с элементарной серой значительно перегнало по числу клеток сообщество микроорганизмов на среде с тиосульфатом и тетрагидратом (рис. 1, рис. 2). Отставание в росте на среде с тиосульфатом сохранялось до конца эксперимента, возможно, как и в случае с аборигенным сообществом микроорганизмов, из-за неблагоприятного для ацидофилов значения pH.

Скорость окисления S-субстратов экспериментальным сообществом микроорганизмов превышала скорость окисления аборигенным сообществом микроорганизмов. По числу клеток в процессе окисления элементарной серы через 6 сут роста экспериментальное сообщество микроорганизмов превосходило аборигенное сообщество: 51.62×10^7 и 20.35×10^7 соответственно. Значение pH при этом достигало 0.64 и 0.98 соответственно. В культуральной жидкости при окислении S-суб-

стратов экспериментальным сообществом микроорганизмов через 6 сут была отмечена более высокая концентрация SO₄²⁻, чем при окислении аборигенным сообществом микроорганизмов.

Степень окисления S-субстратов двумя сообществами микроорганизмов приведена в табл. 1. Экспериментальное сообщество микроорганизмов с большей скоростью в лабораторных экспериментах окисляло S-субстраты, чем аборигенное: элементарную серу – на 7.2, тиосульфат натрия – на 12.27, тетрагидрат калия – на 14.4%. Относительно низкая степень окисления элементарной серы объясняется ее избыточным внесением в среду. Из двух других S-субстратов с большей скоростью оба сообщества микроорганизмов окисляли тетрагидрат калия.

Окисление S-субстратов в флотоконцентрате золотомышьяковой сульфидной руды. В табл. 2 приведены результаты по степени окисления железа, мышьяка и серы, а также по извлечению золота и серебра в результате биоокисления двумя сообществами микроорганизмов флотоконцентрата пирротинсодержащей пиритно-арсенипиритной золотомышьяковой сульфидной руды. Степень окисления сульфидной формы серы аборигенным сообществом микроорганизмов составила 59.15, экспериментальным сообществом микроорганизмов – 49.40%.

Пробирным анализом в исходном флотоконцентрате определено 75 г/т золота и 1.6 г/т серебра. В результате цианирования исходного флотоконцентрата в хвостах (твердые остатки) цианирования определено 28.5 г/т золота и около 1 г/т серебра. В исходном флотоконцентрате содержится 62.0% свободного золота.

В результате цианирования биокека (выход 68%) из процесса биоокисления флотоконцентрата экспериментальным сообществом микроорганизмов в хвостах цианирования определено 12.6 г/т золота и менее 1 г/т серебра. В процессе цианирования окисленного флотоконцентрата было извлечено 88.6% золота и более 62.5% серебра. Из сульфидных минералов в процессе бактериально-химического окисления флотоконцен-

Таблица 2. Степень окисления сульфидных элементов и извлечения благородных металлов двумя сообществами микроорганизмов из концентрата золотомышьяковой сульфидной руды в последних реакторах лабораторной установки

Субстрат	Содержание, %						Степень окисления, %			Извлечение, %	
	Fe _S	As _S	S _{общ}	S ⁰	S _{сульфатн.}	S _S	Fe _S	As _S	S _S	Au	Ag
Исходный концентрат	20.37	6.69	18.33	0.8	0	17.84				62.0	<62.50
Биокек после окисления экспериментальным сообществом	12.30	2.90	17.51	1.97	2.26	13.28	58.94	70.53	49.40	88.60	>62.50
Биокек после окисления аборигенным сообществом	9.22	0.70	15.98	2.21	4.66	9.11	63.79	91.63	59.15	94.3	>62.50

трата экспериментальным сообществом микроорганизмов высвобождено дополнительно 26.6% золота.

В результате цианирования биокека (выход 80%) из процесса биоокисления флотоконцентрата аборигенным сообществом микроорганизмов в хвостах цианирования определено 5.32 г/т золота и менее 1 г/т серебра. В процессе цианирования окисленного флотоконцентрата было извлечено 94.3% золота и более 62.5% серебра. Из сульфидных минералов в процессе бактериально-химического окисления флотоконцентрата аборигенным сообществом микроорганизмов высвобождено дополнительно 32.3% золота, что на 5.7% больше, чем в случае применения экспериментального сообщества микроорганизмов.

Таким образом, несмотря на более высокую скорость окисления содержащих серу субстратов в качестве единственных источников энергии экспериментальным сообществом микроорганизмов, аборигенное сообщество как более адаптированное к субстрату, из которого оно было выделено, с большей скоростью окисляло S-субстраты концентрата пирротинсодержащей пиритно-арсенопиритной золотомышьяковой сульфидной руды.

Работа выполнена при поддержке ЗАО "Полюс".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кондратьева Т.Ф., Пивоварова Т.А., Цапина И.А., Фомченко Н.В., Журавлева А.Е., Муравьев М.И., Меламуд В.С., Булаев А.Г. // Микробиология. 2012. Т. 81. № 1. С. 3–28.
2. Shippers A., Sand W. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 1. P. 319–321.
3. Shippers A., Jozsa P.G., Sand W. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 9. P. 3424–3431.
4. Sand W., Gehrke T., Jozsa P.-G., Schippers A. // Hydrometallurgy. 2001. V. 59. № 2–3. P. 159–175.
5. van Aswegen P.C., van Niekerk J., Olivier W. // Biominning / Eds. D.E. Rawlings, B.D. Johnson. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. P. 1–35.
6. Luthy R.G., Bruce S.G.Jr. // Environ. Sci. Technol. 1979. V. 13. № 12. P. 1481–1487.
7. Sedelnikova G.V., Savari E.E. // Proc. 15th Int. Biohydrometallurgy Sympos. (IBS 2003). Part I / Eds: M. Tsezos, E. Remoudaki, A. Hatzikioseyan. Athens: Nat. Techn. Univ. Athens, 2003. P. 91–100.
8. Thomas J.E., Jones C.F., Skinner W.M., Smart R.St.C. // Geochimica et Cosmochimica. 1998. V. 62. № 9. P. 1555–1565.
9. Lindstrom E.B., Gunneriusson L. // J Ind. Microbiol. 1990. V. 5. № 6. P. 375–382.
10. Lindstrom E.B., Sandstrom A., Sundkvist J.-E. // Hydrometallurgy. 2003. V. 71. № 1–2. P. 21–30.
11. Silverman M.P., Lundgren D.C. // J. Bacteriol. 1959. V. 77. № 5. P. 642–647.
12. Булаев А.Г., Пивоварова Т.А., Меламуд В.С., Бумажкин Б.К., Патутина Е.О., Колганова Т.В., Кузнецов Б.Б., Кондратьева Т.Ф. // Микробиология. 2011. Т. 80. № 6. С. 854–861.
13. Kolmert Å., Wikström P., Hallberg K.B. // J. Microbiol. Methods. 2000. V. 41. № 3. P. 179–184.

Oxidation of Sulfur-Containing Substrates by Aboriginal and Experimentally Designed Microbial Communities

T. A. Pivovarova^a, A. G. Bulaev^a, P. V. Roshchupko^a, A. V. Belyi^b, and T. F. Kondrat'eva^a

^a Winogradsky Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

e-mail: Kondr@inmi.host.ru

^b ZAO Polyus, Krasnoyarsk, Russia

Received January 26, 2012

Abstract—Aboriginal and experimental (constructed of pure microbial cultures) communities of acidophilic chemolithotrophs have been studied. The oxidation of elemental sulfur, sodium thiosulfate, and potassium tetrathionate as sole sources of energy has been monitored. The oxidation rate of the experimental community is higher as compared to the aboriginal community isolated from a flotation concentrate of pyrrhotine-containing pyrite–arsenopyrite gold–arsenic sulfide ore. The degree of oxidation of the mentioned S substrates amounts to 17.91, 68.30, and 93.94% for the experimental microbial community and to 10.71, 56.03, and 79.50% for the aboriginal community, respectively. The degree of oxidation of sulfur sulfide forms in the ore flotation concentrate is 59.15% by the aboriginal microbial community and 49.40% by the experimental microbial community. Despite a higher rate of oxidation of S substrates as a sole source of energy by the experimental microbial community, the aboriginal community oxidizes S substrates at a higher rate in the flotation concentrate of pyrrhotine-containing pyrite–arsenopyrite gold–arsenic sulfide ore, from which it was isolated. Bacterial–chemical oxidation of the flotation concentrate by the aboriginal microbial community allows for the extraction of an additional 32.3% of gold from sulfide minerals, which is by 5.7% larger compared to the yield obtained by the experimental microbial community.

UDC 582.28

PURIFICATION, CHARACTERISATION AND COAL DEPOLYMERISATION ACTIVITY OF LIGNIN PEROXIDASE FROM *Lenzitus betulina* MTCC-1183

© 2012 M. Yadav, S. K. Singh, and S. Yadava

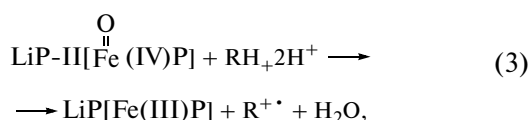
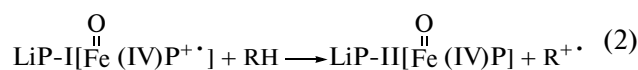
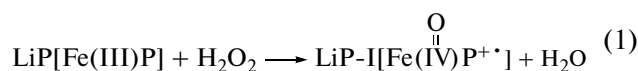
D.D.U. Gorakhpur University, Gorakhpur, 273 009, India

e-mail: drmeerayadav@rediffmail.com

Received February 14, 2012

Lignin peroxidase from the culture filtrate of *Lenzitus betulina* MTCC-1183 has been purified to homogeneity using concentration by ultrafiltration and anion exchange chromatography on DEAE cellulose. The molecular weight of the purified lignin peroxidase using SDS-PAGE analysis was 43 kDa. Specific activity of the enzyme was 29.58 IU/mg. The K_m values for veratryl alcohol and H_2O_2 for the purified enzyme were 54 μ M and 81 μ M, respectively. The k_{cat} value of the purified enzyme was $2.3 s^{-1}$ using 3,4-dimethoxybenzyl alcohol as the substrate. The optimal conditions for the lignin peroxidase assay were detected at pH 2.4 and 22°C. Thermal stability of the purified enzyme has also been studied and its activation energy for deactivation was 287 kJ/mol. The purified lignin peroxidase depolymerised humic acid in presence of H_2O_2 . Depolymerisation of coal by the *L. betulina* MTCC-1183 has been demonstrated using humic acid as a model of coal.

The lignin decomposing white-rot basidiomycetes secrete a heme protein, lignin peroxidases (LiP, E.C. 1.11.1.14) which in presence of H_2O_2 degrade lignin and lignin model compounds [1]. Different steps involved in the catalysis by LiP are



where R is the organic substrate and P is the porphyrin. The LiP compound I (LiP-I) carries both oxidizing equivalents of H_2O_2 , one as an oxyferryl ($Fe^{4+}=O$) center and one as a porphyrin π cation radical ($P^{+\cdot}$), whereas LiP compound II (LiP-II) carries only one oxidizing equivalent.

LiP is a biotechnologically important enzyme having wide potential applications (i) in delignification of lignocellulosic materials [2] which are seen as an alternative to the depleting oil reserves, (ii) in the conversion of coal to low molecular mass fractions [3] which could be used as feed stock for the production of commodity chemicals, (iii) in biopulping and biobleaching [4] in paper industries, (iv) in removal of recalcitrant organic pollutants [5–9] and (v) in the enzymatic polymerization [10] in polymer industries. Keeping in view the biotechnological potential of LiP the authors have initiated enzymatic studies on the LiP from indigenous fungal strains [11–13]. In a previous com-

munication, secretion of LiP from 6 indigenous fungi, namely *Abortiporus biennis*, *Pestalotia bicolor*, *Heterobasidium annosum*, *Gloeophyllum striatum*, *Loweporus lividus*, *Lenzitus betulina*, in their liquid culture growth media amended with lignin-containing natural substances has been reported [14]. However, LiP from these fungal strains have not been purified and characterized. The aim of the study was to purify and characterize LiP from the liquid growth medium of *Lenzitus betulina* MTCC-1183. Its enzymatic characteristics like K_m , pH and temperature optima and thermal stability using veratryl alcohol and H_2O_2 as the substrate have been determined. Depolymerisation of coal by the purified enzyme of *L. betulina* MTCC-1183 has been demonstrated using humic acid as a model of coal.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Veratryl alcohol, which is 3,4-dimethoxybenzyl alcohol was purchased from Aldrich (USA). Nitrioloacetate was from Sigma Chemical Co. (USA). All the chemicals including molecular weight markers phosphorylase (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.0 kDa), ovalbumin (43.0 kDa), carbonic anhydrase (29.0 kDa), soyabean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and lysozyme (14.3 kDa) and were procured from Bangalore Genei Pvt. Ltd. (India). All other chemicals were obtained either from CDH (India) or Loba Chemie (India) or s.d. Fine-Chem. Ltd. (India) and were used without further purification.

Fungal strain. The fungal strain *Lenzitus betulina* MTCC-1183 was procured from Microbial Type Culture Collection Center and Gene Bank, Institute of microbial technology, Chandigarh (India) and was

maintained on agar slants using growth medium consisted (g/l): malt extract – 20.0 and agar – 20.0 dissolved in double distilled water.

For production of LiP, the fungus was grown in a medium containing (g/l): glucose – 10, ammonium tartrate – 1.32, KH_2PO_4 – 0.2, (mg/l): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, CaCl_2 – 0.01, ($\mu\text{g/l}$): thiamine – 10 and 1 ml of a solution containing (g/l): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 3.0, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.5, NaCl – 1.0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.185, CaCl_2 – 0.08, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.18, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ – 0.01, H_3BO_3 – 0.01, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.012 and nitrilotriacetate – 1.5. The pH of basal medium was adjusted to 4.5 with 20 mM dimethyl succinate.

Enzyme was prepared by growing the fungi in 25 ml of sterilized culture media in 100 ml conical flasks containing natural lignin substrate. Flasks were inoculated with mycelia of 1 cm diameter under aseptic conditions and the fungal culture was grown under stationary culture at 30°C. Attempts to scale up production via a proportional increase in both culture volume and flask size or with the use of shallow pans resulted in lower activity [15].

Enzyme assay. The LiP activity [15] has been assayed by monitoring the formation of veratraldehyde using veratryl alcohol as a substrate at $\lambda = 310$ nm with UV/VIS spectrophotometer Hitachi (Japan) model U-2000, which was fitted with electronic temperature control unit. Molar extinction coefficient $9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was used for veratraldehyde to calculate the enzyme unit. The activity of Mn-peroxidase was determined by monitoring the absorbance change at $\lambda = 240$ nm due to formation of Mn (II) lactate and using MnSO_4 as the substrate [16]. The activity of laccase [17] was analysed using 2,6-dimethoxyphenol (DMP) as the substrate. The assay solution of 1 ml consisted of 1 mM DMP in 50 mM sodium malonate buffer, pH 4.5 at 37°C. The reaction was monitored by measuring the absorbance change at $\lambda = 468$ nm and using the molar extinction coefficient of $49.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. One unit of the enzyme was defined as the amount of enzyme, which converts one μmole of substrate to product under the standard assay conditions. The least count of absorbance measurement was 0.001 absorbance unit.

Purification of the enzyme. The secretion of LiP in the liquid culture medium by *L. betulina* MTCC-1183 has been reported and the culture conditions for maximum secretion have already been optimized [14]. The fungus was grown under the reported optimal conditions in 100 ml culture flasks containing 25 ml of the liquid culture growth medium under stationary conditions in a biological oxygen demand incubator at 30°C.

The maximum LiP activity appeared on 5th day after inoculation of mycelia. Culture medium of all flasks were pooled, filtered through 4 layers of cheese cloth and 1200 ml of culture filtrate with 0.50 IU/ml

activity was concentrated to 10 ml with Amicon Concentration Cell Model 8200 (USA) using PM10 ultrafiltration membrane (India). The concentrated enzyme was dialyzed against 1000-fold excess of 5.0 mM sodium succinate buffer (pH 5.5) at 20°C overnight. The dialyzed enzyme was loaded on a DEAE column (1×16 cm) which was preequilibrated with the same buffer. After washing with 50 ml of the same buffer the adsorbed enzyme was eluted by applying a linear gradient of 0–200 mM NaCl (50 ml of buffer + 50 ml of buffer containing 200 mM NaCl). 5 ml fractions were collected and analyzed for the LiP activity [15] and protein concentration was determined by the method Lowry et al. using bovine serum albumin as a standard. The active fractions were combined and concentrated with the Amicon Concentration Cell Model 8200, and then with Model-3 using ultrafiltration membrane PM10 to 1 ml. The concentrated enzyme was stored at 4°C. The enzyme did not lose activity for 2 months under these conditions.

SDS-PAGE. The homogeneity of the enzyme preparation was checked by SDS-PAGE using the method of Weber and Osborn [18]. The separating gel with 12% acrylamide in 0.375 M Tris-HCl buffer (pH 8.8) and stacking gel with 5% acrylamide in 0.063 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) were used. Gel was run at a constant current of 20 mA [20]. Proteins were visualized by silver staining [19].

Enzymatic characteristics. The K_m values of the purified LiP for veratryl alcohol was determined by measuring steady state velocities of the enzyme catalyzed reactions at different substrate concentrations (0.02–2.5 mM) at a fixed H_2O_2 concentration (0.4 mM). The values of K_m and V_{max} were calculated by the linear regression of the double reciprocal plots [20]. The K_m value for H_2O_2 was detected following the same procedure by varying H_2O_2 concentration (0.006–0.6 mM) at a fixed enzyme saturating concentration of veratryl alcohol (2.0 mM). The pH optimum was determined by measuring the steady state velocities of the LiP catalyzed reaction at different pH values (1.8–3.5) in 50 mM disodium tartrate/tartaric acid buffer. The optimum value of pH was detected by plotting steady state velocity against the pH of the reaction solution. The temperature optimum of the enzyme was determined by measuring the steady state velocities of reaction in the range from 15 to 35°C and plotting the steady state velocities against temperatures.

Thermal stability of the enzyme has been assessed by measuring steady state velocities of enzyme catalyzed reaction at different time intervals at fixed temperatures. The values of deactivation rate constants were detected by the $t_{1/2}$ of the deactivation curves. The energy of activation of the deactivation process was determined by Arrhenius plot of $\log k$ vs $1/T$.

Coal depolymerisation activity. The coal depolymerizing activity of the purified LiP was assessed by measuring the decrease of OD_{450} and the increase of

Table 1. Purification of LiP from *L. betulina* MTCC-1183.

Steps	Total volume	Protein, mg/ml	Activity, U/ml	Specific activity, U/mg	Total protein, mg	Total activity, U	Purification, fold	Recovery, %
Crude enzyme	1200	0.10	0.50	5.00	120	600	1	100
Concent-rated enzyme	10	0.90	9.56	10.62	9.0	95.6	2.12	15.9
Dialysed enzyme	16	0.65	7.55	11.62	10.4	120.8	2.32	20.13
DEAE-cellulose chromatography	15	0.12	3.55	29.58	1.80 (6.60)*	53.25 (160.50)*	5.92	8.87 (26.6)*

* The values given in brackets are calculated on the basis of 16 ml of dialyzed sample but only 5 ml of 16 ml dialyzed sample has been loaded on DEAE cellulose column.

OD₃₆₀ [21] when the enzyme and H₂O₂ was added to the humic acid solution. The reaction solution consisted of 200 µl of humic acid (1 mg/ml), 100 µl of freshly prepared 0.4 mM H₂O₂, 200 µl of 50 mM of sodium tartrate buffer (pH 2.5) and 450 µl of double distilled water and maintained at 25°C. The reaction was started by the addition of 50 µl of the enzyme solution. Absorbance was observed at the intervals of 20 s. A plot of absorbance vs time was made.

Screening of the fungi for coal depolymerisation was performed in Petri dishes containing Tein and Kirk medium [11] or modified Kirk and Czapek-Dox agar medium [21]. Tein and Kirk medium contained (g/l): humic acid – 1.0, glucose – 10.0, malt extract – 10, peptone – 2.0, yeast extract – 2.0, L-Asp – 1.0, KH₂PO₄ – 2.0, MgSO₄ · 7H₂O – 1.0, agar – 20.0, (mg/l): thiamine-HCl – 1.0. Modified Kirk medium contained (g/l): humic acid – 1.0, glucose – 0.2, yeast extract – 0.05, 2,2-dimethyl succinate – 2.2, ammonium tartrate – 0.5, KH₂PO₄ – 2.0, MgSO₄ · 7H₂O – 0.5 g, CaCl₂ – 0.1, agar – 28. Czapek-Dox agar medium consisted (g/l): humic acid – 1.0, glucose – 0.2, yeast extract – 0.05, NaNO₃ – 0.5, K₂HPO₄ – 1.0, MgSO₄ · 7H₂O – 0.5, KCl – 0.5, FeSO₄ · 7H₂O – 0.5, agar – 18.0. The plates were inoculated with the *Lenzites* mycelia and incubated at 25°C in the dark for 2 weeks. Decolorisation of the dark brown agar around the fungal growth area was observed periodically. A piece of mycelium of diameter 1 cm taken from the decolorized zone was suspended in 1 ml of double distilled water, filtered through Millex-GS 0.22 µm Millipore filter unit and the filtrate was used for the assay of LiP, Mn-peroxidase and laccase.

RESULTS AND DISCUSSION

The purification procedure of LiP from the culture filtrate of the fungus *L. betulina* MTCC-1183 is summarized in Table 1 and the elution profile of the enzyme activity from the DEAE-cellulose column is given in Fig. 1. All the LiP fractions were combined and concentrated and the enzyme sample obtained was analyzed by SDS-PAGE analysis (Fig. 2). The presence of single protein band in lane 2 of Fig. 2 indicates that the purified enzyme is homogeneous. The molecular weight of the purified enzyme calculated from SDS-PAGE analysis was 43.0 kDa. The molecular weights of different isozymes of LiP purified from the culture filtrate of the fungus *Phanerochaete chrysosporium* ATCC-24725 [15] have been reported in the range 38.0 to 46.0 kDa where as for 2 isozymes of *P. chrysosporium* ATCC-20696 [22] and *Pleurotus sajor caju* MTCC-141 [24] they were 38.0 kDa and 40.0 kDa, respectively. Thus, the molecular weight of

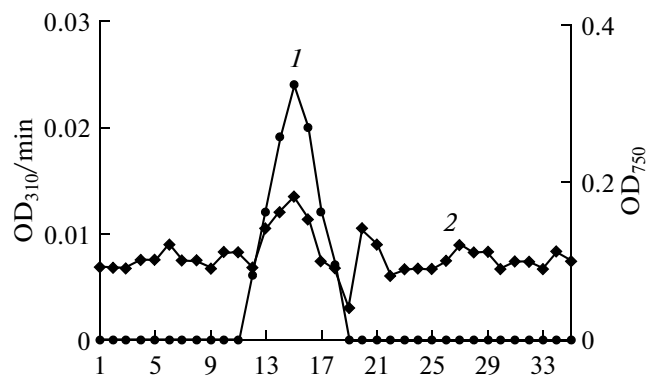


Fig. 1. Typical elution profile of LiP from *L. betulina* MTCC-1183 after DEAE column. 1 – the enzyme activity at 310 nm; 2 – protein at 750 nm.

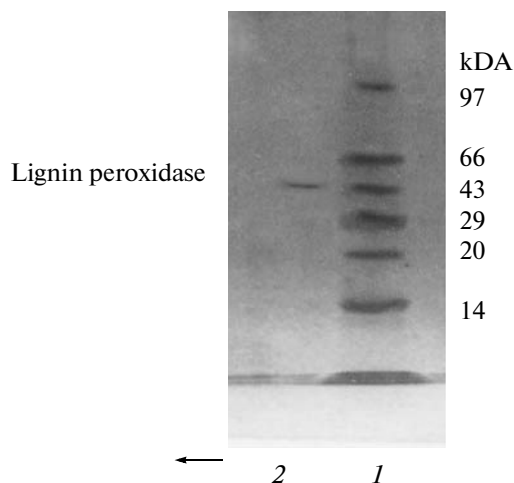


Fig. 2. SDS – PAGE of LiP from *L. betulina* MTCC-1183. 1 – the molecular weight markers; 2 – the purified LiP (50 μ l, 1.55 U/ml).

the LiP purified from the culture filtrate of *L. betulina* MTCC-1183 has been found to be in the same range as for other fungal strains [15, 22]. It is important that the purification procedure described here for the LiP is simpler than the procedures reported for the enzyme from other fungi [15, 22]. Moreover, we have only one activity peak after DEAE cellulose indicating that under the conditions used for the growth of the fungus only one form of the enzyme is produced where as, in cases of purification of LiP from other sources multiple forms of isozymes have been detected [15, 22]. The specific activity of purified LiP of *L. betulina* MTCC-1183 has been found to be 29.58 IU/mg.

Enzymatic characteristics. The Michaelis-Menten and double reciprocals plots using veratryl alcohol and H_2O_2 as the variable substrates at the fixed enzyme saturating concentration are shown in Figs. 3a and 3b, respectively. The calculated K_m values for veratryl alcohol and H_2O_2 were 54 μ M and 81 μ M, respectively. For comparison, the K_m values for veratryl alcohol and H_2O_2 for the LiP purified from the culture filtrates of other fungi are given in Table 2. They were found to be in the same range. The calculated k_{cat} value for the pu-

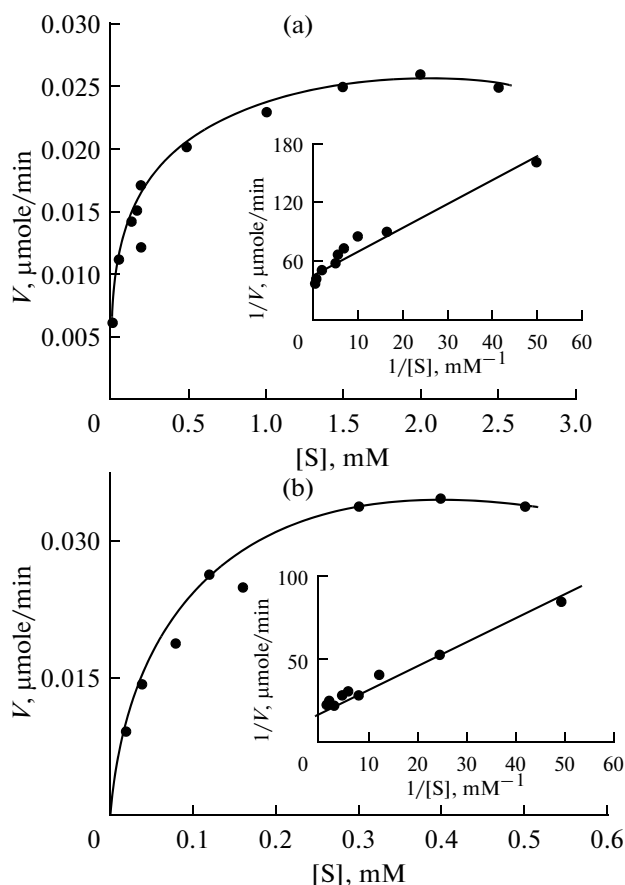


Fig. 3. Michaelis-Menten and double reciprocal plots for LiP from *L. betulina* MTCC-1183. 1 ml reaction mixture consisted of (0.02–2.5) mM veratryl alcohol (a) or (0.006–0.6) mM H_2O_2 (b) as the variable substrate, 0.4 mM H_2O_2 (a) or 2.0 mM veratryl alcohol (b) in 50 mM sodium tartrate buffer pH 2.5 at 25°C.

rified enzyme was 2.3 s^{-1} for veratryl alcohol as the substrate. In order to check that the purified enzyme is a LiP and not a versatile peroxidase, it was analysed for Mn-peroxidase activity [16] and this activity was not revealed.

The variation of the steady state velocity of the purified LiP with pH is shown in Fig. 4a. 1 ml of reaction mixture consisted of 2.0 mM veratryl alcohol, 0.4 mM

Table 2. K_m values for fungal LiP calculated using veratryl alcohol or H_2O_2 as the substrate

Fungal strains	K_m for veratryl alcohol, μ M	K_m for H_2O_2 , μ M	Temp., °C	pH
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> [15]	60	80	26	3.0
<i>Penicillium citrinum</i> [11]	69	64	30	4.0
<i>Fusarium oxysporum</i> [11]	64	72	25	2.3
<i>Aspergillus terreus</i> [11]	60	80	22	2.0
<i>Pleurotus sajor caju</i> [24]	57	80	30	3.0
<i>Loweporus lividus</i> [26]	55	75	25	2.5
<i>L. betulina</i> MTCC-1183	54	81	22	2.4

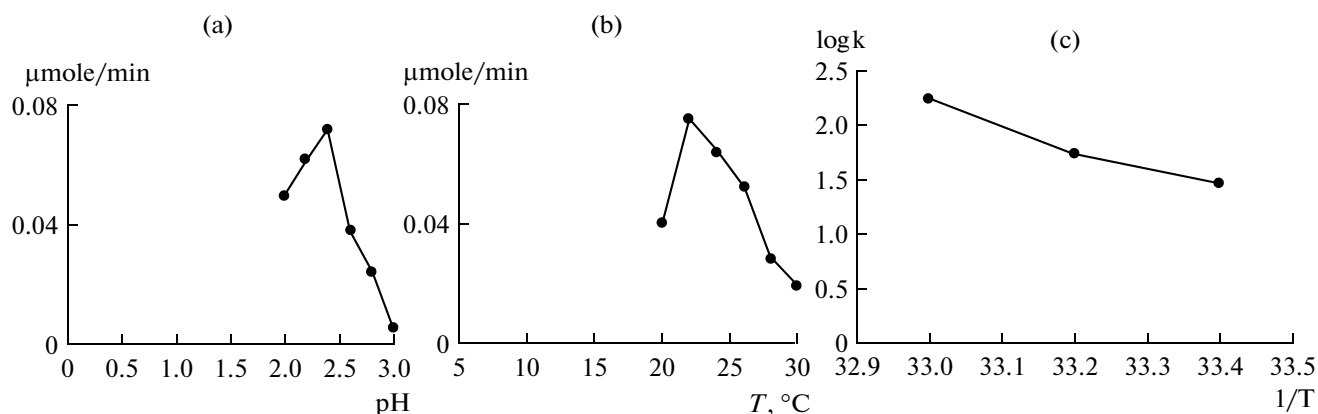


Fig. 4. Dependence of the LiP from *L. betulina* MTCC-1183 on pH (a) and temperature (b). Thermal stability of the LiP from *L. betulina* MTCC-1183 at different time at fixed temperature of reaction (c).

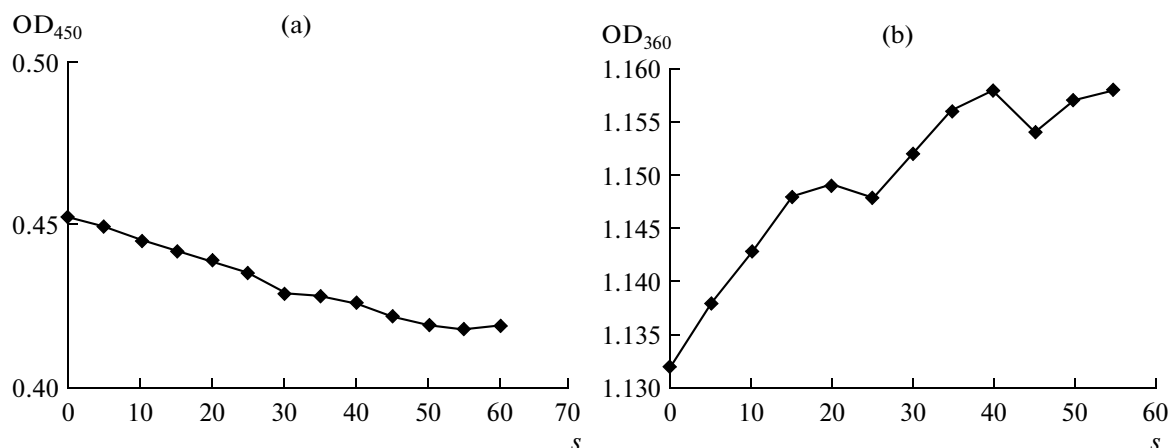


Fig. 5. Coal depolymerising activity of the LiP from *L. betulina* MTCC-1183 assayed by measuring decrease of OD₄₅₀ (a) and increase of OD₃₆₀ (b).

H₂O₂ in 50 mM sodium tartrate buffer at 25°C and pH changed from 1.8 to 4.5. The calculated pH optimum was 2.4. The pH optima of LiP purified from other fungal sources are given in Table 2 and the most of them are located in the range from 2.0 to 4.0 though a few enzymes have pH optima in the alkaline range [13, 25]. Effect of temperature on the steady state velocity of the purified LiP is shown in Fig. 4b. 1 ml of reaction mixture consisted of 2.0 mM veratryl alcohol, 0.4 mM H₂O₂ in 50 mM sodium tartrate buffer at pH 2.5 and temperature changed from 15° to 35°C. Temperature optima of LiP purified from other fungi are also given in Table 2 and they are in the range from 22 to 30°C. Thus, the pH and temperature optima of the purified enzyme are located in the same range as reported for the other fungal strains.

The Arrhenius plot for the determination of energy of activation for the thermal deactivation process of

the enzyme is shown in Fig. 4c. 1 ml of reaction mixture consisted of 2.0 mM veratryl alcohol and 0.4 mM H₂O₂ in 50 mM sodium tartrate buffer (pH 2.5). The calculated energy of activation was 287 kJ/mol. For LiP of other fungi this parameter is not available in the literature for comparison.

Humic acid degradation. The results of depolymerisation of humic acid by the purified LiP of *L. betulina* MTCC-1183 are shown in Fig. 5. Fig. 5a shows the depolymerization of the dark brown humic acid fraction (decrease of OD₄₅₀) and Fig. 5b shows the formation of yellowish colored fulvic-acid-like compounds (increase of OD₃₆₀) by purified LiP of *L. betulina* MTCC-1183. Thus, it has been shown that LiP caused a disappearance of high molecular mass coal fractions and the formation of smaller ones. These investigations have clarified that the LiP from *L. betulina* MTCC-1183 is involved in coal depolymerisation. In 1989 Wondrack et

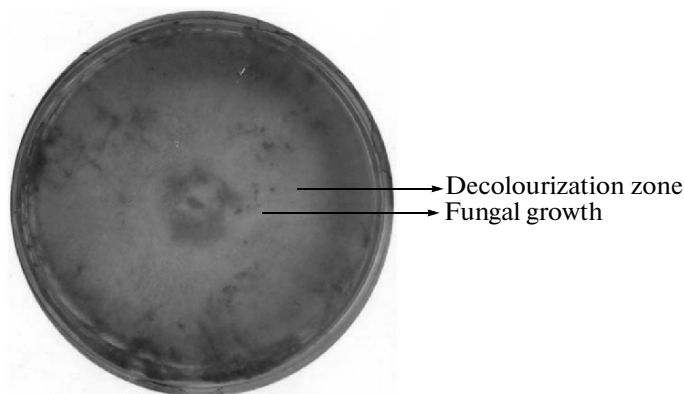


Fig. 6. Decolourisation of humic acid by *L. betulina* MTCC-1183 in modified Kirk medium containing humic acid (1g/l).

al. [23] first demonstrated the oxidizing effect of lignin peroxidase from *P. chrysosporium* on coal polymers in aqueous solution. Mechanism of breakdown is still to be investigated. Due to the large size of lignin as well as coal humic acids, they cannot be taken up into the hyphae, thus an extracellular enzymatic attack has to be assumed. These enzymes are able to form reactive radicals (aryl cation radicals) within the lignin polymer, which can lead to a complete breakdown of the high molecular mass structure.

In order to see if the fungus itself depolymerises humic acid when it was grown on the medium containing humic acid, experiments were performed. The results are shown in Fig. 6. It was found that *L. betulina* MTCC-1183 decolorized the humic acid in modified Kirk medium to maximum extent as compared to the Czapek-Dox agar medium and Tien and Kirk medium. The colour of humic acid containing agar was dark brown which changed to yellow around the fungal growth area. The bleaching effect was stable for 3 weeks at 25°C. It has already been demonstrated [21] that the decolorization of agar medium containing coal humic acids is a suitable and easy method for the rapid detection of coal depolymerizing fungi. The bleaching effect around the growth area of fungi appears due to a breakdown of high molecular mass coal fractions to low molecular mass ones. It was assumed that fulvic-acids-like compounds were formed during depolymerization of coal.

The analysis of a small portion of the decolourized zone of the fungal growth region revealed the presence of the LiP and laccase activity (0.25 U/ml) where as no activity of Mn-peroxidase was found. Thus, LiP is involved at least partially in the depolymerisation of humic acid by *L. butilina* MTCC-1183.

ACKNOWLEDGMENTS

The financial support of University Grant Commission (India) through its Project no. F:4-2/2006

(BSR)/13-149/2008 (BSR) to Dr. Meera Yadav as a UGC's Dr. D.S. Kothari Postdoctoral Fellowship, is thankfully acknowledged. Authors are also thankful to Prof. K.D.S. Yadav for helpful discussions.

REFERENCES

1. Edwards, S.L., Raag, R., Wariishi, H., Gold, M.H., and Poulos T.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, no. 2, pp. 750–754.
2. Harley, B.S., Brodo, P.M.A., and Senior, P.J., *Proceedings of Royal Society Discussion Meeting on Utilisation of Lignocellulosic Wastes*, Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1988.
3. Catcheside, D.E.A. and Ralph, J.P., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, vol. 52, no. 1, pp. 16–24.
4. Eriksson, K.E. and Kirk, T.K., *FEMS Microbiol. Rev.*, 1994, vol. 13, no. 2–3, pp. 351–364.
5. Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D., and Aust, S.D., *Science*, 1985, vol. 228, no. 4706, pp. 1434–1436.
6. Kwant, S.S. and Chang, J.K., *Biotechnol. Lett.*, 1998, vol. 20, no. 6, pp. 569–572.
7. Satwinder, S.M., Rajesh, G., Chand, P., and Kennedy, J.F., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1998, vol. 73, no. 3, pp. 292–296.
8. Levin, L., Papinutti, L., and Forchiassin, F., *Biores. Technol.*, 2004, vol. 94, no. 2, pp. 169–176.
9. Novotny, C., Svobodova, K., Erbanova, P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E., and Sasek, V., *Soil Biol. Biochem.*, 2004, vol. 36, no. 10, pp. 1545–1551.
10. Uyama, H. and Kobayashi, S., *Chemtech.*, 1999, vol. 29, no. 10, pp. 22–28.
11. Kumari, M., Yadav, R.S.S., and Yadav, K.D.S., *Indian J. Expt. Biol.*, 2002, vol. 40, no. 7, pp. 802–806.
12. Shanmugan, V. and Yadav, K.D.S., *Indian J. Microbiol.*, 1997, vol. 37, no. 15, pp. 105–106.
13. Shanmugan, V. and Yadav, K.D.S., *Indian J. Expt. Biol.*, 1996, vol. 34, pp. 1164–1165.
14. Patel, V.K., Yadav, R.S.S., and Yadav, K.D.S., *Indian J. Biotechnol.*, 2007, vol. 6, no. 4, pp. 553–556.

15. Tien, M. and Kirk, T.K., *Methods in Enzymology*, 1988, vol. 161, pp. 238–249.
16. Gold, M.H. and Glenn, J.K., *Methods in Enzymology*, 1988, vol. 161, pp. 258–264.
17. Coll, M.P., Fernandez-Abalos, J.M., Villomueva, J.R., Somtamaria, R., and Perez, P., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, vol. 59, no. 8, pp. 2607–2613.
18. Werber, K. and Osborn, M., *J. Biol. Chem.*, 1969, vol. 244, no. 16, pp. 4406–4412.
19. Morrissey, J.H., *Anal. Biochem.*, 1981, vol. 117, no. 2, pp. 307–310.
20. Fersht, A., *Structure and Mechanism in Protein Science*, New York: Freeman, W.H., and Company, 1998.
21. Hafrichter, M. and Fritsche, W., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1996, vol. 46, no. 3, pp. 220–225.
22. Wang, P., Hu, X., Cook, S., Begonia, M., Lee, S.K., and Hwang, H., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol. 24, no. 10, pp. 2205–2212.
23. Wondrack, L., Scanto, M., and Wood, W.A., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1989, vol. 20–21, no. 1, pp. 765–780.
24. Yadav, M., Singh, S.K., and Yadav, K.D.S., *J. Wood Chem. Technol.*, 2009, vol. 29, no. 1, pp. 59–73.
25. Nozomi, K., Yohru, S., and Kehchi, K., *J. Biosci. Bioeng.*, 2002, vol. 93, no. 4, pp. 405–410.
26. Yadav, M., Yadav, P., and Yadav, K.D.S., *Eng. Life Sci.*, 2009, vol. 9, no. 2, pp. 1–6.

УДК 619:616.98

РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССНОЙ ДЕТЕКЦИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДНОГО АНТИГЕНА И КЛЕТОК ВОЗБУДИТЕЛЯ БРУЦЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

© 2012 г. Н. А. Бызова*, А. В. Жердев*, С. З. Ескендинова**, К. К. Балтин**, Г. Б. Унышева**,
К. К. Муканов**, Е. М. Раманкулов**, Б. Б. Дзантиев*

*Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071, e-mail: nbyzova@inbi.ras.ru

**Национальный центр биотехнологии РК, Астана, Казахстан, 010000

Поступила в редакцию 16.04.2012 г.

Разработан экспресс-метод детекции поверхностного липополисахаридного антигена и клеток возбудителя бруцеллеза крупного рогатого скота, представляющий собой иммунохроматографический анализ в “сэндвич”-формате. Контакт пробы и тест-полоски с нанесенными иммунореагентами инициирует движение жидкости по мембранным компонентам тест-полоски, иммунохимические взаимодействия и формирование окрашенных зон. Показано, что данный метод позволяет за 10 мин определять липополисахаридный антиген клеточной стенки возбудителя бруцеллеза в концентрациях до 10 нг/мл и клетки *Brucella abortus* в концентрациях до 10^6 кл./мл (5×10^4 кл. в пробе). Подтверждена специфичность иммунодетекции. Разработанная тест-система может быть использована при внелабораторной экспресс-диагностике бруцеллеза крупного рогатого скота.

Во многих странах бруцеллез наносит значительный экономический ущерб, обусловленный заражением сельскохозяйственных животных и частыми случаями инфицирования людей [1, 2]. Высока актуальность этой проблемы, в частности, для России и Казахстана [3–6].

Одним из основных направлений в борьбе с бруцеллезом является своевременное выявление очагов инфекции, эффективность которого связана с достоверной, оперативной и информативной лабораторной диагностикой заболевания. Для диагностики бруцеллеза в настоящее время используют бактериологические, биологические, молекулярные и серологические методы, каждый из которых обладает своими достоинствами и ограничениями [7].

Бактериологический метод при положительном результате обеспечивает наиболее достоверную лабораторную диагностику бруцеллеза. Дополнительное преимущество метода заключается в возможности идентификации возбудителя до биовара, что позволяет установить источник инфекции и наметить наиболее эффективные противоэпидемические и профилактические мероприятия. Вместе с тем недостатками метода являются длительность получения результатов, трудоемкость и опасность для персонала, низкая производительность и другие факторы [7, 8].

Биологический метод основан на избирательном накоплении возбудителя бруцеллеза в организме восприимчивых к нему лабораторных животных при парентеральном введении исследуемого материала, в том числе загрязнен-

ного посторонней микрофлорой. Метод несколько более чувствителен, чем бактериологический, при работе с высоковирулентными штаммами бруцелл, но малопригоден при исследовании материала, содержащего возбудитель с ослабленной вирулентностью. В остальном биологический метод сохраняет недостатки бактериологического.

Для детекции и идентификации бруцелл и лабораторного подтверждения диагноза используют также метод полимеразной цепной реакции, позволяющий в течение 5–6 ч определить наличие специфической последовательности ДНК бруцелл в пробах [9]. К ограничениям метода следует отнести длительность, повышенные требования к условиям проведения лабораторного тестирования и квалификации персонала.

Серологические методы позволяют фиксировать наличие антигенсодержащего материала или антител к нему, не прибегая к изоляции болезнетворного агента. В отличие от бактериологического и биологического методов, достоверность которых вытекает из факта выделения бруцелл, серологические тесты представляют доказательства присутствия в исследуемом материале искомого агента на основе специфического взаимодействия антиген–антитело. Важным преимуществом этих методов перед первыми является возможность детекции не только корпускулярных, но и субкорпускулярных и растворимых антигенов (т.е. циркулирующих в организме или выводимых из него фрагментов возбудителя). К настоящему времени предложены и используются разнообразные серологические тесты, позволяю-

щие выявлять как антигены бруцелл, так и специфические антитела: реакция агглютинации [10, 11], реакция связывания комплемента [12], иммунодиффузия [10], иммунофлуоресцентный анализ [13], иммуноэлектрофорез [14], радиоиммунный анализ [15], иммуноферментный анализ (ИФА) [16–18], дот-иммуноанализ [19]. Многообразие серологических методов обусловлено, главным образом, стремлением повысить их достоверность и информативность. Исходя из этого, обычно используют не один серологический тест, а несколько дополняющих друг друга тестов [20].

Выбор оптимального формата иммуноанализа основывается прежде всего на его экспрессности и пределе детекции. Исходя из этих критериев, несомненными преимуществами обладают активно разрабатываемые в последнее время иммунохроматографические методы анализа [21]. При проведении иммунохроматографии контакт пробы с тест-полоской инициирует движение реагентов по мембранам тест-полоски и все происходящее при этом специфические реакции. Вызываемое окрашивание определенных зон тест-полоски позволяет сделать вывод о результатах тестирования, в том числе исходя из визуальной оценки интенсивности окрашивания. Таким образом, иммунохроматография обеспечивает возможность проведения быстрого (5–15 мин) и нетрудоемкого анализа, который может быть реализован непосредственно на месте отбора пробы [22]. Для документирования результатов иммунохроматографии и при необходимости их последующей количественной оценки могут быть дополнительно использованы различные портативные средства видеорегистрации – как специализированные устройства, так и серийные сканеры и мобильные телефоны [23, 24].

Цель исследования – разработка и характеристика экспрессного иммунохроматографического анализа (ИХА) для диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота (КРС), основанного на определении в биоматериале клеток возбудителя бруцеллеза *Brucella abortus* и его специфического антигена – липополисахарида (ЛПС) клеточной стенки.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе применяли антитела козы (GAMIss), кролика (RAMIss) и овцы (SAMIss) против IgG мыши и антитела овцы (SARIss) против IgG кролика (“Имтек”, Россия), антитела козы (GAMI) против IgG мыши (“Arista Biologicals”, США), конъюгат антител быка против IgG мыши с пероксидазой (“Медгамал”, Россия), трис, Тритон X-100, дигидрохлорид 3,3',5,5'-тетраметилбензидина, N-гидроксисукцинимидный эфир биотина, цитрат натрия, азид натрия, фетальную сыворотку КРС (“Sigma”, США), золотохлори-

стоводородную кислоту (“Fluka”, Германия), диметилсульфоксид (ДМСО), Твин-20, БСА (“MP Biomedicals”, Великобритания). Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щелочи, органические растворители) были аналитической или химической чистоты.

Растворы для получения коллоидного золота (КЗ) и его конъюгатов готовили на деионизированной воде (18.2 МΩ см при 25°C, система Simplicity, “Millipore”, США).

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

В работе также использовали коммерческий препарат единого бруцеллезного антигена *Brucella abortus* 19 производства НПО “Антиген” Алматы, Казахстан (концентрация клеток 10^{10} кл./мл).

Выращивание культуры клеток *B. abortus* 19. Культуру клеток *B. abortus* 19 выращивали на эритроцит-агаре при 37°C в течение 3–4 сут. Клетки смывали стерильным физиологическим раствором, pH 7.0–7.2, фильтровали и прогревали при 80°C в течение 1 ч для инактивации бруцелл. Для отделения бактериальной массы взвесь центрифугировали при 3000 г в течение 10–15 мин. Надосадочную жидкость отделяли, а осадок использовали для получения ЛПС клеточной стенки бруцелл.

Получение бактериальных препаратов. При характеристике специфичности тест-систем были использованы клетки *B. suis*, *Yersinia enterocolitica* O:9 R, O:9 S и 287, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae Inaba*, *Salmonella enteritidis yena*, *S. typhimurium* TA 100, *Escherichia coli* 565, *E. coli* 113-3, *Shigella sonne*, *S. flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii* в концентрациях 10^9 – 10^{10} кл./мл, подвергнутые термообработке при 80°C в течение 1 ч.

Выделение ЛПС антигена *B. abortus*. ЛПС бруцелл получали методом водно-фенольной экстракции. Инактивированную клеточную массу *B. abortus* 19 экстрагировали водно-фенольной смесью (объемное соотношение вода–фенол = 1 : 1) 15 мин при 70°C, после охлаждения центрифугировали при 1100 g в течение 1 ч. Отделяли фенольный слой, повторяли экстракцию в таком же режиме, объединяли фенольные фазы и диализовали их против воды. Содержание углеводов определяли фенольно-серным методом [25], а затем концентрировали препарат до 1 мг/мл. К полученному препарату антигена добавляли азид

натрия до конечной концентрации 0.1% и хранили при 2–4°C.

Получение моноклональных антител. Иммунизация включала 5 внутривенных инъекций препарата ЛПС *B. abortus* 54 мышам BALB/c (первая – в смеси с полным адьювантом Фрейнда и 4 последующих – в 50 мМ К-фосфатном буфере, рН 7.4, с 0.1 М NaCl, ФБС). Дозы иммуногена на животное составляли 100 мкг. Титр специфических антител определяли методом ИФА. Для получения иммунных спленоцитов использовали мышей с максимальным титром.

Через 3 сут после последней иммунизации выделяли спленоциты и смешивали их с миеломными клетками линии X63-Ag-8.653. Селекцию гибридом проводили в среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин. Для культивирования клеток использовали среду RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки плода КРС.

Начиная с 10 сут после слияния клеток, супернатанты лунок с визуализированным ростом проверяли методом непрямого твердофазного ИФА на наличие гибридом, продуцирующих антитела против ЛПС бруцелл. Отобранные гибридомы наращивали *in vitro* и в виде асцитных опухолей в перитонеальной полости мышей BALB/c, получивших за 1 нед до введения клеток внутривенную инъекцию 1 мл пристана. Гибридомы вводили в 0.5–1 мл среды RPMI-1640 в концентрации $(1-4) \times 10^6$ кл. на одно животное. Через 10–20 сут выделяли асцитную жидкость.

Полученный штамм гибридных клеток 7F10 депонирован в Республиканской коллекции микроорганизмов Казахстана, регистрационный номер С-РКМ 0271.

Штамм гибридных клеток БИМА получен при иммунизации мышей поли-Б антигеном *B. melitensis* B115 [26].

Очистку иммуноглобулинов проводили трехкратным осаждением сульфатом аммония. Конечные препараты иммуноглобулинов хранили при 4°C в виде осадков под сульфатом аммония.

Моноклональные антитела 7F10 относились к классу IgG, подклассу 1, антитела БИМА – к классу IgG, подклассу 2a. Константа связывания антител 7F10 по отношению к ЛПС бруцелл составляла $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, константа связывания антител БИМА – $7.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$.

Биотинилирование антител [27]. 200 мкл раствора антител в ФБС (100 мкмоль) смешивали с раствором N-гидроксисукцинимидного эфира биотина в ДМСО (1 ммоль) и инкубировали 2 ч при комнатной температуре и непрерывном перемешивании. Избыток непрореагировавших низкомолекулярных реагентов удаляли диализом против ФБС.

“Сэндвич”-ИФА ЛПС. Антитела 7F10 или БИМА в концентрации 3 мкг/мл в ФБС иммобилизовали из объема 100 мкл в лунках микропланшета в течение ночи при 4°C. Затем четырехкратно отмывали микропланшет ФБС с 0.05% Тритона X-100 (ФБСТ). Далее в лунки микропланшета вносили по 50 мкл раствора ЛПС (диапазон концентраций от 40 нг до 20 мкг/мл) в ФБСТ и добавляли по 50 мкл биотинилированных специфических антител в концентрации 1 мкг/мл в ФБСТ. Микропланшет инкубировали 1 ч при 37°C, затем четырехкратно отмывали ФБСТ, добавляли в лунки по 100 мкл стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой (разведение 1 : 5.000 в ФБСТ), и снова инкубировали 1 ч при 37°C. После отмывки (трижды ФБСТ и один раз – дистиллированной водой) определяли пероксидазную активность связавшейся с носителем ферментной метки. Для этого в лунки микропланшета вносили по 100 мкл 0.4 мМ раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в 40 мМ Na-цитратном буфере, рН 4.0, с 3 мМ H₂O₂, инкубировали 15 мин при комнатной температуре, останавливали реакцию добавлением 50 мкл 1 М H₂SO₄ и измеряли D₄₅₀.

Получение КЗ цитратным методом [28]. К 97.5 мл деионизированной воды добавляли 1.0 мл 1%-ного раствора H₂AuCl₄, доводили до кипения и при перемешивании добавляли 1.5 мл 1%-ного раствора цитрата натрия. Смесь кипятили 25 мин, затем охлаждали и хранили при 4–6°C.

Просвечивающая электронная микроскопия. Препараты КЗ наносили на сеточки (300 меш., “Pelco International”, США), покрытые пленкой-подложкой из поливинилформала, растворенного в хлороформе. Снимки получали на электронном микроскопе CX-100 (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении 3.300.000. Фотографии в цифровой форме анализировали в программе Image Tool.

Получение конъюгатов КЗ с антителами. Предварительную характеристику связывания антител с КЗ проводили согласно [27]. С этой целью к 0.1 мл растворов антител в воде (концентрацию варьировали от 5 до 250 мкг/мл) добавляли по 1.0 мл раствора КЗ (D₅₂₀ = 1.0), перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем в каждую пробу добавляли по 0.1 мл 10%-ного NaCl, перемешивали и через 10 мин измеряли D₅₈₀.

Перед конъюгацией с КЗ антитела диализовали против 1000-кратного объема 10 мМ трис-HCl буфера, рН 8.5, в течение 2 ч при 4°C. К раствору КЗ (D₅₂₀ = 1.0) добавляли 0.2 М K₂CO₃ до достижения рН 8.5 и вносили в раствор антител выбранной концентрации. Смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре и перемешивании, после чего вносили БСА до конечной концентрации 0.25%. Частицы КЗ с иммобилизованными на них антителами отделяли от непровази-

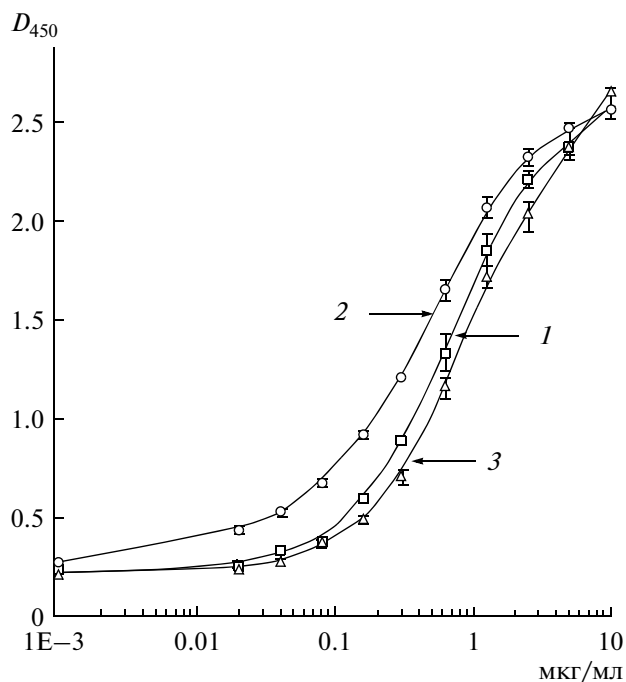


Рис. 1. Определение ЛПС (мкг/мл) *B. abortus* в буфере методом «сэндвич»-ИФА. 1 – 7F10 на фазе, конъюгат 7F10–биотин в растворе, 2 – 7F10 на фазе, конъюгат БИМА–биотин в растворе, 3 – БИМА на фазе, конъюгат 7F10–биотин в растворе.

модействовавших антител центрифугированием при 8000 г в течение 30 мин. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в ФБС, содержащем 0.25% БСА. При необходимости длительного хранения к полученному продукту до-

бавляли азид натрия до конечной концентрации 0.02%.

Изготовление иммунохроматографических тест-систем. Нанесение реагентов на мембраны, входящие в состав тест-системы, проводили с использованием автоматического диспенсера IsoFlow (“Imagene Technology”, США). Конъюгат КЗ с антителами 7F10 наносили на подложку в разведении, соответствующем $D_{520} = 2.0$ (32 мкл на 1 см ширины подложки). Для формирования аналитической зоны использовали антитела 7F10 или БИМА (0.5 мг/мл в ФБС), контрольной зоны – антитела козы против IgG мыши (GAMI, GAMIss, RAMIss, SAMIss; 0.25 мг/мл в ФБС). Растворы стабилизировали и наносили по 2.0 мкл на 1 см ширины рабочей мембраны. Полученные подложки и рабочие мембраны сушили на воздухе при 20–22°C не менее 20 ч. Собирали мультимембранный композит, из которого получали полоски шириной 3.5 мм, используя автоматический гильотинный нарезчик Index Cutter-1 (“A-Point Technologies”, США). Эти тест-полоски с силикагелем в качестве осушителя герметично упаковывали в пакеты из ламинированной алюминиевой фольги с помощью запаивателя с миниконвейером FR-900 (“Wenzhou dingli packing machinery”, Китай). Нарезку и упаковку проводили при 20–22°C в специальном помещении с относительной влажностью воздуха не более 30%. Упакованные тест-полоски хранили при 20–22°C.

ИХА и регистрация результатов. Анализ проводили при комнатной температуре. Вскрывали пакет, извлекали тест-полоску и в вертикальном положении ее нижний конец погружали на 1 мин в

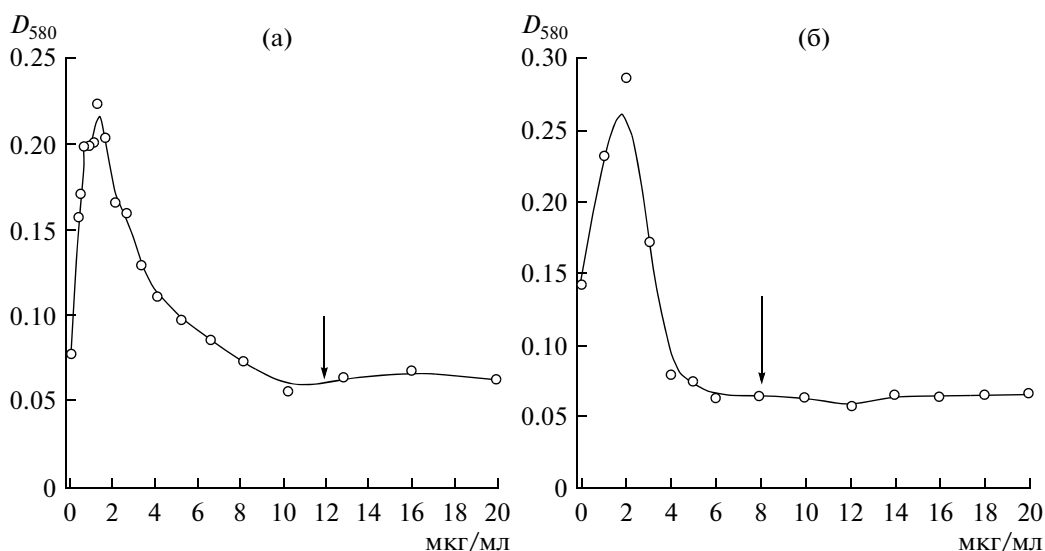


Рис. 2. Определение концентраций (мкг/мл) специфических моноклональных антител 7F10 (а) и БИМА (б) к антигенам *B. abortus*, используемых для конъюгации с коллоидным золотом. Нулевой уровень D_{580} соответствует КЗ без антител и без добавления 10%-ного NaCl. Стрелками указаны концентрации антител, оптимальные для получения стабильных конъюгатов.

аликвоту пробы (50 мкл), после чего помещали тест-полоску на горизонтальную поверхность. Через 10 мин после начала анализа контролировали результат, получая цифровое изображение тест-полосок на сканере CanoScan LiDE 90 (“Canon”) и рассчитывая интегральную интенсивность окрашивания контрольной и аналитической зон, как описано в работе [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор формата иммуноанализа. Поскольку и клетки возбудителя бруцеллеза, и встречающиеся в биоматериале антигенные препараты – фрагменты клеточной стенки *B. abortus* являются поливалентными антигенами, для высокочувствительной иммунодетекции оптимальна реализация “сэндвич”-формата иммуноанализа, основанного на образовании в ходе анализа комплексов иммобилизованное антитело–антиген–меченое антитело. Известно, что данный формат характеризуется низким пределом обнаружения по сравнению с альтернативными форматами, а качественная оценка результатов в случае иммунохроматографии сводится к заключению о наличии или отсутствии окрашивания в аналитической зоне тест-полоски [30, 31].

При проведении “сэндвич”-ИХА анализируемый образец абсорбируется поглощающим участком тест-полоски. При наличии в образце антигена он вступает в реакцию с нанесенными на стартовую зону тест-полоски специфическими антителами, мечеными коллоидным золотом. Образовавшийся комплекс антиген–антитело вступает в реакцию со специфическими антителами, иммобилизованными в аналитической зоне тест-полоски. Таким образом, положительному результату анализа соответствует образование окрашенной линии в аналитической зоне. В случае отсутствия антигена в анализируемом образце окрашивания в аналитической зоне не наблюдается. В контрольной зоне тест-полоски нанесены антитела против IgG мыши, поэтому там образуется окрашенный комплекс независимо от наличия антигена в образце.

Характеристика антител. Для реализации “сэндвич”-иммуноанализа были использованы моноклональные антитела против ЛПС *B. abortus* 7F10 и БИМА. Антигенсвязывающие свойства этих антител были охарактеризованы “сэндвич”-методом ИФА. Были сопоставлены четыре варианта ИФА, отличающиеся по выбору антител для иммобилизации на твердой фазе и мечения ферментом. Для введения метки в образующиеся иммунные комплексы использовали биотинилирование антител в сочетании с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза.

Для достижения максимальной чувствительности анализа оптимизировали условия проведе-

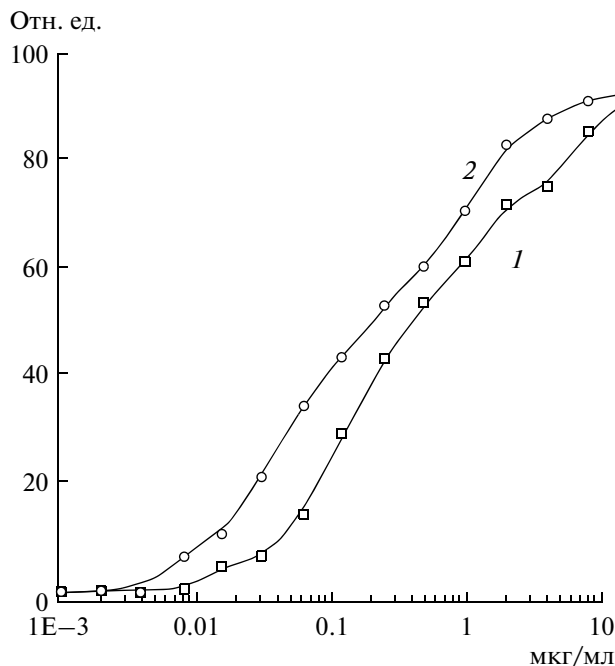


Рис. 3. Зависимость градуировочной кривой ИХА от концентрации ЛПС *B. abortus* при иммобилизации в аналитической зоне тест-полоски антител 7F10 (1) и БИМА (2).

ния ИФА, варьируя количество антител, иммобилизованных на твердой фазе, концентрацию биотинилированных антител в растворе и продолжительность стадий анализа. Как следует из полученных в оптимизированных условиях градуировочных кривых ИФА (рис. 1), предел детекции ЛПС составляет 50 нг/мл в случае, когда иммобилизованы антитела 7F10, а конъюгат БИМА–биотин находится в растворе (кривая 2, рис. 1) и 200 нг/мл, если иммобилизованы антитела 7F10, а конъюгат 7F10–биотин находится в растворе (кривая 1, рис. 1) либо иммобилизованы антитела БИМА, а конъюгат 7F10–биотин находится в растворе (кривая 3, рис. 1). При использовании только антител БИМА предел детекции ЛПС резко возрастает и составляет 10 мкг/мл (данные не представлены).

Однако поскольку в иммунохроматографической системе в неравновесных условиях взаимодействие компонентов определяется прежде всего кинетической константой скорости их взаимодействия, оптимальные комплекции тест-систем могут не совпадать для равновесных (ИФА) и кинетических (ИХА) форматов иммуноанализа. Поэтому представлялось целесообразным реализовать и сопоставить все возможные варианты ИХА.

Получение и характеристика конъюгатов специфических антител с КЗ. КЗ синтезировали по методу Френса [28]. Электронная микроскопия частиц показала высокую степень их однородности

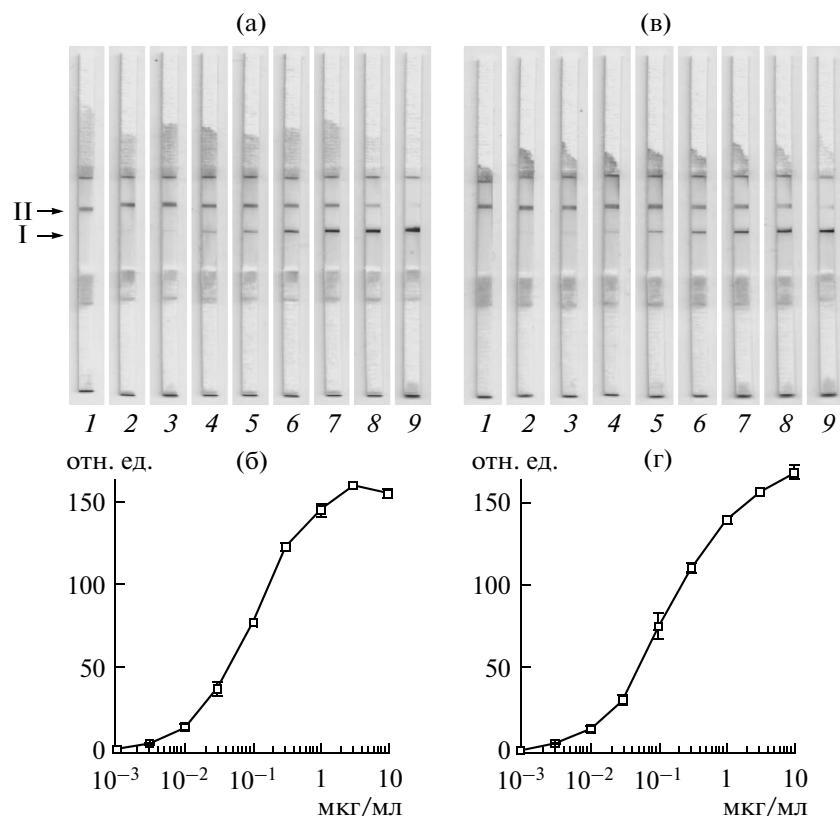


Рис. 4. Иммунохроматографическое определение ЛПС *V. abortus* в буфере (а, б) и фетальной сыворотке КРС (в, г): а, в — внешний вид тест-полосок после проведения анализа (I — аналитическая зона, II — контрольная зона); 1–9 — концентрации ЛПС 0, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 и 10 мкг/мл соответственно; б, г — зависимость интенсивности окраски в аналитической зоне (отн. ед.) от концентрации ЛПС (мкг/мл).

по размерным характеристикам: среднее значение максимальной оси составляло 37 ± 8 нм, минимальной оси — 30 ± 5 нм [29]. Таким образом, частицы характеризовались средним диаметром 34 нм, что соответствует общепринятым рекомендациям по оптимальному размеру КЗ для иммунохроматографии — 30–40 нм [32].

Выбор соотношения антитела : КЗ проводили на основании флоккуляционной кривой, отражающей агрегацию продукта данной реакции при высокой ионной силе раствора. На основании полученных концентрационных зависимостей (рис. 2) для конъюгирования использовали антитела в количестве, на 10–15% превосходящем точку выхода D_{580} на плато, как рекомендовано в [27] — т.е. антитела 7F10 в концентрации 12 мкг/мл либо антитела БИМА в концентрации 8 мкг/мл. Мольное соотношение антитела : КЗ при синтезе составляло 380 : 1 для антител 7F10 и 255 : 1 для антител БИМА.

Избыток непрореагировавших антител удаляли на стадии осаждения конъюгата. Конъюгат антител 7F10 с КЗ при этом сохранял стабильность и иммунологическую активность, а конъюгат антител БИМА с КЗ необратимо агрегировал и в

связи с этим не использовался в последующих экспериментах. Вероятная причина отличий состоит в особенностях ориентации антител разных классов. Так, известно [33], что антитела IgG1 и IgG2 при сорбции на КЗ характеризуются разной ориентацией и степенью доступности.

Разработка иммунохроматографической тест-системы. Для достижения минимального порога детекции ЛПС и клеток возбудителя бруцеллеза была проведена оптимизация тест-системы, включавшая выбор типа, концентрации и режима нанесения реагентов в контрольной, аналитической и стартовой зонах тест-полоски.

Серия препаратов антител против IgG мыши, нанесенных в контрольную зону, была сопоставлена по связыванию конъюгата 7F10–КЗ в ходе иммунохроматографии. При насыщающих концентрациях интенсивность окраски контрольной зоны составляла для козьих антител 74 отн. ед. (GAMIss) и 89 отн. ед. (GAMI), для кроличьих антител — (RAMIss) 59 отн. ед. и для овечьих антител (SAMIss) — 82 отн. ед. Для дальнейшего использования в анализе были выбраны козы антитела GAMI фирмы “Arista Biologicals”, обеспечивающие максимальное связывание маркера. Концен-

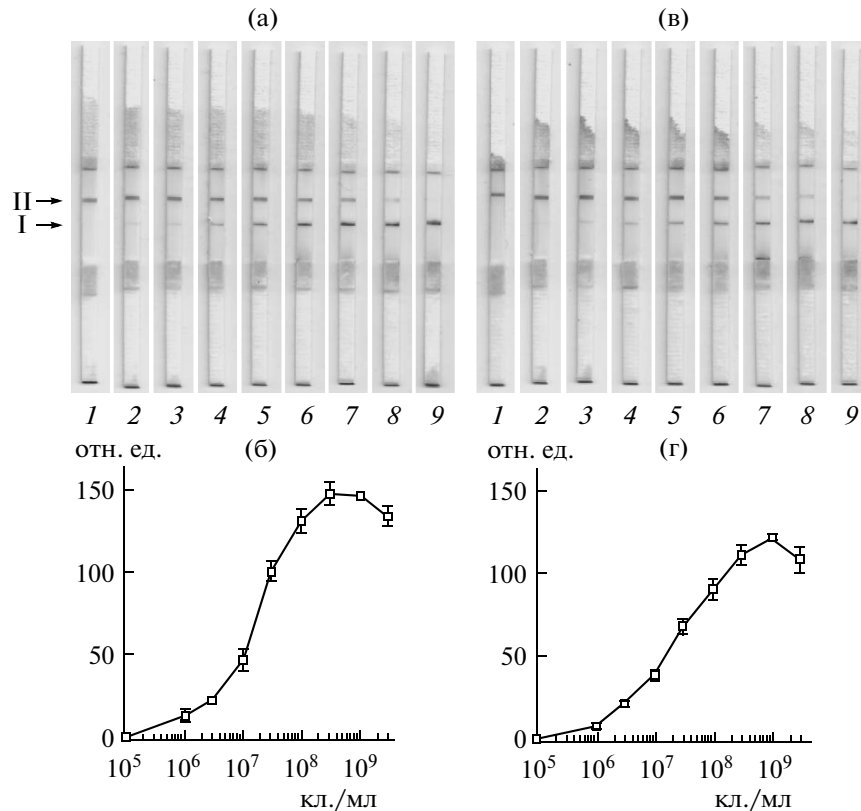


Рис. 5. Иммунохроматографическое определение клеток *B. abortus* в буфере (а, б) и фетальной сыворотке КРС (в, г): а, в — внешний вид тест-полосок после проведения анализа (I — аналитическая зона, II — контрольная зона); 1–9 — концентрации клеток 0, 10^6 , 3×10^6 , 10^7 , 3×10^7 , 10^8 , 3×10^8 , 10^9 и 3×10^9 кл./мл соответственно; б, г — зависимость интенсивности окраски в аналитической зоне (отн. ед.) от концентрации клеток (кл./мл).

трация этих антител при иммобилизации составила 0.25 мг/мл, что соответствует выходу на плато концентрационной зависимости связывания коллоидного конъюгата.

При формировании аналитической зоны тест-полоски сравнивали два варианта, которые различались выбором иммобилизуемых на мембране антител. На рис. 3 представлена зависимость градуировочной кривой ИХА от концентрации ЛПС при иммобилизации в аналитической зоне тест-полоски антител 7F10 и БИМА. В обоих случаях интенсивность окрашивания аналитической зоны при концентрации ЛПС в пробе 10 мкг/мл составляла 90 ± 3 отн. ед. Предел обнаружения ЛПС при данных условиях равняется 50 нг/мл при иммобилизации в аналитической зоне антител 7F10 (кривая 1) и 10 нг/мл при иммобилизации антител БИМА (кривая 2). Исходя из этого, для дальнейшего использования в анализе был выбран вариант с иммобилизованными в аналитической зоне антителами БИМА.

Скорость нанесения реагентов в контрольную и аналитическую зоны, равная 2.0 мкл на 1 см ширины рабочей мембраны, выбранная нами в предыдущих исследованиях [29, 34], обеспечива-

ла равномерность формирования зон и минимальный разброс по степени связывания.

Исходя из данных наших предшествующих работ [29, 34], конъюгат антитела–КЗ наносили из раствора, характеризующегося $D_{520} = 2.0$, что обеспечивало формирование интенсивно окрашенных зон в ходе анализа в сочетании с полной вымывания реагента из стартовой зоны и отсутствием неспецифического окрашивания рабочей мембраны.

Характеристика разработанной иммунохроматографической тест-системы. В соответствии с выбранными оптимальными условиями были изготовлены тест-полоски, использованные для определения ЛПС и клеток *B. abortus* в стандартных растворах и фетальной сыворотке КРС.

На рис. 4 представлены результаты анализа проб с разной концентрацией ЛПС. Предел определения ЛПС в ФБС и фетальной сыворотке одинаков и составляет 10 нг/мл, точность определения — 5%. На рис. 5 даны аналогичные результаты по определению клеток *B. abortus* 19. Предел детекции клеток в ФБС и фетальной сыворотке также одинаков — 10^6 кл./мл (5×10^4 кл./пробе), точ-

ность определения – 5%. Длительность анализа в обоих случаях составляет 10 мин.

В иммунохроматографической системе не наблюдалось перекрестных реакций с патогенными микроорганизмами: *B. suis*, *Yersinia enterocolitica* O:9 S и 287, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* Inaba, *Salmonella enteritidis* yena, *S. typhimurium* TA 100, *Escherichia coli* 565, *E. coli* 113-3, *Shigella sonne*, *S. flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii* при концентрациях вплоть до 10^9 кл./мл. Исключение составлял возбудитель иерсиниоза *Y. enterocolitica* O:9 R, который выявлялся в концентрациях, начиная с 10^7 кл./мл. Причина этой перекрестной реактивности состоит в сходстве O-специфического полисахарида, входящего в состава структуры ЛПС *B. abortus* 19 и *Y. enterocolitica* O:9 R [35, 36].

Компоненты тест-системы сохраняли иммунологическую активность в течение 20 нед. (срок наблюдения) хранения при 4 и 37°C, что свидетельствует об их эффективной стабилизации.

Скорость определения и методическая простота позволяют рассматривать разработанную тест-систему как эффективное средство для обследований крупного рогатого скота с целью диагностики бруцеллеза.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 12-08-01303), Федеральных целевых программ “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (государственный контракт П423 от 12 мая 2010 г.) и “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы” (государственный контракт 11.519.11.2046 от 20 марта 2012 г.).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nicoletti P. // Contributions. Sec. Biol. Med. Sci. MASA. 2010. V. 31. № 1. P. 21–32.
2. Gul S.T., Khan A. // Pakistan Vet. J. 2007. V. 27. № 3. P. 145–151.
3. Искандаров М.И., Федоров А.И., Альбертян М.И., Найманов А.Х., Овдиенко Н.П. // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. 2006. № 4. С. 4–5.
4. Лямкин Г.И., Тихенко Н.И., Манин Е.А., Вилинская С.В., Головнева С.И., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. № 1(107). С. 20–23.
5. Желудков М.М., Цирельсон Л.Е., Кулаков Ю.К., Хадарцев О.С., Горшенко В.В., Иванова А.А. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2009. № 6. С. 23–28.
6. Цирельсон Л.Е., Грушина Т.А., Сыздыков М.С., Ременцова М.М., Коляда Ю.И. // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. 2004. Т. 10. № 2. С. 90–95.
7. Poester F.P., Nielsen K., Samartino L.E., Yu W.L. // Open Vet. Sci. J. 2010. V. 4. P. 46–60.
8. Godfroid J., Nielsen K.H., Saegerman C. // Croat. Med. J. 2010. V. 51. P. 296–305.
9. Queipo-Ortuno M.I., Colmenero J.D., Requera J.M., Garcia-Ordóñez M.A., Pachon M.E., Gonzalez M., Morata P. // Clin. Microbiol. Infect. 2005. V. 11. № 9. P. 713–718.
10. Reid L., Soares R., Vasconcellos S., Megid J., Salgado V., Richtzenstein L. // Res. Vet. Sci. 2009. V. 86. P. 22–27.
11. Kimura M., Imaoka K., Suzuki M., Kamiyama T., Yamada A. // J. Vet. Med. Sci. 2008. V. 70. P. 707–709.
12. Greiner M., Verloo D., de Massis F. // Prev. Vet. Med. 2009. V. 92. P. 373–381.
13. Minas A., Stournara A., Minas M., Papaioannou A., Krikelis V., Tselepidis S. // Vet. Microbiol. 2005. V. 111. P. 211–221.
14. Rubio M., Barrio B., Diaz R. // Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2001. V. 19. № 8. P. 406–407.
15. Lawman M.J., Thurmond M.C., Reis K.J., Gauntlett D.R., Boyle M.D.P. // Vet. Immunol. Immunopathol. 1984. V. 6. № 3–4. P. 291–305.
16. Saegerman C., De Waele L., Gilson D., Godfroid J., Thiange P., Michel P., Limbourg B., Vo T.K., Limet J., Letesson J.J., Berkvens D. // Vet. Microbiol. 2004. V. 100. № 1–2. P. 91–105.
17. Nielsen K.H., Kelly L., Gall D., Nicoletti P., Kelly W. // Vet. Immunol. Immunopathol. 1995. V. 46. № 3. P. 285–291.
18. Kumar M., Chand P. // Trop. Anim. Health. Prod. 2011. V. 43. № 8. P. 1493–1499.
19. Genc O., Buyuktanir O., Yurdusev N. // Trop. Anim. Health. Prod. 2012. V. 44. № 2. P. 213–215.
20. Gall D., Nielsen K. // Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2004. V. 23. № 3. P. 989–1002.
21. Wong R.C., Tse H.Y. Lateral Flow Immunoassay. N.Y.: Humana Press, 2009. 224 p.
22. Posthuma-Trumpie G., Korf J., van Amerongen A. // Anal. Bioanal. Chem. 2009. V. 393. № 2. P. 569–582.
23. Старовойтова Т.А., Зайко В.В., Стериополо Н.А., Мартынкина Л.П., Кутвицкий В.А., Туголуков А.Е., Волощук С.Г., Тогузов Р.Т., Венгеров Ю.Ю. // Биомед. журн. Medline.ru. 2010. Т. 11. С. 44–62.
24. Breslauer D.N., Maamari R.N., Switz N.A., Lam W.A., Fletcher D.A. // PLoS ONE. 2009. V. 4. № 7. P. e6320.
25. Герхард Ф., Мюррей Р.Ж.Е., Костилоу Р.Н. // Методы общей бактериологии. М.: Мир, 1984. 472 с.
26. Булашев А.К., Несмеянов В.А., Дмитриев А.Ф., Муканов К.К., Байтубаев Т.Г., Ромахов В.А., Касьянов А.Н. А.с. СССР № 1604848. // Б. И., 1990. № 41.
27. Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques. Amsterdam: Acad. Press, Elsevier, 2008. 900 p.
28. Frens G. // Nat. Phys. Sci. 1973. V. 241. № 105. P. 20–22.

29. *Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B.* // *Talanta*. 2010. V. 81. № 3. P. 843–848.
30. *Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М.* Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
31. *Дзантиев Б.Б., Жердев А.В.* // Биохимические методы анализа. М.: Наука, 2010. С. 303–332.
32. *Chandler J., Gurmin T., Robinson N.* // *IVD Technology*. 2000. V. 6. № 2. P. 37–49.
33. *Zhou J., Chen S., Jiang S.* // *Langmuir*. 2003. V. 19. № 8. P. 3472–3478.
34. *Бызова Н.А., Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.* // Прикл. биохимия и микробиология 2011. Т. 47. № 6. С. 685–693.
35. *Григорьева Г.И., Игнатов П.Е.* // Успехи соврем. биол. 1991. Т. 3. № 6. С. 890–904.
36. *Bundle D.R., Gidney M.A.J., Perry M.B.* // *Infect. Immun.* 1984. V. 46. № 2. P. 389–393.

Development of Immunochromatographic Test System for the Rapid Detection of Lipopolysaccharide Antigen and Cells of Causative Agent of Bovine Brucellosis

N. A. Byzova^a, A. V. Zherdev^a, S. Z. Eskendirova^b, K. K. Baltin^b, G. B. Unysheva^b, K. K. Mukanov^b, E. M. Ramankulov^b, and B. B. Dzantiev^a

^a *Bach Institute of Biochemistry Russian Academy of Sciences, Moscow 119071*

^b *National Center for Biotechnology of the Republic of Kazakhstan, Astana, Kazakhstan*

e-mail: nbyzova@inbi.ras.ru

Received April 16, 2012

Abstract—A rapid method for detection of the surface lipopolysaccharide antigen and the cells of the causative agent of bovine brucellosis was developed. The method represents a sandwich format immunochromatographic assay. The contact between the sample and the test strip with immobilized immunoreagents initiates the fluid movement along the membrane components of the test strip, immunochemical reactions, and the formation of colored bands. The novel method requires 10 minutes to determine the lipopolysaccharide antigen of the cell wall of the brucellosis causative agent at concentrations down to 10 ng/mL and the *Brucella abortus* cells at concentrations down to 10⁶ cells/mL (5 × 10⁴ cells in the sample). The specificity of the immunodetection was confirmed. The designed test system can be used for the rapid field diagnosis of brucellosis in cattle.

УДК 678.07:617

ПРОЛОНГИРОВАННОЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ХЛОРАМБУЦИЛА И ЭТОПОЗИДА ИЗ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА

© 2012 г. Е. В. Филатова*, С. Г. Яковлев*, А. П. Бонарцев*, **, Т. К. Махина*, В. Л. Мышкина*, Г. А. Бонарцева*

*Институт биохимии им. А.Н. Баха, РАН, Москва, 119071, e-mail: bonar@inbi.ras.ru

**Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119992

Поступила в редакцию 26.08.2011 г.

Получены микросферы на основе поли-3-оксибутирата (ПОБ) с включением в полимерную матрицу цитостатических лекарственных веществ (ЛВ) хлорамбуцила и этопозид, изучены морфология, кинетика высвобождения ЛВ из микросфер и взаимодействие микросфер с опухолевыми клетками рака молочной железы человека линии МФС-7 *in vitro*. Полученные данные свидетельствуют о том, что пролонгированное высвобождение ЛВ происходит за счет диффузии лекарственного вещества из полимерной матрицы на начальном этапе и за счет гидролитической деструкции полимера на более поздних этапах. При изучении биосовместимости и биологической активности биополимерных микросфер показано, что хлорамбуцил сильнее подавляет рост культивируемых опухолевых клеток за короткое время (24 ч). Этопозид действует слабее (подавление роста клеток за 48 ч не превышает 50%), однако в дальнейшем он имеет долгий пролонгированный эффект высвобождения ЛВ из полимерной матрицы. Изучаемая система может послужить основой создания новых лекарственных форм пролонгированного действия этопозид и хлорамбуцила для терапии онкозаболеваний.

Современное состояние химиотерапии для лечения онкологических заболеваний указывает на необходимость улучшения терапевтической эффективности противоопухолевых средств. Современный цитостатический препарат должен отвечать следующим требованиям: обладать высокой эффективностью при постоянной заранее заданной концентрации в опухоли и, в то же время, проявлять низкую системную токсичность и большую продолжительность действия. Для достижения этих условий возможно создание макромолекулярных терапевтических систем с контролируемым высвобождением ЛВ, то есть создание конъюгатов лекарственных препаратов с полимерным носителем.

В качестве полимерного носителя в своей работе мы использовали поли-3-оксибутират – биоразлагаемый термопластик, обладающий хорошей биосовместимостью и способностью полностью разлагаться в организме человека до CO₂ и воды [1–3]. К настоящему времени разработаны технические условия и регламент получения медицинского поли-3-оксибутирата (ПОБ), показано, что полимер поли-3-оксибутират нетоксичен, не обладает раздражающим и сенсibiliзирующим действием, отвечает требованиям нормативной документации при фармацевтическом использовании и применим для парентерального и перорального применения [3, 4]. Поли-3-оксибутират активно используется для создания и исследова-

ния систем пролонгированного высвобождения широкого спектра лекарственных веществ (ЛВ) [5, 6]. Постепенное высвобождение ЛВ из биополимерной матрицы обеспечивает длительное поддержание необходимой концентрации действующего вещества в организме или локально в определенном органе, или ткани. Тем самым, устраняется необходимость дополнительного многократного введения ЛВ, снижается его токсичность и побочные эффекты, повышается стабильность ЛВ и его эффективность за счет равномерной скорости подачи. Это является особенно актуальным для препаратов, применяемых в онкотерапии, так как они обладают высокой токсичностью и вызывают ряд тяжелых осложнений у пациентов.

При создании систем контролируемого высвобождения ЛВ мы использовали два противоопухолевых препарата – Хлорамбуцил и Этопозид. В традиционных лекарственных формах они вызывают ряд осложнений [7], поэтому целесообразно использование пролонгированных лекарственных форм этих препаратов. Использование биосовместимых полимеров, например поли-3-оксибутирата, в качестве основы для таких форм, могло бы не только устранить многие недостатки использования традиционных лекарственных форм онкопрепаратов, но и позволило бы контролировать количество и время высвобождения ЛВ. Ранее нами было показано, что путем варьирования моле-

кулярной массы ПОБ и размера полимерных частиц также можно влиять на скорость высвобождения ЛВ из полимерной основы ПОБ [8–10].

Цель работы – получение и исследование свойств пролонгированных лекарственных форм хлорамбуцила и этопозид, создание биополимерных microspheres на основе поли-3-оксибутирата, содержащих цитостатическое ЛВ – хлорамбуцил или этопозид; исследование кинетики выхода ЛВ из microspheres, изучение биосовместимости и их биологической активности на культуре клеток *in vitro*.

МЕТОДИКА

Материалы. Для получения биополимерных microspheres в работе использовали поли-3-оксибутират (Мм 236 кДа), полученный микробиологическим путем. В качестве продуцента ПОБ был использован штамм *Azotobacter chlorococcum* 7Б [10]. Используются: ЛВ – хлорамбуцил и этопозид (“Sigma”, Германия), хлороформ (“Экос-1”, Россия), поливиниловый спирт (“MP Biomedicals”, США).

Получение поли-3-оксибутирата. Использовали штамм-продуцент ПОБ *A. chroococcum* 7Б, способный синтезировать до 80% ПОБ от сухой массы клеток. Для достижения сверхсинтеза ПОБ культуру *A. chroococcum* выращивали на среде Берка в условиях избыточного содержания источника углерода (г/л): $MgSO_4 \cdot 7H_2O - 0.4$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O - 0.01$; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O - 0.006$; цитрат Na – 0.5; $CaCl_2 - 0.1$; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O - 1.05$; $KH_2PO_4 - 0.2$; сахара – 40; в течение 48 ч в аэробных условиях при 28°C. Выход сухой биомассы составлял 10 г/л среды. Содержание полимера в клетках *A. chroococcum* – 76% от сухой массы клеток.

Выделение и очистка полимера из биомассы *A. chroococcum* включали растворение ПОБ в хлороформе путем встряхивания на качалке при 37°C в течение 12 ч, отделение раствора ПОБ от клеточных остатков фильтрованием, выделение ПОБ из раствора хлороформа осаждением изопропиловым спиртом. После трехкратного перерастворения ПОБ в хлороформе и осаждения изопропанолом очистку завершали высушиванием полимера на воздухе при 60°C. Молекулярную массу полимера определяли методом вискозиметрии: вязкость раствора ПОБ в хлороформе измеряли при 30°C в вискозиметре “RT RHEOTEC” (“RheoTec”, Германия). Молекулярную массу вычисляли по уравнению Марка–Хаувинка–Куна, используя следующие коэффициенты $[\eta] = 7.7 \times 10^{-5} M^{0.82}$, где η – вязкость, M – молекулярная масса ПОБ [11].

Получение микрочастиц из ПОБ. Microspheres были получены с помощью метода одноэтапного эмульгирования раствора ЛВ с ПОБ в хлороформе

с последующим испарением растворителя [10]. Этот метод был адаптирован для инкапсулирования хлорамбуцила и этопозид. Раствор ЛВ и ПОБ с молекулярной массой 236 кДа в соотношении 1 : 4 в 8 мл хлороформа постепенно добавляли к 100 мл поливинилового спирта в дистиллированной воде с концентрацией 1.5% масс./об. при перемешивании. Перемешивание проводили в течение 2 ч при помощи механической верхнеприводной мешалки RZR 2021 (“Heidolph”, Германия) при 1000 об/мин. После полного испарения органического растворителя microspheres отделяли центрифугированием (6 мин при 3000 g), центрифуга 5702 R (“Eppendorf”, Германия), затем 3 раза промывали дистиллированной водой для полного удаления эмульгатора и ЛВ с поверхности сфер. Microspheres высушивали в термостате при 37°C.

Определение размера microspheres из ПОБ и содержания в них ЛВ. Средний диаметр у полученных партий microspheres определяли по микрофотографиям, полученным с помощью светового микроскопа Биомед 1 Вар. 2 (“Биомед”, Россия) с цифровым окуляром Mscope 300M (“Webbers”, Тайвань).

Содержание хлорамбуцила и этопозид в microspheres определялось спектрофотометрически после их растворения в хлороформе путем измерения поглощения света на спектрофотометре DU-650 (“Beckman Coulter”, США) (максимумы поглощения при 259 и 305 нм для хлорамбуцила и 288 нм для этопозид) при сравнении с контрольным раствором ПОБ в хлороформе и с помощью построения калибровочной кривой с использованием растворов в хлороформе ПОБ и ЛВ в различных концентрациях.

Кинетика высвобождения ЛВ из microspheres на основе ПОБ. Эксперимент по высвобождению хлорамбуцила и этопозид из microspheres *in vitro* проводили при 37°C в термостате ТС-1/80 СПУ (“Лабтех”, Россия) в 25 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7.4) с небольшим добавлением эмульгатора (0.05% Triton X-10 по объему): 4 партии по 20 мг microspheres в 4 мл буфера перемешивали на шейкере (“BioSan”, США) при 330 об/мин. Через определенные промежутки времени (через 1, 2, 3 ч и т.д.) microspheres отделяли от буфера центрифугированием при 14100 g на центрифуге MiniSpin Plus, (“Eppendorf”, Германия) и добавляли 4 мл свежего буфера. Содержание ЛВ в буфере определяли на спектрофотометре DU-650 (“Beckman Coulter”, США) с помощью построения калибровочной кривой с использованием водных растворов ЛВ в различных концентрациях. Остаточное содержание ЛВ в microspheres определяли также спектрофотометрически, растворяя их в хлороформе.

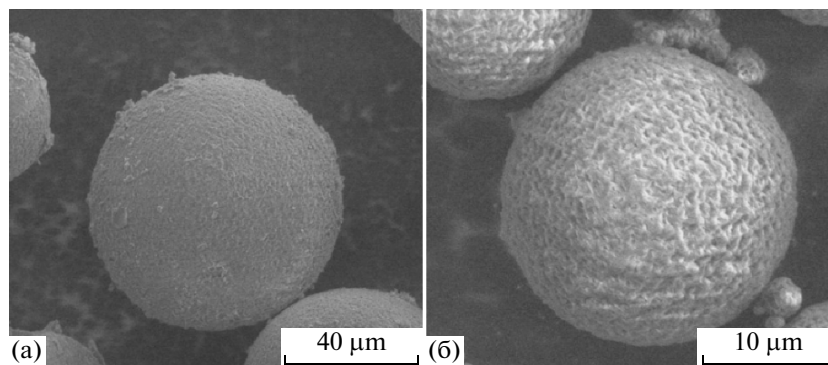


Рис. 1. Микрофотографии полученных микрочастиц (электронная микроскопия): хлорамбуцил (а); этопозид (б).

Микроскопия. Первичное изучение свойств микрочастиц и их морфологии проводилось с помощью световой микроскопии (микроскоп Биомед 1 Вар. 2 (“Биомед”, Россия) с цифровым окуляром MUSE 300M (“Webbers”, Тайвань)). Микрофотографии микрочастиц были получены методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в электронном и ионном излучениях (микроскоп FEI-SMA-QUANTA 200, и SMA QUANTA FEG, “FEI Company”, США).

Взаимодействия микросфер с культурой клеток *in vitro*. Для оценки биобезопасности микросфер *in vitro* использовали культуру клеток рака молочной железы человека линии MCF-7. Клетки культивировали с использованием методов, описанных Фрешни [12]. Выживаемость клеток под влиянием тестируемого агента вычисляли по формуле (1), где S – выживаемость клеток, $N_{\text{оп}}$ – количество живых клеток в опыте, $N_{\text{контр}}$ – кол-во живых клеток в контроле.

$$S = \frac{N_{\text{оп}}}{N_{\text{контр}}} \times 100\%. \quad (1)$$

При этом применялся стандартный МТТ-тест (с использованием в качестве красителя водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ)), как наиболее показательный метод при работе с культурами опухолевых клеток [12]. Микросферы диспергировали в среде культивирования и добавляли к культивируемым клеткам в различных концентрациях. Предварительно сухие микросферы стерилизовали при 100°C в течение 10 мин. Микросферы тестировали в 4 параллельных измерениях при концентрации 3 мг/мл. Суспензию биополимерных микросфер, не содержащих ЛВ (конц. 3 мг/мл), использовали в качестве отрицательного контроля. Измерения проводили через 24 и 48 ч после начала культивации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения микросфер из ПОБ с инкапсулированным ЛВ применялся метод одноэтапного эмульгирования [10]. Были получены микросферы с массовой долей хлорамбуцила в полимере 12%. Средний диаметр составил 24 мкм. Также были получены микросферы с массовой долей этопозиды в полимере 10%, средний диаметр составил 28 мкм.

Для более детального изучения свойств микрочастиц и структуры их поверхности использовалась электронная сканирующая микроскопия. На полученных микрофотографиях (рис. 1) видно, что поверхность сфер шероховатая с отчетливо различимыми тяжами полимера. Причем микрочастицы с хлорамбуцилом имеют более гладкую поверхность, чем частицы с этопозидом, что, по-видимому, объясняется различной степенью гидрофобности включаемых веществ и полимерной основы.

Исследована кинетика выхода хлорамбуцила и этопозиды из полимерной матрицы *in vitro* в 0.025 М фосфатном буфере, рН 7.4 при 37°C (рис. 2). Полученные результаты показывают, что первая фаза выходы хлорамбуцила из полимерной матрицы характеризуется большим выбросом ЛВ, т.н. **берст-эффект**, который, видимо, объясняется слабым гидрофобным взаимодействием между лекарством и полимером. На следующей фазе высвобождения ЛВ преобладают диффузионные процессы между ЛВ и водной средой, поэтому кинетический профиль характеризуется степенной функцией. На более поздних этапах выход ЛВ становится постоянным и практически линейным.

На рис. 2 видно, что высвобождение этопозиды протекает менее активно, чем хлорамбуцила, при этом отсутствует ярко выраженный берст-эффект. Такое различие, видимо, объясняется большим сродством этопозиды к ПОБ, чем у хлорамбуцила, за счет гидрофобных взаимодействий между полимером и ЛВ, что способствует увеличению времени контролируемого высвобождения.

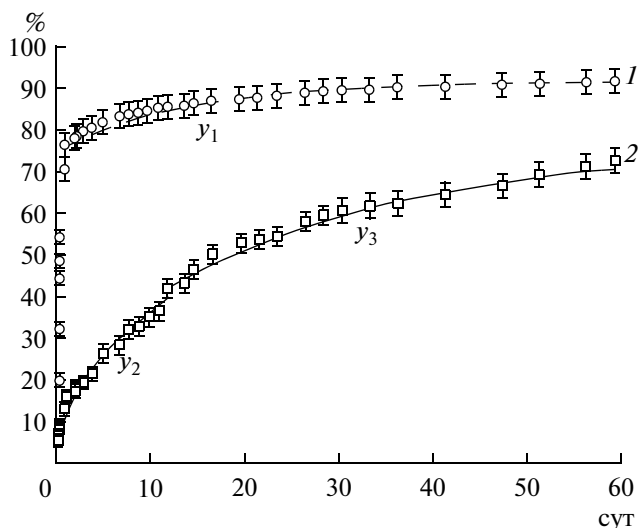


Рис. 2. Кинетика выхода (%) ЛВ из микросфер на основе ПОБ (0.025 М фосфатный буфер, pH 7.4, при 37°C): 1 – микросферы с хлорамбуцилом (средний диаметр – 24 мкм, включение – 12%); $y_1 = 1 + m_1 \exp(-k_1 x)$, $m_1 \sim -0.6$; 2 – микросферы с этопози-дом (средний диаметр – 28 мкм, включение – 10%); $y_2 = a_2 x b_2 + c_2 x$, $b_2 \sim 0.5$; $y_3 = 1 + m_3 \exp(-k_3 x)$, $m_3 \sim -0.6$.

ния ЛВ по сравнению с более гидрофильным веществом хлорамбуцилом [13]. Выход этопозида длится дольше, чем хлорамбуцила, что позволяет достигнуть более пролонгированного эффекта, который также связан с тесным гидрофобным взаимодействием этопозида с ПОБ [14].

В случае выхода этопозида, полученный кинетический профиль на начальных этапах (1–10 сут) аппроксимируется сложной степенной функцией с показателем степени, близким к 0.5 (рис. 2), что соответствует уравнению диффузии (2) [15, 16], описывающему выход вещества из полимерных микросфер, где M_t и M_0 – количества высвободившегося и изначально загруженного ЛВ в полимерную матрицу (мг) в момент времени t (с), r –

радиус микросфер (m , 24×10^{-6} и 28×10^{-6} м в нашем случае) и D – коэффициент диффузии.

$$\frac{M_t}{M_0} = 6 \left(\frac{Dt}{r^2 \pi} \right)^{1/2} - \frac{3Dt}{r^2}. \quad (2)$$

Если на первой стадии высвобождения этопозида из микросфер преобладают диффузионные процессы между водным буфером и ЛВ, то на более поздних этапах диффузия уступает место гидролитической деградации полимерной основы, что и объясняет линейность скорости выхода ЛВ. На этих поздних этапах выхода этопозида (12–60 сут) кинетические профили аппроксимируются экспоненциальной функцией (рис. 2), что согласуется с описанной ранее [15, 16] зависимостью (3), где M_t и M_0 – количества высвободившегося и изначально загруженного ЛВ в полимерную матрицу (мг) в момент времени t (с), r – радиус микросфер (m) и D – коэффициент диффузии.

$$\frac{M_t}{M_0} = 1 - \frac{6}{\pi^2} e^{\left(\frac{-\pi^2 Dt}{r^2} \right)}. \quad (3)$$

В случае высвобождения хлорамбуцила, из-за его высоких гидрофильных свойств, основная часть ЛВ (около 70%) вымывается из полимерной основы за 1 сут. Поэтому диффузионная стадия выхода протекает быстрее (по сравнению с выходом этопозида) и практически полностью соответствует берст-эффекту (начальному выбросу ЛВ), а все последующее высвобождение хлорамбуцила протекает в основном за счет деградации полимерной основы микрочастиц, поэтому эта часть кинетического профиля (3–60 сут) характеризуется экспоненциальной зависимостью (рис. 2).

Различные стадии деградации хорошо видны на фотографиях, сделанных с помощью световой микроскопии на разных этапах эксперимента (рис. 3). Из полученных данных видно, что деградация микросфер с хлорамбуцилом отчетливо проявляется на 30 сут инкубации в фосфатном бу-



Рис. 3. Микрофотографии гидролитической деградации биополимерных микросфер на основе ПОБ с инкапсулированным хлорамбуцилом (световая микроскопия): а – 1, б – 15, в – 30 сут.

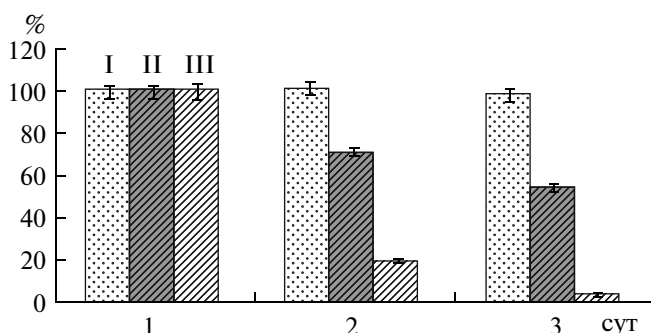


Рис. 4. Диаграмма выживаемости (%) клеток при культивации с микросферами, содержащими: I – без добавок, II – этопозид, III – хлорамбуцил.

фере. На 90 сут инкубации микросферы теряют свои очертания, представляя собой уже аморфную полимерную массу. Деградиация микросфер с этопозидом имела те же стадии и не имела принципиальных отличий от деградации микросфер с хлорамбуцилом.

Последний этап работы состоял в исследовании взаимодействия микросфер из ПОБ с инкапсулированным хлорамбуцилом и этопозидом с опухолевыми клетками рака молочной железы человека МФС-7. В течение 48 ч опухолевые клетки культивировали с чистыми полимерными микросферами (не несущими ЛВ), а также со сферами с инкапсулированным хлорамбуцилом и этопозидом. Полученные результаты эксперимента представлены на диаграмме зависимости выживаемости клеток от продолжительности инкубации их с микросферами (рис. 4).

Из полученных результатов можно сделать вывод о том, что полимерные сферы без лекарственных веществ являются биосовместимыми с опухолевыми клетками и не проявляют цитотоксичности. Микросферы на основе ПОБ с этопозидом уже за 24 ч подавляли рост опухолевых клеток на 28%, через 48 ч инкубации процент подавления роста клеток достигал 45%. Микросферы на основе ПОБ с хлорамбуцилом угнетали рост культивируемых клеток еще активнее. За 24 ч культивирования микросфер с хлорамбуцилом количество культивируемых опухолевых клеток снизилось в пять раз, а за 48 ч процент подавления роста клеток достигал 96%.

Таким образом, основываясь на полученных результатах сравнительного изучения влияния полимерных сфер с этопозидом и хлорамбуцилом на подавление роста культуры опухолевых клеток рака молочной железы человека можно сделать вывод, что полимерные сферы с этопозидом и хлорамбуцилом имеют различное токсичное воздействие на культуру опухолевых клеток, а именно: хлорамбуцил действует активнее и сильнее подавляет рост культивируемых клеток за корот-

кое время (80% за 24 ч, рис. 4). По данным кинетики выхода за первые 2 сут процент высвобождения ЛВ из матрицы достигал 80% (рис. 2). Этопозид действует слабее (процент подавления роста клеток за 48 ч не превышал 50%), однако в дальнейшем (по данным исследования кинетики выхода *in vitro* (рис. 2)) он имеет длительный пролонгированный эффект высвобождения ЛВ из полимерной матрицы. Хлорамбуцил может быть использован для нанесения первичного шокового удара на опухолевые клетки с дальнейшим длительным поддерживающим цитотоксическим эффектом. Этопозид же может быть использован для проведения длительной онкотерапии, так как матричная система на его основе позволяет поддерживать действующую терапевтическую дозу этопозида благодаря его постоянному высвобождению.

Получены микросферы на основе биосовместимого и биоразлагаемого полимера поли-3-оксибутирата с включением цитостатических лекарственных веществ хлорамбуцила и этопозида. Изучена кинетика пролонгированного высвобождения лекарственных веществ хлорамбуцила и этопозида из микросфер. Полученные данные свидетельствуют о том, что пролонгированное высвобождение происходит за счет диффузии лекарственного вещества из полимерной матрицы на начальном этапе, и за счет гидролитической деструкции полимера на более поздних этапах.

На основе анализа кинетики высвобождения изученных ЛВ *in vitro*, а также анализа результатов экспериментов на культуре клеток ткани выявлены принципиальные отличия полученных пролонгированных лекарственных форм хлорамбуцила и этопозида. Хлорамбуцил действует активнее и сильнее подавляет рост культивируемых клеток за короткое время (24 ч). Этопозид действует слабее (процент подавления роста клеток за 48 ч не превышает 50%), однако в дальнейшем он имеет длительный пролонгирующий эффект высвобождения из полимерной матрицы, что может быть оптимально при проведении онкотерапии.

Таким образом, результаты, полученные в данной работе, могут послужить основой для создания и изучения новых пролонгированных лекарственных форм этопозида и хлорамбуцила. Качественно отличные друг от друга пролонгированные формы этопозида и хлорамбуцила могут быть использованы для оптимального выбора тактики лечения онкологического заболевания у пациента.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГК № 16.512.11.2019, ГК № П548, ГК № 16.740.11.0652 Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разра-

ботки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы” и ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” с использованием оборудования Центров коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова и Института биохимии им. А.Н. Баха РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chen G.Q., Wu Q.* // *Biomaterials*. 2005. № 26. P. 6565–6578.
2. *Park J., Ye M., Park K.* // *Molecules*. 2005. V. 1. № 10. P. 146–161.
3. *Босхмоджиев А.П., Бонарцев А.П., Иванов Е.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Багров Д.В., Филатова Е.В., Бонарцева Г.А., Иорданский А.Л.* // *Пластические массы*. 2009. № 8. С. 13–18.
4. *Босхмоджиев А.П., Бонарцев А.П., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Багров Д.В., Филатова Е.В., Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А.* // *Биомедицинская химия*. 2009. Т. 55. № 6. С. 625–635.
5. *Bonartsev A.P., Livshits V.A., Makhina T.A., Myshkina V.L., Bonartseva G.A., Iordanskii A.L.* // *Express Polym. Lett.* 2007. V. 12. № 1. P. 797–803.
6. *Bonartsev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Zaikov G.E.* // *Polymers Res. J.* 2008. № 2. V. 2. P. 127–160.
7. Государственная Фармакопея Российской Федерации. М.: Науч. центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. Изд. XII. 696 с.
8. *Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Лучинина Е.С., Лившиц В.А., Босхмоджиев А.П., Маркин В.С., Иорданский А.Л.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2006. Т. 42. № 6. С. 710–715.
9. *Косенко Р.Ю., Иорданский А.Л., Маркин В.С., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А.* // *Хим.-фармацевт. ж.* 2006. Т. 41. № 12. С. 27–30.
10. *Лившиц В.А., Бонарцев А.П., Иорданский А.Л., Иванов Е.А., Махина Т.А., Мышкина В.Л., Бонарцева Г.А.* // *Высокомолекул. соедин.* 2009. Т. 51. № 7. С. 1243–1251.
11. *Фрешни Р.Я.* *Культура животных клеток : практическое руководство*. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010. 691 с.
12. *Akita S., Einada Y., Miyaki Y., Fugita H.* // *Macromolecules*. 1976. № 9. P. 774–780.
13. *Fundueanu G., Constantin M., Ascenzi P.* // *Acta Biomater.* 2009. V. 1. № 5. P. 363–373.
14. *Yao B., Ni C., Xiong C., Zhu C., Huang B.* // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2010. V. 4. № 33. P. 457–63.
15. *Arifin D.Y., Lee L.Y., Wang C.-H.* // *Advanced Drug Delivery Rev.* 2006. № 58. P. 1274–1325.
16. *Baker R.* *Controlled Release of Biologically Active Agents*. N.Y.: Acad. Press, 1987. 279 p.

Prolonged Release of Chlorambucil and Etoposide from Poly-3-Oxybutyrate-Based Microspheres

E. V. Filatova^a, S. G. Yakovlev^a, A. P. Bonartsev^{a, b}, T. K. Makhina^a,
V. L. Myshkina^a, and G. A. Bonartseva^a

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

^b *Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia*

Received August 26, 2011

Abstract—Microspheres were obtained on the basis of poly(3-oxibutyrate) (POB) with the inclusion of the Chlorambucil and Etoposide cytostatic drugs in a polymer matrix, and the morphology, kinetics of drug release from microspheres, and the interaction between microspheres and tumor cells in vitro were studied. Data on the kinetics of drug release suggests that a prolonged release occurs by drug diffusion from the polymer matrix at the initial stage and at the expense of hydrolytic degradation of the polymer at a later stage. A study of the biocompatibility and biological activity of biopolymeric microspheres showed that chlorambucil operates actively and strongly inhibits the growth of cultured cells for a short time (24 h). Etoposide acts weaker (the percentage of cell growth suppression during 48 h does not exceed 50%), but subsequently it has a basis for the creation of new dosage forms with prolonged action of Etoposide and chlorambucil for cancer therapy.

UDC 577.154.2

SCANNING ASSAY OF β -GALACTOSIDASE ACTIVITY

© 2012 W. Li, X. Zhao, S. Zou, Y. Ma, K. Zhang, and M. Zhang

Tianjin University, Tianjin 300072, China

e-mail: zhangkun@tju.edu.cn

Received December 16, 2011

β -galactosidase, encoded by the *lacZ* gene in *E. coli*, can cleave lactose and structurally related compounds to galactose and glucose or structurally related products. Its activity can be measured using an artificial substrate, *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG). Miller firstly described the standard quantitative assay of β -galactosidase activity in the cells of bacterial cultures by disrupting the cell membrane with the permeabilization solution instead of preparing cell extracts. Therefore, β -galactosidase became one of the most widely used reporters of gene expression in molecular biology to reflect intracellular gene expression difference. But the Miller assay procedure could not monitor the β -galactosidase reaction in real time and its results were greatly influenced by some operations in the Miller procedure, such as permeabilization time, reaction time and concentration of the cell suspension. A scanning method based on the Miller method to determine the intracellular β -galactosidase activity in *E. coli* Tuner (DE3) expressing β -galactosidase in real time was developed and the permeabilization time of cells was optimized for that. The comparison of 3 assays of β -galactosidase activity (Miller, colorimetric and scanning) was made. The results proved that scanning method for the determination of enzyme activity with using ONPG as substrate is simple, fast and reproducible.

β -Galactosidase (β -D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23), encoded by the *lacZ* gene of the *lac* operon in *E. coli*, is a large (120 kDa, >1000 amino acids) protein that forms a tetramer. It cleaves lactose and structurally related compounds to galactose and glucose or structurally related products [1, 2]. Since its activity can be monitored using a variety of chromogenic and fluorogenic substrates [3, 4], it has been a versatile reporter for both prokaryotes and eukaryotes [5–10]. The standard quantitative assay of β -galactosidase activity in cells, originally described by Miller [11] for assay in bacterial cultures, involves spectrophotometric measurement of the formation of the yellow chromophore *o*-nitrophenol (ONP) as the hydrolytic product of the β -galactosidase reaction from the colorless substrate *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG). The amount of ONP produced as a function of reaction time per volume of cell culture is divided by the optical density of the culture to generate a value of specific enzyme activity in Miller units [11]. Subsequently, some derivative methods based on Miller's method were reported [12–14].

In the Miller method and its derivative methods, the bacteria cells are treated by some surfactant and/or organic solvents, e.g. chloroform and SDS, which partially disrupts the cell membrane and after that small molecules like ONPG can freely diffuse into the cell instead of preparing cell extracts, e.g., by sonic disruption. Therefore, β -galactosidase became one of the most widely used reporters of gene expression in molecular biology to reflect intracellular gene expression difference. But the Miller procedure and its derivative methods are colorimetric which cannot monitor the

reaction in real time. Therefore, the results of the β -galactosidase activity assay are influenced by some operations in the Miller procedure, such as permeabilization time, reaction time and cell suspension concentration.

The aim of the study was to develop a scanning method based on the Miller procedure and its derivative methods to determine the intracellular β -galactosidase activity using *E. coli* Tuner (DE3) in which β -galactosidase was expressed.

MATERIALS AND METHODS

Materials. *E. coli* DH5 α [*endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1D (lacZYA-argF) U169 (f80dlacd(lacZ)M15)*] was obtained from Invitrogen (USA). *E. coli* Tuner (DE3) [*F⁻ ompT hadSB (rB⁻mB⁻) gal dcm lacY1 (DE3)*] and plasmid pET28a were purchased from Novagen (Germany). DNA modification enzymes, restriction enzymes and polymerase chain reaction (PCR)-related materials were obtained from Takara Bio (Japan). Oligonucleotides synthesis and DNA sequence were purchased from Invitrogen (USA).

Bacterial strains and growth conditions. *E. coli* DH5 α and *E. coli* Tuner (DE3) were used for cloning experiments and for protein expression, respectively. They were routinely grown in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C. 15 μ g/ml of kanamycin was added when required.

For protein expression experiments, cells were grown in M9 defined medium with kanamycin at 37°C and 200 rpm [15]. Overnight culture, accounting for a

1/100 volume of the fresh medium, was used for inoculation. When the OD_{600} of the cultured cells reached 0.5 ± 0.01 , protein expression was induced by adding IPTG to a final concentration of 0.5 mM.

Plasmid construction. Standard PCR was performed with Pfu DNA polymerase (Promega, USA) according to the manufacturer's instructions. General techniques for plasmid DNA preparation, restriction enzyme manipulation, molecular cloning, and agarose gel electrophoresis were carried out as described in [15].

The lacZ gene was PCR-amplified with two primers lacZ-NcoI (5'-AACAGCCATGGGCATGAT-TACGGATTC-3') and lacZ-XhoI (5'-ACCAGCTC-GAGTTATTTTGGACACCAGACC-3') from *E. coli* K-12 genome. The PCR product was digested with restriction enzymes NcoI and XhoI and cloned into the restriction enzyme sites of NcoI and XhoI in vector pET28a to form pET28a-lacZ.

β -Galactosidase activity assays. β -Galactosidase activities were assayed in at least triplicate as described [11, 12] with the following modifications.

Colorimetric method and Miller's method. 20 μ l of cell suspension mixed with 80 μ l of permeabilization solution (PS) preheated at 30°C, containing 100 mM Na_2HPO_4 , 20 mM KCl, 2 mM $MgSO_4$, 0.8 mg/ml of hexadecyltrimethylammonium bromide, 0.4 mg/ml of sodium deoxycholate and 5.4 μ l/ml of β -mercaptoethanol. Then 600 μ l of substrate solution (SS) preheated at 30°C, containing 60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 1 mg/ml of ONPG and 2.7 μ l/ml of β -mercaptoethanol, was added to initiate the reaction. The reaction was conducted at 30°C and stopped by adding 700 μ l of 1 M Na_2CO_3 when a faint yellow color was observed. The reaction time was accurately recorded and not less than 1 min. Then both OD_{420} and OD_{550} were measured.

Scanning method. 20 μ l of cell suspension mixed into 80 μ l PS preheated at 30°C. Then 600 μ l SS preheated at 30°C was added to start the reaction. The reaction was carried out at 30°C and monitored at 420 nm. The activities were determined from the increase rates of the ONP formation.

One unit of β -galactosidase activity determined by colorimetric and scanning methods was defined as the amount of cells produced 1 μ mol of ONP per min under the assay conditions. The specific activity was expressed in μ mol/min OD_{600} l. The β -galactosidase activities measured by Miller's method were calculated in Miller Units which give the change in OD_{420} /min/ml for cell density at OD_{600} .

The absorbance value was read on a Cary50 spectrophotometer (Varian, USA). All initial rates were corrected for the background (nonenzymatic) reaction.

Standard curve of ONP. *Standard curve of ONP for colorimetric method.* 0–200 μ l of ONP standard solution (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 1.0 mM ONP and 2.7 μ l/ml of β -mercaptoethanol) were pi-

petted to 10 tubes respectively and sodium phosphate buffer (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , and 2.7 μ l/ml of β -mercaptoethanol) was added to 620 μ l. 80 μ l PS preheated at 30°C and 700 μ l of 1 M Na_2CO_3 was added to each tube. Absorbance readings were spectrophotometrically determined at 420 nm.

Standard curve of ONP for scanning method. The standard curve of ONP for scanning method was carried out as for colorimetric method but without adding Na_2CO_3 . Absorbance readings were spectrophotometrically determined at 420 nm. The values obtained were converted to molar concentrations using ONP standard curve.

RESULTS

Calculations of β -galactosidase activities. *β -Galactosidase activities calculated in Miller's method.* The following equation to calculate units of enzyme activity assayed with Miller's method:

$$\text{Miller Units} = 1000 \times [(OD_{420} - 1.75OD_{550}) / (T \times V \times OD_{600})], \quad (1)$$

where OD_{420} and OD_{550} were read from the reaction mixture; OD_{600} reflected cell density in the washed cell suspension; T was the time of the reaction in minutes; V (ml) was the volume of culture used in the assay. The units gave the change in OD_{420} /min/ml for cell density at OD_{600} .

β -Galactosidase activities calculated in colorimetric method. The standard curve of ONP for colorimetric method resulted in the straight line $OD_{420} = -0.00256 + 0.00319 \times \text{ONP (nmol)}$ with a correlation coefficient of 0.99995 (Fig. 1a). One unit of β -galactosidase activity determined by this method was defined as the amount of cells that produces 1 μ mol of ONP per min under the assay conditions. Therefore, β -galactosidase activity measured by colorimetric method was calculated by following equation:

$$\text{Colorimetric activity Units} = (OD_{420} + 0.00256) / (0.00319 \times 1000 \times T \times V \times OD_{600}), \quad (2)$$

where OD_{420} was read from the reaction mixture; OD_{600} reflected cell density of the cell suspension; T was the time of the reaction in min; V (l) was the volume of the cell suspension used in the assay. The specific activity was expressed in μ mol/min $\cdot OD_{600} \cdot l$.

β -Galactosidase activities calculated in scanning method. The standard curve of ONP for scanning method resulted in the straight line $OD_{420} = 0.01512 + 2238.1 \times [\text{ONP}]$ (mol/l) with a correlation coefficient of 0.99957 (Fig. 1B), so the molar extinction coefficient of ONP in the assay system was $2238.1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. One unit of β -galactosidase activity of scanning method was defined as the amount of cells that produced 1.0 μ mol of ONP per min under the assay conditions.

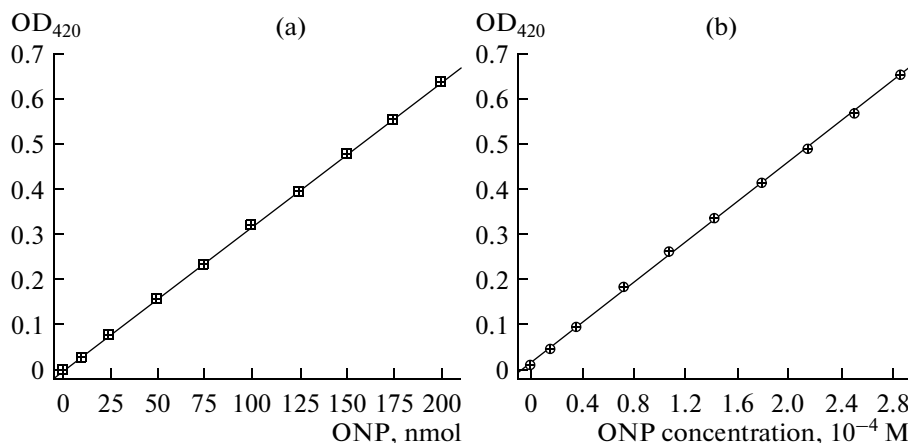


Fig. 1. The standard curves of β -galactosidase assay determined by colorimetric (a) and scanning (b) methods. a – standard curve of the ONP is presented by plotting OD_{420} versus the ONP in nmol. The fitting line was expressed by formula $OD_{420} = -0.00256(\pm 9.05996 \times 10^{-4}) + 0.00319(\pm 1.04561 \times 10^{-5}) \times ONP$ (nmol) with a correlation coefficient of 0.99995. b – standard curve of the ONP is presented by plotting OD_{420} versus the ONP concentration. The fitting line was expressed by formula $OD_{420} = 0.01512(\pm 5.40908 \times 10^{-4}) + 2238.1(\pm 3.89442) \times [ONP]$ (M) with a correlation coefficient of 0.99957. All measurements were done in at least three times. The error bars are smaller than the symbol size and therefore barely visible.

Therefore, β -galactosidase activity measured by scanning method was calculated by following equation:

$$\begin{aligned} \text{Scanning activity Units} &= \\ &= OD_{420} \times V_r \times 1000000 / (\varepsilon \times V \times OD_{600}), \end{aligned} \quad (3)$$

where OD_{420} was the variation of OD_{420} per min; OD_{600} reflected cell density of the cell suspension; V_r was the volume of the reaction system; ε was the molar extinction coefficient of ONP in the assay system, $2238.1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; V was the volume (l) of the cell sus-

pension used in the assay. The specific activity was expressed in $\mu\text{mol}/\text{min OD}_{600} \text{ l}$.

Effect of the PS treatment time on the β -galactosidase activity. The *E. coli* Tuner (DE3)-pE28Z cells were cultured to $OD_{600} = 0.5 \pm 0.01$, and protein expression was induced by adding IPTG to a final concentration of 0.5 mM. After 2 h of induction at 37°C the suspension was taken out for enzyme assay. β -Galactosidase activities were determined using above-mentioned 3 methods at different incubation time of the cell suspension with PS. The results are shown in Fig. 2. No matter which method was used, the β -galactosidase activity of the mixture of cell suspension with PS incubated for 10 min was the highest. Then, the enzyme activities were decreased with increasing the PS treatment time. The curve of the β -galactosidase activities determined by Miller's method was similar to that determined by colorimetric method. They declined slowly, but the curve of the β -galactosidase activity determined by scanning method sharply dropped.

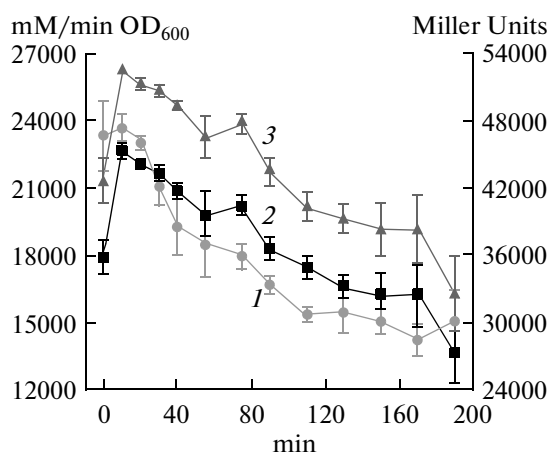


Fig. 2. The β -galactosidase activities of the *E. coli* Tuner(DE3)-pE28Z cells were determined using 3 methods at different incubation time of cell suspension with PS. Time of induction of protein expression was 2 h. 1 – β -galactosidase activity assayed by scanning method, $\mu\text{mol}/\text{min OD}_{600} \text{ l}$; 2 – β -galactosidase activity assayed by colorimetric method, $\mu\text{mol}/\text{min OD}_{600} \text{ l}$; 3 – β -galactosidase activity assayed by Miller's method, Miller Units.

Effect of the dilution of cell suspensions on the β -galactosidase activity. The *E. coli* Tuner (DE3)-pE28Z cells were cultured to $OD_{600} = 0.5 \pm 0.01$, and protein expression was induced by adding IPTG to a final concentration of 0.5 mM. After 1 h of induction at 37°C the suspension was taken out for β -galactosidase assay. The mixture of the cell suspension with PS was incubated for 10 min. β -galactosidase activities of the cells taken in different dilutions were determined using above-mentioned 3 methods. The results are presented in Fig. 3. The enzyme assay does not depend on dilution of the cell suspension.

β -Galactosidase activities determined at different induced times using 3 methods. The *E. coli* Tuner

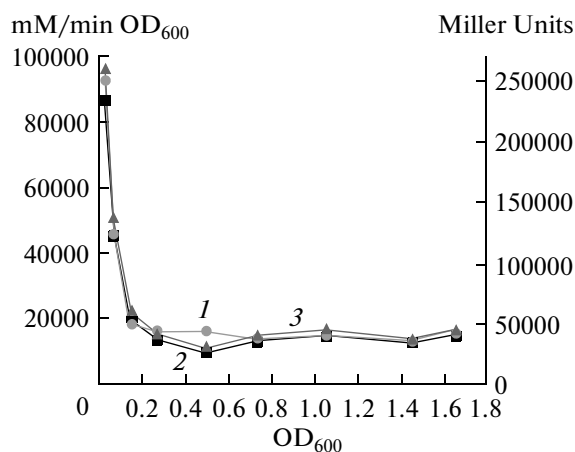


Fig. 3. The β -galactosidase activities of the of the *E. coli* Tuner(DE3)-pE28Z cells taken in different dilutions determined using 3 methods. Time of the induction of protein expression was 1 h. Legend to the curves is the same as in Fig. 2.

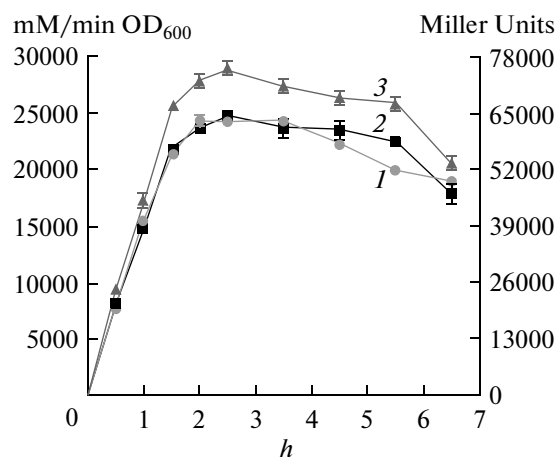


Fig. 4. The β -galactosidase activities of the *E. coli* Tuner(DE3)-pE28Z cells determined at different time of induction of protein expression using 3 methods. The cell suspension was incubated with permeabilization solution for 10 min. Legend to the curves is the same as in Fig. 2.

(DE3)-pE28Z cells were cultured to $OD_{600} = 0.5 \pm 0.01$, and protein expression was induced by adding IPTG to a final concentration of 0.5 mM. The cell suspension was used for different time of induction in β -galactosidase assay using above-mentioned 3 methods. The mixture of the cell suspension with permeabilization solution was incubated for 10 min. The results are shown in Fig. 4.

After the beginning of induction the β -galactosidase activity increased rapidly and the intracellular enzyme accumulated to a high level; then after about 6 h of induction, the rate of reaction gradually slowed down and the intracellular β -galactosidase maintained this high level. The curves of the β -galactosidase activities determined by 3 methods were similar and the data determined by Miller' method were higher.

DISCUSSION

ONPG is an artificial chromogenic substrate for β -galactosidase. It is colorless, while its hydrolytic product of the action of β -galactosidase, ONP is yellow ($OD_{max} = 420$ nm). Therefore, enzyme activity of β -galactosidase can be measured by the rate of formation of yellow color using a spectrophotometer.

However, the color intensity of ONP is pH dependent. Only when its hydroxyl is deprotonated, ONP becomes yellow, so the strongest color appears at $pH > 8.0$. Obviously, such a high pH may inhibit the enzyme in the process of assay. A stopped-time assay can avoid this problem because it can be run at the optimum pH for the enzyme, and then the pH can be raised when the reaction is stopped, which was usually done by the addition of sodium carbonate. Therefore, colorimetric methods were popular in enzyme assay of β -galactosidase.

Although its color is not as strong as that at $pH > 8.0$, ONP also can be chromogenic at pH about 7.0 and OD_{420} value is linear to the ONP concentration when it is less than 0.3 mM. Therefore, ONPG as substrate can be feasible for a real-time scanning assay of β -galactosidase activity with controlling the assay buffer at pH about 7.0.

A critical step in the Miller procedure is the permeabilization of cells. Rather than preparing cell extracts, e.g., by sonic disruption, the bacteria could be treated by the permeabilization solution that partially disrupts the cell membrane such that ONPG can freely diffuse into the cell. On the other hand, other molecules in the permeabilization solution also can enter into cells and denaturalize the β -galactosidase since the permeabilization solution usually contains surfactant and/or organic solvents. Therefore, it is important to fix the incubation time of the cell suspension with permeabilization solution, which not only ensure the cell membrane can be disrupted and ONPG can freely diffuse into the cell, but also the intracellular β -galactosidase is denaturalized as less as possible. The results obtained revealed that the incubation time of the cell suspension with permeabilization solution should better be controlled in 10 min.

In the Miller and colorimetric methods, the color of reaction solution must be kept close watch on and the reaction time must be noted. If there is too much β -galactosidase in incubation mixture, the reaction solution will turn yellow in few minutes or even seconds. The reaction time is too short to be exactly noted and it is one of the greatest contributions to error. Therefore, the reaction time is usually adjusted to a long time, 45–60 min, so that the time error becomes insignificant. Cells containing β -galactosidase had to be diluted in order to delay the reaction time. Howev-

er, it is necessary to take into account that diluting cell suspension would seriously affect the β -galactosidase activity, especially when the OD_{600} of the cell suspension is less than 0.1.

Besides that, the reaction is stopped usually by the addition of sodium carbonate. In this case the end of the reaction depends on the observation of experimenters, and the color of reaction solution will change after adding sodium carbonate, which makes the assay results by the Miller and colorimetric methods poor reproducible.

It is very important that colorimetric method gives the product, ONP, being produced at a linear rate. Actually, the reactions are often not linear. Because colorimetric method is not real-time monitor assay, the measurement of enzyme activities usually is inaccurate.

Due to development of scan method every assay could be completed in 1 ~ 5 min without considering the reaction time or the color of reaction solutions. Therefore, scanning method for the detection of β -galactosidase activity with ONPG as substrate is simple, fast and reproducible.

ACKNOWLEDGMENTS

The research was funded by grants from the National Natural Science Foundation of China (NSFC-30600369, NSFC-30900033, NSFC-20806055, NSFC-20875068). This work was also supported by National 973 Project (2011CBA00804) and Project of Introducing Talents of Discipline to Universities (B06006) of China.

REFERENCES

1. Davies, C.M. and Apte, S.C., *Environ. Toxicol.*, 1999, vol. 14, no. 3, pp. 355–359.
2. George, I., Crop, P., and Servals, P., *Water Res.*, 2002, vol. 36, no. 10, pp. 2607–2617.
3. Wutor, V.C., Togo, C.A., and Pletschke, B.I., *Chemosphere*, 2007, vol. 68, no. 4, pp. 622–627.
4. Gong, H., Zhang, B., Little, G., Kovar, J., Chen, H., Xie, W., Schutz-Geschwender, A., and Olive, D.M., *Anal. Biochem.*, 2009, vol. 386, no. 1, pp. 59–64.
5. Gekas, V. and Lopez-Leiva, M., *Process Biochem.*, 1985, vol. 20, no. 1, pp. 2–12.
6. Scrimshaw, N.S. and Murray, E.B., *Am. J. Clin. Nutr.*, 1988, vol. 48, no. 4, pp. 1079–1159.
7. Gonzalez-Siso, M.I., *Biores. Technol.*, 1996, vol. 57, no. 1, pp. 1–11.
8. Rakhmanova, V.A. and MacDonald, R.C., *Anal. Biochem.*, 1998, vol. 257, no. 2, pp. 234–237.
9. Serebriiskii, I.G. and Golemis, E.A., *Anal. Biochem.*, 2000, vol. 285, no. 1, pp. 1–15.
10. Tang, Y., Luo, J., Fleming, C.R., Kong, Y., Olini, G.C.Jr., Wildey, M.J., Cavender, D.E., and Demarest, K.T., *Assay Drug Dev. Technol.*, 2004, vol. 2, no. 3, pp. 281–289.
11. Miller, J.H., *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: CSH Laboratory Press, 1972.
12. Zhang, X. and Bremer, H., *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, no. 19, pp. 11181–11189.
13. Pelisek, J., Engelmann, M.G., Golda, A., Fuchs, A., Armeanu, S., Shimizu, M., Mekkaoui, C., Rolland, P.H., and Nikol, S., *J. Mol. Med.*, 2002, vol. 80, no. 11, pp. 724–736.
14. Vidal-Aroca, F., Giannattasio, M., Brunelli, E., Vezzoli, A., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., and Bertoni, G., *Biotechniques*, 2006, vol. 40, no. 4, pp. 433–443, 436.
15. Sambrook, J., Russell, D.W., *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3 Ed., New York: Cool Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Сдано в набор 25.06.2012 г.	Подписано к печати 4.09.2012 г.	Формат бумаги 60 × 88 ¹ / ₈
Цифровая печать	Усл. печ. л. 12.0	Уч.-изд. л. 12.0
	Тираж 121 экз.	Зак. 685

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

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