

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	ГРИБЫ РОДА <i>PENICILLIUM</i> КАК ПРОДУЦЕНТЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ (ОБЗОР) Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В.	5	1
<input type="checkbox"/>	REFOLDING OF RECOMBINANT HUMAN INTERFERON α -2A FROM <i>ESCHERICHIA COLI</i> BY UREA GRADIENT SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY Gao F., Shi L., Xu L.X.	17	0
<input type="checkbox"/>	ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ <i>YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS</i> Покровский В.С., Покровская М.В., Александрова С.С., Андрианов Р.М., Жданов Д.Д., Омелянюк Н.М., Трещалина Е.М., Соколов Н.Н.	24	2
<input type="checkbox"/>	АМИЛАЗА ИЗ ГРИБА ЕЖОВИКА ГРЕБЕНЧАТОГО <i>HERICIUM ERINACEUM</i> Ду Ф., Ван Н.Х., Наг Т.Б.	29	0
<input type="checkbox"/>	ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ, ОЧИСТКА И СВОЙСТВА БЕЛКА-ИНГИБИТОРА ХИМОТРИПСИНА ИЗ КАРТОФЕЛЯ Парфёнов И.А., Ревина Т.А., Герасимова Н.Г., Кладницкая Г.В., Валуева Т.А.	34	0
<input type="checkbox"/>	ОСОБЕННОСТЬ КРИСТАЛЛООБРАЗОВАНИЯ У ПИГМЕНТООБРАЗУЮЩИХ КУЛЬТУР <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> Чил-Акопян Л.А., Амбарцумян А.А., Чахалян А.Х.	41	0
<input type="checkbox"/>	ГИДРАТАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА МИЦЕЛИЯ ГРИБОВ И СОДЕРЖАНИЕ β - ГЛЮКАНА Киянко М.В., Канел Р.С., Людемман В., Позе Г., Вагнер Д.Р.	48	0
<input type="checkbox"/>	ПОЛУЧЕНИЕ БИОДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА НА ОСНОВЕ ЛИПИДОВ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ Лунин В.В., Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Мысякина И.С., Ивашечкин А.А., Богдан В.И., Феофилова Е.П.	53	0
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РАСТЕНИЙ НА БИОСИНТЕЗ РЕЗВЕРАТРОЛА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ВИНОГРАДА АМУРСКОГО <i>VITIS AMURENSIS RUPR.</i> Киселёв К.В., Шумакова О.А., Маняхин А.Ю.	61	0
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ ДИНАТРИЕВОЙ СОЛИ ЦИКЛОПЕНТЕНОВОГО α,β -ТРИКЕТОНА НА АКТИВНОСТЬ ГИДРОЛАЗ И СОСТОЯНИЕ ЧАСТИЦ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ В ЛИСТЬЯХ ТАБАКА Лапшина Л.А., Реунов А.В., Нагорская В.П., Шестак О.П., Новиков В.Л.	67	1
<input type="checkbox"/>	БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ЦИТОПАТОГЕННОСТИ ВИРУСОВ В МАКРОФАГАХ Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Крылова Н.В., Леонова Г.Н., Ляпун И.Н., Смирнов И.С.	72	0
<input type="checkbox"/>	АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭФИРНЫХ МАСЕЛ ОРЕГАНО, ТИМЬЯНА И ЧАБЕРА Алинкина Е.С., Мишарина Т.А., Фаткуллина Л.Д.	82	3
<input type="checkbox"/>	МЕТОД МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ БЫСТРОГО ОБНАРУЖЕНИЯ <i>RAENIBACILLUS LARVAE</i> В ГНИЛОСТНОЙ МАССЕ СОТ И КОЛОНИЯХ БАКТЕРИЙ Русенова Н.В., Парванов П., Станилова С.	88	0
РЕЦЕНЗИИ			
<input type="checkbox"/>	В. К. ВОЙНИКОВ "МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ ПРИ ТЕМПЕРАТУРНОМ СТРЕССЕ". НОВОСИБИРСК, АКАДЕМИЧЕСКОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО "ГЕО". 2011, 163 С Глянько А.К.	94	0

УДК 582.281.123.2.017.735:547.92

ГРИБЫ РОДА *Penicillium* КАК ПРОДУЦЕНТЫ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ (ОБЗОР)

© 2013 г. А. Г. Козловский, В. П. Желифонова, Т. В. Антипова

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино, 142290;
e-mail: Kozlovski@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 6.02.2012 г.

Грибы рода *Penicillium*, выделенные из малоизученных местообитаний, способны синтезировать как известные ранее, так и новые физиологически активные вещества различной структуры. К ним относятся вторичные метаболиты алкалоидной природы — эргоалкалоиды, дикетопиперазины, хинолины, хиназолины, бензодиазепины и поликетиды. Обсуждается использование профилей вторичных метаболитов для целей таксономии. Изучение физиолого-биохимических характеристик продуцентов биоактивных соединений показало, что биосинтез алкалоидов начинается с первых суток культивирования и идет параллельно росту. Отмечен циклический характер накопления алкалоидов, связанный с процессами биосинтеза, экскреции из клеток, деградацией в культуральной жидкости и поглощением алкалоидов клетками. Синхронные изменения концентрации внутриклеточного триптофана и алкалоидов необходимы для регуляции оптимального для культуры количества триптофана.

DOI: 10.7868/S0555109913010091

Микроскопические грибы рода *Penicillium* — одни из наиболее перспективных источников физиологически активных соединений, в том числе алкалоидов, антибиотиков, гормонов, микотоксинов и т.д. В настоящее время активный поиск продуцентов этих соединений ведется среди штаммов грибов, выделенных из малоизученных и практически неисследованных местообитаний. Грибы—продуценты представители рода *Penicillium* характеризуются особенностями роста и биосинтеза вторичных метаболитов. Транспорт и экскреция метаболитов алкалоидного характера также подчиняются определенным законам, присущим для грибов этого рода.

Грибы рода *Penicillium* считаются трудными объектами для видовой идентификации традиционными микробиологическими методами. Общепринятая идентификация пенициллов по микро- и макроморфологическим признакам часто не дает однозначных результатов. Надежность отнесения пенициллов к определенному виду представляется возможным из-за видоспецифичной продукции различных биологически активных веществ.

Цель обзора — обобщение данных о продуцентах новых биологически активных соединений среди грибов рода *Penicillium*, физиолого-биохимических особенностей штаммов, синтезирующих биоактивные соединения, использование

данных о метаболоме для целей таксономии пенициллов.

СТРУКТУРНЫЕ ТИПЫ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Грибы рода *Penicillium* известны как продуценты вторичных метаболитов, относящихся к различным классам химических соединений — эргоалкалоидам, дикетопиперазинам, бензодиазепинам, хинолинам, хиназолинам и поликетидам (табл. 1).

Пенициллы продуцируют разнообразные по структуре эргоалкалоиды клавинового ряда, особенностью которых является наличие тетрациклического эрголинового ядра. Разнообразие клавиновых алкалоидов обусловлено множеством структурных модификаций кольца D. Эти соединения могут иметь двойную связь в различных положениях кольца и различаться радикалами заместителей. Для них характерно наличие нескольких асимметрических атомов углерода и соответствующих изомеров. Клавиновые алкалоиды, синтезируемые пенициллами, можно разделить на 3 группы. В первую входят производные 6-N-метилэргolina, такие, как фестуклавин, эпикостаклавин, костаклавин, фумигаклавины и изофумигаклавины А и Б с полностью насыщенным кольцом D. Ко второй группе можно отнести эрголены с

Таблица 1. Биологическая активность вторичных метаболитов грибов рода *Penicillium*

Класс соединений	Метаболиты	Биологическая активность, [3, 4, 6, 7, 11, 14, 15, 19, 20, 24, 26, 32]
Эргоалкалоиды	Агроклавин-І	Антибиотическая и противоопухолевая активность [4]
	Аурантиоклавин	—*
	Изофумигаклавины А и Б	—
	Изоханоклавин-І	—
	Костаклавин	—
	Пироклавин	—
	Ругуловазины А и Б	Гипотензивные свойства [20]
	Циклопиазоновая кислота	Микотоксин [20]
	Ханоклавин-І	—
	Фестуклавин	Антибиотическая и противоопухолевая активность [6, 7]
	Фумигаклавины А и Б	—
	Ханоклавины-ІІІ	—
	Эпикостаклавин	—
Эпоксиягроклавин-І	Гипотензивные свойства [3]	
Дикетопиперазиновые алкалоиды	Бревианамиды А и Б	Антибиотическая и противоопухолевая активность [14]
	Веррукозин	—
	Гландиколины А и Б	—
	3,12-дигидророкефортин	—
	Изоругулозувин	—
	Мелеагрин	—
	Оксалин	—
	Пискаринины А и Б	Противоопухолевая активность [10]
	Пролилтриптофанилдикетопиперазин	—
	Рокефортин	Микотоксин [20]
	Ругулозувины А (пуберулин А) и Б (пуберулин)	Противоопухолевая активность [11]
Феллутанин А-Е, изофеллутанин В и С	Противоопухолевая активность [19]	
Хинолиновые алкалоиды	Виридикатин, виридикатол	Противоопухолевая активность [15]
	Хиноцитринины А и Б	Антибиотическая и противоопухолевая активность [26]
Хиназолиновые алкалоиды	Фумихиназолины А и Б	Противоопухолевая активность [32]
Производные аминокислот	Квестиомицин	Антибиотическая и противоопухолевая активность [24]
	Ксантоциллин	Антибиотическая активность [24]
Поликетиды	Гризеофульвин	Антибиотическая активность [20]
	Охратоксины А и Б	Микотоксины [20]
	Патулин	»
	Цитринин	»

*Знак " — " — не изучалась.

двойной связью в положении 8, 9 – агроклавин, агроклавин-I, ханоклавин-I, ханоклавин-III, изоханоклавин-I и в порядке исключения в число этих соединений можно включить также эпоксиагроклавин-I. И, наконец, третья группа – клавиновые алкалоиды с модифицированными кольцами С или D: ругуловазины А и Б, аурантиоклавин и α -циклопиазоновая кислота (ЦПК).

Все эргоалкалоиды в той или иной степени обладают биологической активностью, действуют на центральную нервную систему, благодаря их структурному сходству с молекулами таких нейромедиаторов, как адреналин, серотонин, дофамин и др. [1, 2]. Ранее проведенные исследования фармакологической активности эпоксиагроклавина-I показали, что соединение обладает нейротропной активностью, оказывает умеренное гипотензивное действие, замедляет частоту сердечных сокращений, снижает реактивность сосудистой системы на норадреналин [3]. Для некоторых эргоалкалоидов показаны антибиотическое и цитостатическое действия [4]. Так, агроклавин, фестуклавин и их алкилпроизводные проявляют бактериостатический эффект в отношении *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и др. Наибольшей активностью обладает 1-пропил-6-норфестуклавин, подавляющий рост всех исследованных бактерий и дрожжей *Candida albicans* [5, 6]. Производные фестуклавина, подавляя транспорт нуклеозидов в некоторых опухолевых клетках, ингибируют синтез ДНК и РНК [7].

К другой группе, синтезируемых пенициллами вторичных метаболитов, относятся циклические пептиды, состоящие из остатков двух аминокислот и мевалоновой кислоты. Для этих соединений алкалоидной природы характерно наличие дикетопиперазинового ядра. Конденсация триптофана, гистидина и мевалоновой кислоты приводит к биосинтезу алкалоидов группы рокефортина (рокефортин, 3,12-дигидророкефортин, гландиколины А и Б, мелеагрин, оксалин) [8]. Триптофан и мевалоновая кислота являются также предшественниками дикетопиперазиновых алкалоидов феллутанинов и изофеллутанинов [9]. По такой же схеме из триптофана, пролина и одной или более молекул мевалоновой кислоты образуются бревинамиды А и Б и новые алкалоиды – пискаринины А и Б [10]. К дикетопиперазиновым алкалоидам, предшественниками которых являются триптофан и лейцин, относятся лейцилтриптофанилдикетопиперазин и веррукозин [8]. Соединения, образованные из остатков триптофана и фенилаланина, представлены такими алкалоидами, как ругулозувин, изоругулозувин, пуберулин (= ругулозувин А), пуберулин А (= ругулозувин Б) [11]. Наиболее распространенным и хорошо изу-

ченным с точки зрения биологической активности является рокефортин. Рокефортин известен как микотоксин, обладающий нейротоксическими свойствами. Показано, что в определенной степени рокефортин ингибирует ферменты желудочно-кишечного тракта [12] и активности цитохромов Р 450 [13]. Для некоторых дикетопиперазинов, например для ругулозувинов и бревинамидов, показана антибиотическая и противоопухолевая активность [11, 14].

Если в начале биосинтетической цепочки вместо триптофана находится антраниловая кислота, то в результате метаболических процессов образуются бензодиазепиновые (циклопептин, циклопенин и циклопенол), хинолиновые (виридикатин, виридикатол и хиноцитринины А и Б), хиназолиновые (фумихиназолины А и Б) соединения. Интерес к этим алкалоидам возрастает благодаря ценным фармакологическим и терапевтическим свойствам. Примером может служить 3-О-метилвиридикатин – сильный ингибитор фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), вызванной вирусом иммунодефицита [15].

Самая многочисленная группа вторичных метаболитов, продуцируемая пенициллами, относится к поликетидам. Среди них наиболее изучены охратоксины А и Б, патулин, цитринин, которые по своей биологической активности относятся к микотоксинам [16].

ПОИСК ПРОДУЦЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Для поиска новых биологически активных молекул перспективных лекарственных средств использованы различные подходы. Во-первых, отбор среди штаммов, относящихся к видам, у которых ранее была обнаружена способность к синтезу новых биомолекул. Во-вторых, исследование метаболома у продуцентов, выделенных из малоизученных, экстремальных местообитаний, так как именно у них с большой вероятностью можно ожидать синтез новых вторичных метаболитов, которые помогают продуценту выживать и адаптироваться в этих условиях.

Поиск продуцентов среди представителей видов, перспективных в отношении синтеза вторичных метаболитов. Ранее была установлена способность *P. fellutanum* (= *P. sizovae*) синтезировать эргоалкалоиды с необычной стереохимией у 5 и 10 атомов углерода эрголинового ядра – агроклавин-I и эпоксиагроклавин-I, а также эргоалкалоид с димерной структурой с N-N сочленением индольных колец – димер эпоксиагроклавина-I [17, 18]. При изучении 5 штаммов *P. fellutanum* было установлено, что один штамм синтезирует, по-видимому, биогенетически связанных между собой,

группу дикетопиперазиновых алкалоидов, у которых триптофан является предшественником [9]. По продуценту эти метаболиты были названы как феллутанин А, феллутанин Б, изофеллутанин Б, феллутанин С, изофеллутанин С, феллутанин Д и феллутанин Е. Было установлено, что феллутанин Д проявляет цитотоксические свойства: IC_{50} (мкг/мл) для клеток фибропластов мышей линии L-929 составляет 11.6, для клеток лейкемии человека линии K-562 – 9.5 и HeLa – 19.7 [9, 19].

Грибы вида *P. piscarium* известны как продуценты индолсодержащих треморгенных микотоксинов янтитрема В, фумитреморгина В, веррукулогена и пенитремов [20]. Сведения о синтезе грибами вида *P. piscarium* алкалоидов, не относящихся к треморгенной группе, немногочисленны. В результате скрининга среди трех штаммов *P. piscarium* было обнаружено, что они синтезировали разнообразные дикетопиперазиновые алкалоиды [21]. Веррукозин, пролилтриптофанилдикетопиперазин, пуберуллин А, изоругулозувин и феллутанин А найдены у штамма ВКМ F-325. Гриб ВКМ F-1823 синтезировал только изоругулозувин и феллутанин А. Продукция пролилтриптофанилдикетопиперазина обнаружена у штамма ВКМ F-691. Кроме того, из культуральной жидкости этого штамма были выделены в очищенном виде два новых метаболита и установлена их структура. Эти новые метаболиты, относящиеся к семейству дикетопиперазиновых алкалоидов, имеют необычную структуру дигидропиранилзамещенного индольного ядра. По продуценту соединения были названы пискаринин А и пискаринин Б. Метаболиты проявляли средний уровень антимикробной активности против бактерий и грибов и среднюю цитотоксичность. Метаболиты активны в отношении клеточной линии рака простаты LNCAP с IC_{50} 2.195 мкг/мл для пискаринина А и 1.914 мкг/мл для пискаринина Б [10].

Поиск новых продуцентов среди штаммов грибов, выделенных из необычных местообитаний. Экологическая система, такая, как орбитальная космическая станции (ОКС) “Мир”, которая в процессе космического полета в течение многих лет подвергалась непрерывному воздействию различных факторов, рассматривалась в качестве уникального материала для углубленных биотехнологических исследований [22]. Осуществление космических полетов с использованием как пилотируемых, так и беспилотных средств сопровождалась выносом за пределы естественных природных условий различных микроорганизмов, контаминирующих космическую технику. Исследования, проведенные на станции “Мир”, показали, что ее микрофлора включала более

100 видов микроскопических грибов. Причем некоторые из них проявляли способность к многолетнему заселению конструкционных материалов интерьера, оснащения и оборудования станции [22]. В 1997–1998 г. в пробах микрофлоры были достоверны диагностированы штаммы, отнесенные к видам *P. expansum* и *P. chrysogenum* – отдаленных потомков культур, выделенных в ее обитаемых отсеках более восьми лет назад.

Выделенные на ОКС “Мир” штаммы пенициллов были изучены в отношении их способности к синтезу азотсодержащих вторичных метаболитов. Было установлено, что 4 штамма *P. chrysogenum* и 6 штаммов *P. expansum* синтезировали метаболиты алкалоидной природы: рокефортин, 3,12-дигидророкефортин, мелеагрин, виридикатин, виридикатол, изоругулозувин, ругулозувин Б и N-ацетилтриптамин [23]. Было показано также, что штамм-резидент *P. expansum* ИМБП 2-7, ставший доминантным в конце длительного полета, и штаммы *P. chrysogenum* ИМПБ 1-5 и 1-6 способны синтезировать ксантоциллин Х (бревицид) и квестиомицин А – антибиотики широкого спектра действия [24].

Поиск новых продуцентов среди штаммов грибов, выделенных из вечной мерзлоты. В результате скрининга штаммов, выделенных из мерзлотных отложений, было установлено, что 41 штамм из 56 изученных способны синтезировать разнообразный спектр вторичных метаболитов [25–31]. Был обнаружен штамм *P. citrinum*, который синтезировал не только метаболиты, необычные для этого вида – эргоалкалоиды эпоксиагроклавин-I и агроклавин-I (ЭА), но и новые вторичные метаболиты хинолиновой природы, названные нами по продуценту как хиноцитринин А и хиноцитринин Б [26]. Хиноцитринины (ХЦ) обладают различными видами биологической активности. Они эффективны против грамположительных, грамотрицательных бактерий, дрожжей и грибов. Эти метаболиты также обладают цитотоксичностью против опухолевых клеток. Так, ингибирующая концентрация (LC_{50} мкг/мл) для хиноцитрининов А и Б для клеток фибробластов мышей линии L-929 составила 33.1 и 18.6, для клеток лейкемии человека линии K-562 – 19.5 и 7.8 и HeLa >50 соответственно [26]. Позднее данный спектр метаболитов был идентифицирован у *P. waksmani* ВКМ FW-2875, выделенного из арктического мерзлотного грунта [30]. В процессе исследования были обнаружены два штамма *P. thymicola*, которые синтезировали фумикиназолины F и G [31]. Они обладали противораковой активностью на клетки лимфолейкоза P 388 (ED_{50} 13.5 мкг/мл и 13.8 мкг/мл соответственно) [32].

Таблица 2. Профили вторичных метаболитов пенициллов, выделенных в различных регионах вечной мерзлоты [25–31, 36, 38]

Штамм, ВКМ FW	Идентифицированные метаболиты	Первоначальный диагноз вида	Окончательный диагноз вида
2885	ЦПК	<i>P. citrinum</i>	<i>P. commune</i>
2666	»	<i>P. melinii</i>	»
2830	»	<i>P. melinii</i>	»
2829	»	<i>P. miczynskii</i>	»
1447, 2753, 2851, 2853, 2876, 2881	»	<i>P. viridicatum</i>	»
2852, 2854	ЦПК, фестуклавин, фумигаклавины А и Б	<i>P. viridicatum</i>	<i>P. palitans</i>
657, 667, 690, 704, 794	Фестуклавин, фумигаклавины А и Б	<i>P. verrucosum</i>	»
738, 741, 766	Рокефортин, дигидророкефортин	<i>P. aurantiogriseum</i>	<i>P. melanoconidium</i>
2877	Рокефортин	<i>P. miczynskii</i>	<i>P. chysogenum</i>
2873	Рокефортин, мелеагрин	»	»
2835	Рокефортин, дигидророкефортин	»	»
2739	Рокефортин, мелеагрин, триптофанилдегидрогистидилдикетопиперазин	»	»
2863	Рокефортин, мелеагрин, триптофанилдегидрогистидилдикетопиперазин, гландиколины А и Б	»	»
2600, 2665	Циклопенин, циклопептин	<i>P. verrucosum</i>	<i>P. solitum</i>
2921	»	<i>P. viridicatum</i>	»
2928, 2604	Циклопенин, циклопептин, виридикатин	»	»
2615	Циклопенин, циклопептин, циклопенол	»	»
791, 725	Микофеноловая кислота	<i>P. brevicompactum</i>	<i>P. bialowiezense</i>
875, 877, 878, 907, 908, 2899	Охратоксин А и Б	<i>P. verrucosum</i>	<i>P. verrucosum</i>
2648	Фумихиназолин F и G, PC-2	<i>P. canescens</i>	<i>P. thymicola</i>
869	»	<i>P. griseofulvum</i>	»
2251	Гризеофульвин	<i>P. griseofulvum</i>	<i>P. griseofulvum</i>
800	Агроклавин-I, эпоксиагроклавин-I, хиноцитринины А и Б	<i>P. citrinum</i>	<i>P. citrinum</i>
2875	»	<i>P. waksmanii</i>	<i>P. waksmanii</i>
655, 806, 811, 816, 818	Ругуловазины А и Б	<i>P. variable</i>	<i>P. variable</i>
809	Не обнаружены	<i>P. verrucosum</i>	<i>P. viridicatum</i>
2859	»	<i>P. viridicatum</i>	»

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ В КАЧЕСТВЕ ЭЛЕМЕНТА ПОЛИФАЗНОЙ ТАКСОНОМИИ

В последнее время для идентификации грибов подрода *Penicillium* разработана новая система, в которой, наряду с микро- и макроморфологическими признаками исследуемых штаммов, используются профили их вторичных метаболитов [33]. Их применение основывается на эмпирическом наблюдении общих физиологических и биохимических характеристик у филогенетически родственных организмов. Потенциальная и фактическая продукция вторичных метаболитов является частью физиолого-биохимической идентификации. Эти принципы лежат в основе полифазной таксономии. Исходя из этих подходов, на

основании профилей вторичных метаболитов было уточнено таксономическое положение 41 штаммов пенициллов из 56 изученных. Штаммы были выделены из различных регионов многолетней мерзлоты: в Антарктиде, в Северной Америке (Канада), в Северо-Восточной Азии (Колыма) и на Камчатке (Россия) [34, 35]. Культуры были изолированы из образцов грунтов, воды, криопэггов и пепла вулканов различного геологического возраста. Было установлено, что определение точной видовой принадлежности этих грибов в момент их выделения из природных субстратов затруднено из-за смещения температурного оптимума роста в сторону низких температур [25, 30, 31, 36].

Ранее Самсон и Фрисвад уже использовали полифазную таксономию для уточнения таксономического положения штаммов грибов [33]. В отличие от их подхода, при изучении профилей вторичных метаболитов культуры выращивали глубинным способом на минеральной среде, содержащей два углеродных субстрата – сукцинат и маннит. Для 6 штаммов наблюдалось соответствие между видовыми наименованиями и набором морфологических признаков и вторичных метаболитов, известных для видов *P. verrucosum* Dierckx и *P. griseofulvum* Dierckx (табл. 2). Так, наличие охратоксинов А и Б, обнаруженных у 5 штаммов, однозначно свидетельствовало об их принадлежности к виду *P. verrucosum* [36]. Гризеофульвин, идентифицированный у одного из штаммов, соответствовал первоначально определенному виду *P. griseofulvum* [31]. К этой группе можно отнести 2 штамма, синтезирующие идентичный спектр метаболитов, состоящий из эрголенов с двойной связью в положении 8,9-агроклавин-1, эпоксиагроклавин-1 и хинолиновые алкалоиды хиноцитринины А и Б (табл. 2). По морфологическим признакам штаммы были отнесены к видам *P. citrinum* Thom и *P. waksmanii* Zaleski [26, 27, 30]. Ранее подобные профили метаболитов были обнаружены у двух культур *P. corylophyllum* Dierckx и *P. fellutanum* Biourge, выделенные из современных местообитаний [17, 37]. Все эти виды пенициллов относятся к подроду *Furcatum*.

Для остальных 42 штаммов было отмечено несоответствие признаков. По профилю вторичных метаболитов штаммы были разделены на несколько групп (табл. 2). Для каждой группы штаммов, адаптированных к искусственным условиям поддержания, был характерен идентичный набор макро- и микроморфологических признаков.

В группу, синтезирующую только ЦПК, вошло 10 штаммов (табл. 2) [30, 31]. Их морфологические признаки соответствовали грибам секции *Viridicata* серии *Camemberti*. Продукция только ЦПК характерна для одного вида – *P. camemberti* Thom. У других видов пенициллов серии *Camemberti*, продуцирующих ЦПК, хемотаксономическими маркерами выступают и другие соединения: для *P. commune* Thom – ругуловазины, для *P. palitans* Westling – фумигаклавины [33]. Морфологические признаки, проявляемые этими штаммами на диагностических агаризованных средах, были схожи и соответствовали виду *P. commune*. У двух штаммов идентифицирован полный набор метаболитов, характерных для вида *P. palitans* – ЦПК, фумигаклавины А и Б и фестуклавины [31]. У 5 штаммов были идентифицированы фумигаклавины А и Б и фестуклавины, а ЦПК отсутство-

вала [29]. Морфологические признаки, проявляемые этими штаммами на диагностических агаризованных средах, были сходны и соответствовали виду *P. palitans*.

Дикетопиперазиновые алкалоиды группы рокефортина идентифицированы у 8 штаммов, первоначально отнесенным к видам *P. aurantiogriseum* Dierckx (3 шт.) и *P. miczynskii* Zaleski (5 шт.) [25, 30]. Вид *P. aurantiogriseum* относят к подроду *Penicillium* секции *Viridicata* серия *Viridicata*. В этом таксоне биосинтез метаболитов группы рокефортина характерен только для вида *P. melanoconidium* Frisvad et Samson. Для вида *P. miczynskii* (подрод *Furcatum*) биосинтез метаболитов группы рокефортина не известен [33]. Повторная идентификация этих культур на диагностических средах и биосинтез ими метаболитов группы рокефортина однозначно свидетельствовали о принадлежности их к подроду *Penicillium* секции *Chrysogena* серии *Chrysogena* к виду *P. chysogenum* Thom.

Продуценты бензодиазепиновых (циклопептин, циклопептин, циклопенол) и хинолиновых (виридикатин) алкалоидов первоначально были отнесены к видам *P. viridicatum* Westling (секция *Viridicata* серия *Viridicata*) и *P. verrucosum* Dierckx (секция *Viridicata* серия *Verrucosa*) [31]. Идентификация видов в этой секции часто проблематична из-за наличия общих межвидовых морфологических признаков, в связи с чем особый смысл имеет определение способности штаммов к продукции вторичных метаболитов, имеющих диагностическое значение. В серии *Viridicata* циклопептины и виридикатины служат хемотаксономическими маркерами видов *P. cyclopium* Westling, *P. freii* Frisvad et Samson, *P. neoehinulatum* (Frisvad, Filtenborg et Wicklow) Frisvad et Samson, *P. polonicum* Zaleski; а в серии *Solita* – видов *P. discolor* Frisvad et Samson, *P. echinulatum* Fassatiowa и *P. solitum* Westling [33]. Морфологические признаки, проявляемые на диагностических средах, адаптированных к искусственным условиям поддержания культур, а также биосинтез циклопептинов и виридикатинов, позволили отнести эти штаммы к виду *P. solitum*. Для остальных видов, продуцирующих циклопептины и виридикатины, в состав маркерных метаболитов входят и другие соединения [33].

Микофеноловая кислота была идентифицирована у двух штаммов, отнесенных по микро- и макроморфологическим признакам виду *P. brevicompactum* Dierckx (подрод *Penicillium* секция *Corotata* серия *Olsoni*) [38]. Однако продукция только микофеноловой кислоты этими штаммами указывала на принадлежность к другому виду серии *Olsoni* – *P. bialowiezense* Zaleski [33]. По морфологическим признакам эти виды трудноразли-

чимы. Различие между ними заключается в продукции бревинанамида А *P. brevicompactum* [33].

Два штамма синтезировали хиназолиновые алкалоиды – фумихиназолины F и G, а также поликетид РС-2 [31]. На диагностических агаризованных средах эти культуры показали невысокую скорость роста, психротолерантность и высокую галотолерантность. По ранее опубликованным данным [33], такие экофизиологические свойства имеют 4 вида пенициллов из секции *Viridicata* серий *Verrucosa* (*P. verrucosum*, *P. thymicola*), *Camemberti* (*P. camemberti*) и *Corymbifera* (*P. radicolica* Overy et Frisvad). Обнаружение продукции фумихиназолинов и микроморфологические признаки подтверждают их принадлежность к виду *P. thymicola*, *P. thymicola* – новый вид, отнесенный Фрисвадом и Самсоном к секции *Viridicata* серии *Verrucosa*. От близких к нему видов *P. verrucosum* и *P. nordicum* Dragoni et Marino этот вид отличается составом продуцируемых метаболитов, шероховатыми конидиями и желтым реверсом на среде СУА.

У 5 из 11 изученных штаммов вида *P. variable* Sopp (подрод *Biverticillium*), выделенных в различных регионах вечной мерзлоты, была обнаружена продукция эргоалкалоидов клавинового ряда ругуловазинов А и Б [28]. У грибов этого вида ругуловазины обнаружены впервые. Ругуловазины синтезируют пенициллы, относящиеся к двум под родам – *Biverticillium* (*P. purpurogenum* Stoll, *P. rugulosum* Thom, *P. islandicum* Sopp) и *Penicillium* (*P. atramentosum* Thom, *P. biforme* Thom (= *P. camemberti*), *P. caseifulvum* Lund, *P. commune* Thom) [33]. Близость макро- и микроморфологических признаков у видов *P. variable* и *P. rugulosum* могла служить основанием для переопределения видовой принадлежности штаммов, синтезирующих ругуловазины. Однако принадлежность изученных продуцентов ругуловазинов к виду *P. variable* не вызывает сомнений из-за отсутствия прорастания их конидий при 5°C.

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОДУЦЕНТОВ

Было изучено влияние состава среды и способа культивирования на алкалоидообразование гриба *P. fellutanum* ВКМ F-3020 [39]. Дикетопиперазиновые алкалоиды – феллутанины синтезировались культурой на всех изученных средах. При крайне слабом росте на среде Чапека–Докса в условиях как глубинного, так и поверхностного культивирования, в культуральной жидкости накапливались в основном конечные продукты биосинтетической цепи. При росте на глюкозопептонной и на минеральной средах в мицелии и вне клеток обнаружен весь спектр алкалоидов.

Было показано, что биосинтез феллутанинов грибом-продуцентом на минеральной среде, содержащей сукцинат и маннит, процесс, идущий параллельно росту культуры. Установлено, что экзогенный триптофан использовался культурой в первичном метаболизме и не стимулировал алкалоидообразование. Максимальный выход продукта от биомассы и максимальное накопление алкалоидов культурой наблюдалось на среде с глутаминовой кислотой. Источник азотного питания практически не влиял на их качественный состав, но отражался на соотношении компонентов алкалоидной фракции. При использовании фенилаланина в качестве единственного источника азота, помимо феллутанинов, обнаружен триптофанилфенилаланиндикетопиперазин (изоругулозувин).

Биосинтез пискарининов А и Б наиболее активно проходил при поверхностном культивировании гриба *P. piscarium* на комплексной среде [21, 40]. При глубинном культивировании штамма на минеральной среде продукция пискарининов была в 2 раза ниже. Увеличение посевной дозы конидий, обработанных твином-80, повышало продуктивность культуры. Замена маннита на глюкозу, а также внесение ионов цинка, железа или меди в среду полностью подавляло продукцию этих алкалоидов.

При изучении динамики содержания квестиомицина А и ксантоциллина Х в среде культивирования в процессе роста одного из продуцентов – *P. expansum* 2–7 было установлено, что синтез этих метаболитов идет также параллельно росту культуры-продуцента [24]. Имеются периоды накопления и снижения содержания этих метаболитов в процессе роста и развития продуцента. Максимальный уровень антибиотиков наблюдался в стационарную фазу роста гриба. Внесение цинка в среду стимулировало синтез этих метаболитов. Однако, если для синтеза ксантоциллина Х оптимальной концентрацией цинка являлось 0.3 мг/л, то для квестиомицина А – 3.0 мг/л.

Биосинтез эргоалкалоидов и хиноцитрининов штаммом *P. citrinum* ВКМ FW-800 также шел параллельно росту [41]. Большая часть этих вторичных метаболитов экскретировалась в среду. В фазах замедления роста наблюдалось их частичное поглощение клетками продуцента. Ионы цинка стимулировали как процессы основного, так и вторичного метаболизма. При внесении этого микроэлемента в среду культивирования возрастало накопление биомассы и синтез как эргоалкалоидов, так и хиноцитрининов. При изучении влияния аминокислот на рост и биосинтез алкалоидов грибом *P. citrinum* установлено, что экзогенные аминокислоты использовались культурой

в основном в первичном метаболизме [42]. Добавленные при посеве триптофан и лейцин не влияли существенно ни на рост культуры, ни на синтез алкалоидов, а изолейцин стимулировал накопление биомассы. Триптофан, внесенный в стационарную фазу роста гриба, стимулировал синтез эргоалкалоидов и хиноцитрининов. Изолейцин независимо от времени внесения в питательную среду ингибировал биосинтез обоих классов алкалоидов. Лейцин, внесенный в стационарную фазу роста, не влиял на синтез эргоалкалоидов и подавлял биосинтез хиноцитрининов.

Принципиальное отличие в отношении роста и развития среди продуцентов вторичных метаболитов наблюдалось у грибов вида *P. variable*, синтезирующих клавиновые алкалоиды – ругуловазины А и Б, впервые обнаруженные у данного вида [28, 43]. Так, при глубинном культивировании штамма-продуцента наблюдалось несколько микроциклов конидиирования. Синтез алкалоидов носил также циклический характер. Обнаружена синхронность цикличности биосинтеза ругуловазинов и конидиообразования. Ионы цинка стимулировали рост гриба, но отрицательно влияли на биосинтез ругуловазинов. Способность грибов вида *P. variable* синтезировать ругуловазины не зависела от места выделения продуцентов и была обнаружена как у штаммов-реликтов, так и у культур, выделенных из современных местобитаний. При глубинном культивировании на синтетической среде на ранних стадиях роста у исследованных грибов наблюдался микроциклический конидиогенез, наличие или отсутствие которого, а также активность культур в отношении биосинтеза ругуловазинов определялись составом среды культивирования. На сложной среде, содержащей добавки пептона, конидиогенез имел место, но был значительно подавлен. На среде с дрожжевым экстрактом дифференцировка мицелия полностью отсутствовала. При этом в обоих случаях заметных количеств ругуловазинов не было обнаружено.

Таким образом, для подавляющего большинства штаммов-продуцентов грибов рода *Penicillium* характерны следующие закономерности. На синтетической среде, содержащей маннит, янтарную кислоту, минеральные соли и аммонийный азот, выбранной нами в качестве оптимальной для синтеза вторичных метаболитов, биосинтез азотсодержащих соединений проходил параллельно росту продуцента. Классическая кинетика для биосинтеза вторичных метаболитов, таких, как антибиотики, трофо-фаза (фаза роста) и идеофаза (фаза продукции) в этом случае отсутствовали. У изученных нами продуцентов триптофан выполнял только функцию предшественника, в отличие от грибов рода *Claviceps*, проду-

центов эргоалкалоидов, у которых он является также индуктором ключевого фермента – диметилаллилпирофосфат: – L-триптофан – диметилаллилтрансферазы, а также его дерепрессором при использовании в составе среды глюкозы или повышенных концентраций фосфата [2]. В случае продуцентов, относящихся к роду *Penicillium*, варьирование в достаточно широких пределах состава сред, как правило, приводит к изменению интенсивности синтеза, но не к полному его подавлению. Для изученных продуцентов характерна цикличность биосинтеза и потребления вторичных метаболитов, связанное с фазами роста культур. После достижения к определенному моменту, как правило, к окончанию фазы линейного роста, максимального содержания в культуральной жидкости, следует быстрое (в течение 1 сут или даже за меньший период) потребление 30–40% метаболита.

ТРАНСПОРТ И ЭКСКРЕЦИЯ АЛКАЛОИДОВ

Циклическое накопление алкалоидов в среде и в клетках отмечено у многих пенициллов, синтезирующих алкалоиды различной структуры. Причем количество периодов максимального и минимального содержания алкалоидов в процессе роста может быть различным у разных продуцентов. В процессе биосинтеза ЭА и ХЦ у 4 продуцентов *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. fellutanum* и *P. waksmanii* наблюдалось два падения концентрации алкалоидов в культуральной жидкости: во вторую лаг-фазу и в начале стационарной фазы роста культур [44].

Содержание алкалоидов в культуральной жидкости определяется соотношением процессов биосинтеза, экскреции их из клеток, деградации в культуральной жидкости и поглощением алкалоидов клетками. Отдельные стадии были детально исследованы на примере конкретных продуцентов. Так, процессы транспорта и экскреции рокефортина были исследованы в различных условиях у *P. crustosum* [45]. Было установлено, что при потреблении грибом-продуцентом экзогенного C¹³-рокефортина образуются метаболиты PF-1–PF-4, а также происходит включение продуктов деградации в первичный обмен. На модельных опытах было показано, что клетки гриба *P. crustosum*, способны поглощать рокефортин из культуральной среды с помощью двух транспортных систем – энергозависимой и энергонезависимой. Транспорт рокефортина стимулировался сукцинатом, но не глюкозой или маннитом.

Аналогичная картина наблюдалась у гриба *P. nalgiovense* – продуцента циклического эргоалкалоида аурантиоклавина [46]. Было установлено, что динамика накопления аурантиоклавина в

культуральной жидкости также носит двухфазный характер. Культура способна в зависимости от стадии роста как к экскреции в культуральную среду, так и поглощению из среды продуцируемого им алкалоида аурантиоклавина. Эти процессы соответствуют различным физиологическим состояниям культуры. Экскреция наблюдается в период активного роста гриба и сопровождается интенсивным биосинтезом аурантиоклавина, энергонезависимой экскрецией его и увеличением концентрации алкалоида в среде культивирования. Поглощение отмечается в период второй лаг-фазы, когда происходит адаптационная перестройка с одного источника углерода — сукцината на другой — маннит. При этом наблюдается уменьшение концентрации аурантиоклавина в культуральной среде, вызванное поглощением его клетками гриба посредством энергонезависимого транспортного процесса. Экскреция и обратное поглощение алкалоида его продуцентом, по-видимому, являются регулируемы процессами, связанными с ростом и физиологическим состоянием культуры.

У продуцента ЭА и ХЦ *P. citrinum* на различных моделях также исследовались различные аспекты этого феномена [41, 47]. Было предположено, что в фазы активного роста гриба *P. citrinum* (на сукцинате и манните) преобладают процессы синтеза и экскреции алкалоидов, а при остановке роста, во вторую лаг-фазу и в начале стационарной фазы роста, доминирует поглощение и (или) деградация алкалоидов в культуральной жидкости. Как правило, двухфазный характер накопления вторичных метаболитов объясняют либо превращением исходного метаболита в другие, либо потреблением этого метаболита культурой. Для проверки предположения о возможном превращении ЭА и ХЦ в другие метаболиты методом ТСХ был проведен анализ кислых и щелочных хлороформных экстрактов культуральной жидкости *P. citrinum* в периоды до и после резких изменений концентраций алкалоидов в культуральной жидкости. Было обнаружено, что состав алкалоидов не изменялся [41]. Таким образом, на фоне уменьшения концентрации ЭА и ХЦ в культуральной жидкости заметного превращения их в другие алкалоиды не происходило. Снижение концентрации алкалоидов в культуральной жидкости в начале стационарной фазы роста *P. citrinum* было вызвано поглощением алкалоидов клетками гриба. Способность поглощать ХЦ не зависела от возраста мицелия, в то же время способность поглощать ЭА у молодого мицелия было выше, чем у мицелия в стационарной фазе [47]. Поглощение мицелием внесенных ЭА сопровождалось экскрецией внутриклеточных ХЦ. Обнаружен различный эффект от внесения ХЦ на экскрецию из мицелия разного возраста: поглощение

внесенных ХЦ приводило к полной остановке экскреции ЭА активно растущим мицелием, в то время как экскреция ЭА из мицелия стационарной фазы роста проходила в течение всего времени проведения опыта. Процесс экскреции ЭА и ХЦ из мицелия разного возраста осуществлялся энергонезависимо. Таким образом, перенося результаты модельных опытов на растущую культуру можно считать, что в фазе активного роста гриба *P. citrinum* преобладает процесс биосинтеза алкалоидов и их энергонезависимая экскреция из мицелия. При остановке роста гриба в начале стационарной фазы роста доминирование поглощения алкалоидов из культуральной жидкости над их экскрецией определяется остановкой биосинтеза алкалоидов из-за падения уровня свободного триптофана в клетках.

При изучении биосинтеза эргоалкалоидов грибов рода *Claviceps* [2] было высказано предположение, что эти соединения связывают избыточное количество первичных метаболитов, а именно триптофана — предшественника эргоалкалоидов, предотвращая тем самым репрессию конечным продуктом и остановку роста. Возможно, что в случае *P. citrinum* имеет место обратный процесс, алкалоиды потребляются в начале стационарной фазы роста из-за низкого уровня первичных метаболитов, например триптофана, необходимого для роста гриба.

Изучение процессов транспорта алкалоидов имеет непосредственное значение для выяснения их роли в общем метаболизме грибной клетки и механизма регуляции биосинтеза этих вторичных метаболитов. Сложная динамика накопления различных алкалоидов в среде культивирования, связанная с процессами их экскреции и потребления клетками, свидетельствуют о том, что данные соединения не являются физиологически инертными продуктами клеточного метаболизма, а играют определенную роль в физиологии организма-продуцента, участвуя в процессах его роста и развития.

* * *

Динамическое взаимодействие между конкурирующими организмами в определенной экологической нише отражается через функциональное разнообразие вторичного метаболизма. Природная пластичность вторичного метаболизма лежит в основе той легкости, с которой микроорганизмы развивают устойчивость к антибиотикам.

Каждый биосинтетический путь вторичного метаболизма происходит из первичного метаболизма и включает сложные и часто высоко специфичные реакции, которые приводят к определенным конечным продуктам. Во многих случаях

первая реакция, которая отклоняется от первичного метаболизма, является стержневой при образовании нового вторичного биосинтетического пути. Эта реакция дает начало первому интермедиату, который далее превращается в биоактивный конечный продукт. Ферменты, участвующие в процессах анаболизма в том числе в биосинтезе азотсодержащих вторичных метаболитов, являются конститутивными и их регуляция может осуществляться по механизму репрессии или ингибирования конечным продуктом.

Для синтеза большинства катаболических ферментов, в данном случае субстратом являются вторичные метаболиты, требуется индукция. Известно, что образование ферментов, участвующих в процессах анаболизма, например в биосинтезе пиримидинов, аминокислот, регулируется путем репрессии. Индукция и репрессия действуют медленно, и их можно рассматривать, как механизмы грубой регуляции. Изменение активности ключевого фермента проявляется мгновенно. Это можно отнести к тонкой регуляции. Таким образом, у пенициллов в отношении вторичных метаболитов периодически протекают процессы как анаболизма (биосинтез вторичных метаболитов), так и катаболизма (периодическое потребление вторичных метаболитов). Поэтому в данном случае регуляция, очевидно, осуществляется с использованием обоих механизмов.

Известно, что геном мицелиальных грибов содержит кластеры генов, ответственных за образование вторичных метаболитов. В биосинтез вторичных метаболитов вовлечены мультифункциональные ферментные комплексы: поликетидсинтаза (ПКС) и нерибосомальная пептидсинтаза (НРПС) и гибридная ПКС-НРПС. Конструирование ди- и трипептидных алкалоидов выполняется НРПС. Иногда в НРПС присутствуют модифицированные домены эпимеризации, гетероциклизации, N-метилирования и др. [48]. В свою очередь, грибные поликетиды синтезируются с помощью модульных ПКС I типа [49].

В настоящее время описаны гены, ответственные за биосинтез важных антибиотиков и микотоксинов. Кластер генов, ответственный за биосинтез индол-дигтерпенового алкалоида паксиллина были исследованы у *P. paxilli* [50]. Ген изоэпоксиддегидрогеназы, участвующий в биосинтезе патулина, описан у *P. griseofulvum* и *P. expansum* [51]. Экспрессия генов вторичного метаболизма тонко регулируется и зависит от факторов питательной среды и стадии развития продуцента. Существует мнение, что гены, кодирующие биосинтез вторичных метаболитов, не всегда экспрессируются у продуцентов [52]. Поэтому, чтобы узнать весь потенциал “молчащих”

генов вторичного метаболизма у продуцентов применяются различные подходы, а именно, изменение компонентов питательной среды культивирования, использование низкомолекулярных эпигенетических модификаторов и др. Такой подход, называемый OSMAC (один штамм, много соединений), может в будущем привести к расширению спектра синтезируемых вторичных метаболитов и к открытию новых лекарственных препаратов [53].

Таким образом, грибы рода *Penicillium* являются креативным источником как известных ранее, так и новых физиологически активных веществ. Профили вторичных метаболитов успешно используются для целей таксономии. Биосинтез алкалоидов идет параллельно росту и имеет циклический характер. Синхронные изменения концентрации внутриклеточного свободного триптофана и алкалоидов у продуцента необходимы для регуляции оптимального для культуры количества триптофана.

Работа выполнена при поддержке ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы” (государственный контракт № 16.518.11.7035).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fluckiger E.* Ergot Compounds and Brain Function: Neuroendocrine and Neuropsychiatric Aspects / Ed. M. Goldstein. N. Y.: Raven Press, 1980. 298 p.
2. *Rehacek Z., Sajdl P.* Ergot Alkaloids. Chemistry, Biological Effect, Biotechnology. Praha: Academia, 1990. 383 p.
3. Патент РФ. 2010. № 2386692.
4. *Schwartz G., Eich E.* // *Planta Med.* 1983. V. 47. P. 212–214.
5. *Glatt H., Pertz H., Kasper R., Eich E.* // *Anticancer Drugs.* 1992. № 3. P. 609–614.
6. *Eich E., Eichberg D., Schwarz G., Clas F., Loos M.* // *Arzneimittelforschung.* 1985. B. 35. № 12. S. 1760–1762.
7. *Hibasami H., Nakashima K., Pertz H., Kasper R., Eich E.* // *Cancer Lett.* 1990. V. 50. № 2. P. 161–164.
8. *Козловский А.Г., Винокурова Н.Г., Соловьева Т.Ф., Бузилова И.Г.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1996. Т. 32. № 1. С. 43–52.
9. *Козловский А.Г., Винокурова Н.Г., Аданин В.М., Седмера П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1997. Т. 33. № 4. С. 408–414.
10. *Kozlovsky A.G., Vinokurova N.G., Adanin V.M., Grafe U.* // *Nat. Prod. Lett.* 2000. V. 14. № 5. P. 333–340.
11. *Козловский А.Г., Аданин В.М., Дазе Х.М., Грефе У.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 3. С. 292–296.

12. *Krupyanko V.I., Reshetilova T.A.* // IX Int. IUPAC Symp. Mycotoxins and Phycotoxins. Italy: Rome, 1996. 27–31 May. P. 215.
13. *Aninat C., Hayashi Y., Andre F., Delaforge M.* // Chem. Res. Toxicol. 2001. V. 14. № 9. P. 1259–1265.
14. *Thomas G.R., Giles S., Flemming J., Miller J.D., Puniani E.* // Toxicol. Sci. 2005. V. 87. № 1. P. 213–222.
15. *Heguy F., Cai P., Meyn P., Houck D., Russo S., Michitsch R., Pearce C., Katz B., Bringmann G., Feineis D., Taylor D., Tums A.* // Antivir. Chem. Chemother. 1998. V. 9. P. 149–155.
16. *Тутельян В.А., Кравченко Л.В., Сергеев А.Ю.* // Микология сегодня. Т. 1 / Ред. Ю.Т. Дьяков, Ю.В. Сергеев. М.: Нац. акад. микол., 2007. С. 283–304.
17. *Козловский А.Г., Веприцкая И.Г., Гаязова Н.Б.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1986. Т. 22. № 2. С. 205–210.
18. *Козловский А.Г., Зеленкова Н.Ф., Аданин В.М., Сахаровский В.Г., Аринбасаров М.У.* // Прикл. биохим. и микробиология. 1995. Т. 31. № 5. С. 540–544.
19. *Kozlovsky A.G., Vinokurova N.G., Adanin V.M., Burkhard G.H., Dahse M., Graefe U.* // J. Nat. Prod. 2000. V. 63. P. 698–700.
20. *Cole R.J., Schweikert M.A.* Handbook of Secondary Fungal Metabolites. Amsterdam: Acad. Press, 2003. V. 1–2. 1925 p.
21. *Козловский А.Г., Винокурова Н.Г., Аданин В.М.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 3. С. 317–321.
22. *Шнырева А.В., Сизова Т.П., Брагина М.П., Викторов А.Н., Дьяков Ю.Т.* // Микология и фитопатология. 2001. Т. 35. № 3. С. 37–42.
23. *Козловский А.Г., Желифонова В.П., Аданин В.М., Антипова Т.В., Шнырева А.В., Викторов А.Н.* // Микробиология. 2002. Т. 71. № 6. С. 773–777.
24. *Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В., Аданин В.М., Новикова Н.Д., Дешевая Е.А., Шлегель Б., Дазе Х.М., Голлмик Ф., Гефе У.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 3. С. 344–349.
25. *Козловский А.Г., Желифонова В.П., Аданин В.М., Антипова Т.В., Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., Грефе У.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 4. С. 446–451.
26. *Kozlovsky A.G., Zhelifonova V.P., Antipova T.V., Adanin V.M., Ozerskaya S.M., Kochkina G.A.* // J. Antibiot. 2003. V. 56. № 5. P. 488–491.
27. *Козловский А.Г., Желифонова В.П., Аданин В.М., Антипова Т.В., Озерская С.М., Кочкина Г.А., Грефе У.* // Микробиология. 2003. Т. 72. № 6. С. 816–821.
28. *Желифонова В.П., Антипова Т.В., Козловский А.Г.* // Микробиология. 2006. Т. 75. № 5. С. 742–746.
29. *Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 2. С. 202–206.
30. *Антипова Т.В., Желифонова В.П., Баскунов Б.П., Озерская С.М., Иванушкина Н.Е., Козловский А.Г.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 3. С. 318–323.
31. *Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В., Баскунов Б.П., Кочкина Г.А., Озерская С.М.* // Микробиология. 2012. Т. 81. № 3. С. 332–338.
32. *Takahashi C., Matsushita T., Doi M., Minoura K., Shingu T., Kumeda Y., Numata A.* // J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 1. 1995. № 18. P. 2345–2353.
33. *Samson R.A., Frisvad J.C.* // Stud. Mycol. 2004. № 49. P. 1–241.
34. *Ozerskaya S., Ivanushkina N., Kochkina G., Fattakhova R., Gilichinsky D.* // Int. J. Astrobiol. 2004. V. 3. № 4. P. 327–331.
35. *Ozerskaya S., Kochkina G., Ivanushkina N., Gilichinsky D.* // Permafrost Soils / Ed. R. Margesin. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 2009. P. 85–95.
36. *Желифонова В.П., Антипова Т.В., Озерская С.М., Кочкина Г.А., Козловский А.Г.* // Микробиология. 2009. Т. 78. № 3. С. 393–398.
37. *Козловский А.Г., Соловьева Т.Ф., Сахаровский И.Г., Аданин М.М.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1982. Т. 18. № 4. С. 535–541.
38. *Желифонова В.П., Антипова Т.В., Козловский А.Г.* // Микробиология. 2010. Т. 79. № 3. P. 291–300.
39. *Козловский А.Г., Желифонова В.П., Винокурова Н.Г., Аданин В.М.* // Микробиология. 1997. Т. 66. № 5. С. 605–610.
40. *Желифонова В.П., Майер А., Козловский А.Г.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 6. С. 671–675.
41. *Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 5. С. 568–572.
42. *Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В., Лысанская В.Я.* // Микробиология. 2006. Т. 75. № 3. С. 334–341.
43. *Антипова Т.В., Желифонова В.П., Кочкина Г.А., Козловский А.Г.* // Микробиология. 2008. Т. 77. № 4. С. 502–507.
44. *Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В., Зеленкова Н.Ф.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 4. С. 469–473.
45. *Reshetilova T.A., Kozlovsky A.G.* // J. Basic Microbiol. 1990. V. 30. № 2. P. 109–114.
46. *Желифонова В.П., Кулаковская Т.В., Козловский А.Г.* // Микробиология. 2003. Т. 72. № 2. С. 183–188.
47. *Желифонова В.П., Козловский А.Г.* // Микробиология. 2007. Т. 76. № 4. С. 456–461.
48. *Strieker M., Tanovic A., Marahiel M.A.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 2010. V. 20. P. 234–240.
49. *Li Y., Xu W., Tang Y.* // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 22762–22771.
50. *Young C., McMillan L., Telfer E., Scott B.* // Mol. Microbiol. 2001. V. 39. № 3. P. 754–764.
51. *Dombrink-Kurtzman M.A.* // Antonie van Leeuwenhoek. 2006. V. 89. P. 1–8.
52. *Williams R.B., Henrikson J.C., Hoover A.R., Lee A.E., Cichewicz R.H.* // Org. Biomol. Chem. 2008. V. 6. P. 1895–1897.
53. *Bode H.B., Bethe B., Höfs R., Zeek A.* // Chem. Biol. Chem. 2002. V. 3. P. 619–627.

Fungi of the Genus *Penicillium* as Producers of Physiologically Active Compounds (Review)

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

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

e-mail: Kozlovski@ibpm.pushchino.ru

Received February 6, 2012

Abstract—Fungi of the genus *Penicillium* isolated from little studied habitats are able to synthesize both previously known and new physiologically active compounds with diverse structures. They include secondary metabolites of alkaloid nature, i.e., ergot alkaloids, diketopiperazines, quinolines, quinazolines, benzodiazepines, and polyketides. We discuss the use of profiles of secondary metabolites for taxonomy purposes. Studying the physicochemical characteristics of producers of biologically active compounds showed that the biosynthesis of alkaloids is initiated on the first days of cultivation and proceeds simultaneously with growth. The cyclic character of alkaloid accumulation was recorded related to the processes of alkaloid biosynthesis, excretion from cells, degradation in culture fluid, and consumption by cells. Synchronic variations in the concentrations of intracellular tryptophan and alkaloids are necessary for the regulation of the optimal quantity of tryptophan necessary for the culture.

UDC 577

REFOLDING OF RECOMBINANT HUMAN INTERFERON α -2a FROM *Escherichia coli* BY UREA GRADIENT SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY

© 2013 F. Gao*, L. Shi**, and L.-X. Xu*

*College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China

**Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

e-mail: gaofeiqf@yahoo.cn

Received December 20, 2011

Protein refolding is still a puzzle in the production of recombinant proteins expressed as inclusion bodies (IBs) in *Escherichia coli*. Gradient size exclusion chromatography (SEC) is a recently developed method for refolding of recombinant proteins in IBs. In this study, we used a decreasing urea gradient SEC for the refolding of recombinant human interferon α -2a (rhIFN α -2a) which was overexpressed as IBs in *E. coli*. In chromatographic process, the denatured rhIFN α -2a would pass along the 8.0–3.0 M urea gradient and refold gradually. Several operating conditions, such as final concentration of urea along the column, gradient length, the ratio of reduced to oxidized glutathione and flow rate were investigated, respectively. Under the optimum conditions, 1.2×10^8 IU/mg of specific activity and 82% mass recovery were obtained from the loaded 10 ml of 1.75 mg/ml denatured protein, and rhIFN α -2a was also purified during this process with the purity of higher than 92%. Compared with dilution method, urea gradient SEC was more efficient for the rhIFN α -2a refolding in terms of specific activity and mass recovery.

DOI: 10.7868/S0555109913010054

Nowadays, a large number of recombinant proteins have been produced in recombinant strain of *Escherichia coli*. However, highly expressed recombinant proteins in *E. coli* often result in the formation of the aggregation, known as “inclusion bodies (IBs)” [1, 2]. IBs are insoluble and inactive, therefore it is necessary to solubilize them and refold the protein into its native structure. The usually employed method for the refolding of recombinant protein is dilution method. Although it is simple and easy to perform, refolding by dilution need to perform at extremely low protein concentrations (5–100 μ g/ml) to minimize aggregation and misfolding which are often responsible for low refolding yield [3]. Additionally, this traditional refolding method used for commercial applications requires larger volumes and long refolding times. So, it is necessary to explore novel methods for the refolding of recombinant proteins.

Size exclusion chromatography (SEC), as one of the effective ways for protein refolding has been attracted much attention in recent years [4–9]. The principle of protein refolding by SEC is to separate the denaturants from the unfolded protein by the gel media of SEC while they pass through the column. As the denaturant concentration surrounding the unfolded protein is reduced, the protein begins to fold into the native state [10]. Additionally the protein can be partially purified during the chromatographic process which significantly reduced the processing steps and

times [11]. To fully explore the advantage of SEC, Gu with co-workers developed urea gradient SEC [12], in which urea concentration around the denatured proteins was decreased linearly and gently which could significantly increase the refolding yield at a high protein concentration. The gradient chromatography has been used in refolding studies during recent years [13–17]. However, there are only a few investigations on refolding of recombinant proteins, especially disulfide bonded proteins up to the present.

Interferon α -2a (IFN α -2a) is a therapeutic protein with a wide spectrum of biological activities including virus-unspecific antiviral effect, cell growth inhibition and immunomodulatory properties [18, 19]. It consists of 165 amino acids with 4 cysteine residues involved in the formation of 2 disulfide bridges [20]. IFN α -2a has being used extensively to treat chronic hepatitis B and C and several types of cancer, i.e. hairy cell leukemia, melanoma, multiple myeloma, condylomata acuminata, AIDS-related Kaposi's sarcoma, and in combination with retinoids, IFN α -2a induces regression in advanced squamous carcinomas of the cervix [21, 22].

In this study, we used a urea gradient SEC method for the refolding of rhIFN α -2a. The gel filtration column was pre-equilibrated with urea at decreasing concentration (Fig. 1). From the top of column to the end of the gradient, urea concentration was gradually de-

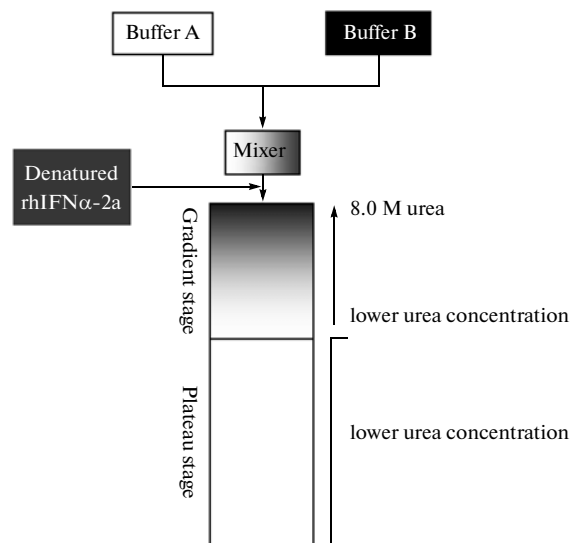


Fig. 1. Experimental system for the urea gradient SEC refolding process.

creased from 8.0 M to a lower concentration. Due to its larger molecular weight of 19.2 kDa, the rhIFN α -2a migrated faster than the gradient formed by small molecules of urea. When unfolded rhIFN α -2a passed through the column filled with a linear decreasing urea gradient, the urea concentration around the denatured rhIFN α -2a molecules would decrease gradually, and rhIFN α -2a would refold step by step. Several operating conditions which significantly influence the refolding efficiency of rhIFN α -2a were investigated, respectively. And we also compared its refolding yield with that obtained by dilution method.

Therefore, the aim of the present study was to introduce an efficient method for refolding of rhIFN α -2a which was overexpressed as IBs in *E. coli* and to examine the effect of operating conditions on this novel refolding performance and thus for exploit of gradient SEC advantages for refolding applications.

MATERIALS AND METHODS

Materials. The *E. coli* strain BL21 (DE3) and the vector pBV220-rhIFN α -2a were provided by the Protein Expression Section, Qufu Normal University (China). Human amnion WISH cells and standard interferon- α were purchased from the National Institute for Control of Pharmaceutical and Biological Products (China). Vesicular stomatitis virus (VSV) was obtained from Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences (China). Oxidized glutathione (GSSG), reduced glutathione (GSH), urea and tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) were purchased from Sigma (USA). ÄKTA systems, chromatography media and electrophoresis apparatus were obtained from Amersham Pharmacia Biotech (Upp-

sala, Sweden). All other chemicals were of analytical grade.

Expression and isolation of rhIFN α -2a inclusion bodies. The *E. coli* strain BL21 (DE3) was transformed by the vector pBV220-rhIFN α -2a for the production of rhIFN α -2a. Single colonies were picked and grown overnight at 30°C in Luria Bertani (LB) medium (g/l): tryptone – 10, yeast extract – 5 and NaCl – 10, containing 100 μ g/ml of ampicillin. The culture mixture was then inoculated to fresh LB medium (1 : 100 dilution) containing ampicillin and grown at 30°C until the cells OD₆₀₀ reached to 0.6. Then, the cells were induced by shifting the culture temperature quickly to 42°C. After a further 5 h, the cells were harvested and rhIFN α -2a expression was analyzed by SDS-PAGE. The cell pellets were resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 1.0 mM EDTA at the ratio of 1 : 20 (w : v) and disrupted by ultrasonication on ice bath for 3 s \times 200 W. After centrifugation at 8,000 g for 20 min, the IBs were washed 3 times with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 0.5% Triton X-100 and 1.0 mM EDTA.

Solubilization of the rhIFN α -2a IBs. The IBs were solubilized at the ratio of 1 : 10 (w : v) in the denaturing buffer (50 mM Tris-HCl, 8.0 M urea, 50 mM β -mercaptoethanol, 1.0 mM EDTA, pH 8.0) by incubation at 4°C for 8 h with agitation and then centrifuged at 12000 g for 20 min to remove any insoluble matter.

Refolding of rhIFN α -2a by urea gradient SEC. Urea gradient SEC for the refolding of rhIFN α -2a was carried out using a pre-packed Sephacryl S-200 column (100 cm \times 3.5 cm). Two buffers were used in the chromatographic process. Buffer A: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.0 mM EDTA, 15% glycerol (v/v), 0–3.3 mM GSH, 0–1.8 mM GSSG; buffer B: buffer A containing 8.0 M urea. The column was first equilibrated with the mixed buffer of various ratios of buffer A and buffer B. Then, gradually increasing buffer B up to 100%, urea gradient was formed. As shown in Fig. 1, urea concentrations in the column were varied from 8.0 M to a lower concentration. Dark colors represent higher urea concentrations, light colors represent lower urea concentrations. Then, various volumes of denatured rhIFN α -2a prepared above were loaded onto the column and eluted with buffer B. The experiments were performed at 4°C and the peak fractions containing rhIFN α -2a were collected and tested for protein activity.

To investigate the effect of operating conditions, one of them was varied while keeping other conditions unchanged. Four parameters in the refolding process, including gradient length, final urea concentration along the column, the ratio of GSH/GSSG and flow rate were investigated, respectively.

Refolding of rhIFN α -2a by dilution. In order to compare with refolding by gradient SEC, denatured rhIFN α -2a prepared above in various volume was diluted with a refolding buffer (50 mM Tris-HCl, 3.0 M

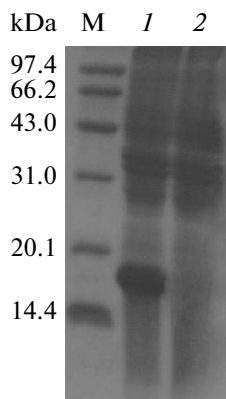


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of the rhIFN α -2a expression in *E. coli*. M – molecular weight markers; 1 – after induction at 42°C; 2 – before induction.

urea, 1 mM EDTA, 15% glycerol (v/v), 3.0 mM GSH and 0.6 mM GSSG, pH 8.0) to a volume of 100 ml, which corresponds to the peak width of rhIFN α -2a in the urea gradient SEC. After incubation at 4°C for 24 h, the protein activity was determined.

Analytical methods. Protein concentrations were determined by Bradford's method [23]. Protein expression was analyzed by a reducing SDS-PAGE using 15% running gel and 4.5% stacking gel. The protein purity was analyzed by the GD 1000 gel documentation system (Bio-Rad, USA).

The mass recovery (MR, %) of rhIFN α -2a was defined as:

$$MR = \frac{M_{I,F}}{M_{I,IB}} = \frac{(C_F V_F P_F)}{(C_{IB} V_{IB} P_{IB})} \times 100\%$$

where $M_{I,F}$ is the mass of rhIFN α -2a in the finally obtained rhIFN α -2a solution (mg); C_F is total protein concentration in the finally obtained rhIFN α -2a solution (mg/ml); V_F is the volume of the finally obtained rhIFN α -2a solution (ml); P_F is the purity of rhIFN α -2a in the finally obtained rhIFN α -2a solution; $M_{I,IB}$ is the mass of rhIFN α -2a in the injected solution of IBs (mg); C_{IB} is total protein concentration in the injected solution of IBs (mg/ml); V_{IB} is the volume of the injected solution of IBs (ml); P_{IB} is the purity of rhIFN α -2a in the injected solution of IBs.

Assay of rhIFN α -2a activity. The antiviral activity of rhIFN α -2a was measured by protection of human amnion WISH cells against the cytopathic action of VSV infection as described by traditional method [24]. Antiviral activity was expressed as the amount of rhIFN α -2a required for 50% protection of the death of WISH cells from VSV infection.

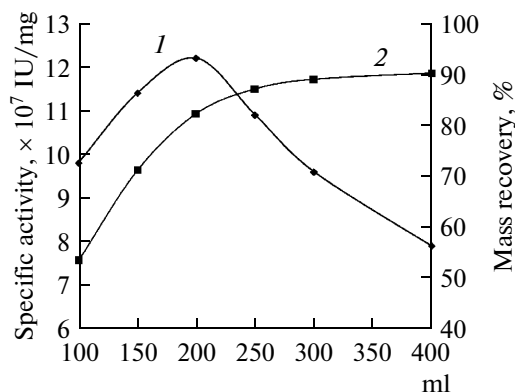


Fig. 3. Effect of urea gradient length (ml) on the rhIFN α -2a refolding. Buffer A contained 2.7 mM GSH and 0.9 mM GSSG. Urea gradient: 8.0 M urea (100% B) to 3.0 M (37.5% B) in various gradient length. The rhIFN α -2a loading: 10 ml with 1.75 mg/ml, flow rate 1.0 ml/min. 1 – specific activity; 2 – mass recovery.

RESULTS AND DISCUSSION

Expression of rhIFN α -2a as IBs. The expression of rhIFN α -2a analyzed by SDS-PAGE is shown in Fig. 2. After 42°C induction an obvious band with molecular weight of 19.2 kDa was revealed in the pellet after cell disruption and centrifugation (see lane 1). The rhIFN α -2a was expressed as IBs and it was found that after 5 h of induction, the yield of the rhIFN α -2a IBs was around 2.6 g of wet weight per 1 l of culture. After washing with the detergent buffer, the purified IBs were dissolved in 8.0 M urea and the concentration of rhIFN α -2a was measured to be 1.75 mg/ml with a purity of 60%.

Effect of the length of urea gradient on rhIFN α -2a refolding. In this experiment, the column was pre-equilibrated with a linear decreased urea gradient. The denatured rhIFN α -2a was loaded onto the top of the gradient where the urea concentration was 8.0 M, which was the same as that in the loading sample. The denatured rhIFN α -2a went through the column gradually from 8.0 M urea to the final renaturation buffer containing a low concentration of urea. If the length of the gradient was too short, the change of the urea concentration was too fast to make the rhIFN α -2a refolding correctly. However, if the gradient length was too long, the denatured protein was eluted out with higher urea concentration than the optimum for protein refolding. Experiments were conducted to select an optimal length of urea gradient for the rhIFN α -2a refolding. Fig. 3 shows that the specific activity and mass recovery of rhIFN α -2a changed with the length of urea gradient. It can be seen that the mass recovery of rhIFN α -2a increased with the increase of the urea gradient length. That is because the increase of urea gradient length could make a slower change of urea concentration around the denatured rhIFN α -2a, thus reducing the chance of getting aggregations. The high-

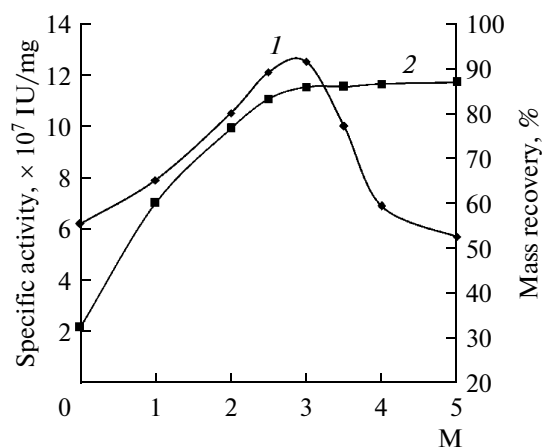


Fig. 4. Effect of final urea concentration (M) on the rhIFN α -2a refolding. The length of urea gradient was 200 ml, other conditions were the same as those indicated in Fig. 3 except for final concentration of urea. 1 – specific activity; 2 – mass recovery.

est specific activity was obtained at a urea gradient with a length of 200 ml. With this gradient, denatured rhIFN α -2a could move exactly to the final renaturation buffer containing a low concentration of urea at the end of column, meanwhile this length of the urea gradient had to be long enough for gradual removal of urea from denatured protein, thus giving the highest protein specific activity. Therefore, we chose the gradient length of 200 ml for the subsequent refolding experiments.

Effect of final urea concentration on the refolding of rhIFN α -2a. As we know, urea can not only denature the protein but also prevent the protein forming aggregation. It was found that a suitable concentration of urea in refolding buffer can increase the yield of correctly refolded protein [12, 25, 26]. With the aim of finding the optimum urea concentration for rhIFN α -2a refolding, the effects of final urea concentration in urea gradient SEC was investigated (Fig. 4). It can be seen that both specific activity and mass recovery of rhIFN α -2a increased with the increase of final urea concentration before 3.0 M (37.5% B). This indicates that too low urea concentration is not enough to prevent protein molecules forming aggregation with each other. However, when the final urea concentration was higher than 3.0 M, the specific activity decreased rapidly with the increase of urea concentration, but the protein mass recovery didn't have any loss. This implies that higher than 3.0 M urea concentration is enough for preventing aggregation, but this concentration is unfavorable for denatured rhIFN α -2a refolding to their active state. The above results indicate that both protein specific activity and mass recovery reach maxima at 3.0 M urea (37.5% B) which is potent enough to suppress the aggregation of the protein and simultaneously make the denatured rhIFN α -2a refold

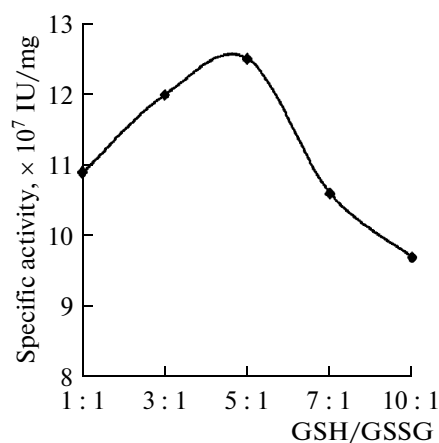


Fig. 5. Effect of the ratio of GSH/GSSG on the rhIFN α -2a refolding. The final urea concentration was 3.0 M, other conditions were the same as those indicated in Fig. 4 except for the ratio of GSH/GSSG.

to their activity structure. Therefore, we chose this concentration for subsequent gradient SEC refolding studies.

Effect of the ratio of GSH/GSSG on rhIFN α -2a refolding. The rhIFN α -2a molecule contains two intra-molecular disulfide bonds, and both are required for its correct conformation and consequently its bio-activity [20]. Thus, the formation of right disulfide bonds plays an important role during the course of the rhIFN α -2a refolding. It was reported that an appropriate redox pairs in refolding buffer presumably helped to reoxidize the reduced disulfide bonds of protein to oxidized state [27]. The most commonly used redox agent is glutathione in the reduced and oxidized forms (known as GSH and GSSG). Previous refolding studies showed that a suitable ratio of GSH/GSSG was able to provide a favorable refolding environment which could influence the formation of disulfide bonds and hence the rate of correct refolding [28, 29]. In this work, experiments were conducted to select a suitable ratio of GSH/GSSG for the rhIFN α -2a refolding by using urea gradient SEC. The highest specific activity of rhIFN α -2a was achieved when the ratio of GSH/GSSG was 5 : 1 (Fig. 5). Therefore, we chose the ratio of GSH/GSSG of 5 : 1 in the buffer for rhIFN α -2a refolding.

Effect of flow rate on the refolding of rhIFN α -2a. The flow rate is also a significant impact in gradient SEC. It was reported that the elution flow rate influenced the retention time of the proteins in the column, which determined refolding time of the proteins [30]. To research the effect of the elution flow rate on the rhIFN α -2a refolding, denatured rhIFN α -2a was eluted out at 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 ml/min, respectively (Fig. 6). It was demonstrated that the specific activity of rhIFN α -2a decreased with the increase of

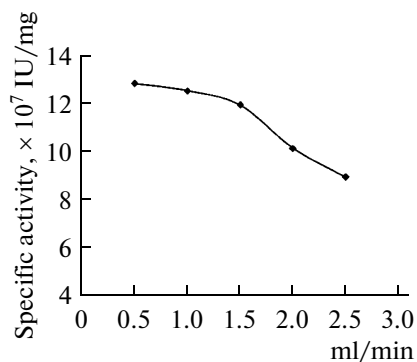


Fig. 6. Effect of flow rate (ml/min) on the rhIFN α -2a refolding. The ratio of GSH/GSSG was 5 : 1, other conditions were the same as those indicated in Fig. 5 except for the elution flow rate.

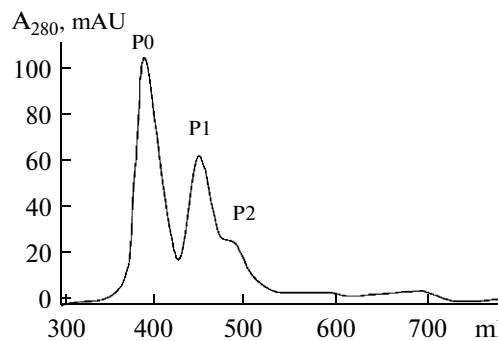


Fig. 7. Profile of rhIFN α -2a refolding by urea gradient SEC. Buffer A contained 3.0 mM GSH and 0.6 mM GSSG. Urea gradient: 200 ml from 8.0 M (100% B) to 3.0 M (37.5% B). The rhIFN α -2a loading: 10 ml with 1.75 mg/ml, flow rate 1.5 ml/min.

elution flow rate. That occurred because higher flow rate means faster removing of urea from unfolded rhIFN α -2a, which was not benefit for the refolding of rhIFN α -2a. Besides that, a slow elution flow rate could give the protein sufficient refolding time (residence time) to stay inside of the SEC column for refolding. In order to strike a balance between experimental time and protein activity, we used a flow rate of 1.5 ml/min as an optimal elution flow rate.

Comparison of rhIFN α -2a refolding by urea gradient SEC and dilution method. Dilution is the most often used method for the refolding of proteins produced by *E. coli*. In this work, a comparison between the urea gradient SEC and the dilution refolding was conducted (Table). Both of specific activity and mass recovery of rhIFN α -2a obtained by dilution method are lower in comparison with results after urea gradient SEC at the same sample loading volume. It can also be seen in Table that the protein specific activity and mass recovery

decreased with the increase of the sample loading volume for the two refolding methods. It was because a large sample loading volume could increase the loading amount (loading volume \times concentration) of denatured rhIFN α -2a, and thus increase the chance of intermolecular collision and the protein aggregations. However, with the increase of the sample loading volume, the protein specific activity and mass recovery obtained by gradient SEC decreased slower than that by dilution method, and the larger the loading volume, the bigger the difference between the two refolding methods. That was because gradient SEC could suppress aggregations more effectively by gradual removal of urea [15]. We can conclude that urea gradient SEC is more efficient than dilution method for rhIFN α -2a refolding.

Optimal conditions for the refolding of rhIFN α -2a by urea gradient SEC. Fig. 7 represents the chromatography profiles of rhIFN α -2a refolding at the opti-

Comparison of the rhIFN α -2a refolding by urea gradient SEC and dilution method*

Loading volume, ml	Specific activity, $\times 10^7$ IU/mg		Mass recovery, %	
	urea gradient SEC	dilution	urea gradient SEC	dilution
5	13.4 \pm 1.1	9.2 \pm 1.9	88.7 \pm 5.0	24.9 \pm 2.6
7.5	12.9 \pm 1.5	8.3 \pm 2.1	85.9 \pm 4.7	21.9 \pm 1.8
10	12.1 \pm 1.4	6.8 \pm 1.6	82.3 \pm 5.8	14.6 \pm 2.7
12.5	9.5 \pm 1.9	5.3 \pm 1.3	78.1 \pm 3.2	10.1 \pm 1.7
15	8.7 \pm 1.7	3.4 \pm 1.1	74.6 \pm 3.5	8.3 \pm 2.5

* For urea gradient SEC, the length of urea gradient was 200 ml, the elution flow rate was 1.5 ml/min, the ratio of GSH/GSSG was 5 : 1, other conditions were the same as those demonstrated in Fig. 3. For dilution refolding, the conditions were the same as those demonstrated in the section devoted to refolding of rhIFN α -2a by dilution.

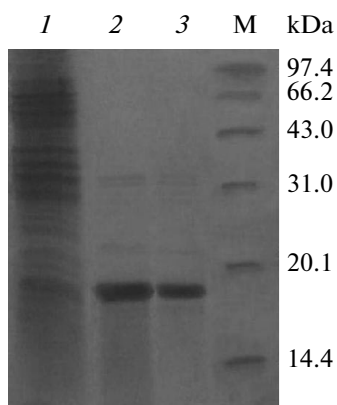


Fig. 8. SDS-PAGE analysis of the rhIFN α -2a refolding by urea gradient SEC. M – molecular weight markers; 1 – fraction from peak P0; 2 – fraction from peak P1; 3 – fraction from peak P2.

imum experimental conditions determined above by urea gradient SEC. Three peaks (P0, P1 and P2) were found during refolding process. Analysis of peak P0 by electrophoresis (Fig. 8, lane 1) revealed compounds of large molecular weights, mainly impurities, and there was no activity of rhIFN α -2a. So, we suppose this peak may contain some impurities in the IBs. On the other hand, peaks P1 and P2 contained predominantly refolded rhIFN α -2a (Fig. 8, lanes 2 and 3). The specific activities of the protein in the P1 and P2 peaks were similar, around 1.2×10^8 IU/mg. From Fig. 7, we can see that peak P2 is a little refolding rhIFN α -2a following peak P1. It was most likely due to a little aggregation and precipitation of the protein on the gel matrix after the denatured rhIFN α -2a passed through the column [10, 31]. With the urea gradient moved downwardly, the precipitated aggregation could be resolubilized by the following urea and be eluted out from the column following the refolding rhIFN α -2a peak (Fig. 7, peak P1). That is the reason why the higher protein mass recovery can be achieved by urea gradient SEC refolding. In addition, another remarkable advantage of this method is that the rhIFN α -2a can be purified during chromatographic process; its purity was about 92% scanned by Bio-Rad Gel Doc (Fig. 8).

The advantage of the gradient SEC refolding must relate to its gentle, smooth exchange of the buffer around the unfolded protein, from the denaturing buffer to the refolding buffer, which can increase both of its specific activity and mass recovery by preventing the formation of inactive protein and aggregations. In this paper, we have successfully refolded rhIFN α -2a overexpressed in *E. coli* by urea gradient SEC. Several operating conditions such as gradient length, final urea concentration along the column, the ratio of GSH/GSSG and flow rate have been investigated. Under optimal conditions, when 10 ml of denatured rhIFN α -2a at a concentration of 1.75 mg/ml was loaded onto the SEC column, rhIFN α -2a with specif-

ic activity of 1.2×10^8 IU/mg, purity of 92%, and mass recovery of 82% was obtained. In conclusion, urea gradient SEC is a high efficiency refolding method for rhIFN α -2a, and we hope our studies could be useful in refolding of other recombinant proteins expressed in *E. coli* as IBs.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (30970640), the S&T Plan Projects of Shandong Provincial Education Department (J06104), the Research Fund of Qufu Normal University (XJ200822/XJ201208), and the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (SIMM0912QN-10).

REFERENCES

- Buchner, J. and Rudolph, R., *J. Biotechnol.*, 1991, vol. 9, no. 2, pp. 157–162.
- Qoronfleh, M.W., Hesterberg, L.K., and Seefeldt, M.B., *Protein Express. Purif.*, 2007, vol. 55, no. 2, pp. 209–224.
- Hutchinson, M.H. and Chase, H.A., *J. Chromatogr. A*, 2006, vol. 1128, no. 1, pp. 125–132.
- Werner, M.H., Clorea, G.M., Gronenborn, A.M., Kondohb, A., and Fisher, R.J., *FEBS Lett.*, 1994, vol. 345, no. 2–3, pp. 125–130.
- Batas, B., Jones, H.R., and Chaudhuri, J.B., *J. Chromatogr. A*, 1997, vol. 766, no. 1–2, pp. 109–119.
- Fahey, E.M., Chaudhuri, J.B., and Binding, P., *J. Chromatogr. B*, 2000, vol. 737, no. 1–2, pp. 225–235.
- Dong, X.Y., Wang, Y., Shi, J.H., and Sun, Y., *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, vol. 30, no. 6, pp. 792–797.
- Schlegl, R., Iberer, G., Machold, C., Necina, R., and Jungbauer, A., *J. Chromatogr. A*, 2003, vol. 1009, no. 1–2, pp. 119–132.
- Park, B.J., Lee, C.H., Mun, S.Y., and Koo, Y.M., *Process Biochem.*, 2006, vol. 41, no. 5, pp. 1072–1082.
- Batas, B. and Chaudhuri, J.B., *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, vol. 50, no. 1, pp. 16–23.
- Geng, X.D. and Wang, C.Z., *J. Chromatogr. B*, 2007, vol. 249, no. 1–2, pp. 69–80.
- Gu, Z.Y., Su, Z.G., and Janson, J.C., *J. Chromatogr. A*, 2001, vol. 918, no. 2, pp. 311–318.
- Li, J.J., Liu, Y.D., Wang, F.W., Ma, G.H., and Su, Z.G., *J. Chromatogr. A*, 2004, vol. 1061, no. 2, pp. 193–199.
- Zhang, X.Y., Li, S.X., and Yuan, Q.S., *Protein Peptide Lett.*, 2005, vol. 12, no. 7, pp. 671–676.
- Wang, C.Z., Wang, L.L., and Geng, X.D., *Biotechnol. Prog.*, 2008, vol. 24, no. 1, pp. 209–213.
- Fan, X.D., Xu, D.S., Lu, B., Xia, J., and Wei, D.Z., *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2008, vol. 70, no. 6, pp. 1130–1138.

17. Ersoy, M., Matic, S., and Schmidt, S.R., *Biomed. Chromatogr.*, 2009, vol. 23, no. 10, pp. 1121–1128.
18. Eppstein, D.A. and Stewart, W.E., *J. Virol.*, 1982, vol. 41, no. 2, pp. 575–582.
19. Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C., and Samuel, C.E., *Annu. Rev. Biochem.*, 1987, vol. 56, no. 1, pp. 727–777.
20. Nyman, T.A., Tolo, H., Parkkinen, J., and Kalkkinen, N., *Biochem. J.*, 1998, vol. 329, no. 2, pp. 295–302.
21. Foser, S., Schacher, A., Weyer, K.A., Brugger, D., Dietel, E., Marti, S., and Schreitmüller, T., *Protein Express. Purif.*, 2003, vol. 30, no. 1, pp. 78–87.
22. Karan, M.A., Oztürk, S., Yenerel, M., Erten, N., Cefle, K., Palanduz, S., and Tascioglu, C., *Hepato-gastroenterology*, 2003, vol. 50, no. 54, pp. 2031–2034.
23. Bradford, M.M., *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254.
24. Rubinstein, S., Familietti, P.C., and Pestka, S., *J. Virol.*, 1981, vol. 37, no. 2, pp. 755–758.
25. Cowley, D.J. and Mackin, R.B., *FEBS Lett.*, 1997, vol. 402, no. 2–3, pp. 124–130.
26. Li, M., Zhang, G.F., and Su, Z.G., *J. Chromatogr. A*, 2002, vol. 959, no. 1–2, pp. 113–120.
27. Park, B.J., Lee, C.H., and Koo, Y.M., *Korean J. Chem. Eng.*, 2005, vol. 22, no. 3, pp. 425–432.
28. Wang, S.S.S., Chang, C.K., Peng, M.J., and Liu, H.S., *Food Bioprod. Process*, 2006, vol. 84, no. 1, pp. 18–27.
29. Chen, Y. and Leong, S.S., *J. Chromatogr. A*, 2009, vol. 1216, no. 24, pp. 4877–4886.
30. Guan, Y.X., Fei, Z.Z., Luo, M., Jin, T., and Yao, S.J., *J. Chromatogr. A*, 2006, vol. 1107, no. 1–2, pp. 192–197.
31. Clark, E.D.B., Schwarz, E., and Rudolph, R., *Methods Enzymol.*, 1999, vol. 309, pp. 217–236.

УДК 577.150

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОЙ L-АСПАРАГИНАЗЫ

Yersinia pseudotuberculosis

© 2013 г. В. С. Покровский*, М. В. Покровская*, С. С. Александрова*, Р. М. Андрианов**, Д. Д. Жданов*, Н. М. Омелянюк*, Е. М. Трещалина***, Н. Н. Соколов*

* Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, Москва, 119121
e-mail: vadimpokrovsky@yandex.ru

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

*** Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАН, Москва, 115478

Поступила в редакцию 3.10.2011 г.

Изучены физико-химические, каталитические свойства, а также антипролиферативная активность рекомбинантной L-аспарагиназы *Yersinia pseudotuberculosis* (YpA). Получены следующие результаты: K_M для L-аспарагина 17 ± 0.9 мкМ, оптимальная температура 60°C , pH 8.0, pI 5.4 ± 0.3 , L-глутаминовая активность не более 5–6% от L-аспарагиназной, антипролиферативная активность на лимфаденозе Фишера L5178y составляет T/C = 136% ($p < 0.001$) при 15% излечения. Описанная характеристика позволяет считать YpA противоопухолевым ферментом с близкими L-аспарагиназе *E. coli* (EcA) биологическими свойствами.

DOI: 10.7868/S0555109913010169

L-аспарагиназа (L-аспарагин амидогидролаза, КФ 3.5.1.1.) катализирует расщепление L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и аммиака. L-аспарагиназу *E. coli* (EcA) включают в схемы стандартной индукционной терапии острого лимфобластного лейкоза, лимфогранулематоза, множественной миеломы, НК/Т-клеточной и кожной Т-клеточной лимфомы [1–6]. Однако клиническое применение EcA лимитировано выраженными побочными эффектами: аллергические реакции, нарушения функций печени и поджелудочной железы, а также формирование резистентности при длительном лечении. Считается, что побочные эффекты отчасти связаны с L-глутаминовой активностью фермента, поэтому поиск новых менее токсичных L-аспарагиназ целесообразен среди ферментов с низкой L-глутаминовой активностью и высокой активностью при физиологических условиях [7]. Одним из таких ферментов является L-аспарагиназа *Yersinia pseudotuberculosis* (YpA), филогенетически близкая к EcA [8].

Ранее нами был получен продуцент рекомбинантной YpA (штамм *E. coli* BL21(DE3)/pBad24/YERS), которая показала значимую цитотоксичность на культурах клеток различных опухолей человека: Т-лимфобластного лейкоза MOLT-4 и Jurkat, аденокарциномы молочной железы MCF-7, невриномы Гассерова узла крысы НГУК-1 и карциномы простаты человека LnCap [9, 10].

Цель работы – изучение физико-химических и каталитических свойств, а также первичная оценка антипролиферативной активности рекомбинантной YpA in vivo.

МЕТОДИКА

Реактивы. L-аспарагин (“Reanal”, Венгрия), глицин, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KCl (“Serva”, Германия), реактив Несслера, ТХУ, бакто-триптон, бакто-дрожжевой экстракт (“Fluka”, Швейцария); NaOH, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (“Merck”, Германия); TRIS (“BIO-Rad”, США); HCl, CH_3COOH , CH_3COONa (“Реахим”, Россия).

Рекомбинантный штамм-продуцент и его культивирование. В работе использован штамм-реципиент: *E. coli* BL21 (DE3) [F⁻, ompT, hsdSB, (rB⁻, mB⁻), dcm, gal, λ (DE3)] (Центр “Биоинженерия” РАН). Трансформированный штамм *E. coli* BL21(DE3)/pBad24/YERS культивировали в колбах Эрленмейера объемом 1 л в 200 мл среды LB при 37°C на качалке при скорости перемешивания 200 об/мин [10]. Для индукции экспрессии в середине логарифмической фазы роста (оптическая плотность (ОП) 1.5–1.6) вносили арабинозу до конечной концентрации 0.001 М. Выделение и очистку YpA проводили по отработанному ранее методу, степень очистки целевого фермента 93% [10].

Масс-спектрометрический анализ YpA. Проводили на MALDI-TOF масс-спектрометре Bruker

Reflex III ("Bruker Daltonics", Германия) с УФ-лазером (337 нм) в линейном режиме, регистрируя положительный ток в диапазоне масс 2.7–80 кДа.

Изоэлектрическая точка. Определение проводили путем изоэлектрофокусирования на колонке фирмы "LKB" (Германия) при pH 4.0–10.0 [11].

Определение ферментативной активности. Активность фермента определяли с помощью реактива Несслера [12, 13]. За единицу активности L-аспарагиназы (МЕ) принимали количество фермента, которое высвобождает 1 мкмоль аммиака за 1 мин при 37°C. Глутаминазную активность оценивали аналогичным образом, используя в качестве субстрата L-глутамин. Зависимость активности от pH изучали при 37°C и pH 3.0–11.0 в стандартных буферных растворах: натрий-ацетатный (pH 3.0–6.0), натрий-фосфатный (pH 6.0–8.0), TRIS-HCl (pH 7.0–9.0) и боратный (pH 9.0–11.0) [14]. Влияние температуры на активность изучали в диапазоне 30–80°C. Зависимость удельной активности УрА от ионной силы определяли, изменяя концентрацию KCl от 100 до 3000 мМ. В качестве контроля для всех экспериментов использовали препарат L-аспарагиназы *E. coli* ("Medak", Германия).

Кинетические параметры ферментов. Определение константы Михаэлиса (K_M) проводили по скорости образования аммиака при ферментативном гидролизе L-аспарагина и L-глутамина, аспарагиназную активность оценивали в термостабируемой при 37°C ячейке, pH 8.0. Аликвоту 1 мл раствора субстрата аспарагина (0.01–0.04 М) смешивали с 0.2 мл 12.5 мМ боратного буфера, затем вносили 0.1 мл раствора ЕсА или УрА (0.5–10 мг/мл). Реакцию останавливали, добавляя 0.6 мл 10%-ного раствора ТХУ. Измерение аммиака проводили с использованием реактива Несслера. Величину поглощения определяли при длине волны 480 нм. Графическую обработку полученных данных и расчет K_M и максимальной скорости реакции (V_{\max}) проводили при помощи программы *Microsoft Excel* по методу двойных обратных величин Лайнуивера–Берка.

Температурная и химическая денатурация. Стабильность УрА и ЕсА изучали при инкубировании в фосфатном буфере в течение 3 мин при различных температурах (до 80°C), а также в течение 1 ч в присутствии 0–8.0 М мочевины, после чего оценивали ферментативную активность стандартным способом [12, 13]. За 100% принимали активность фермента, определяющуюся при 37°C или в отсутствие мочевины.

Антипролиферативная активность in vivo. Использованы мыши-самки ДВА₂ массой тела 18–24 г. Перед лечением животных распределяли на группы: опытная ($n = 13$) и контрольная ($n = 11$). Для выявления антипролиферативного действия УрА была использована сигнальная для L-аспарагиназ

модель in vivo – лимфаденоз Фишера L5178у [15]. Штамм L5178у получен из Банка опухолевых штаммов Российского онкологического центра им. Н.Н. Блохина, в опытах использован 3 пассаж in vivo. Клетки L5178у трансплантировали внутривентриально (в/б) по стандартной методике [16]. Инъекционный раствор УрА в концентрации 50 МЕ/мл вводили мышам в/б в разовой дозе 1000 МЕ/кг 10-кратно с интервалом 24 ч, суммарная доза составила 10000 МЕ/кг. Лечение начинали через 24 ч после трансплантации опухоли. Животным в контрольной группе вводили по 0.3 мл растворителя в аналогичном режиме. Эффективность лечения оценивали по увеличению продолжительности жизни в сравнении с контрольной группой, для чего определяли среднюю продолжительность жизни (СПЖ) в обеих группах и рассчитывали отношения показателей опытной группы к контрольной, Т/С, %, в контрольной группе Т/С = 100%. Мышей, проживших более 60 сут без признаков опухолевого процесса на вскрытии (асцит, узловой рост, поражение брыжеечных лимфатических узлов), считали излеченными [16]. При расчете СПЖ излеченных мышей не учитывали. Статистическую обработку выживаемости мышей проводили с использованием логарифмического рангового критерия и построением кривых Каплана–Майера. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Химическая структура. УрА состоит из 345 аминокислотных остатков. Анализ аминокислотной последовательности УрА с помощью программы CLUSTAL 2.0.10 показал 99% идентичность с L-аспарагиназой *Yersinia pestis* (Q1CGG1, Q1CA77, A6BSN7 и др.). В ряду применяемых в клинической онкологии L-аспарагиназ УрА наиболее гомологична периплазматической ЕсА (B7MZQ6, B7U104-1). Аминокислотные последовательности указанных ферментов идентичны на 74%, причем N-концевые участки более близки, чем C-концевые (рис. 1). По данным масс-спектрометрии молекулярная масса мономера УрА сопоставима с массой ЕсА и составляет 36.5 кДа [17].

Изоэлектрическая точка. Изоэлектрическая точка УрА находится при pH 5.4 ± 0.3 и лежит примерно в той же кислой зоне pH, как и у ЕсА [13]. Этот результат соответствует теоретическому значению.

Зависимость активности от pH, температуры и ионной силы. УрА, аналогично ЕсА, каталитически активна в широком диапазоне pH независимо от состава буферного раствора. Максимальная активность отмечена при pH 8.0. При понижении pH до 7.4 активность УрА сохраняется на достаточно высоком уровне $\geq 96\%$. Увеличение pH до 10.0 приводило к снижению активности УрА, но

УрА	MKYIKLTVLAGIFVGISSPVFALPNITLLATGGTIAGGGDSATKSNYTAGKLGVDA	56
ЕсА	MEFFKKTALAALVMGFSGAALALPNITILATGGTIAGGGDSATKSNYTVGKVGVEN	56
	LVEAVPAIKDIANIQQEQVNVNIGSQDMNDDVWLTLLAKKINKDCTKTDGFFVITHGTDTL	114
	LVNAVPLKDIANVKGEQVNVNIGSQDMNNDVWLTLLAKKINTDCDKTDGFFVITHGTDTM	114
	EETAYFLDLTVNCDKPVVIVGAMRPATALGADGPLNLYNAVVAEADSAKRGVLMVAMND	174
	EETAYFLDLTVKCDKPVVMVGAMRPSTSMSADGPFNLYNAVVTAAADKASANRGVLMVAMND	174
	MVFTGRDVVKTNTTTSVQTFQSPNTGPLGYIYDGKVNLYHQPAARQP---AFDISKLNTL	230
	TVLDGRDVTKTNTTDVATFKSVNYGPLGYIHNGKIDYQRTPAK HT SDT PF DVSKLNEL	233
	PKVGI IYNYANASDI PAKALIADGYQGIVSAGVGNGLYHTVFDTLATAASHGVAVVRSS	290
	PKVGI VYNYANASDL PAKALVDAGYDGIVSAGVGNGLYKSVFDTLATAAKTGTAVVRSS	293
	RVPSGSTTEGAEIDDAKYGFVAAGALNPQKARVLLQLALTQTQKPEIQKLFHTY	345
	RVPTGATTQDAEVDDAKYGFVASGTLNPQKARVLLQLALTQTQKDPQIQQIFNQY	348

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей УрА и ЕсА (CLUSTAL 2.0.10). Выделен основной антигенный эпитоп ЕсА.

не такому существенному, как для ЕсА. Таким образом, в отличие от ЕсА, оптимум рН УрА находится в более щелочной области, однако выявленные различия незначительны (рис. 2).

Температурный оптимум действия отмечался при 55–60°C. При 36–37°C активность фермента составляла около 60–70% от максимальной. Зависимость активности УрА от температуры сопоставима с аналогичными характеристиками ЕсА. Увеличение активности ферментов при повышении температуры вызвано снижением энергии активации реакции, а последующее падение связано с тепловой денатурацией белка [18]. Изменение ионной силы в присутствии 100–3000 мМ КСl практически не влияет на активность УрА.

Стабильность фермента. При инкубировании УрА при нормальной температуре тела человека (37°), комнатной температуре (24°C), а также при 4°C L-аспарагиназная активность сохранялась на

уровне $\geq 95\%$ от начальной в течение 3 сут. В диапазоне от -70 до -20°C в буфере (10 мМ K_2HPO_4 , 10 мМ KH_2PO_4 , 1 М глицин, 1 мМ ЭДТА, 0.28 М КСl и 0.5% глюкозы) активность УрА не снижалась в течение 12 мес. При инкубировании при 60°C через 3 мин сохранялось всего 15% активности УрА, а через 5 мин – только 6% (рис. 3). Инкубирование при 80°C в течение 10 мин приводило почти к полной потере активности, оставалось менее 1% от исходной.

Инкубирование УрА и ЕсА в течение 1 ч с 0–4 М мочевиной продемонстрировало устойчивость обоих ферментов (сохраняется не менее 80% активности). При дальнейшем увеличении концентрации мочевины активность начинала постепенно снижаться, в присутствии 8 М мочевины активность – $\geq 40\%$.

Кинетические свойства. Для УрА характерна гиперболическая зависимость скорости гидролиза

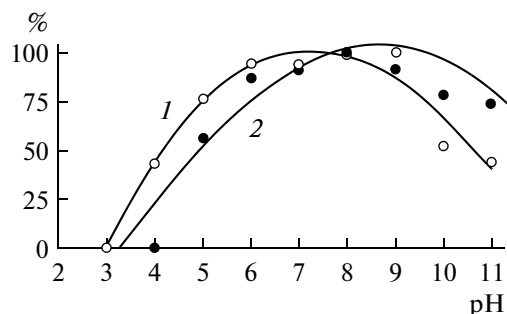


Рис. 2. Зависимость активности (%) от рН. 1 – УрА, 2 – ЕсА.

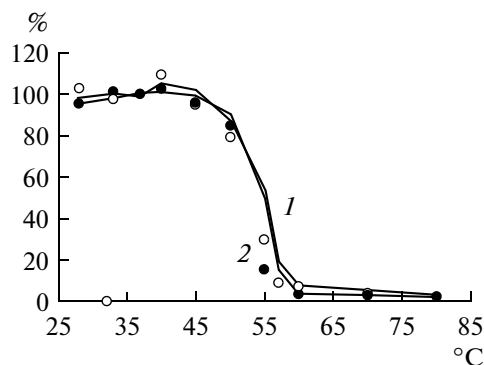


Рис. 3. Активность (%) УрА (1) и ЕсА (2) после инкубирования в течение 3 мин при различных температурах.

L-аспарагина и L-глутамин. K_M для YpA в отношении L-аспарагина составила 17 мкМ, $V_{\text{макс}}$ 4.8 мМ/мин (при концентрации фермента в реакционной смеси 21 мкМ), $K_{\text{кат}} = 0.22 \text{ с}^{-1}$. Измеренная аналогичным образом K_M для EcA составила также 17 мкМ, что соответствовало полученным ранее данным [19]. L-глутаминовая активность, определенная с использованием реактива Несслера, не превышала 6% от L-аспарагиназной, что соответствует аналогичным параметрам для EcA.

Антипролиферативная активность. Показано, что при 10-кратном курсе лечения в разовой дозе 1000 МЕ/кг YpA продлевает СПЖ мышей в сравнении с группой контроля: 23.7 ± 3.1 и 17.5 ± 1.8 сут соответственно, $T/C = 136\%$ ($p < 0.001$). Излеченными в опытной группе оказались 2 мыши, что составило 15%, в группе контроля случаев спонтанного рассасывания не наблюдали. Кривые выживаемости по Каплану–Майеру представлены на рис. 4. При вскрытии излеченных мышей на 60 сут опыта признаков опухолевого процесса не отмечено. Переносимость лечения была удовлетворительной, гибели мышей от токсичности не отмечали.

Таким образом, в работе показано, что YpA по основным физико-химическим и кинетическим параметрам близка EcA и проявляет достоверную антипролиферативную активность *in vivo*. Сравнительные физико-химические характеристики YpA и EcA, обобщенные в таблице, показывают сходные значения оптимумов pH, изоэлектрических точек и кинетических констант для L-аспарагина, что соответствует данным о 74% гомологичности аминокислотных последовательностей. Основные активные центры YpA и EcA совпадают: взаимодействующие с NH_2 -группой и карбоксильными группами субстрата Три¹², Гли⁵⁹, Сер⁵⁸, Три⁸⁹, Асп⁹⁰, Ала¹¹⁴, Глу²⁸³; непосредственно участвующий в катализе Тир²⁵; важные для стабилизации нативного тетрамера EcA Тир¹⁸¹ и Тир³²⁶, а

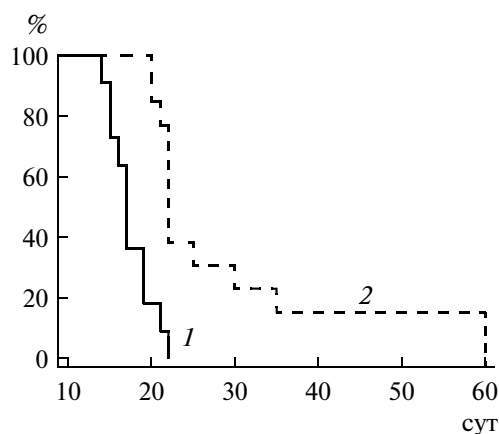


Рис. 4. Антипролиферативный эффект (выживаемость, %) на модели лимфаденоза Фишера L5178y. 1 – контроль, 2 – YpA.

также Асн²⁴⁸, отвечающий за L-глутаминовую активность EcA и образующий водородную связь с остатком Асп⁹⁰ [19–21]. В то же время один из установленных [22] основных антигенных эпитопов EcA (¹⁹⁵RKH¹⁹⁷) у YpA не дублируется. Следовательно, несмотря на близкие структуры активного центра и схожие молекулярные механизмы действия, у YpA можно предположить иные антигенные свойства.

Полученная характеристика YpA свидетельствует о близких к EcA физико-химических свойствах (K_M для L-аспарагина YpA 17 ± 0.9 мкМ; оптимальная температура 60°C и pH 8.0, сопоставимая L-глутаминовая активность) и значимой антипролиферативной активности ($T/C = 136\%$, 15% излечения) в невысокой суммарной терапевтической дозе 10000 МЕ/кг. Полученные результаты позволяют считать YpA противоопухолевым ферментом с близкими EcA биологическими свойствами. Для подтверждения преимуществ YpA перед L-аспарагиназой *E. coli* целесообразно

Физико-химические свойства и равновесные кинетические параметры YpA и EcA

Параметр	YpA	EcA
Молекулярная масса мономера, кДа	36.27	36.85
Число аминокислотных остатков	345	348
Оптимум pH	8.0–8.5	7.0–7.5
pI	5.4 ± 0.3	5.0 ± 0.2
K_M для L-аспарагина, мкМ	17 ± 0.9	17 ± 0.9
L-глутаминовая активность, % от L-аспарагиназной	5.7	≈5

подробное изучение особенностей противоопухолевого действия и оценка перекрестной антигенности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Capizzi R.L. // *Leuk. Lymphoma*. 1993. № 10. P. 147–150.
2. Jaccard A., Petit B., Girault S., Suarez F., Gressin R., Zini J.M., Coiteux V., Larroche C., Devidas A., Thiéblemont C., Gaulard P., Marin B., Gachard N., Bordessoule D., Hermine O. // *Ann. Oncol.* 2009. V. 20. № 1. P. 110–116.
3. Yong W., Zheng W., Zhang Y., Zhu J., Wei Y., Zhu D., Li J. // *Int. J. Hematol.* 2003. V. 78. № 2. P. 163–167.
4. Obata K., Tara M., Niina K. // *Int. J. Hematol.* 1999. V. 69. № 4. P. 260–262.
5. Agrawal N.R., Bukowski R.M., Rybicki L.A., Kurtzberg J., Cohen L.J., Hussein M.A. // *Cancer*. 2003. V. 98. № 1. P. 94–99.
6. Kobrinsky N.L., Spoto R., Shah N.R., Anderson J.R., DeLaat C., Morse M., Warkentin P., Gilchrist G.S., Cohen M.D., Shina D., Meadows A.T. // *J. Clin. Oncol.* 2001. V. 19. № 9. P. 2390–2396.
7. Reinert R.B., Oberle L.M., Wek S.A., Bunpo P., Wang X.P., Mileva I., Goodwin L.O., Aldrich C.J., Durden D.L., McNurlan M.A., Wek R.C., Anthony T.G. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 42. P. 31222–31233.
8. Borek D., Jaskólski M. // *Acta Biochim. Pol.* 2001. V. 48. № 4. P. 893–902.
9. Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Борисова А.А., Сидорук К.В., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Покровская М.В., Кондакова Л.И., Соколов Н.Н. // *Биомед. химия*. 2008. Т. 54. № 6. С. 712–719.
10. Сидорук К.В., Покровский В.С., Борисова А.А., Омелянюк Н.М., Александрова С.С., Покровская М.В., Гладилина Ю.А., Богуш В.Г., Соколов Н.Н. // *Бюлл. эксперим. биол. мед.* 2011. Т. 152. № 8. С. 179–183.
11. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами, М.: Наука, 1983. 304 с.
12. Wriston J.C., Yellin T.O. // *Adv. Enzymol.* 1985. V. 39. P. 185–248.
13. Wade H.E., Philips B.P. // *Anal. Biochem.* 1971. V. 44. P. 189–199.
14. Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. С. 354–369.
15. Трещалина Е.М. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения. М.: Практическая медицина, 2005. 270 с.
16. Chabner B.A., Longo D.L. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001, P. 678–699.
17. Whelan H.A., Wriston J.C. // *Biochemistry*. 1969. V. 8. № 6. P. 2386–2393.
18. Peng G., Fritsch G., Zickermann V., Schägger H., Mentele R., Lottspeich F., Bostina M., Radermacher M., Huber R., Stetter K.O., Michel H. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. № 10. P. 3032–3039.
19. Derst C., Henseling J., Röhm K.H. // *Protein Sci.* 2000. V. 9. № 10. P. 2009–2017.
20. Lubkowski J., Wlodawer A., Ammon H.L., Copeland T.D., Swain A.L. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. № 34. P. 10257–10265.
21. Derst C., Henseling J., Röhm K.H. // *Protein Eng.* 1992. V. 5. № 8. P. 785–789.
22. Jianhua C., Yujun W., Ruibo J., Min W., Wutong W. // *Mol. Biotechnol.* 2006. V. 33. № 1. P. 57–65.

Physicochemical Properties and Antiproliferative Activity of Recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-Asparaginase

V. S. Pokrovskii^a, M. V. Pokrovskaya^a, S. S. Aleksandrova^a, R. M. Anriyanov^b, D. D. Zhdanov^a, N. M. Omel'yanyuk^a, E. M. Treshchalina^c, and N. N. Sokolov^a

^a Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul. 10, Moscow, 119832 Russia

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

^c Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe sh. 24, Moscow, 115478 Russia

Received October 3, 2011

Abstract—The physicochemical, catalytic, and antiproliferative activity of a recombinant L-asparaginase from *Yersinia pseudotuberculosis* (YpA) have been studied. The following results were obtained: the K_M value for L-asparagine is $17 \pm 0.9 \mu\text{M}$, the optimal temperature is 60°C , pH is 8.0, pI is 5.4 ± 0.3 , the L-glutaminase activity is no more than 5–6% of the L-asparaginase activity, and the antiproliferative activity on the Fisher L5178y lymphadenosis cell line comprised T/C = 136% ($p < 0.001$) at a 15% recovery rate. The described characteristic allows one to regard YpA as an antitumor enzyme with biological features similar to the L-asparaginase of *E. coli*.

UDC 579

АМИЛАЗА ИЗ ГРИБА ЕЖОВИКА ГРЕБЕНЧАТОГО *Hericium erinaceum*

© 2013 г. Ф. Ду*, Н. Х. Ван*, Т. Б. Наг**

*Государственная лаборатория агробιοтехнологии кафедры микробиологии,
Китайский сельскохозяйственный университет, Пекин 100193, Китай

e-mail: hxwang@cau.edu.cn

**Медицинский факультет, Китайский университет Гонконга, Шатин, Новые Территории, Гонконг, Китай

e-mail: b021770@mailserv.cuhk.edu.hk

Поступила в редакцию 29.03.2012 г.

Из плодовых тел гриба ежевика гребенчатого *Hericium erinaceum* выделена и очищена амилаза, сходная по молекулярной массе и N-концевой последовательности аминокислот с ферментом из *Bacteroides thetaiotaomicron*. Схема очистки включала экстракцию фермента из плодовых тел дистиллированной водой, ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, SP-сефарозе и FPLC на Superdex 75. Амилаза *H. erinaceum* сорбировалась на ДЭАЭ-целлюлозе в 10 мМ трис-HCl буфере, pH 7.4, элюировалась 0.2 М NaCl в том же буфере, на SP-сефарозе в 10 мМ трис-HCl буфере, pH 4.5, элюировалась 0.3 М NaCl в том же буфере. Собранные активные фракции подвергали очистке на FPLC на колонке с Superdex 75. На основании ДДС-ПААГ-электрофореза собранные фракции содержали гомогенный белок с молекулярной массой 55 кДа. Амилаза из *H. erinaceum* имела оптимум pH 4.6, температурный оптимум 40°C. Активность фермента увеличивалась в присутствии ионов Mn^{2+} и Fe^{3+} , ингибировалась ионами Hg^{2+} .

DOI: 10.7868/S0555109913010042

Hericium erinaceum хорошо известен, как съедобный и лекарственный гриб в восточных странах. В последнее время проведены исследования его антимикробных и противораковых свойств. Показано, что полисахариды гриба обладают противоопухолевой активностью и в комбинации с доксорубицином являются эффективными при лечении лекарственно-устойчивой гепатоцеллюлярной карциномы человека [1]. В 2010 г. в работе [2] было показано, что полисахариды из *H. erinaceum* способны увеличивать активность антиоксидантных ферментов, матричной металлопротеиназы-1, тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 и уровня коллагенового белка в коже пожилых крыс. Водный экстракт *H. erinaceum* способствовал индукции экспрессии генов в макрофагах путем активации фактора транскрипции NF- κ B [3]. Он также способствовал проявлению естественной цитолитической активности клеток-убийц через индукцию интерлейкина-12 в спленоцитах, а также в других иммуномедиаторах или клеточных компонентах [4]. В 1994 г. Кавасаги с соавт. [5] выделили из *H. erinaceum* лектин HEL (54 кДа), специфичный к сиаловой кислоте, который включал субъединицы с молекулярной массой 15 и 16 кДа. В 2010 г. Ли с соавт. выделили из *H. erinaceum* лектин (51 кДа), который был стабильный в диапазоне pH 1.9–12 и при температуре до 70°C [6]. Лектин обладал митогенной

активностью по отношению к спленоцитам, антипролиферативным действием по отношению к раку молочной железы и клеткам гепатомы, ингибирующей активностью по отношению к обратной транскрипции ВИЧ-1 [6]. Из этого же источника были выделены лакказы с новой N-концевой последовательностью и молекулярной массой 63 кДа [7], дитерпеноиды эринацины H, I и Q еринакол [8].

В настоящее время в литературе нет данных о выделении амилазы (EC 3.2.1.1) из *H. erinaceum*. В 2008 г. Куфориджи и Фасиди [9] обнаружили амилазную активность в спорофорах и в склероциях *Pleurotus tuber-regium*, но попытки выделить фермент не было сделано.

Цель работы – выделение амилазы из гриба ежевика гребенчатого *H. erinaceum*, изучение ее свойств, сравнение N-концевой последовательности аминокислот с другими микробными α -амилазами.

МЕТОДИКА

Микроорганизмы и реактивы. Свежие гриба ежевика гребенчатого *H. erinaceum* (600 г) были приобретены в торговой сети г. Пекина (Китай). Для очистки фермента использовали ДЭАЭ-целлюлозу фирмы “Sigma” (США), Superdex 75 HR 10/30 и систему АКТА Purifier фирмы “GE Health-

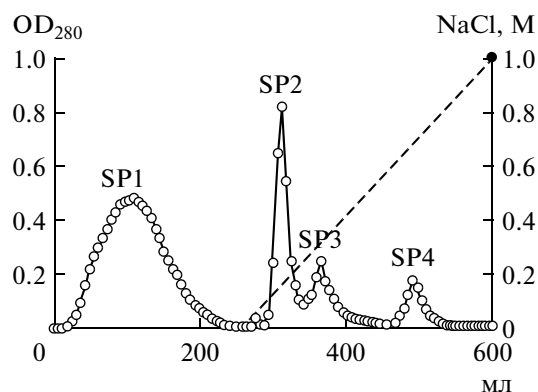


Рис. 1. Ионообменная хроматография на SP-сефарозе фракции D3, полученной после элюции с ДЭАЭ-целлюлозы 10 мМ трис-НСI буфером (рН 7.4), содержащим 0.2 М NaCl. Пунктирная линия – линейный градиент концентрации NaCl (0–1.0 М).

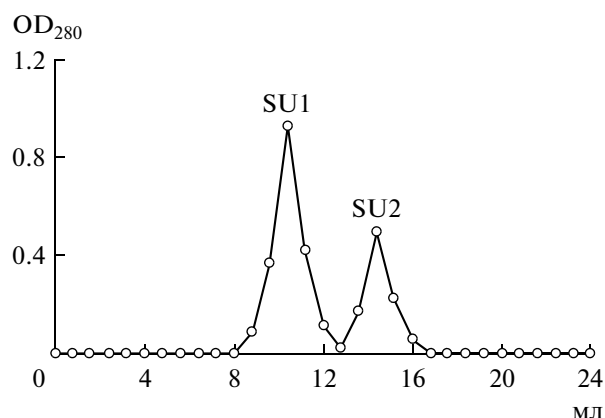


Рис. 2. FPLC фракции SP2 на колонке Superdex 75.

care” (США). Все остальные химические вещества, используемые в работе, были аналитической чистоты.

Выделение амилазы из *H. erinaceum*. Свежий гриб *H. erinaceum* (600 г) гомогенизировали в дистиллированной воде (2 мл/г) в блендере Варинга (США) при максимальной скорости в течение 2 мин. Гомогенат центрифугировали при 12000 g 20 мин, к супернатанту добавляли трис-НСI буфер, рН 7.4, до концентрации 10 мМ. Полученный раствор наносили на колонку (2.5 × 20 см) с ДЭАЭ-целлюлозой, предварительно уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили тем же буфером для удаления не связавшихся с ионообменником фракций (D1), адсорбированные белки элюировали последовательно 0.1, 0.2 и 1.0 М NaCl в 10 мМ трис-НСI буфере, рН 7.4. В результате получены фракции D2, D3 и D4. Фракцию D3 диализовали против 10 мМ NH₄-ацетатного буфера, рН 4.5, в течение ночи перед проведением ионообменной хроматографии на SP-сефарозе (колонка 1.5 × 20 см) в том же буфере (рис. 1). После выхода неадсорбированного белка (фракция SP1) проводили элюцию линейным градиентом концентрации (0–1 М) NaCl в 10 мМ NH₄-ацетатном буфере, рН 4.5.

Фракция SP2 была элюирована 0.3 М NaCl, собрана и лиофилизирована, затем подвергнута FPLC на колонке Superdex 75 HR10/30 (рис. 2) в 0.2 М NH₄НСO₃ буфере, рН 8.5. Скорость потока составляла 0.4 мл/мин, объем фракций 0.8 мл. Первый пик (фракция SU1) представлял очищенную амилазу.

Определение молекулярной массы амилазы. Электрофорез очищенного белка в ПААГ с Na-ДДС проводили по методу Лемли [10]. Гели окрашивали смесью: 0.1%-ный Кумасси голубой в растворе 30%-ного (об.) метанола и 10%-ной (об.) уксусной кислоты. Отмывку проводили в раство-

ре, содержащем 30% (об.) метанола и 10% (об.) уксусной кислоты. Определение молекулярной массы осуществляется методом гель-фильтрации (FPLC) на колонке Superdex 75 HR10/30. В работе использовались стандарты белков с известной молекулярной массой: бычий сывороточный альбумин (67 кДа), яичный альбумин (43 кДа), рибонуклеаза (13 кДа), аprotинин (6.5 кДа) и витамин B₁₂ (1.355 кДа).

Анализ N-концевой аминокислотной последовательности очищенного фермента. Анализ N-концевой последовательности выделенной амилазы проводили с помощью Edman degradation с использованием секвенатора Hewlett Packard 1000A (США), оснащенного системой жидкостной хроматографии высокого разрешения [11].

Количественное определение активности амилазы. Активность амилазы оценивалась по количеству восстанавливающих сахаров с 3.5-динитросалициловой кислотой (ДНС) [12]. Разбавленный фермент (100 мкл) инкубировали в 100 мкл ацетатного буфера, рН 4.6, при 40°C в течение 5 мин, после чего добавляли 1.0%-ный растворимый крахмал (200 мкл) предварительно нагретый до температуры 40°C. Реакцию проводили в течение 10 мин и останавливали добавлением 400 мкл 0.4 М NaOH. Затем вносили 100 мкл ДНС, смесь нагревали до 100°C 5 мин, после чего определяли оптическую плотность при длине волны 520 нм. За единицу активности фермента принимали такое количество фермента, которое образует 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за 1 мин. Все реакции проведены по крайней мере трижды, рассчитаны стандартные ошибки.

Определение оптимальных рН и температуры для действия амилазы из *H. erinaceum*. Для определения оптимального рН, была подготовлена серия буферов с рН от 3.6 до 5.6 на основе 200 мМ солей уксусной кислоты. Фермент (100 мкл) ин-

кубировали при 40°C 5 мин в 100 мкл буфера, как описано выше.

Для определения оптимальной температуры, реакционную смесь инкубировали при температуре от 4 до 100°C в течение 10 мин, после чего проводили измерение активности амилазы в растворе 200 мМ уксусной кислоты, рН 4.6, по выше описанной методике.

Действие ионов металлов. Раствор фермента (10 мкл) предварительно инкубировали при 40°C в течение 2 ч с 10 мкл раствора ионов металлов в концентрациях от 1.25 до 10 мМ после чего измеряли активность амилазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение амилазы из *H. erinaceum*. Активность амилазы *H. erinaceum* была обнаружена во фракции D3, которая десорбируется с колонки с ДЭАЭ-целлюлозой 10 мМ трис-НСI буфером, рН 7.4, содержащим 0.2 М NaCl (данные не представлены). На следующем этапе очистки на SP-сефарозе фракция SP2 с активностью амилазы была отделена от фракции SP3 с гемагглютинирующей активностью (рис. 1). Фракции SP2 на хроматограмме соответствовал острый пик, который был значительно больше двух других пиков SP3 и SP4, и все же гораздо меньше, чем основной пик SP1. Фракция была разделена FPLC на Superdex 75, получены 2 пика SU1 и SU2 (рис. 2). Амилазная активность была обнаружена только во фракции SU1. Таким образом, из 600 г плодовых тел было получено 147 мг фракции D3, 23 мг фракции SP2 и 10 мг фракции SU1.

Определение молекулярной массы амилазы *H. erinaceum*. Результаты электрофоретического исследования полученной фракции SU1 в ПААГ с ДДС представлены на рис. 3. Выделенная из *H. erinaceum* амилаза проявлялась в виде одной полоски белка, соответствующей молекулярной массе 55 кДа. Молекулярную массу выделенного фермента рассчитывали в соответствии со значениями R_F , используемых метчиков с 94 до 14 кДа. Очищенный белок показал одинаковую молекулярную массу, как при геле-фильтрации на Superdex 75, так и при электрофорезе в ПААГ с Na-ДДС, что указывало на то, что это мономерный белок. Его молекулярная масса близка к молекулярной массе лектина (51 кДа), выделенного и очищенного до гомогенного состояния из того же продуцента [6]. По сравнению с другими амилазами (табл. 1), молекулярная масса фермента из *H. erinaceum* была близка выделенным из *Chrysosporium asperatum* [13] и *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS [14] и значительно выше молекулярной массы амилазы, выделенной из *Bacillus cereus* MS6 [15] и *Bacillus cereus* [16].

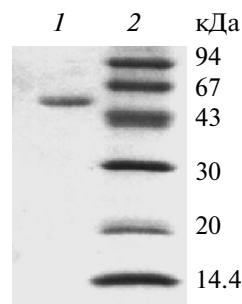


Рис. 3. ДДС-ПААГ-электрофорез выделенной амилазы из *H. erinaceum* (фракция SU1). 1 – очищенная амилаза *H. erinaceum*; 2 – белки-стандарты с разными молекулярными массами.

Анализ N-концевой последовательности амилазы из *H. erinaceum*. Определенная N-концевая аминокислотная последовательность амилазы из *H. erinaceum* (KNIGKKQIKLPYDAA) показала сходство с ферментом *Bacterioides thetataomicron*, но гомологии с другими бактериальными, грибными и амилазами растений обнаружено не было [17].

Характеристики амилазы из *H. erinaceum*. *Влияние рН на активность амилазы из *H. erinaceum*.* Изучение влияния рН на активность фермента показало, что амилаза активна в диапазоне рН 3.6–5.6, активности не было обнаружено при щелочных значениях рН. Оптимальное значение рН для действия выделенного фермента было 4.6 (рис. 4а), что соответствует литературным данным, полученным для других грибов, например, таких, как *Scrytalidium thermopile* [18]. При значениях рН выше 4.6 активность постепенно снижалась, при рН 5.6 сохранялось только 34% от максимальной (рис. 4а).

*Влияние температуры на активность амилазы из *H. erinaceum*.* Ферментативная активность увеличивалась с ростом температуры от 4°C и достигала максимальной при 40°C (рис. 4б). Значительную активность 60–70% от максимальной наблюдали в интервале температур от 50–100°C (рис. 4б), что свидетельствовало об относительной термостабильности амилазы из *H. erinaceum*.

Таблица 1. Сравнение молекулярной массы амилазы из *H. erinaceum* и других микробных амилаз

Вид	Молекулярная масса, кДа	Ссылка
<i>H. erinaceum</i>	55	Настоящая работа
<i>Chrysosporium asperatum</i>	55	[13]
<i>Bacillus subtilis</i> KIBGE-HAS	56	[14]
<i>Bacillus cereus</i> MS6	27	[15]
<i>Bacillus cereus</i>	42	[16]

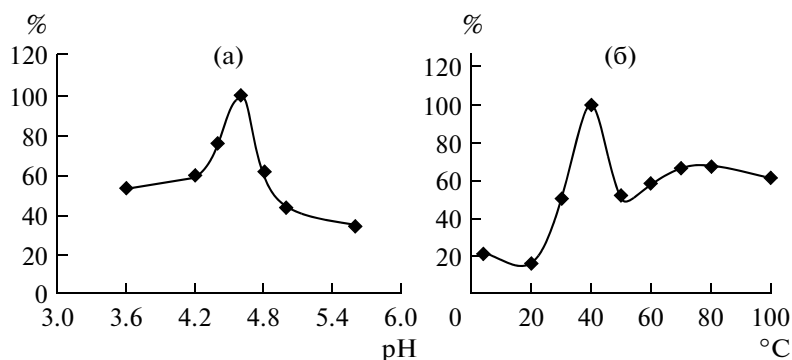


Рис. 4. Влияние pH (а) и температуры (б) на активности амилазы из *H. erinaceum*.

Ранее была изучена оптимальная температура для действия фермента других амилаз из различных грибов [19–21]. Оптимальные температуры находились в широком диапазоне в зависимости от степени адаптации штаммов к условиям окружающей среды. Активность амилазы из *Aspergillus niger* постепенно увеличивалась с повышением температуры от 20°C, достигая максимума при 60°C [19], для амилазы из *Aspergillus falvus* var. *columnaris* температурный оптимум – 35°C [20]. У термофильных видов, таких как *Thermomyces lanuginosus* [21], оптимальная температура для действия фермента была 50°C.

Влияние ионов металлов на активность амилазы из *H. erinaceum*. Большинство ионов одновалентных, двух- и трехвалентных хлоридов металлов, включая K^+ , Fe^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} и Al^{3+} , не оказывали влияния на активность амилазы из *H. erinaceum* (табл. 2). С другой стороны, активность ферментов ингибировалась ионами Hg^{2+} в концентрации 5.0 и 10.0 мМ, в то время как

Таблица 2. Влияние ионов металлов на активность амилазы из *H. erinaceum*

Ион	Амилазная активность, %			
	10 мМ	5 мМ	2.5 мМ	1.25 мМ
Fe^{2+}	114	131	128	103
K^+	115	125	123	131
Ca^{2+}	95	121	138	122
Cd^{2+}	101	111	100	134
Cu^{2+}	113	147	119	129
Hg^{2+}	14	53	102	107
Mg^{2+}	120	127	97	91
Mn^{2+}	378	294	304	248
Pb^{2+}	151	109	103	111
Al^{3+}	109	133	109	133
Fe^{3+}	126	160	125	124

ионы Mn^{2+} и Fe^{3+} в концентрации 10.0, 5.0, 2.5 и 1.25 мМ увеличивали активность амилазы. Известно, что ионы металлов влияют на различные амилазы по-разному: амилаза из *Bacillus* sp. TS-23 в значительной степени ингибировалась ионами Hg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} и ЭДТА, ионы Ni^{2+} и Cd^{2+} оказывали меньшее воздействие [22]. Выделенная из *Bacillus amyloliquefaciens* TSWK1-1 амилаза слабо ингибировалась ионами Mg^{2+} и Cu^{2+} , значительно сильнее ионами Na^+ и Fe^{2+} [23]. Большинство амилаз являются металлоферментами, которые нуждаются в ионах Ca^{2+} для проявления активности, структурной целостности и стабильности. В 2010 г. Мукерджи и др. [17] показали, что ионы тяжелых металлов Hg^{2+} , Ag^+ и Cd^{2+} ингибируют активность фермента из *Tinospora cordifolia*, в то время как присутствие ионов Ca^{2+} увеличивало активность и термостабильность фермента.

В литературе встречается только несколько упоминаний о присутствии амилазы у таких грибов, как *Leucoagaricus gonylophorus* [24], *Lentinus edodes* [25–26], *Agrocybe cylindracea*, *Corticium rolfsii* [27], *Schizophyllum commune* [28], *H. erinaceum* [29] и *Ganoderma lucidum* [30], однако активный фермент не был выделен и очищен до гомогенного состояния. Исключение составляет только фермент *Corticium rolfsii* [27].

Выделенная в настоящей работе амилаза из *H. erinaceum* обладала меньшей молекулярной массой по сравнению с ферментом из *C. rolfsii* (69–79 кДа), более низким температурным оптимумом (60°C), однако имела такой же pH-оптимум (pH 4.5) для действия фермента и также сорбировалась при хроматографии на ионообменной колонке ДЭАЭ-целлюлозой.

Работа выполнена при финансовой поддержке Национального гранта Китая (2010CB732202).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee J.S., Hong E.K. // Cancer Lett. 2010. V. 297. № 2. P. 144–154.

2. Xu H., Wu P.R., Shen Z.Y., Chen X.D. // Int. J. Biol. Macromol. 2010. V. 47. № 1. P. 33–36.
3. Son C.G., Shin J.W., Cho J.H., Cho C.K., Yun C.H., Chung W., Han S.H. // Int. Immunopharmacol. 2006. V. 6. № 8. P. 1363–1369.
4. Yim M.H., Shin J.W., Son J.Y., Oh S.M., Han S.H., Cho J.H., Cho C.K., Yoo H.S., Lee Y.W., Son C.G. // Acta. Pharmacol. Sin. 2007. V. 28. № 6. P. 901–907.
5. Kawagishi H., Mori H., Uno A., Kimura A., Chiba S. // FEBS Lett. 1994. V. 340. № 1–2. P. 56–58.
6. Li Y., Zhang G., Ng T.B., Wang H. // J. Biomed. Biotechnol. 2010. 716515.
7. Wang H.X., Ng T.B. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 322. № 1. P. 17–21.
8. Kenmoku H., Shimai T., Toyomasu T., Kato N., Sassa T. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002. V. 66. № 3. P. 571–575.
9. Kuforiji O.O., Fasidi I.O. // Bioresour. Technol. 2008. V. 99. № 10. P. 4275–4278.
10. Laemmli U.K., Favre M.J. // Mol. Biol. 1973. V. 80. № 4. P. 575–599.
11. Lam S.S., Wang H., Ng T.B. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. V. 253. № 1. P. 135–142.
12. Miller G.L. // Anal. Chem. 1959. V. 1. № 31. P. 426–429.
13. Sanghvi G.V., Koyani R., Rajput K.S. // J. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 21. № 5. P. 470–476.
14. Bano S., Ul, Qader S.A., Aman A., Syed M.N., Azhar A. // AAPS Pharm. SciTech. 2011. V. 12. № 1. P. 255–261.
15. Al-ZaZae M.M.A., Neelgund S., Gurumurthy D.M., Rajeshwara D.M. // Adv. Environ. Biol. 2011. V. 5. № 5. P. 992–999.
16. Annamalai N. // Indian J. Microbiol. 2011. V. 51. № 4. P. 424–429.
17. Mukherjee A., Ghosh A.K., Sengupta S. // Carbohydr. Res. 2010. V. 345. № 18. P. 2731–2735.
18. Aquino A.C., Jorge J.A., Terenzi H.F., Polizeli M.L. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 61. № 4. P. 323–328.
19. Omemu A.M. // Afr. J. Biotechnol. 2005. V. 4. № 1. P. 19–25.
20. Ellaiah P., Srinivasulu B., Adinarayana K. // Process Biochem. 2002. V. 38. № 1. P. 615–620.
21. Kunamneni A., Permaul K., Singh S. // J. Biosci. Bioeng. 2005. V. 100. № 2. P. 168–171.
22. Lin L.L., Chyau C.C., Hsu W.H. // Biotechnol. Appl. Biochem. 1998. V. 28. № 1. P. 61–68.
23. Kikani B.A., Singh S.P. // Int. J. Biol. Macromol. 2011. V. 48. № 4. P. 676–681.
24. Silva A., Bacci M.Jr., Pagnocca F.C., Bueno O.C., Hebling M.J. // Curr. Microbiol. 2006. V. 53. № 1. P. 68–71.
25. Ko H.G., Park S.H., Kim S.H., Park H.G., Park W.M. // Folia Microbiol. 2005. V. 50. № 2. P. 103–106.
27. Nagasaka Y., Kurosawa K., Yokota A., Tomita F. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 50. № 3. P. 323–330.
28. Reyes F., Lahoz R., Vazquez C. // Can. J. Microbiol. 1980. V. 26. № 9. P. 1120–1125.
29. Han J. // Int. J. Food Microbiol. 2003. V. 80. № 1. P. 61–66.
30. Han J.R., An C.H., Yuan J.M. // J. Appl. Microbiol. 2005. V. 99. № 4. P. 910–915.

An Amylase from Fresh Fruiting Bodies of the Monkey Head Mushroom *Hericium Erinaceum*

F. Du^a, H. X. Wang^a, and T. B. Ng^b

^a State Key Laboratory for Agrobiotechnology and Department of Microbiology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

^b Faculty of Medicine, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, New Territories, Hong Kong, China

e-mail: hxwang@cau.edu.cn; b021770@mailserv.cuhk.edu.hk

Received March 29, 2012

Abstract—An amylase with a molecular mass of 55 kDa and an N-terminal sequence exhibiting similarity to enzyme from *Bacteroides thetaiotaomicron* was isolated from fruiting bodies of the monkey head mushroom *Hericium erinaceum*. The purification scheme included extraction with distilled water, ion exchange chromatography on DEAE-cellulose and SP-sepharose, and gel filtration by FPLC on Superdex 75. The amylase of *H. erinaceum* was adsorbed on DEAE-cellulose in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and eluted with 0.2 M NaCl in the same buffer. The enzyme was subsequently adsorbed on SP-Sephadex in 10 mM ammonium acetate buffer (pH 4.5) and eluted with 0.3 M NaCl in the same buffer. This fraction was subsequently subjected to gel filtration on Superdex 75. The first peak eluted had a molecular mass of 55 kDa in SDS-PAGE. The amylase of *H. erinaceum* exhibited a pH optimum of 4.6 and a temperature optimum of 40°C. The enzyme activity was enhanced by Mn²⁺ and Fe³⁺ ions, but inhibited by Hg²⁺ ions.

УДК 577.152.34.02

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ, ОЧИСТКА И СВОЙСТВА БЕЛКА-ИНГИБИТОРА ХИМОТРИПСИНА ИЗ КАРТОФЕЛЯ

© 2013 г. И. А. Парфёнов, Т. А. Ревина, Н. Г. Герасимова, Г. В. Кладницкая, Т. А. Валуева

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

e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 16.05.2012 г.

Ген *PKPIJ-B*, кодирующий в картофеле (*Solanum tuberosum* L., сорт Юбилей Жукова) белок-ингибитор химотрипсина, принадлежащий к подсемейству картофельных ингибиторов Кунитца (PKPI, potato Kunitz-type proteinase inhibitors) был клонирован в вектор pET23a и затем экспрессирован в клетки *Escherichia coli*. Рекомбинантный белок PKPIJ-B, полученный в виде телец включения, денатурировали, отделяли от примесей методом высоко эффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на Mono Q в денатурирующих условиях и ренатурировали. Ренатурированный белок был дополнительно очищен с помощью ВЭЖХ на ДЭАЭ-Тоурераг. Белок PKPIJ-B эффективно подавлял активность химотрипсина, слабее действовал на трипсин и угнетал рост и развитие фитопатогенных микроорганизмов, поражающих растения картофеля.

DOI: 10.7868/S0555109913010145

Ингибиторы протеиназ типа Кунитца из картофеля (PKPI – potato Kunitz-type proteinase inhibitors) представляют собой белки с молекулярными массами 20–25 кДа [1, 2]. На основании структуры N- и C-концевых аминокислотных последовательностей среди этих белков выделяют три структурные группы: А, В и С [1]. Установлено, что в геноме культурного картофеля имеются гены, кодирующие все три группы. При этом, вероятно, каждая группа кодируется множественными генами [2].

Ранее нами был выделен ген, обозначенный как *PKPIJ-B*, кодирующий в картофеле (*Solanum tuberosum* L., сорт Юбилей Жукова) белок, принадлежащий к группе В [3]. Анализ аминокислотной последовательности, восстановленной по нуклеотидной последовательности этого гена, позволил определить, что он кодирует белок PKCI, выделенный нами ранее из клубней картофеля того же сорта и действующий как ингибитор химотрипсина и трипсина [4].

Нуклеотидная последовательность гена *PKPIJ-B* характеризовалась высокой степенью сходства (от 89 до 99% идентичных н.п.) с генами *PKPI-B9* (AY693424), *PKPI-B10* (AF536175.1) [5], *PI-2* (AY166690) [6], *KPi B-k2* (DQ168333.1) [7], *PIH5* (AF492359), *PAD11* (AF4955584), *SIC1* (AF492769) [2] и *gCDI-B1* (Q41484) [1], которые были обнаружены в картофеле сортов Истринский, Elkana, Kuras, Provita, Saturna и Danshaku соответственно. При этом наиболее вариабельные фрагменты последовательностей были расположены в 5'-концевой части молекул. Анализируя положения замен

нуклеотидов в этих последовательностях, можно сделать заключение, что они локализируются в одних и тех же участках. Весьма вероятно, что в этих участках и происходили рекомбинации. Оказалось, что восстановленная по последовательности нуклеотидов аминокислотная последовательность белка, кодируемого геном *PKPIJ-B*, содержит уникальные замены [3, 4].

Замены остатков в аминокислотных последовательностях ингибиторов PKPI могут приводить к изменению специфичности их действия на протеиназы. Например, три белка группы В, полученные в результате экспрессии в *Schizosaccharomyces pombe*, идентичность в аминокислотных последовательностях которых составляла только 97%, проявляли различную специфичность действия по отношению к сериновым протеиназам, трипсину, α -химотрипсину и субтилизину, а также к цистеиновой протеиназе, папаину [8]. Вариабельность структуры и свойств белков PKPI, возможно, имеет важное функциональное значение и играет определенную роль в защитном ответе растений при атаке патогенными организмами [9–11]. В наших работах [12, 13] было показано, что в клубнях картофеля, инфицированных оомицетом *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, а также подверженных механическому повреждению, накапливаются ингибиторы протеиназ, основную долю которых составляют белки PKPI-B. Эти белки обладают высокой токсичностью по отношению к патогену, подавляя прорастание гиф и ускоряя разрушение зооспор оомицета [12, 13].

Цель работы – получение высокоочищенного рекомбинантного белка РКРІІ-В и изучение его свойств.

МЕТОДИКА

Тотальную РНК выделяли из 2 нед проростков картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Юбилей Жукова) по методу, описанному в работе [14]. Методом обратной транскрипции, используя выделенную мРНК как матрицу, была получена кДНК картофеля. Для выделения геномной ДНК использовали штамм *Escherichia coli* BL-21(DE3), вектор pUC18 [15] и pGEM-T-Easy фирмы “Promega” (США).

Прямой 5-atggatccaacctactagtgctactccagta-3 и обратный 5-attggatcctactggacttgggtgaaggagacatcaaggatt-3 олигонуклеотидные праймеры, гомологичные областям генов группы В, кодирующим N- и C-концевые участки зрелых белков и не содержащие вырожденных позиций, были сконструированы с использованием программ Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и Vector NTI (<http://www.invitrogen.com>) и описаны в работе [3]. Использовали также штамм *E. coli* BL21(DE3) и вектор pET23a (“Promega”) для проведения гетерологичной экспрессии, рестриктазы *NdeI*, *SacI* и *XhoI* (“МБИ Ферментас”, Литва), хромогенные субстраты (*n*-нитроанилиды N-сукцинил-L-глицил-L-глицил-L-фенилаланина (СукГГФПА), N- α -бензоил-L-аргинина (БАПА), N-карбобензоксиг-Л-аланил-L-аланил-L-лейцина (КбзААЛПА) и L-пироглутамил-L-фенилаланил-L-лейцина (ПрФЛПА) фирмы “Calbiochem” (США), химотрипсин (КФ 3.4.21.1.) (“Serva”, Германия), трипсин (КФ 3.4.21.4) (“Spofa”, Чехия), дополнительно перекристаллизованный из сульфата магния, субтилизин Карлсберг (КФ 3.4.21.14) (“Sigma”, США), папаин (КФ 3.4.22.1) (“Fluka”, Швейцария), а также низкомолекулярные белки-маркеры фирмы “Pharmacia” (Швеция).

Процедуры выделения геномной ДНК картофеля, амплификацию, молекулярное клонирование, выделение плазмидной ДНК и рестрикционный анализ проводили согласно методам, описанным ранее [4].

Секвенирование плазмидных конструкций осуществляли на автоматическом секвенаторе AbiPrism 310 (“Applied Biosystems”, США) с использованием стандартных праймеров pUC/M13, T7-promoter и SP6 (“Promega”).

Продукт, полученный в результате амплификации геномной ДНК картофеля с использованием прямого и обратного праймеров, был клонирован в вектор pET-23, линеаризованный по сайту *Eco32.I*. Была отобрана рекомбинантная плаزمида pUK-18, содержащая фрагмент ДНК размером 587 п.н., включающая часть кодирую-

щей области гена *PKPII-B*, которая соответствует зрелому белку РКРІІ-В, содержащему в N-концевой части дополнительно семь аминокислотных остатков, входящих в состав пептида вакуолярного сортирования [1]. Плазмиду pUK-18 обрабатывали рестриктазами *NdeI* и *SacI*, сайты узнавания которых содержались, соответственно, в полилинкере вектора pUK18 и в прямом праймере. Полученный в результате фрагмент плазмиды был клонирован в экспрессионный вектор pET23a, расщепленный рестриктазами *NdeI* и *XhoI*. Итоговая плазмиды была обозначена pKT-B1.

Трансформацию *E. coli* BL21(DE3) экспрессионной плазмидой pKT-B1 осуществляли в соответствии со стандартным методом [16]. Бактерии, несущие плазмиду pKT-B1, культивировали в чашках на агаризованной среде LB (10 г/л пептон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 10 г/л NaCl), содержащей ампициллин в концентрации 100 мг/л и глюкозу в концентрации 0.4%. Полученные колонии бактерий, имеющие возраст не более 30 ч с момента трансформации, смывали 6 мл свежей среды LB и использовали полученный смыв для засева 2 колб, содержащих по 100 мл жидкой среды LB (10 г/л пептон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 20 г/л NaCl), содержащей ампициллин в концентрации 100 мг/л. Ферментация осуществлялась в условиях интенсивной аэрации при 30°C в течение еще 24 ч в отсутствие индуктора изопропилтиогалактозида. По окончании ферментации выращенную биомассу собирали центрифугированием и промывали физиологическим раствором для удаления остатков среды. Клетки ресуспензировали в 0.05 М трис-НСІ-буфере, рН 8.0, охлаждали до 0°C и дезинтегрировали с помощью ультразвука на Soniprep-150 (“MSE-Sanyo”, Великобритания–Япония). Полученную суспензию центрифугировали при 1500 g в течение 30 мин для отделения нерастворимой клеточной фракции, содержащей тельца включения. Собранную фракцию телец включения ресуспензировали в деионизованной воде и вторично осаждали в тех же условиях. Процедуру повторяли 2–5 раз.

Солюбилизацию белка осуществляли с помощью денатурирующего буфера (0.05 М трис-НСІ-буфер, рН 8.0, содержащем 7 М мочевины и 0.01 М ДТЭ) при 65°C в течение 1 ч. Затем раствор центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин. Осветленный супернатант (5 мл) наносили на колонку (2.5 × 30 см) с Mono Q (“Pharmacia”, Швеция), уравновешенным 0.05 М трис-НСІ-буфером, рН 8.0, содержащим 7 М мочевины. Количество целевого белка в препарате составляло от 10 до 50 мг. Связанный с сорбентом материал элюировали линейным градиентом повышающейся концентрации NaCl от 0 до 1 М в стартовом буфере. Фракции, содержащие целевой белок (1–2 мг/мл), объединяли.

Ренатурацию денатурированного белка проводили путем диализа против 0.05 М трис-НСl-буфера, рН 8.0, при 4°C в течение 96 ч с однократной сменой буфера. Затем полученную суспензию центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин. Супернатант, содержащий ренатурированный белок РКРІІ-В, наносили на колонку (2.5 × 30 см) с ДЭАЭ-ToyoPearl (“Toyo Soda”, Япония), уравновешенным 0.05 М трис-НСl-буфером, рН 8.0. Связавшийся с ионообменником белок элюировали линейным градиентом повышающейся концентрации NaCl от 0 до 1 М в стартовом буфере. Фракции, содержащие белок РКРІІ-В, объединяли, обессоливали и концентрировали ультрафильтрацией на ячейке Амикон (США) с мембраной UM-2, а затем лиофильно высушивали.

Диск-электрофорез в 20%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na и β-меркаптоэтанола (ДДС-ПААГ) проводили по Лэммли [17]. Гели окрашивали 0.1%-ным раствором кумасси R-250 в 25%-ном растворе этанола, содержащем 5% формальдегида.

Активность рекомбинантного белка РКРІІ-В оценивали по степени подавления активности соответствующих ферментов (трипсин, химотрипсин, субтилизин Карлсберг и папаин). Активность ферментов определяли по скорости гидролиза хромогенных субстратов: БАПА (для трипсина), СукГГФПА (для химотрипсина), КбзААЛПА (для субтилизина) и ПгФЛПА (для папаина) [18–21]. Концентрацию активных ферментов определяли титрованием активных центров: трипсина – *n*-нитрофенил-*n*'-гуанидинобензоатом [22] и химотрипсина – *N*-транс-циннамоилимидазолом [23].

Молекулярную массу комплексов ингибитора с ферментами определяли высоко эффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на колонке Bio Sep-S-200 (“Beckman Coulter”, США). Гель уравновешивали 0.02 М фосфатным буфером, рН 7.0, содержащим 0.1 М NaCl. Белки элюировали стартовым буфером.

Влияние белка на рост и развитие макроконидий гриба *Fusarium culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. и зооспор оомицета *P. infestans* изучали с помощью метода, описанного в работе [24]. Суспензию макроконидий гриба или зооспор оомицета (2000000 спор в 1 мл) получали, смывая их с поверхности 14-суточного мицелия, выросшего при 25°C на овсяно-агаровой среде с добавлением термостабильных белков картофеля. Количество проросших и лизированных макроконидий (зооспор) и длину гиф, образующихся при их прорастании, определяли в трехкратной повторности для каждой концентрации белка на микроскопе Laboval (Германия) при увеличении 120×. В качестве контроля использовали суспензию макроконидий (зооспор) без добавления РКРІІ-В.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате предварительного анализа клонов геномной ДНК картофеля была отобрана рекомбинантная плазмида рUK18, в составе которой присутствовал фрагмент ДНК размером 587 п.н. Этот фрагмент включал часть кодирующей области гена *PKPII-B*, которая соответствовала зрелому белку РКРІІ-В, содержащему в качестве *N*-концевой последовательности дополнительные остатки Met-Асп-Про-Иле-Гли-Лей-Асп-. Эта последовательность входит в состав консервативного пептида белка-предшественника, кодирующего вакуоль-распределяющий сигнал [1]. Плазмида рUK18 была использована для создания экспрессионной плазмиды рКТ-В1, кодирующей белок, содержащий в *N*-концевой части дополнительно девять аминокислотных остатков (рис. 1).

Ожидаемый продукт экспрессии рКТ-В1, представляющий собой рекомбинантный белок РКРІІ-В, был обнаружен в основном в тельцах включения и в меньшем количестве в растворимой фракции клеточных белков *E. coli* штамма BL21(DE3). Молекулярная масса полученного белка РКРІІ-В, определенная методом ДДС-ПААГ-электрофореза, имела значение около 25 кДа и совпадала с расчетной величиной, составлявшей 24.7 кДа [4]. В клетках контрольных бактерий, трансформированных вектором рЕТ23b, не содержащим вставки, белковый продукт с такой молекулярной массой не обнаруживался.

Нерастворимая фракция, содержащая тельца включения *E. coli*, была солибилизирована в денатурирующем буфере. Известно, что в процессе ренатурации белков *in vitro* может происходить как правильный, так и ошибочный фолдинг белковых молекул, а также их агрегация вследствие межмолекулярных взаимодействий [25]. Хотя в литературе имеются указания на то, что наличие посторонних примесей практически не влияет на фолдинг целевого белка [25], предварительные эксперименты показали, что присутствие небелковых примесей отрицательно сказывается на процессе ренатурации белка РКРІІ-В. В связи с этим денатурированные тельца включения были подвергнуты очистке от белковых и небелковых примесей. На рис. 2 приведены результаты выделения целевого белка методом ВЭЖХ на колонке с Mono Q при рН 8.0 в присутствии 7 М мочевины. По данным ДДС-ПААГ-электрофореза, компонент I содержал в основном белок РКРІІ-В и был практически отделен от примесей, присутствовавших в клеточном лизате *E. coli*. Выход денатурированного целевого белка РКРІІ-В составил 2 мг на 0.4 г биомассы.

Известно, что рефолдинг солибилизированных белков телец включения *E. coli* осуществляется либо путем быстрого разбавления раствора,

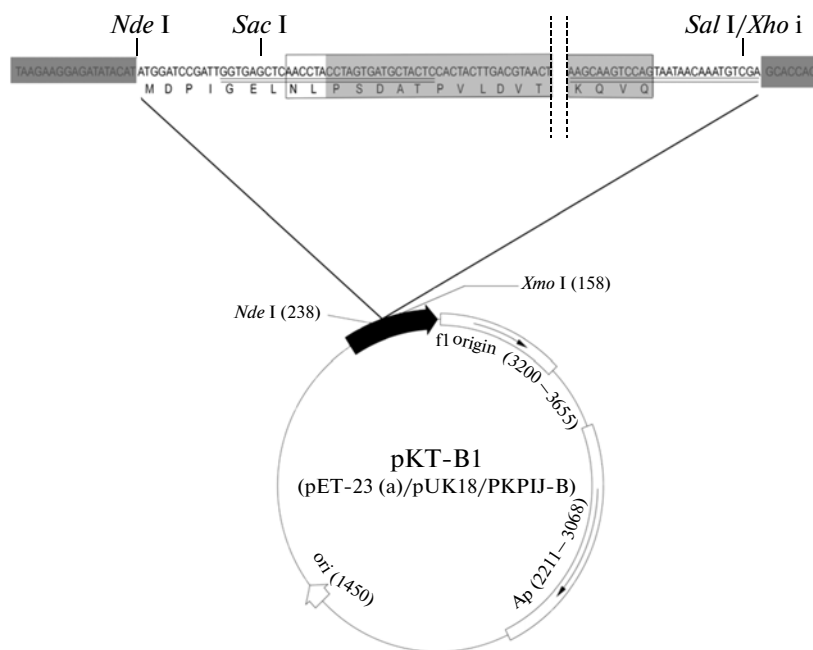


Рис. 1. Схема создания рекомбинантной плазмиды pKT-B1. Последовательность нуклеотидов вектора pET23a заштрихована темно-серым цветом, N- и С-концевые участки зрелого белка, кодируемого геном PKPIJ-B, — светло-серым; фрагмент прямого и обратного праймеров подчеркнут двойной линией, в рамку заключены N- и С-концевые области гена PKPIJ-B. Стрелками указаны сайты действия рестриктаз NdeI, SacI и SalI.

либо путем диализа, который обеспечивает плавное снижение концентрации денатурирующего агента. Правильный фолдинг белка при отсутствии межмолекулярной агрегации может происходить как в тех, так и в других условиях и зависит от свойств белка [25]. Это определяется только экспериментальным путем. В предварительных экспериментах было установлено, что фолдинг РКPIJ-B проходит с высокой эффективностью, как при быстром разбавлении денатурирующего раствора, так и при диализе. Основная масса бел-

ка РКPIJ-B была ренатурирована путем диализа против 0.05 М трис-НСl-буфера, рН 8.0.

Ренатурированный РКPIJ-B дополнительно очищали до гомогенности методом анионообменной FPLC-хроматографии на ДЭАЭ-ТоуоРearl при рН 8.0 (рис. 3). По данным ДДС-ПААГ-электрофореза компонент I-1, элюирующийся при концентрации NaCl 0.15 М, содержал гомогенный белок РКPIJ-B (рис. 4). На основании данных электрофореза можно также заключить,

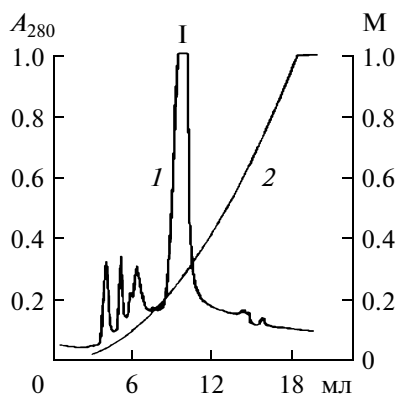


Рис. 2. ВЭЖХ на колонке с Mono Q белков, образующихся при денатурации телец включения: I — компонент, содержащий денатурированный рекомбинантный белок РКPIJ-B; 1 — A_{280} , 2 — NaCl, М.

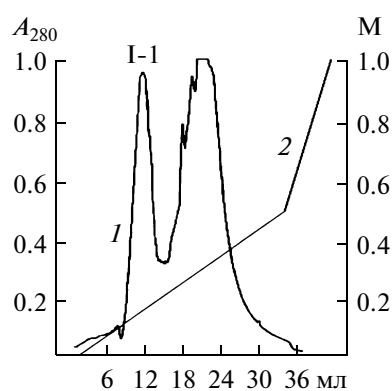


Рис. 3. ВЭЖХ компонента I на колонке с ДЭАЭ-ТоуоРearl.

I-1 — компонент, содержащий рекомбинантный белок РКPIJ-B; 1 — A_{280} , 2 — NaCl, М.

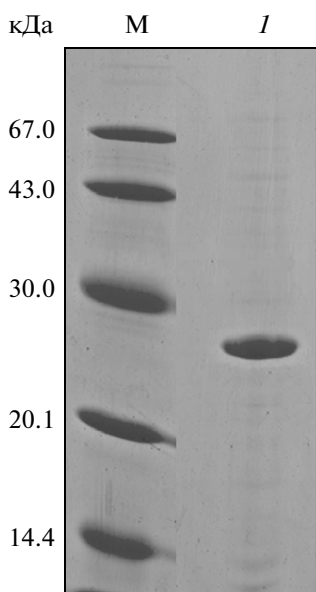


Рис. 4. ДДС-ПААГ-электрофорез компонента I-1, полученного после ВЭЖХ на колонке с ДЭАЭ-Toyo-pearl.

I – белок РКРІІ-В, М – белки-маркеры (сверху вниз): БСА, яичный альбумин, карбоангидраза, соевый ингибитор трипсина Кунитца, лактальбумин; значения молекулярных масс белков-маркеров, кДа.

что молекула рекомбинантного белка РКРІІ-В состоит из одной полипептидной цепи.

Результаты изучения влияния белка РКРІІ-В на активность трипсина и α -химотрипсина приведены на рис. 5. Видно, что белок эффективно подавлял активность химотрипсина и в несколько меньшей степени трипсина. Зависимость степени подавления активности химотрипсина от количества добавленного ингибитора сохраняла линейный характер до достижения 80%-ного ингибирования (рис. 5, кривая 1), а трипсина – 78%-го (рис. 5, кривая 2). Расчеты показали, что 1 моль РКРІІ-В реагировал стехиометрически с 1 молем, как химотрипсина, так и трипсина. В то же время белок РКРІІ-В очень слабо действовал на активность субтилизина Карлсберг и не подавлял активность цистеиновой протеиназы, папаина.

При ВЭЖХ на колонке Bio Sep-Sec-S-200 смесей, содержащих эквимоллярные количества рекомбинантного белка РКРІІ-В, α -химотрипсина и трипсина, элюировался только один тяжелый компонент с молекулярной массой 65 ± 1 кДа, представляющий собой, вероятнее всего, тройной комплекс ингибитора с ферментами, в котором с одной молекулой ингибитора связывались одновременно одна молекула α -химотрипсина и одна молекула трипсина. Это свидетельствует о том, что рекомбинантный белок является “дву-главым” ингибитором и содержит два независимо

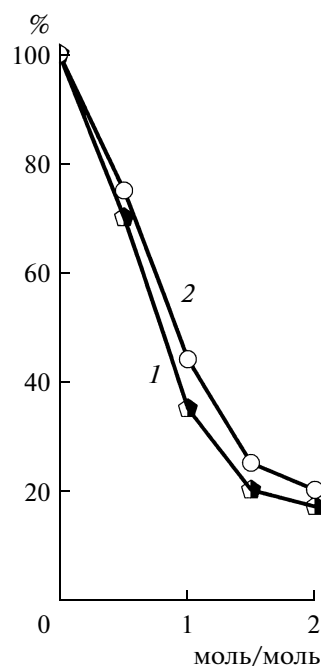


Рис. 5. Влияние рекомбинантного белка РКРІІ-В на активность химотрипсина (1) и трипсина (2).

Измеряли остаточную активность ферментов (% от исходной) при различных соотношениях ингибитор/фермент. В качестве субстратов использовали СукГГФПА (1) и БАПА (2).

действующих реактивных центра, ответственных за связывание каждой из этих протеиназ.

Таким образом, рекомбинантный белок РКРІІ-В и выделенный нами из клубней картофеля белок РКСІ [4] обладают одинаковым характером действия на протеиназы. Некоторое снижение активности белка РКРІІ-В по отношению к протеиназам может быть обусловлено наличием в N-концевой части его молекулы дополнительных аминокислотных остатков, которые были добавлены при конструировании экспрессионной плазмиды.

В предыдущей работе [3] было показано, что белок РКСІ, выделенный из клубней картофеля сорта Юбилей Жукова, угнетает рост и развитие двух фитопатогенных микроорганизмов: гриба *F. culmorum* и оомицета *P. infestans*, поражающих растения картофеля. Оказалось, что белок РКСІ слабее действовал на рост и развитие оомицета, чем гриба. В связи с этим представлялось интересным исследовать действие рекомбинантного белка РКРІІ-В на рост гиф и развитие макроконидии гриба *F. culmorum* и зооспор оомицета *P. infestans*. На рис. 6 представлены результаты этого исследования. Оказалось, что при добавлении 400 мкг белка РКРІІ-В длина растущих гиф гриба уменьшалась на 40% по сравнению с контролем (рис. 6а, кривая 1). При этом более чем 50% макроконидий подвергались повреждению (рис. 6а,

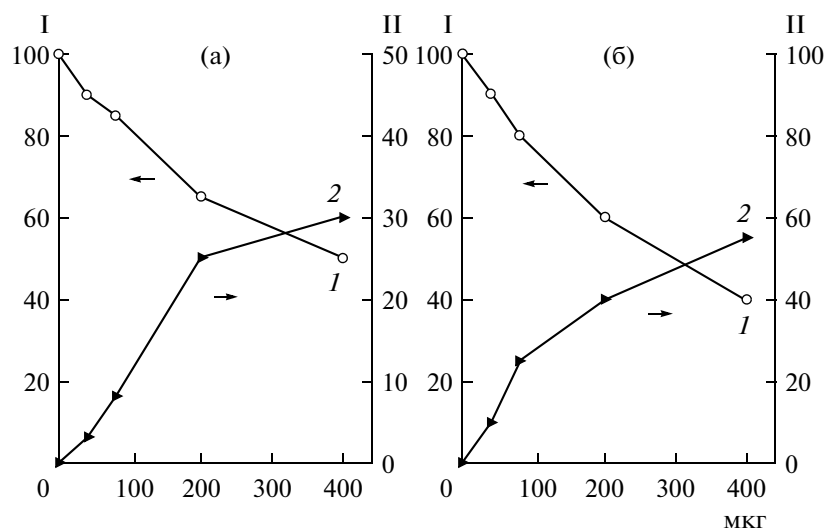


Рис. 6. Влияние рекомбинантного белка РКPIJ-B (мкг) на прорастание гиф и лизис макроконидий гриба *F. culmorum* (а) и зооспор оомицета *P. infestans* (б) 1 – размер гиф (шкала I, % от контроля), 2 – количество лизированных макроконидий или зооспор (шкала II, % от контроля). Представлены средние значения трех независимых экспериментов со стандартной ошибкой от 2 до 10%.

кривая 2). При той же концентрации белка РКPIJ-B длина гиф оомицета уменьшалась только на 20% (рис. 6б, кривая 1) и разрушению подвергались всего 30% его зооспор (рис. 6б, кривая 2). Таким образом, белок РКPIJ-B так же, как белок РКCI, присутствовавший в клубнях картофеля Юбилей Жукова [3], слабее действовал на рост и развитие оомицета, чем гриба.

Полученные результаты указывают на то, что методом гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli*, трансформированных плазмидой рКТ-В1, синтезировался белок РКPIJ-B с молекулярной массой около 25 кДа, молекула которого состоит из одной полипептидной цепи. Рекомбинантный белок РКPIJ-B действовал как эффективный ингибитор химотрипсина и трипсина, был способен образовывать тройные комплексы, в которых с одной молекулой ингибитора одновременно связывались два различных фермента, а также подавлял рост и развитие двух фитопатогенных микроорганизмов, поражающих растение картофеля. Это с большой степенью вероятности свидетельствует о том, что рекомбинантный белок РКPIJ-B идентичен белку РКCI, обнаруженному нами в клубнях картофеля сорта Юбилей Жукова [3, 4].

Следует отметить, что отсутствие или присутствие определенных аминокислотных остатков в первичной структуре определяет специфичность действия ингибиторов РКCI. В нашей предыдущей работе [4] была отмечена высокая изменчивость в последовательностях белков РКCI-В на участке, расположенном между остатками Цис147 и Цис164, которая согласуется с данными об их высокой функциональной значимости для молекулы ингибитора [7]. Мы предположили, что обра-

зование замен, расположенных на этом участке, происходит в результате независимых мутаций. Вполне вероятно, что полиморфизм генов *PKPIJ-B* является следствием адаптивной эволюции, направленной на защиту растений от фитопатогенных микроорганизмов и насекомых-вредителей. Большой набор вариантов генов белков-ингибиторов способен привести к экспрессии их новых изоформ, которые позволят противостоять адаптации фитопатогенов к ингибиторам. Можно предположить, что при активации гена *PKPIJ-B* в клубнях картофеля экспрессируется белок РКCI, обладающий токсичностью по отношению к фитопатогенам, который включается в защитную систему растения картофеля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ishikawa A., Ohta S., Matsuoka K., Hattori T., Nakamura K. // Plant Cell Physiol. 1994. V. 35. № 2. P. 303–312.
2. Heibges A., Glaczinski H., Ballvora A., Salamini F., Gebhardt C. // Mol. Gen. Genomics. 2003. V. 269. № 4. P. 526–534.
3. Ревина Т.А., Парфёнов И.А., Гвоздева Е.Л., Валуева Т.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 3. С. 265–271.
4. Valueva T.A., Parfenov I.A., Revina T.A., Morozkina E.V., Benevolensky S.V. // Plant Physiol. Biochem. 2012. V. 52. № 1. P. 83–90.
5. Сперанская А.С., Крилицына А.А., Полтрониери П., Фазано Л., Сантино А., Шевелев А.Б., Валуева Т.А. // Биохимия. 2005. Т. 70. № 3. С. 360–369.
6. Pouvreau L., Gruppen H., van Koningsveld G.A., van den Broek L.A.M., Voragen A.G.J. // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 17. P. 5001–5005.

7. Bauw G., Nielsen H.V., Emmersen J., Nielsen K.L., Jorgensen M., Welinder K.G. // FEBS J. 2006. V. 273. № 15. P. 3569–3584.
8. Heibges A., Salamini F., Gebhardt C. // Mol. Gen. Genom. 2003. V. 269. № 4. P. 535–541.
9. Jongsma M.A., Bolter C. // J. Insect. Physiol. V. 43. № 3. P. 885–895.
10. Валеева Т.А., Мосолов В.В. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1600–1606.
11. Cristeller J.T. // FEBS J. 2005. V. 272. № 22. P. 5710–5722.
12. Valueva T.A., Revina T.A., Kladnitskaya G.V., Mosolov V.V. // FEBS Lett. 1998. V. 426. № 1. P. 131–134.
13. Валеева Т.А., Ревина Т.А., Гвоздева Е.Л., Герасимова Н.Г., Озерецковская О.Л. // Биооргани. химия. 2003. Т. 29. № 5. С. 499–504.
14. Krapp A., Hoffman B., Schafer C., Stitt M. // Plant J. 1993. V. 3. № 6. P. 817–828.
15. Vieira J., Messin J. // Gene. 1991. V. 100. № 1. P. 184–194.
16. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982. V. 3. P. 507–520.
17. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
18. Kakade M.L., Simons N., Liener I.E. // Cereal Chem. 1969. V. 46. № 5. P. 518–526.
19. Bieth J., Wermuth C.G. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1973. V. 53. № 2. P. 383–390.
20. Люблинская Л.А., Якушева Л.Д., Степанов В.М. // Биооргани. химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 273–279.
21. Filippova I.Ju., Lysogorskaya E.N., Oksenoit E.S., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. // Anal. Biochem. 1984. V. 143. № 2. P. 203–297.
22. Shonbaum G.R., Lerner B., Bender M.Z. // Biol. Chem. 1961. V. 236. № 11. P. 2930–2935.
23. Chase T., Shaw E. // Meth. Enzymol. 1970. V. 19. P. 20–27.
24. Ревина Т.А., Герасимова Н.Г., Кладницкая Г.В., Чаленко Г.И., Валеева Т.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 1. С. 101–105.
25. Rudolph R., Lilie H. // FASEB J. 1996. V. 10. № 1. P. 49–56.

Heterologous Expression, Purification, and Properties of a Chymotrypsin Inhibitor Isolated from Potatoes

I. A. Parfenov, T. A. Revina, N. G. Gerasimova, G. V. Kladnitskaya, and T. A. Valueva

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

e-mail: valueva@inbi.ras.ru

Received May 16, 2012

Abstract—The *PKPIJ-B* gene encoding a chymotrypsin inhibitor from a subfamily of potato Kunitz-type proteinase inhibitors (PKPI) in potatoes (*Solanum tuberosum* L. cv. Yubilei Zhukova) was cloned into a pET23a vector and then expressed in *Escherichia coli*. The recombinant PKPIJ-B protein obtained in the inclusion bodies was denatured, purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) on Mono Q under denaturing conditions, and renatured. The renatured protein was additionally purified using HPLC on DEAE-ToyoPearl. The PKPIJ-B protein efficiently suppressed chymotrypsin activity, had a weaker effect on trypsin, and inhibited the growth and development of phytopathogenic microorganisms affecting potato plants.

УДК 579.852.11

ОСОБЕННОСТЬ КРИСТАЛЛООБРАЗОВАНИЯ У ПИГМЕНТООБРАЗУЮЩИХ КУЛЬТУР *Bacillus thuringiensis*

© 2013 г. Л. А. Чил-Акопян, А. А. Амбарцумян, А. Х. Чахалян

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА, Армения, Ереван, 0056

e-mail: arm_biotech@yahoo.com, anachakh@gmail.com

Поступила в редакцию 13.10.2011 г.

У ряда пигментообразующих культур *Bacillus thuringiensis* (ВТ) обнаружена прямая корреляция между розовой пигментацией колоний и образованием инсектицидных кристаллов – токсинов. Указанная закономерность впервые установлена нами у штаммов ВТ серотипов Н3, Н10, Н16. Беспигментные клоны этих серотипов кристаллов не образуют. У штаммов серотипа Н14, образующих овальные включения, эта закономерность не отмечена.

Выявленная корреляция позволяет дифференцировать кристаллообразующие колонии в культурах указанных сероваров по наличию пигментации. Предлагаемый способ может служить эффективным экспресс-методом выявления вирулентных клонов, что особенно важно при использовании этих штаммов для производства инсектицидных препаратов.

DOI: 10.7868/S0555109913010030

Как известно, инсектицидность культур ВТ обусловлена в основном наличием в клетках кристалловидных включений. Обнаружение этих включений обычно осуществляется микроскопически. Массовые исследования культур ВТ необходимы при хранении и репродукции штаммов, при отборе наиболее продуктивных штаммов для промышленного изготовления бактериальных инсектицидов, для оценки кристаллообразования у культур, применяемых в производстве, в исследованиях по экспериментальной изменчивости и других работах. Очевидно, что для таких работ возможность визуальной оценки кристаллообразования предпочтительнее микроскопических исследований отдельных колоний.

Отмеченное нами в ранних работах [1] свойство некоторых культур серотипа Н10 образовывать розовый пигмент разной интенсивности или его отсутствие впоследствии стало предметом более тщательного исследования. Обнаружено, что эти культуры отличаются также разной степенью продуцирования кристаллов и вирулентностью. При изучении явления потери кристаллообразования штаммами ВТ серотипа Н10 в процессе их ферментации в производстве бактериальных инсектицидных препаратов было установлено, что появившиеся беспигментные клоны не образуют кристалловидных токсинов.

Впервые розовый пигмент обнаружен Бейеринком в 1919 г. у дрожжей *Candida pulcherrima* и назван пульхерримином. Образуется пульхерримин также споровыми бактериями [2]. Свойство продуцировать розовый пигмент культурами

B. thuringiensis var. *alesti* установлено еще в 1959 г. [3]. Этот признак использован Тумановым [3], а затем де Баржак и Бонфуа [4, 5].

Проведенный нами ранее микроскопический анализ пигментных и беспигментных колоний ряда культур ВТ серотипов Н10 и Н16 позволил допустить существование определенной корреляции между пигментацией и образованием кристалловидных дельта-эндотоксинов у исследованных культур. Последующие исследования позволили подтвердить существование отмеченной корреляции у некоторых культур ВТ серотипов Н10 и Н16 [6]. Других сведений о корреляции розовой пигментации с кристаллообразованием у культур ВТ в литературе нами не обнаружено.

Цель работы – изучение корреляции образования дельта-эндотоксина с пигментацией колоний у широкого спектра штаммов ВТ разных сероваров, продуцирующих розовый пигмент.

МЕТОДИКА

Материалом для исследований служили выделенные и идентифицированные нами ранее пигментообразующие штаммы серотипов Н10 и Н16 [7], а также новые пигментообразующие штаммы этих серотипов и серотипов Н3 и Н14. Все полученные штаммы включены в “Каталог культур микроорганизмов” Республиканского центра депонирования микробов (РЦДМ) НАН Армении, ранее Институт микробиологии АН Армении (ИНМИА). В качестве эталонных использованы штаммы, впервые выделенные нами, а также

Таблица 1. Пигментация и кристаллообразование у коллекционных и эталонных штаммов *B. thuringiensis*

Серотип	Серовар	№ штамма по ИНМИА	Пигментация	Кристаллообразование
Н3	<i>alesti</i>	890*, 1020*, 1116	+	+
		741, 743, 744, 1012, 1014, 1021	–	–
	<i>kurstaki</i>	1093*, 1094, 1095	–	+
Н10	<i>caucasicus**</i>	805**, 811, 837	+	+
	<i>darmstadiensis</i>	1075*	–	+
Н14	<i>israelensis</i>	1125*, 874*	+	+
Н16	<i>indiana</i>	1200*	–	+
		827*	+	+

Примечание к табл. 1, 3, 4.

* Коллекционные штаммы и впервые описанные нами штаммы, использованные в работе в качестве эталонных.

** Описан в 1968 г. как *B. thuringiensis* var. *caucasicus* [8–10]. Включен в список инвалидных наименований [11]. В настоящей работе для дифференциации от беспигментных штаммов серовара *darmstadiensis* [12] именуется сероваром *caucasicus*.

Таблица 2. Количество штаммов и колоний пигментообразующих серотипов *B. thuringiensis*, исследованных в работе

Серотип	Количество исследованных штаммов и колоний				
	всего штаммов	пигментация			число исследованных колоний
		П ⁺	П [–]	смесь колоний	
Н3	17	2	13	2	154
Н10	44	12	12	20	405
Н14	22	20	2	–	63
Н16	12	9	3	–	48
Всего	95	43	31	22	670

культуры из мировых коллекций, хранящиеся в РЦДМ [7]. Список исследованных эталонных штаммов приведен в табл. 1.

Параллельно с пигментными штаммами *alesti*, *caucasicus* и *israelensis* исследовались беспигментные культуры этих серотипов на наличие в них единичных пигментных клонов (табл. 2).

Образование пигмента этими штаммами проверяли на модифицированной питательной среде Беттхера [13]. Состав среды: 10%-ная эмульсия желтка куриного яйца в физиологическом растворе с 3% агар-агара. Желток из асептически вскрытого яйца добавляли в растопленную и остуженную до 40–50°C питательную среду. Тщательно перемешанную среду разливали в чашки Петри. Рассев исследуемых культур осуществляли с расчетом получения отдельных колоний. После двухсуточного инкубирования при 30°C из посева каждого исходного штамма выделяли

беспигментные колонии и колонии с розовой окраской для последующего их изучения. Из отдельных колоний готовились мазки, окрашивались карболовым фуксином Циля [14]. Препараты изучали на наличие энтомоцидных кристаллов с помощью микроскопа “БИОЛАМ ЛОМО” (Россия) в фазовом контрасте. Серотипирование выделенных колоний осуществляли Н-антисыворотками, полученными из Института Пастера в Париже, а также приготовленной нами антисывороткой к штамму ИНМИА 811 серовара *caucasicus*, по известной методике [4].

Выделенные из одной культуры П⁺ и П[–] колонии исследовали по некоторым физиолого-биохимическим тестам, составляющим ключ для дифференциации и идентификации ВТ: образование ацетилметилкарбинола (АМК) и уреазы; лецитинвителлиновая реакция; ферментация маннозы, сахарозы, салицина, целлобиозы; гид-

Таблица 3. Корреляция образования пигмента и кристалловидных токсинов у коллекционных и выделенных нами П⁺ культур *B. thuringiensis* серотипа НЗ

Серovar	Окраска колоний исходного штамма	Исследованы штаммы			Состав исследованных колоний			
		число штаммов	№ по ИНМИА	число колоний	П ⁺		П ⁻	
					К ⁺	К ⁻	К ⁺	К ⁻
<i>alesti</i>	П ⁺	2	1020*, 890*	5	5	—	—	—
	Смесь П ⁺ и П ⁻	2	1014, 1116	16	6	—	—	10
	П ⁻	5	741, 743, 744, 1012, 1021	51	—	—	—	51
<i>kurstaki</i>	П ⁻	3	1093*, 1094, 1095	18	—	—	18	—
подобные <i>kurstaki</i>	П ⁻	5	683, 710, 1105, 1106, 1114	56	—	—	11	45

Таблица 4. Корреляция образования пигмента и кристалловидных токсинов у коллекционных и выделенных П⁺ культур *B. thuringiensis* серотипа Н10

Серovar	Окраска колоний исходного штамма	Исследованы штаммы			Характеристика колоний			
		число штаммов	№ по ИНМИА	число колоний	П ⁺		П ⁻	
					К ⁺	К ⁻	К ⁺	К ⁻
<i>caucasicus</i>	П ⁺	12	837, 839, 841, 844, 853, 876, 880, 889, 893, 896, 917, 1096-3	37	37	—	—	—
	Смесь П ⁺ и П ⁻	20	805**, 811, 831, 871, 873, 875, 879, 884, 887, 888, 891, 895, 905, 914, 915, 918, 919, 921, 924, 1113	193	96	—	—	97
<i>darmstadiensis</i>	П ⁻	1	1075*	5	—	—	5	—
подобные <i>darmstadiensis</i>	П ⁻	6	911, 926, 927, 928, 939, 957	15	—	—	10	5
		5	641, 825, 828, 925, 950	155	—	—	—	155

ролиз крахмала, эскулина и желатина [4, 15]. Выделение плазмидной ДНК и электрофорез проводили по известным методикам [16].

В работе использовали акриламид, этидиум бромид, ЭДТА производства “Serva” (Германия). Все остальные реактивы были производства фирмы “Реахим” (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделенные нами новые культуры ВТ серотипов НЗ, Н10, Н14, Н16 – продуценты розового пигмента, изучали на наличие пигментных (П⁺) и беспигментных (П⁻) колоний и сравнивали с коллекционными штаммами, принятыми нами в качестве эталонных для указанных серотипов.

В результате этих работ установлено значительное разнообразие штаммов по составу колоний в культурах разных сероваров. У одних штаммов в культуре обнаружены только розовые колонии или

колонии без пигмента, у других – колонии обоих типов. Всего проанализировано 670 колоний 95 штаммов (табл. 2).

В табл. 3 представлены результаты микроскопического анализа отдельных колоний штаммов ВТ серотипа НЗ. Эталонные штаммы 1020 и 890 и не эталонные 1014, 1116 серовара *alesti* соответствовали описанию, т.е. образовывали розовый пигмент и характеризовались кристаллообразованием (К⁺) [17]. Выделенные нами беспигментные варианты этих штаммов кристаллов не образовывали (К⁻).

Штаммы *alesti* из разных коллекций, утратившие в результате длительного хранения способность образовывать пигмент, не содержали кристаллов.

Коллекционные штаммы *kurstaki* 1093, 1094 и 1095 также соответствовали их описанию – П⁻К⁺ [18]. Группа штаммов “подобные *kurstaki*” отли-

Таблица 5. Корреляция образования пигмента и кристаллоподобных токсинов у коллекционных и выделенных нами П⁺ культур *B. thuringiensis* серотипов Н16 и Н14

Серо-тип	Серовар	Окраска колоний исходного штамма	Исследованы штаммы			Состав исследованных колоний			
			число штаммов	№ по ИНМИА	число колоний	П ⁺		П ⁻	
						К ⁺	К ⁻	К ⁺	К ⁻
Н16	<i>indiana</i>	П ⁻	3	1200*	14	–	–	14	–
				695, 716	10	–	–	–	10
	Подобные <i>indiana</i>	П ⁺	9	32, 43, 827*, 848, 854, 855, 962, 881, 903	25	25	–	–	–
Н14	<i>israelensis</i>	П ⁺	1	1125*	20	10	10	–	–
			11	6, 644, 685, 713, 858, 874*, 912, 913, 1096-2, 1109-1, 1111	22	22	–	–	–
			8	600, 619, 921, 622, 630, 732, 733, 899	16	–	16	–	–
		П ⁻	2	848, 762	5	–	–	–	5

чалась содержанием колоний с кристаллами и без кристаллов при отсутствии пигментации. Наименование “подобные” связано с тем, что хотя дополнительный антиген у этих штаммов не определялся, по отсутствию пигмента эти штаммы близки к *kurstaki*.

Полученные при изучении штаммов серотипа Н3 результаты подтвердили корреляцию исследуемых признаков, обнаруженную у штаммов серовара *alesti*, образующих пигмент: кристаллы обнаружены только у пигментных клонов.

Штаммы серотипа Н10 так же, как и штаммы серотипа Н3, состоят из двух групп: П⁺ и П⁻ (табл. 4).

Как видно из табл. 4, большинство отдельных колоний из 32 выделенных и изученных нами штаммов серовара *caucasicus*, образуют пигмент и инсектицидные кристаллы. Однако в культуре этих штаммов обнаруживаются также клоны без пигмента, которые не имеют кристаллов. Культуры остальных штаммов, которые по отсутствию пигмента и ряду других свойств ближе к серовару *darmstadiensis* и обозначены как “подобные”, состоят из беспигментных колоний с кристаллами, аналогично эталонному штамму серовара *darmstadiensis* ИНМИА 1075, хотя обнаруживаются также клоны без кристаллов. Как и в беспигментных культурах сероваров *kurstaki* и *darmstadiensis*, пигментные клоны не выявляются.

Следовательно, для пигментообразующих штаммов серотипа Н10 так же, как и серотипа Н3, характерна корреляция признаков П⁺ и К⁺.

У типовых штаммов серовара *indiana* (Н16), по описанию авторов [19], а также у коллекционного штамма 1200 пигментация отсутствует при нормальном кристаллообразовании (табл. 5).

У двух беспигментных штаммов (695 и 716) этого серовара из нашей коллекции кристаллы не образуются. В отличие от них, описанные нами ранее представители серотипа Н16, в том числе эталонный штамм ИНМИА 827, продуцируют пигмент [7, 10]. При этом, исследованные пигментные колонии, выделенные из 9 штаммов этого серотипа, содержали кристаллы, т.е. у этих штаммов имела место корреляция пигментации и наличия кристаллов. Беспигментных колоний в рассевах указанных штаммов не обнаружено.

Таким образом, исследования пигментообразующих штаммов трех серотипов (Н3, Н10 и Н16) показали: как правило, если колония изучаемой культуры пигментирована, то ее клетки образуют ромбовидные или многогранные кристаллы токсинов. При отсутствии пигментации кристаллы также отсутствуют.

Штаммы серовара *israelensis* (Н14), в том числе эталонные штаммы ИНМИА 874 и коллекционный ИНМИА 1125 [20], также характеризуются присутствием пигмента (табл. 5). Только два штамма (848, 762) оказались П⁻К⁻. У 19 исследованных пигментных штаммов кристаллы выявлены только у 11. То есть, описанная закономерность корреляции П⁺ и К⁺, установленная для предыдущих трех сероваров, образующих ромбовидные и многогранные кристаллы, по-видимо-

Таблица 6. Физиолого-биохимическая характеристика П⁺К⁺ и П⁻К⁻ штаммов *B. thuringiensis* серовара *caucasicus*

№ штамма по ИНМИА	Продуцирование				Ферментация				Гидролиз		
	пигмент	АМК	лецитиназа	уреаза	сахароза	манноза	салицин	целлобиоза	крахмал	желатин	эскулин
831, 837, 853, 873, 879, 887, 891, 895, 905, 926, 939, 1113	+	+	+++	-	-	-	±	++	++	++	++
	-	+	+++	-	-	-	±	++	++	+++	++
811, 918, 924	+	+	+++	-	-	-	±	++	++	++	++
	-	+	+++	-	+++	-	±	++	++	+++	++
871	+	+	+++	-	+	-	±	++	++	++	++
	-	+	+++	-	+++	-	±	++	++	+++	++
875	+	+	+++	-	+++	-	±	++	++	++	++
	-	+	+++	-	+++	-	±	±	++	+++	++
884, 921	+	+	+++	-	-	-	±	++	++	++	++
	-	+	+++	-	-	-	±	++	++	+++	-
888	+	+	+++	-	-	-	+	++	++	++	++
	-	+	+++	-	+++	-	-	++	++	+++	++
914, 915	+	+	+++	-	++	-	±	++	++	++	++
	-	+	+++	-	+++	-	±	++	++	+++	++
919	+	+	+++	-	+	-	±	++	++	++	++
	-	+	+++	-	+++	-	±	++	++	+++	++
926	+	+	+++	-	-	-	±	++	++	++	-
	-	+	+++	-	-	-	±	++	++	+++	+
928	+	+	+++	-	-	-	±	++	++	++	-
	-	+	+++	-	++	-	±	++	++	+++	++
950	+	+	+++	-	+++	-	+	++	++	++	++
	-	+	+++	-	+++	-	+	++	++	+++	++

му, не распространяется на штаммы серовара *israelensis*, для которых характерными являются сферические параспоральные включения.

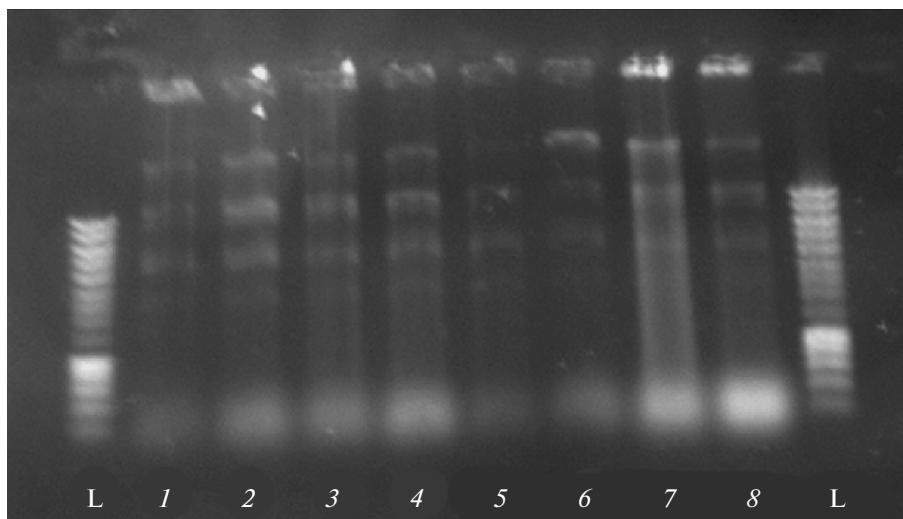
Поскольку серологические свойства штаммов являются основным дифференцирующим признаком для ВТ [21], выделенные из штаммов сероваров *alesti* и *caucasicus* П⁻К⁻ клоны были серотипированы антисыворотками к Н-антигенам типовых культур. Положительная реакция свидетельствовала об их гомологичности, а также исключала вероятность присутствия в пигментнообразующих культурах колоний *B. cereus* (П⁻К⁻) постороннего происхождения.

Идентичность указанных клонов была дополнительно подтверждена физиолого-биохимическими диагностическими исследованиями по 10 признакам. В табл. 6 обобщены данные сравнительного изучения П⁺ и П⁻ клонов культур серовара *caucasicus* (Н10).

Как видно из табл. 6, изученные клоны П⁻ по большинству признаков идентичны исходным П⁺. Некоторые различия наблюдаются лишь в усвоении сахарозы и эскулина. Основное отличие – наличие или отсутствие пигмента и кристаллов, по-видимому, является результатом внутриштаммовой изменчивости.

Вопросами внутриштаммовой изменчивости и вирулентности энтомопатогенных бактерий ВТ занимались еще в ранние годы развития промышленного производства и применения бактериальных инсектицидных препаратов [22, 23]. На культурах разных серотипов (Н1, Н4 и др.) была показана связь морфологии колоний со споро- и токсинообразованием [24, 25].

В настоящей работе выявлена корреляция между образованием розового пигмента и кристаллов δ-эндотоксина. Установлено, что эта особенность свойственна штаммам серотипов Н3, Н10 и Н16, продуцирующих ромбовидные и не-



Электрофореграмма плазмидных ДНК штаммов *B. thuringiensis*.

1 – 811 П⁺; 2 – 811 П⁻; 3 – 890 П⁺; 4 – 890 П⁻; 5 – 853 П⁺; 6 – 853 П⁻; 7 – 888 П⁺; 8 – 888 П⁻. L – маркеры молекулярных масс “EuroGenTec” (200–10000 п.о.).

определенной формы кристаллы, и не характерна для штаммов серотипа Н14, образующих кристаллы сферической формы. В культурах этого серотипа обнаруживаются как варианты П⁺К⁺, так и П⁺К⁻.

Одновременная потеря способности образовывать кристаллы и пигмент могла быть следствием элиминации плазмид. Однако изучение плазмидного состава некоторых штаммов ВТ серовара *caucasicus* (Н10) не выявило различий у П⁺К⁺ и выделенных из них П⁻К⁻ штаммов (рисунок).

По-видимому, в случае исследованных нами штаммов одновременная потеря признаков кристаллообразования и пигментации не связана с изменением генетического материала, а, как известно, [26–28], является следствием внутрштаммовой диссоциации.

Во всех случаях корреляция между образованием кристаллов δ-эндотоксина и розового пигмента, установленная в настоящей работе для энтомопатогенных штаммов ряда сероваров ВТ, может быть использована в исследованиях по экспериментальной изменчивости, служить критерием сохранения их активности при длительном хранении и эффективным средством отбора вирулентных клеток из популяций культур, что особенно важно при применении этих штаммов для производства инсектицидных препаратов.

Прикладное значение выявленной закономерности ранее было оценено нами после успешного применения разработанного подхода при производстве бактериального препарата БИП с использованием выделенного нами штамма 844 [7]. Исходя из опыта этой работы,

мы полагаем, что изучение других энтомопатогенных пигментообразующих штаммов на предмет выявления установленной нами корреляции, может быть полезно с точки зрения повышения эффективности производств, использующих эти штаммы, для получения инсектицидных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чил-Акопян Л.А., Африкян Э.К., Исмаилова А.Ю., Киракосян И.А., Пучинян Л.П., Чилингарян К.О. // Вопросы микробиологии V(XV). Ереван: Изд-во АН Арм ССР, 1972. С. 203–228.
2. Феофилова Е.П. Пигменты микроорганизмов. М.: Наука, 1974. 218 с.
3. Toumanoff C., Le Coroller J. // Ann. Inst. Paster. 1959. V. 96. P. 680–688.
4. de Varjas H., Bonnefoi A. // Entomophaga. 1962. V. 7. № 1. P. 5–31.
5. de Varjas H., Bonnefoi A. // J. Invertebr. Pathol. 1968. V. 11. № 3. P. 335–347.
6. Чил-Акопян Л.А., Чарчян С.З. А.с. № 927854 // Б. И. 1982. № 18.
7. Каталог культур микроорганизмов / Ред. Э.Г. Африкян, А.А. Хачатурян. Ереван: Гитутюн, 1996. 260 с.
8. Африкян Э.К., Чил-Акопян Л.А. // ДАН Арм. ССР. 1968. Т. 47. № 4. С. 227–231.
9. Зурабова Э.Р., Рыжкова А.С., Дубинина Т.П. // Биол. журн. Армении. 1980. Т. 33. № 4. С. 374–378.
10. Африкян Э.К., Чил-Акопян Л.А. // Биол. журн. Армении. 1980. Т. 33. № 4. С. 355–365.
11. Synonyms and Dated Names (Invalid for Bacteria), www.vkm.ru/catalog/pdf/synonyms.pdf.

12. Krieg A., de Barjac H., Bonnefoi A. // J. Invertebr. Pathol. 1968. V. 10. № 2. P. 428–430.
13. Беммхер К. // Микробиология. 1961. Т. 30. № 4. С. 673–678.
14. Smirnoff W.A. // J. Insect Pathol. 1962. V. 4. № 3. 384 p.
15. De Barjac H., Bonnefoi A. // Entomophaga. 1990. V. 35. № 2. P. 233–240.
16. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor laboratory. 1982. 545 p.
17. Toumanoff C., Vago C. // C.R. Acad. Sci. 1951. V. 233. № 23. P. 1504–1506.
18. De Barjac H., Lemille F. // J. Invertebr. Pathol. 1970. V. 15. № 1. P. 139–140.
19. De Lucca A.J., Simonson J., Larson A. // J. Invertebr. Pathol. 1979. V. 34. P. 323–324.
20. De Barjac H. // Entomophaga. 1978. V. 21. № 4. P. 309–319.
21. Lecadet M.M., Frachon E., Cosmao Dumanoir V., Ripouteau H., Hamon S., Laurent P., Thiéry I. // J. Appl. Microbiol. 1999. V. 86. № 4. P. 660–672.
22. Талалаев Е.В. // Микроорганизмы в защите растений от вредных насекомых. Иркутск: Изд-во ИГУ, 1978. С. 3–11.
23. Барайшук Г.В. // Биология микроорганизмов и их использование в народном хозяйстве. Иркутск: Изд-во ИГУ, 1980. С. 100–105.
24. Бурцева Л.И., Штерниис М.В., Калмыкова Г.В. // Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / Ред. В.В. Глупова. М.: Круглый год, 2001. С. 124–156.
25. Секерина О.А., Чемерилова В.И. // Микробиология. 2003. Т. 72. № 5. С. 689–694.
26. Головлев Е.Л. // Микробиология. 1998. Т. 67. № 2. С. 149–155.
27. Дорошенко Е.В., Лойко Н.Г., Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Горнова И.Б., Климанова Е.В., Эль-Регистан Г.И. // Микробиология. 2001. Т. 70. № 6. С. 811–819.
28. Чемерилова В.И., Секерина О.А., Талалаева Г.Б. // Микробиология. 2007. Т. 76. № 4. С. 507–514.

Crystal Formation Peculiarities in Pigmented Cultures of *Bacillus thuringiensis*

L. A. Chil-Hakobyan, A. A. Hambardzumyan, and A. Kh. Chakhalyan

SPC Arm biotechnology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia, Yerevan, 0056 Armenia
e-mail: arm_biotech@yahoo.com, anachakh@gmail.com

Received October 13, 2011

Abstract—A direct correlation has been established between pink-colored pigmentation and the production of insecticide crystals (toxins) for some *Bacillus thuringiensis* (BT) pigmented cultures. This regularity was for the first time determined by us for BT strains of the H3, H10, and H16 serotype. Pigment-free clones of these serotypes do not produce crystals. A correlation was not observed in the case of H14 serotype strains with oval inclusions. The revealed correlation makes it possible to distinguish crystal-yielding colonies in cultures of the above-mentioned serotypes by the availability of pigmentation. This method can serve as an effective express method for the detection of virulent clones, which is especially important if these strains are used for obtaining insecticide preparations.

УДК 582.28

ГИДРАТАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА МИЦЕЛИЯ ГРИБОВ И СОДЕРЖАНИЕ β -ГЛЮКАНА

© 2013 г. М. В. Киянко*, Р. С. Канел**, В. Людеманн**, Г. Позе**, Дж. Р. Вагнер**

*Национальный университет Кильмес, Буэнос-Айрес, 1876, Аргентина

**Национальный научно-исследовательский совет, Буэнос-Айрес, 1033, Аргентина

e-mail: vkyanko@gmail.com

Поступила в редакцию 14.02.2012 г.

Выделены и идентифицированы мицелиальные грибы из различных источников для исследования свойств пищевых волокон мицелия и содержания β -глюкана. Изучена способность мицелия к поглощению и удерживанию воды. Содержание пищевых волокон в грибах варьировало в пределах 16–53%, самые высокие значения были получены для родов *Paecilomyces* и *Penicillium*, что соответствовало более высокому содержанию в них β -глюкана (24 и 17% соответственно). Эти показатели значительно выше ранее опубликованных для базидиомицетов и дрожжей. Мицелий грибов с высокой водоудерживающей способностью обладал также и большей способностью к поглощению воды. Мицелий *Paecilomyces variotii* и *Penicillium nalgiovense* обладали лучшими гидратационными свойствами, высушенный мицелий в значительной степени терял способность к удерживанию воды (на 75%). Полученные результаты вносят вклад в исследование новых нетрадиционных ингредиентов с высоким содержанием белка и β -глюкана. Использование высушенного мицелия в качестве таких добавок может изменять водоудерживающие свойства пищевых систем.

DOI: 10.7868/S055510991301008X

Грибы были частью рациона человека на протяжении тысяч лет, в том числе в составе ферментированных продуктов, получаемых с помощью дрожжей, которые используются в хлебопечении, а также при производстве различных напитков. Другие известные продукты, приготовленные с помощью мицелиальных грибов, — это синие и белые сыры, колбасы, темпе и мисо [1, 2].

Недостаток животного белка вызвал интерес к поиску подходящих микробных источников для замены обычных пищевых белков [3]. Микробные белки по своим питательным свойствам успешно конкурируют с животными. Существует множество работ по использованию одноклеточных грибов в качестве пищевых добавок, но недостаточно по использованию мицелиальных грибов для этой цели [4]. Грибы могут применяться как пищевые добавки, поскольку практически не содержат холестерин, имеют высокое содержание белка, в состав которого входят все незаменимые аминокислоты [5]. Однако в настоящее время существует большое количество источников растительного белка, представленных в изобилии на рынке по конкурентным ценам, поэтому микробные продукты питания в 21 веке не могут претендовать на рыночный успех на основании только высокого содержания этого компонента. Такие продукты должны иметь дополнительные качества, например пробиотические или быть техно-

логически более доступными, обладать особыми реологическими свойствами. Примером может служить микобелок Quorn, полученный из *Fusarium venenatum*. Этот единственный продукт, содержащий грибной белок, в котором волокна делают конечный продукт похожим на мясо или рыбу, что является преимуществом по сравнению с соевым белком и часто рассматривается как “замена мяса”. В настоящее время его продажи в Европе растут, продукт также распространяется и в США [6, 7]. С другой стороны, съедобные грибы являются потенциальным источником пищевых волокон, так как в состав грибных клеточных стенок входят хитин и другие гемицеллюлозы, маннаны, и β -глюкан. Последние привлекают особое внимание, так как обладают биологически активными и лекарственными свойствами, такими как: иммуностимулирующие, противовоспалительные, антибактериальные, противовирусные, противоопухолевые, радиозащитные и ранозаживляющие, а также способностью снижать уровень холестерина [8, 9]. В работе Манзи [10] были исследованы разные виды грибов и обнаружены значительные колебания в содержании β -глюкана (от 0.22 до 0.53 г/100 г сухого вещества). Следует отметить, что в настоящее время мало сведений о содержании этого компонента в мицелии различных грибов.

Благодаря структуре мицелия и высокому содержанию белков и полисахаридов [7, 11], грибы

можно использовать в пищевой промышленности в качестве ингредиентов пищи, которые обладают такими функциональными свойствами, как способность к водопоглощению и влагоудерживанию.

Водопоглощающая способность (ВПС) характеризуется способностью материала поглощать воду при контакте с увлажненной поверхностью. Водоудерживающая способность (ВУС) характеризует способность увлажненного материала удерживать воду при воздействии приложенной внешней силы, например, центробежной, силы тяжести или сжатия. Показатели ВПС и ВУС весьма важны для характеристики компонентов пищи [12].

Цель работы – выделение и идентификация мицелиальных грибов из различных источников для изучения содержания пищевых волокон и β -глюкана, а также исследование ВПС и ВУС мицелия.

МЕТОДИКА

Нетоксичные гиалиновые грибы (37 штаммов) были выделены из злаков и овощей и идентифицированы в соответствии с определителями Самсома с соавт. [13] и Питта и Хокинга [14]. Токсичность грибов была протестирована по методике с *Artemia salina* [15]. В качестве положительного контроля токсичности были использованы *Fusarium graminearum* NRRL 22198, а в качестве отрицательного – *F. graminearum* 3/4 NRRL 26139 (Quorn™). Эти контрольные штаммы были любезно предоставлены Керри О'Доннелл (США, Министерство сельского хозяйства США).

Изолированные штаммы грибов принадлежали к родам *Paecilomyces* [5], *Fusarium* [8], *Mucor* [6], *Absidia* [3], *Rhizopus* [3], *Trichoderma* [3], *Aspergillus* [3] and *Penicillium* [7]. Культуры выращивали в жидкой среде, содержащей 20 г/л дрожжевого экстракта и 40 г/л сахарозы, при 25°C и скорости перемешивания 135 об./мин в течение 7 сут после инокуляции от 1×10^5 конидий/мл.

Образцы мицелия собирали на вакуумном фильтре, используя фильтр № 1 фирмы “Watman” (Англия), дважды промывали дистиллированной водой, сушили при температуре 50°C в печи с циркулирующим потоком воздуха до достижения образцами постоянной массы, после чего измельчали и просеивали через сита размером 0.5 мм. Высушенный мицелий анализировали на содержание белка [16], общее содержание клетчатки (ОСК) [17, 18], РНК [19] и содержание β -глюкана.

ОСК определяли методом АОАС, с использованием коммерческого набора Megazim ТМ (Ирландия). АОАС – ферментативно-гравиметрический метод включал несколько этапов: порцию сухих мицелиальных грибов (1 г сухого вещества)

подвергали воздействию 2 амилаз: термостабильной α -амилазы (Megazim cat. № E-BLAAM, 10000 Е/мл по растворимому крахмалу) в течение 15 мин на кипящей водяной бане, затем амилогликозидазы (Megazim cat. № E-AMGDF, 3300 Е/мл по растворимому крахмалу) 30 мин при 60°C для удаления гликогена и очищенной протеиназы (Megazim cat. № E-BSPRT, 350 Е/мл по тирозину) в течение 30 мин при 60°C для растворения белков. После осаждения этанолом нерастворимый осадок был отфильтрован, высушен и взвешен.

Для определения β -глюкана использовали коммерческий набор Megazim ТМ (Ирландия). Высушенный мицелий растворяли в 10 н. соляной кислоте, затем гидролизовали 1.3 н. HCl при 100°C в течение 2 ч. На следующем этапе проводили ферментативный гидролиз: смесь инкубировали с 0.1 мл высокоочищенной экзо-1,3- β -глюканазы (20.0 Е/мл) и β -глюкозидазой (4.0 Е/мл) при 40°C в течение 60 мин. Образовавшееся количество D-глюкозы измеряли при 510 нм по методу, описанному в работе [20].

Были также определены ВПС и ВУС. ВПС измеряли в расчете на сухой мицелий, ВУС на увлажненный мицелий (до сушки) и на сухой. Для определения ВУС 100 мг образца гомогенизировали в 9 мл воды на орбитальном шейкере 2 ч при 100 об./мин, после чего центрифугировали 30 мин (на 800 г), полученный осадок взвешивали. Кинетика водопоглощения была измерена с использованием оборудования Бауманн для 50 мг образца [21]. Измеряли максимальное количество поглощенной воды (ВПС) и необходимое для этого время. ВПС и ВУС выражали в г воды/г сухого вещества. Одновременно анализировали также образцы сухой нежирной говядины, *Agaricus bisporus* и коммерческого соевого белка (высушенный при температуре 50°C до постоянной массы) в качестве контроля. Образцы были высушены, как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице приведены основные изученные компоненты мицелиальных грибов. Содержание белка в пределах 30–47% было самым высоким у представителей рода *Rhizopus*, хотя значительная внутривидовая изменчивость наблюдалась во всех родах. Содержание РНК было в пределах 3.6–6.2%, что согласовывалось со значениями (2.5–6.0%), полученными ранее для грибов [4].

Величина ОСК варьировала в пределах 16.3–53.3%, что также согласовывалось с ранее опубликованными данными для съедобных грибов и дрожжей [22–25]. Наиболее высокие значения были получены для мицелия *Paecilomyces* и *Penicillium*, что коррелирует также с более высоким содержанием в них β -глюкана – 23.8 и 17.0% со-

Основные компоненты грибов различных родов

Грибы	Состав, % г/г			
	белок	ОСК *	β -глюкан	РНК
<i>Absidia corymbifera</i> [3]	36.0 \pm 7.0	23.9 \pm 3.7	0.7 \pm 0.6	4.8 \pm 0.1
<i>Mucor hiemalis</i> [3]				
<i>Mucor circinelloides</i> [2]	40.6 \pm 3.1	24.5 \pm 4.3	1.9 \pm 1.8	6.1 \pm 0.7
<i>Mucor racemosus</i> [1]				
<i>Rhizopus oryzae</i> [3]	47.5 \pm 8.2	16.3 \pm 5.3	0.9 \pm 0.3	3.7 \pm 0.2
<i>Fusarium graminearum</i> [1]	37.7 \pm 8.3	34.0 \pm 11.4	6.0 \pm 1.3	4.6 \pm 1.5
<i>Fusarium</i> sp. [7]				
<i>Aspergillus candidus</i> [3]	36.0 \pm 2.4	35.9 \pm 0.1	3.4 \pm 1.2	4.5 \pm 0.2
<i>Trichoderma harzianum</i> [3]	44.5 \pm 2.1	27.2 \pm 6.8	6.2 \pm 0.8	6.2 \pm 0.2
<i>Paecilomyces lilacinus</i> [1]	29.9 \pm 5.7	51.7 \pm 5.5	23.8 \pm 2.4	3.6 \pm 0.5
<i>Paecilomyces variotii</i> [4]				
<i>Penicillium nalgiovense</i> [7]	31.0 \pm 3.8	53.3 \pm 5.2	17.0 \pm 3.5	3.8 \pm 0.6

* ОСК — общее содержание клетчатки.

ответственно. Эти значения, по крайней мере, в три раза выше, по сравнению с содержанием β -глюкана у остальных изученных родов. Кроме того, оно выше сообщавшихся ранее для базидиомицетов и дрожжей [10, 26–28]. В нашем исследовании β -глюкан составлял 46 и 32% от ОСК для *Paecilomyces* и *Penicillium* соответственно. В работе [29] было показано, что у коммерческих видов грибов (*Boletus group*, *Agrocybe aegerita* и *Pleurotus eryngii*), содержание β -глюкана составляет от 2 до 13% от ОСК.

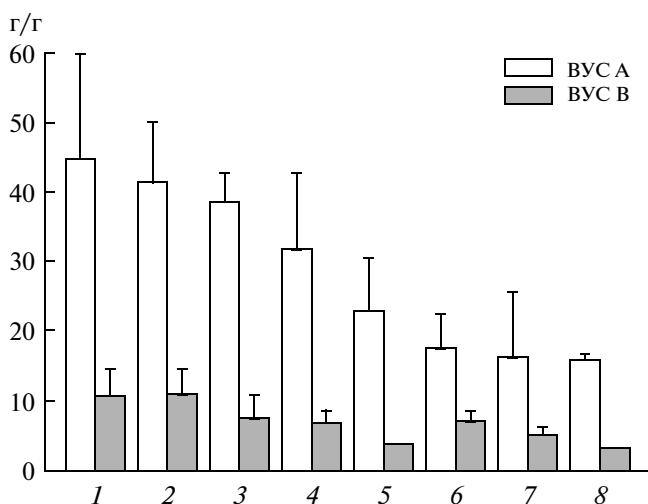


Рис. 1. Способность к удерживанию воды мокрого (ВУС А) и сухого (ВУС В) мицелия разных видов мицелиальных грибов. 1 – *Penicillium nalgiovense*, 2 – *Paecilomyces lilacinus* и *P. variotii*, 3 – *Aspergillus candidus*, 4 – *Fusarium graminearum* и *Fusarium* sp., 5 – *Trichoderma harzianum*, 6 – *Mucor hiemalis*, *M. racemosus* и *M. circinelloides*, 7 – *Rhizopus oryzae*, 8 – *Absidia corymbifera*.

В другой работе [26] было обнаружено, что у дрожжей эта величина составляла 22%. Таким образом, мицелиальные грибы *Penicillium* и *Paecilomyces* могут быть использованы в качестве источника этого полисахарида.

На рис. 1 показаны значения ВУС для различных родов грибов. Самые низкие значения для влажного мицелия наблюдались у родов Zygomycetes (*Absidia*, *Mucor* и *Rhizopus*), составляя в среднем 16.5 г воды/г сухого образца, что ниже среднего значения для β -глюкана на 2.0% (таблица). Наиболее высокие значения ВУС были обнаружены для родов *Paecilomyces* и *Penicillium*, в среднем 43.2 г воды/г сухого образца, что соответствует также более высокому содержанию этого полисахарида. Самое низкое значение ВУС было обнаружено у *P. lilacinus* (данные не представлены). Показано значительное снижение значения ВУС (на 75%), в тех случаях, когда мицелий сушили, за исключением штаммов рода *Mucor*, для мицелия которых снижение было меньше, чем на 60%. Этот род вместе с *Paecilomyces*, *Penicillium* и *Aspergillus* обладал самым высоким уровнем удерживания воды мицелием в сухом состоянии (рис. 1).

Высокая скорость поглощения воды достигала максимального значения менее чем за 2 мин у 60% штаммов мицелиальных грибов (рис. 2). Важно отметить, что изоляты, принадлежащие к видам *Paecilomyces variotii*, обладали наивысшими значениями ВПС, в среднем 6 г воды/г сухого образца. Эти значения были выше, чем для сухой нежирной говядины (2.93 г воды/г сухого образца) и высушенного мицелия *Agaricus bisporus* (2.19 г воды/г сухого образца). Значение ВПС для коммерческих соевых образцов составляло

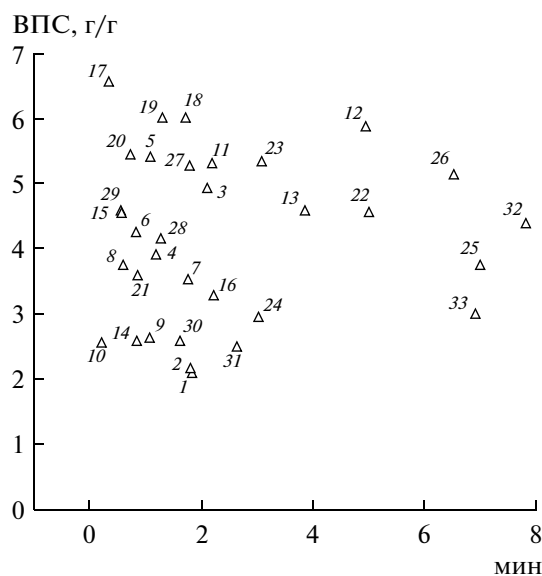


Рис. 2. Отношения между ВПС (г/г сухого образца) и временем поглощения воды (мин) у различных штаммов мицелиальных грибов. 1 – *Absidia corymbifera* T62, 2 – *A. corymbifera* T61, 3 – *Fusarium graminearum* NRRL 26139, 4 – *Fusarium* sp. 201, 5 – *Fusarium* sp. 213, 6 – *Fusarium* sp. 214, 7 – *Fusarium* sp. 235, 8 – *Fusarium* sp. 237, 9 – *Fusarium* sp. 239, 10 – *Fusarium* sp. 229, 11 – *Mucor circinelloides* G31, 12 – *M. circinelloides* G32, 13 – *M. hiemalis* A11, 14 – *M. racemosus* 250, 15 – *M. hiemalis* 307, 16 – *Paecilomyces lilacinus*, 17 – *P. variotii* 101, 18 – *P. variotii* 102, 19 – *P. variotii* 440, 20 – *P. variotii* 439, 21 – *Penicillium nalgiovense* 262, 22 – *P. nalgiovense* S1-2, 23 – *P. nalgiovense* S14-4, 24 – *P. nalgiovense* S15-1, 25 – *P. nalgiovense* S15-3, 26 – *P. nalgiovense* S16-2, 27 – *P. nalgiovense* S35-1, 28 – *Aspergillus candidus* curso, 29 – *A. candidus* 508, 30 – *Trichoderma harzianum* 464, 31 – *T. harzianum* 465, 32 – *Rhizopus oryzae* 503, 33 – *R. oryzae* 514.

8.5 г воды/г сухого образца, что согласуется с литературными данными для соевого белка [30, 31]. Несмотря на то, что эта величина превышала на 30%, полученную для штамма *P. variotii*, время достижения ВПС для мицелия последнего было в два раза меньше. Таким образом, полученные результаты показали перспективность использования мицелия этого штамма.

Важнейшими выводами работы являются следующие: 1) штаммы мицелиальных грибов с высокими показателями удерживания воды в большинстве случаев обладают и большей ВПС, 2) *P. variotii* и *Penicillium nalgiovense* обнаружили высокое содержание пищевых волокон с хорошими гидратационными свойствами; 3) выявлена связь между гидратационными свойствами мицелия и общим количеством пищевых волокон у различного родов грибов (рис. 3); 4) виды *P. variotii* and *P. nalgiovense* имеют более высокое содержание β -глюкана, по сравнению с ранее опубликованными данными для базидиомицетов и дрожжей, что является очень важным результатом, который до сих пор не был опубликован.

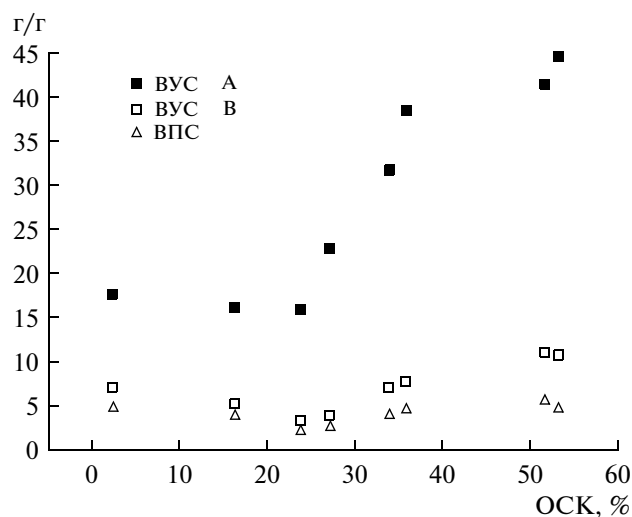


Рис. 3. Связь между гидратационными свойствами и ОСК у мицелиальных грибов. ВУС А – водоудерживающая способность влажного мицелия; ВУС В – водоудерживающая способность сухого мицелия.

Полученные результаты вносят вклад в поиск новых нетрадиционных ингредиентов питания, которые могут обеспечивать высокое содержание белка и β -глюкана. Внесение в пищу высушенного мицелия может влиять на гидратационные свойства продукта. Необходимы дальнейшие исследования для поиска универсальной пищевой матрицы, исследования ее функциональных свойств и технологических параметров.

Авторы выражают благодарность Национальному университету Кильмес, Грант (PUNQ 53/1007) и Agencia de Promoción Científica y Tecnológica, за финансовую поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wainwright M.* Introducción a la biotecnología de los hongos. Zaragoza: Acibia S.A., 1995.
2. *Thrane U.* // Food Mycology. A Multifaceted Approach to Fungi and Food / Ed. J. Dijksterhuis and R. Samson. Utrecht: CRC Press. 2007. P. 353–360.
3. *Snyder H.E.* // Adv. Food Res. 1970. V. 18. P. 85–140.
4. *Villalobos A.* // Agronomía Mesoamericana. 2004. V. 15. № 1. P. 93–106.
5. *Moore D., Chiu S.W.* Bio-Exploitation of Filamentous Fungi / Ed. S.B. Pointing and K.D. Hyde. Hong Kong: Fungal Diversity Press, 2001. P. 223–251.
6. *Edelman J.* // J. Chem. Technol. Biotechnol. 1988. V. 43. P. 279–283.
7. *Weibe M.G.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 58. P. 421–427.
8. *Cheung P.* // J. Nutr. 1998. V. 128. № 9. P. 1512–1516.
9. *Freimund S., Sauter M., Kappeli O., Dutler H.* // Carbohydr. Polym. 2003. V. 54. № 2. P. 159–171.

10. Manzi P., Pizzoferrato L. // Food Chem. 2000. V. 68. № 3. P. 315–318.
11. Rodger G. // Food Technology. 2001. V. 55. № 7. P. 36–41.
12. Fennema O., *Química de los Alimentos*. 2 ed. Zaragoza: Acibia, 2000.
13. Samsom R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. Introduction to Food- and Airborne Fungi. 6 Ed. Baarn. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000.
14. Pitt J.I., Hocking A.D. Fungi and Food Spoilage. 3 Ed. Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer. 2009.
15. Harwing J., Scott P.M. // Appl. Microbiol. 1971. V. 21. № 6. P. 1011–1016.
16. Official Methods of Analysis. 16 Ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1996.
17. Prosky L., Asp N.-G., Schweizer T.F., DeVries J.W., Furda I. // J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1988. V. 71. P. 1017–1023.
18. Lee S.C., Prosky L., DeVries J.W. // J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1992. V. 75 P. 131–133.
19. Rut M. // Kvasny Prumysl. 1973. V. 19. P. 131–133.
20. Megazyme: Mixed-linkage beta-glucan Assay Procedure. Me Cleary method. 1985.
21. Torgensen H., Toledo R.T. // J. Food Sci. 1977. V. 42. № 6. P. 1615–1618.
22. Regula J., Siwulski M. // Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria. 2007. V. 6. № 4. P. 135–142.
23. Díez V.A., Alvarez A. // Food Chem. 2001. V. 75. № 4. P. 417–422.
24. Cheung P. C.-K. // J. Sci. Food Agric. 1997. V. 73. № 2. P. 225–260.
25. Kalac P. // Food Chem. 2009. V. 113. № 1. P. 9–16.
26. Williams D.L., McNamee R.B., Jones E.L., Pretus H.A., Ensley H.E., Browder I.W., DiLuzio N.R. // Carbohydr. Res. 1991. V. 219. P. 203–213.
27. Ko Y.-T., Lin Y.-L. // J. Agric. Food Chem. 2004. V. 52. № 11. P. 3313–3318.
28. Kim K.S., Chang J.E., Yun H.S. // Enzyme Microb. Technol. 2004. V. 35. № 6–7. P. 672–677.
29. Manzi P., Marconi S., Aguzzi A., Pizzoferrato L. // Food Chem. 2004. V. 84. № 2. P. 201–206.
30. Wagner J., Añón M. // J. Food Sci. 1990. V. 55. № 3. P. 765–770.
31. Añón M., Sorgentini D., Wagner J. // J. Agric. Food Chem. 2001. V. 49. № 10. P. 4852–4858.

β-Glucan Content and Hydration Properties of Filamentous Fungi

M. V. Kyanko^a, R. S. Canel^b, V. Ludemann^b, G. Pose^b, and J. R. Wagner^b

^a National University of Quilmes, Buenos Aires, 1876 Argentina

^b National Scientific and Research Council, Buenos Aires, 1033 Argentina

e-mail: vkyanko@gmail.com

Received February 14, 2012

Abstract—The aim of this work was to isolate and identify filamentous fungi from several sources to study the dietary fiber and β-glucan content. The fungal hydration properties such as water absorption and water holding capacities were also evaluated. Total dietary fiber of isolates exhibited a noticeable variability from 16 to 53% and the highest values were obtained for the genera *Paecilomyces* and *Penicillium*, a fact consistent with a higher content of β-glucans (24 and 17%, respectively), higher than previously reported for Basidiomycetes and yeast. We observed a large decrease (75%) in the water holding capacity when the mycelia were dried. Isolates of filamentous fungi with greater water holding capacity also exhibited greater absorption capacity. *Paecilomyces variotii* and *Penicillium nalgiovense* had the best hydration properties. Our results contribute to the search for new unconventional ingredients providing a high protein and β-glucans content. The addition of these dried mycelia could change the hydration properties in the food system.

УДК 602.4.582.28:577.114

ПОЛУЧЕНИЕ БИОДИЗЕЛЬНОГО ТОПЛИВА НА ОСНОВЕ ЛИПИДОВ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

© 2013 г. В. В. Лунин*, Я. Э. Сергеева**, Л. А. Галанина**, И. С. Мысякина**,
А. А. Ивашечкин**, В. И. Богдан***, Е. П. Феофилова**

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

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

*** Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991

e-mail: feofilov@inmi.host.ru

Поступила в редакцию 14.02.2012 г.

Рассмотрены основные этапы биотехнологии получения биодизельного топлива на основе липидов мицелиальных грибов порядка Mucorales. Проведен скрининг грибов семейства Cunninghamella-seae, получены данные о липогенной активности изученных штаммов, и найден продуцент, образующий до 50% липидов, представленных в основном триацилглицеринами. Изучено влияние замены источника углерода и азота на более дешевые компоненты (в том числе отходы от ряда производств), их влияние на количество и основные характеристики конечного продукта. Использована экологически чистая методика извлечения липидов из мицелия грибов с помощью сверхкритических технологий. Обнаружена зависимость между содержанием липидов в посевном споровом материале и максимальным содержанием липидов в биомассе, что предлагается использовать для оптимизации биотехнологии и увеличения выхода конечного продукта.

DOI: 10.7868/S0555109913010121

Биодизельное топливо, или биодизель, представляет собой смесь моноалкиловых (метиловых или этиловых) эфиров жирных кислот, полученных при переэтерификации возобновляемых биологических ресурсов. По своим техническим характеристикам биодизельное топливо близко к параметрам дизельного топлива, получаемого из нефти. В последнее десятилетие получение возобновляемого топлива из биологических ресурсов стало одной из основных проблем биотехнологии в связи с резким истощением разведанных запасов нефти и газа [1]. В настоящее время, кроме получения биодизеля из масел сельскохозяйственных растений, появилась новая тенденция — получение возобновляемого топлива из биомассы микроорганизмов, среди которых наибольший интерес представляют мицелиальные грибы [2]. Биодизель на основе липидов грибов по сравнению с растительными маслами имеет ряд существенных преимуществ: высокая скорость роста продуцента, независимость выхода продукта от сезонных и климатических условий, отсутствие потребности в посевных площадях, возможность создания экологически чистых, безотходных и многоцелевых технологий.

В Институте микробиологии РАН проводятся исследования [2, 3] совместно с химическим факультетом МГУ им. М.В. Ломоносова [4, 5] и Институтом органической химии им. Н.Д. Зелин-

ского РАН по созданию нового биодизельного топлива на основе липидов мицелиальных грибов. Найден суперпродуцент, образующий около 50% липидов (от сухой биомассы), представленных в основном триацилглицеринами; определены основные характеристики полученного биодизельного топлива, создана биотехнологическая схема получения липидов, включающая микробиологический процесс и химический — извлечение и переэтерификация липидов [3].

Полученные данные позволяют перейти ко второму этапу создания биотехнологии получения биодизельного топлива — удешевлению процесса получения липидов из биомассы мицелиальных грибов.

Цель работы — скрининг новых олеагенных штаммов, уменьшение стоимости среды для выращивания продуцента, сокращение времени ферментации и увеличение стабильности и экологичности процесса.

МЕТОДИКА

Работу проводили с мицелиальными грибами: *Cunninghamella echinulata* (старое название *C. japonica*) ВКМ-F-470(–), ВКМ-F-471(+), ВКМ-F-775(+), ВКМ-F-776(–), ВКМ-F-1204(–) и гомоталличным штаммом *C. homotallica* ВКМ F-930.

Таблица 1. Отходы производств, которые использовали в качестве замены источника углерода в ферментационной среде

Отход	Состав отхода	Количество отхода в среде, %
Мезга 1	Картофельная мезга	3.2
Мезга 2	Картофельная мезга	3.2
	Глюкоза	0.5
Шелуха 1	Картофельная шелуха	3.2
Шелуха 2	Картофельная шелуха	3.2
	Глюкоза	0.5
Очистки 1	Картофельные очистки	3.2
Очистки 2	Картофельные очистки	3.2
	NH ₄ NO ₃	0.12
Крахмал	Крахмал	3.2
Глицерин 1	Глицерин	2
Глицерин 2	Глицерин	4
Глицерин 3	Глицерин (добавляли до засева культуры) картофельной мезги	2 3.2
Глицерин 4	Глицерин (добавляли к 48 ч культуре) картофельной мезги	2 3.2
Белый лепесток	Белый лепесток	3
Кофейный шлам	Кофейный шлам	3
Свекольный жом	Свекольный жом	3
Лузга	Лузга подсолнечника	3
Гидролизат древесины	Арабиноза	0.033
	Глюкоза	2.284
	Ксилоза	0.910

Культуру поддерживали в пробирках на скошенном сусло-агаре (7°Б, 2.5%) при комнатной температуре в течение 4 сут, затем хранили при температуре 4–5°С. Пересевы культуры в ходе работы осуществляли не реже одного раза в месяц.

Биомассу получали при глубинном культивировании на качалке (220 об/мин), при 26–27°С в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды. Колбы засеивали водной суспензией 5-суточных спор, полученных смывом культуры с агаризованного сусла, которую вносили в питательную среду в количестве 2–2.5%.

Для выращивания гриба использовали среду Гудвина следующего состава (%): глюкоза – 5.0, аспарагин – 0.2, КН₂РО₄ – 0.1%, MgSO₄ · 7Н₂О – 0.025%, дрожжевой экстракт – 0.1%.

В процессе оптимизации среды для удешевления аспарагин заменяли на следующие источники азота, взятые в эквивалентном по азоту количестве (42 мг%, т.е. в каждой среде содержание азота составляло 42 мг на 100 мл среды (%)): нитрат натрия – 0.26, нитрат аммония – 0.12, хлорид аммония – 0.16, мочевины – 0.09.

Также была испытана и мучная среда (%): кукурузная мука – 1.73, соевая мука – 4.00, КН₂РО₄ – 0.05%.

Источник углерода глюкозу заменяли на различные типы отходов других производств, в том числе и сельскохозяйственные (табл. 1). В этих опытах в качестве источника азота использовали нитрат аммония (0.12%) с добавлением дрожжевого экстракта (0.1%), КН₂РО₄ (0.1%), MgSO₄ · 7Н₂О (0.025%).

Экстракцию липидов проводили по методу Фолча [6], а также сверхкритическим СО₂ на проточной установке (рис. 1). В реактор помещалась высушенная в термостате при 55°С биомасса и обрабатывалась сверхкритическим диоксидом углерода при 100°С и давлении СО₂ 32 МПа.

Качественный анализ общих липидов гриба проводили методом ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (“Merck”, Германия).

Качественный и количественный анализ состава жирных кислот общих липидов гриба проводили на газожидкостном хроматографе Хроматэкс-Кристалл 5000.1 (Россия). Капиллярная

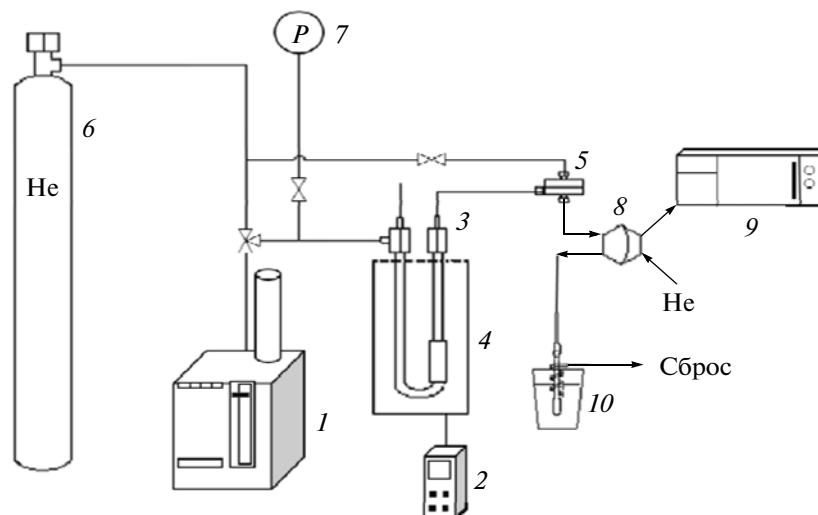


Рис. 1. Принципиальная схема лабораторной установки проточного типа для проведения сверхкритических экспериментов: 1 – насос высокого давления, 2 – терморегулятор электропечи, 3 – реактор, 4 – электропечь, 5 – мембранный клапан, 6 – баллон, 7 – манометр, 8 – шестипортовый кран, 9 – хроматограф, 10 – приемник продуктов.

колонка: Optima-240 (0.25 мм – 60 м – 0.25 мкм, “Macherey-Nagel” Германия) неподвижная фаза: 33% суанопропил-метил-67% dimethylpolysiloxane. Газ-носитель – гелий, режим изотермический: температура колонки 180°C, испарителя 250°C.

Жирные кислоты идентифицировали по относительному времени удерживания на колонке компонентов смеси в сравнении со стандартами. Повторность опытов 3–4 раза, результаты обработки с использованием медианы (Me) [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Способность различных видов разнополюх штаммов *Cunninghamella* к синтезу липидов. Мы исходили из предположения, что некоторые разнополюе штаммы муконовых грибов, например

Blakeslea trispora, способны при совместном культивировании (+) и (–) штаммов образовывать во много раз больше нейтральных липидов, чем при отдельном выращивании [8]. Результаты выращивания (–) и (+) штаммов *C. echinulata*, а также *C. homothallica*, и накопление ими липидов представлены в табл. 2. Как видно из табл. 2, все исследованные штаммы грибов на 5 сут роста накапливали более 15 г/л биомассы. Содержание липидов в мицелии всех штаммов превышало 35%, но совместное культивирование не увеличило содержания липидов в мицелии продуцентов, что еще раз подтвердило существование физиологических различий между грибами семейств Cunninghamellaceae и Choanephoraceae [9]. Анализ состава жирных кислот липидов исследуемых штаммов (рис. 2) показал присутствие насыщенных и ненасыщенных

Таблица 2. Показатели биомассы и выхода липидов у гетероталлических штаммов *C. echinulata* и гомоталлического штамма *C. homothallica*

Организм	Биомасса, г/л	Липиды	
		%	г/л
<i>Cunninghamella echinulata</i> ВКМ F-626 (–)	16.44	41.92	6.89
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-657 (–)	14.15	47.73	6.75
<i>C. japonica</i> ВКМ F-1204 (–)	19.16	42.37	8.12
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-470 (–)	15.54	44.23	6.87
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-471 (+)	15.44	40.58	6.26
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-775 (–)	18.35	43.21	7.93
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-776 (+)	16.02	37.82	6.06
<i>C. homothallica</i> ВКМ F-930	20.49	44.08	9.03
<i>C. echinulata</i> ВКМ F-775 (–) + F-776 (+)	18.20	39.50	6.81

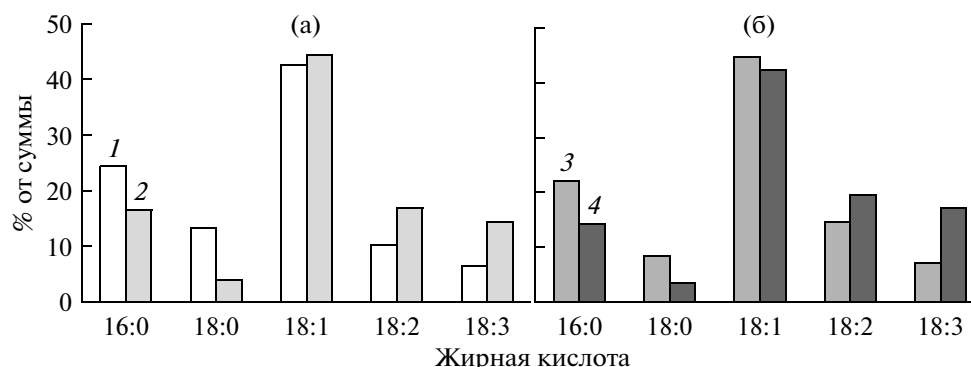


Рис. 2. Состав (% от суммы) жирных кислот в липидах гетероталлических штаммов *Cunninghamella echinulata*. а: 1 – ВКМ F-470 (–); 2 – ВКМ F-471 (+); б: 3 – ВКМ F-775 (–); 4 – ВКМ F-776 (+).

жирных кислот C_{14} – C_{20} с преобладанием пальмитиновой, олеиновой и линолевой кислот, суммарное содержание C_{20} жирных кислот составляло менее 2%. Интересным представляется тот факт, что все штаммы, независимо от их половой принадлежности, синтезировали линоленовую кислоту ($C_{18:3}$). Более того, в отличие от других мукоровых грибов, например *Blakeslea trispora* [10], (+) штаммы *Cunninghamella* синтезировали больше $C_{18:3}$, чем (–) штаммы. Так, резкое увеличение (более чем в два раза) отмечено для линоленовой кислоты: у штамма 471 (+) по сравнению с 470 (–) – с 6.58 до 14.69%, а у штамма 775 (+) по сравнению с 776 (–) с 7.31 до 17.09%. Повышение содержания линолевой и линоленовой кислот на фоне снижения пальмитиновой и стеариновой кислот может указывать на большую активность десатураз у грибов сем. Cunninghamellaceae, ответственных за синтез $C_{18:2}$ и $C_{18:3}$ кислот соответственно.

Таким образом, исследованные разнополюе штаммы *Cunninghamella* характеризовались по сравнению с другими Mucogales (например, *B. trispora*) более высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот. Все штаммы *Cunninghamella* синтезировали линоленовую кислоту, при этом содержание данной кислоты в липидах (+) штаммов превышало соответствующий показатель (–) штаммов более чем в 2 раза. Таким образом, впервые показано, что существуют различия в метаболизме липидов у грибов порядка Mucogales. В отличие от других Choanephoraceae, у представителей рода *Cunninghamella* не только не увеличивался выход нейтральных липидов при копуляции разнополюх штаммов, но (+) и (–) штаммы имели практически идентичный состав жирных кислот. Все исследованные штаммы обладали способностью накапливать липиды, содержание которых в мицелии превышало 35–38%. По составу и содержанию жирных кислот рассмотренные липиды можно отнести к маслам олеинового типа [11].

Ранее [12] сообщалось о способе экстракции липидов из биомассы мукоровых грибов при давлениях 20–35 МПа и температурах 40–70°C. В настоящей работе нами впервые проведено извлечение липидов сверхкритическим диоксидом углерода с применением новых параметров экстракции из биомассы грибов штамма *Cunninghamella echinulata*. Из навески высушенного до постоянной массы мицелия в токе сверхкритического CO_2 при температуре 100°C и давлении 32 МПа было извлечено 56 вес. % липидов. ГЖХ анализ состава жирных кислот подтвердил идентичность липидному составу, экстрагированному по методике Фолча [6].

Основные характеристики биодизеля на основе липидов мицелиальных грибов. В связи с тем, что в ряде стран для создания биодизеля используется рапс, липиды которого соответствуют требованиям, предъявляемым к биодизелю, мы сравнили основные характеристики нашего биодизеля с созданным на основе липидов рапса. Полученные результаты показали (табл. 3), что значение цетанового числа (ЦЧ) биодизеля, полученного из липидов гриба, составила 55.68, а биодизеля, полученного на основе рапсового масла, 51.74 МДж/кг. В требованиях европейских стандартов установлена минимальная граница данного показателя – 51 ед. ЦЧ – основной показатель воспламеняемости дизельного топлива. Это число характеризует способность топлива к воспламенению. Оно влияет также на запуск двигателя, жесткость работы, расход топлива и дымность отработанных газов. Чем выше ЦЧ тем более спокойное и плавное горение дизельного топлива, которое обеспечивает высокие мощностные и экономические показатели работы двигателя [15].

На основании полученных данных были определены другие характеристики биодизельного топлива, полученного на основе липидов мукорового гриба *C. echinulata*. В качестве сравнения использовали масло рапса *Brassica napus*. На основании данных о количественном и качественном

Таблица 3. Характеристика биодизельного топлива

Источник	Йодное число	Цетановое число	Теплота сгорания, МДж/кг	Источник
Дизельное топливо	–	47	45.3	[9]
Биодизель (EN 14214)	≤120	≥51	≥5	[10]
Рапс <i>Brassica napus</i>	94–120	54.4	40.4	[9]
<i>Cunninghamella japonica</i> F-1204	114.9	51.74	37.31	собственные данные
	90.81	55.68	37.27	собственные данные

составе жирных кислот были рассчитаны такие показатели, как степень ненасыщенности липидов и йодное число. Степень ненасыщенности липидов мукорового гриба составила 1.06, липидов рапса – 1.34, величина йодного числа 90.81 и 114.91 соответственно. Согласно данным литературы [16], величина йодного числа для рапса находится в пределах от 94 до 120. В России нет принятых стандартов для биодизеля, поэтому сравнение проводили на основе европейских стандартов (EN 14214 и EN 14213), согласно которым йодное число не должно превышать 120 и 130 ед. соответственно. Содержание линоленовой кислоты в биодизеле не должно превышать 12%, а также суммарное содержание полиненасыщенных жирных кислот с 4 и более двойными связями не должно превышать 1% от суммы жирных кислот.

Теплота сгорания является одной из важнейших характеристик топлива, при оценке его энергетических возможностей и экономической эффективности. Полученные результаты показали, что низшая теплота сгорания биодизеля, полученного из липидов гриба, составила 37.27 МДж/кг, а биодизеля, полученного на основе рапсового масла, 37.31 МДж/кг. Следует отметить, что низшая теплота сгорания биодизеля на основе липидов гриба, была определена экспериментально (в РГГУ нефти и газа им. И.М. Губкина) и составила 37.13 МДж/кг, т.е. расхождение теоретически рассчитанной и экспериментально полученной величины составило менее 1%. В требованиях европейских стандартов установлена минимальная граница данного показателя – 35 МДж/кг.

Таким образом, основываясь на результатах и данных литературы (табл. 3), можно сказать, что биодизель на основе липидов мукорового гриба *C. echinulata* по ряду основных показателей соответствует требованиям европейских стандартов для биодизеля и аналогичен наиболее широко используемому в странах ЕС биодизелю на основе рапсового масла.

Оптимизация состава среды. При удешевлении стоимости среды ферментации в биотехнологии

используют “оптимальный показатель (ОП) выхода конечного продукта”, который получают без учета стоимости процесса. Ферментация грибов при получении биодизеля проводили на среде Гудвина, высокая стоимость которой определяется наличием аспарагина (источник азота) и глюкозы (источник углерода), поэтому основные усилия по оптимизации среды были направлены на снижение стоимости источника азота и углерода.

Нами показано, что в качестве источника азота вместо аспарагина может быть использован нитрат аммония, при этом ОП липидов не понижается и не меняется их жирнокислотный состав. Результаты влияния различных источников азота на показатели роста и выход липидов на примере *C. japonica* F-1204 представлены в табл. 4.

Таким образом, замена аспарагина на нитрат аммония вызывала интенсификацию ростовых процессов у всех исследованных штаммов, накопление биомассы превышало контроль более чем в два раза; использование минерального источника азота практически не влияло на липогенную активность культур, выход липидов у всех штаммов увеличивался более чем в 1.5 раза за счет увеличения количества биомассы.

Для замены источника углерода в среде выращивания продуцента в целях ее удешевления ис-

Таблица 4. Показатели биомассы и выхода липидов при культивировании *C. japonica* F-1204 на средах с использованием различных источников азота

Источник азота	Биомасса, г/л	Липиды	
		%	г/л
Аспарагин	10.50	50.68	5.32
Нитрат натрия	17.42	27.71	4.83
Нитрат аммония	16.01	46.59	7.46
Хлорид аммония	5.16	31.20	1.61
Мочевина	12.92	25.96	3.35
Кукурузно-соевая мука	18.49	11.96	2.21

Таблица 5. Состав и содержание (% от суммы) жирных кислот в липидах, синтезируемых при культивировании *S. japonica* на средах с использованием картофельной мезги

Жирная кислота	Контроль	Мезга 1	Мезга 2
16 : 0	19.68	25.51	26.24
18 : 0	7.48	7.78	7.20
18 : 1	46.4	37.42	34.32
18 : 2	18.82	20.33	23.24
18 : 3	6.30	6.87	6.94
прочие	1.62	2.09	2.06

Таблица 6. Показатели роста и содержания липидов при культивировании *S. japonica* F-1204 на средах с использованием различных видов отходов

Отход	Биомасса, г/л	Липиды, %
Контроль	16.35	39.27
Белый лепесток	11.49	11.77
Кофейный шлам	18.54	24.57
Свекольный жом	12.07	9.22
Лузга	13.69	13.98

пользовали среды, указанные в табл. 1. Во всех вариантах опыта замена источника углерода глюкозы на картофельную мезгу не оказала какого-либо влияния на активность ростовых процессов, при этом величина накопленной биомассы была на уровне контроля. Что касается липогенной активности культуры, содержание липидов во всех рассмотренных вариантах сред с использованием мезги, было ниже, чем в контроле (табл. 5), при этом состав жирных кислот остался практически без изменения.

Были рассмотрены и другие виды отходов: белый лепесток, кофейный шлам, свекольный жом, лузга подсолнуха (отходы получены от Градовой Н.Б., за что выражаем ей глубокую благодарность). Как видно из табл. 6, муцоровый гриб способен утилизировать все испытанные виды отходов, величина накопленной биомассы составила более 10 г/л. Что касается содержания липидов в клетках гриба, то наибольшее их содержание, составившее около 60% от контроля, было отмечено на среде с кофейным шламом.

Наилучший результат был получен при использовании отходов от маслодельных заводов (сточные воды производства оливкового масла) при значении редуцирующих веществ (РВ) 2.5%. В состав РВ входили в основном глюкоза, сахароза, ксилоза и арабиноза. В данном случае выход липидов составил около 40%.

Использование гидролизатов древесины. Сотрудниками лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха (зав. лаб. проф. Синецын А.П.) был любезно предоставлен образец гидролизата древесины хвойных пород для изучения возможности замены глюкозы на данный тип гидролизата. Следует отметить, что ранее нами [17] при работе с *S. japonica* было показано, что для роста гриба можно использовать смеси различных моносахаридов (как пентоз, так и гексоз), при этом отдельные компоненты смеси утилизировались организмом в определенной последовательности и степень потребления того или иного компонента зависела от состава исходной смеси. Полученные результаты показали, что лучшим моносахаридом является глюкоза, но полнота ее использования определяется ее содержанием в среде.

Предоставленный для исследований гидролизат древесины был получен из хвойных пород деревьев (отходы лесоперерабатывающей промышленности) под действием ферментов карбогидраз (целлюлаз и сопутствующих ферментов), синтезированных промышленными штаммами *Trichoderma* sp. и *Penicillium* sp. — суперпродуцентами карбогидраз, выделенных в Институте биохимии им. А.Н. Баха [18]. Суммарное содержание сахаров в гидролизате составило 3.2%, при этом преобладающим компонентом была глюкоза, в меньших количествах присутствовали ксилоза и арабиноза.

Полученные результаты указывают на то, что среда с гидролизатом древесины пригодна для роста гриба, при этом величина накопленной биомассы и содержания в ней липидов несколько меньше соответствующих величин контроля, что может быть объяснено меньшим начальным содержанием сахаров в среде. Был рассчитан экономический показатель как для синтетической среды с глюкозой, так и для опытной среды с гидролизатом древесины. Для синтетической среды величина данного показателя составила 3.2 и 3.6 для штамма F-470 и F-930 соответственно и на среде с гидролизатом древесины — 3.3 и 3.4 соответственно. Таким образом, с учетом экономического показателя среда с гидролизатом древесины может рассматриваться в качестве перспективной замены среды с глюкозой.

В биотехнологии известен еще один путь удешевления стоимости конечного продукта — *использование побочных продуктов производства*. С этой целью исследовали возможность применения глицерина — побочного продукта при получении биодизеля в качестве источника углерода вместо глюкозы. Было рассмотрено несколько вариантов сред: **глицерин 1** — 2% глицерина; **глицерин 2** — 4% глицерина; **глицерин 3** — глицерин с дополнительным внесением мезги; **глицерин 4** —

среда с картофельной мезгой с дополнительным внесением к 48-часовой культуре. Как видно из приведенной таблицы (табл. 7), гриб обладал способностью к росту на среде с глицерином, и совместное применение глицерина и картофельной мезги дает лучшие результаты, чем глицерин. Повысить выход липидов можно также за счет увеличения начального содержания глицерина в среде. Кроме того, внесение вместе с посевным материалом 0.2% глюкозы увеличивает потребление глицерина и повышает выход липидов до 19–20%.

Оптимизация получения спорового посевного материала. Третья задача получения биодизеля включала изучение посевного материала с целью повышения его всхожести, стабильности хранения и увеличения выхода конечного продукта.

Влияние возраста посевных спор на содержание липидов в опытном мицелии. Установлено, что использование 5 сут спор обеспечивало наиболее высокий выход липидов в мицелии гриба (рис. 3). С увеличением возраста посевных спор количество липидов в мицелии уменьшалось, причем особенно заметно при использовании спор 20–30-суточных. Установлена обратная зависимость между количеством липидов в спорах и их возрастом. Максимальное содержание липидов отмечено в 7-суточных спорах – 6.4%, при увеличении возраста посевных спор содержание липидов в них уменьшалось, например, в 14 сут спорах содержалось почти в два раза меньше липидов – 3.3%.

При исследовании влияния возраста посевного материала на выход конечного продукта – липидов установлено, что максимальное содержание липидов в мицелии гриба отмечалось на 4 сут культивирования и наибольшее их содержание наблюдается при посеве 5–7 сут спорами, т.е. спорами, наиболее богатыми липидами. Таким образом, впервые обнаружена прямая взаимосвязь между количественным содержанием липидов в спорах и выросшего из них мицелия.

Улучшение экологии производственного процесса. Улучшение достигнуто удалением растворителей при извлечении липидов из биомассы грибов и использование вместо них на этой стадии процесса сверхкритической CO₂.

Таким образом, проведенные исследования позволили оптимизировать среду для выращивания продуцента, введя в нее дешевый источник азота – аммонийный азот, и тем самым, одновременно увеличить выход липидов. Наиболее дешевым источником углерода могут служить отходы от картофельных производств или отход от производства биодизеля – глицерин, которые могут заменить почти половину глюкозы в ферментационной среде без снижения выхода конечного продукта. Изучение состава липидов посевного материала позволило установить новую закономерность – прямую зависимость между содержа-

Таблица 7. Накопление биомассы и липидов при культивировании *C. japonica* F-1204 на различных средах с глицерином

Отход	Биомасса, г/л	Липиды, %
Глицерин 1	6.84	10.15
Глицерин 2	5.60	8.82
Глицерин 3	19.55	11.32
Глицерин 4	17.43	14.35

нием липидов в посевных спорах и в выращенном из них мицелием, которая может найти применение в других грибных производствах. Установлена возможность, эффективность и экологичность извлечения образованных липидов из мицелия грибов *C. japonica* с помощью сверхкритических технологий.

Для таксономии Mucorales важны данные, свидетельствующие о ряде отличий грибов рода *Cunninghamella* и других мукоровых грибов в отношении липидообразования гетероталлических штаммов, в частности способность (+) и (–) штаммов *C. japonica* синтезировать в одинаковых количествах линоленовую кислоту. Для других Mucorales, например *B. trispora*, эта кислота рассматривается в настоящее время как надежный критерий при определении половой принадлежности гетероталлических штаммов [19], так как отличительной особенностью (–) штаммов *B. trispora* является неспособность синтезировать γ -линоленовую кислоту.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (контракт № 11-1135/26 от 08 августа 2011 г.) и компании ООО “ЭНВАЙРОКЕТ”.

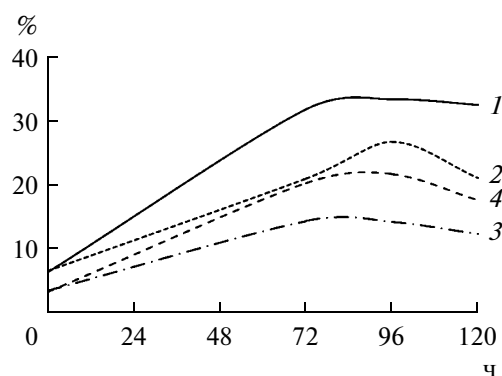


Рис. 3. Изменение содержания липидов (%) в биомассе *C. japonica* F-1204 в зависимости от возраста посевного материала (сут):

1 – 7; 2 – 14; 3 – 21; 4 – 28.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wei Du, Wei Li, Tang Sun, Xin Chen, Dehna Lin* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 79. № 2. P. 331–337.
2. *Феофилова Е.П., Сергеева Я.Э., Иващечкин А.А.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2010. Т. 45. № 4. С. 405–415.
3. *Сергеева Я.Э., Андриянова Д.А., Феофилова Е.П.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2008. Т. 44. № 5. С. 1–6.
4. *Сергеева Я.Э., Галанина Л.А., Лунин В.В., Феофилова Е.П.* // *Катализ в промышленности.* 2009. № 5. С. 84–88.
5. *Сергеева Я.Э., Иващечкин А.А., Алехин А.И., Андриянова Д.А., Гальченко В.Ф., Мысякина И.С., Галанина Л.А., Феофилова Е.П., Лунин В.В.* Способ получения липидов. Заявка на патент РФ номер 2011104913.
6. *Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H.* // *J. Biol. Chem.* 1957. V. 226. № 1. P. 497–509.
7. *Ашмарин И.П., Воробьев А.А.* Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медицина. 1972. 180 с.
8. *Феофилова Е.П.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2006. Т. 42. № 5. С. 501–519.
9. *Андриянова Д.А., Сергеева Я.Э., Кочкина Г.А., Галанина Л.А., Усов А.И., Феофилова Е.П.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2011. Т. 48. № 4. С. 448–451.
10. *Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С.* // *Микробиология.* 2005. Т. 74. № 6. С. 750–755.
11. *Тютюнников Б.Н.* Химия жиров. М.: Пищпром, 1966. 632 с.
12. *Certik M., Horenitzky R.* // *Biotechnol. Techniq.* 1999. V. 13. № 11. P. 11–15.
13. *Gunstone F.D.* // *The Lipid Handbook 3rd ed / Eds. F.D. Gunstone, J.L. Harwood, A.J. Dijkstra.* Boca Raton–London–New York: CRC Press, 2007. 656 p.
14. *The Biodiesel Handbook / Eds. G. Knothe, J.V. Gerpen, J. Krahl.* Illinois: AOCS Press, 2005. P. 278–285.
15. *Refaat A.A.* // *Inter. J. Environ. Sci. and Technol.* 2009. V. 6. № 4. P. 677–694.
16. *Gunstone F.D., Harwood J.L., Radley F.B.* *The Lipid Handbook, 2 ed.* L.: Chapman and Hall, 1994. 1273 p.
17. *Галанина Л.А., Бехтерева М.Н., Павлова Т.А., Цветкова Е.В.* // *Микробиология.* 1988. Т. 57. № 2. С. 213–217.
18. *Осипов Д.О., Рожкова А.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Рубцова Е.А., Правильников А.Г., Зоров И.Н., Симицына О.А., Овешников И.Н., Давидов Е.Р., Симицын А.П.* // *Катализ в промышленности.* 2010. № 5. С. 63–70.
19. *Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С., Хохлова Н.М.* // *Микробиология.* 2000. Т. 69. № 5. С. 606–612.

Biodiesel Fuel Production from Lipids of Filamentous Fungi

V. V. Lunin^a, Ya. E. Sergeeva^b, L. A. Galanina^b, I. S. Mysyakina^b, A. A. Ivashchkin^b,
V. I. Bogdan^c, and E. P. Feofilova^b

^a *Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

^b *Vinogradsk Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

^c *Zelinsk Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

e-mail: feofilov@inmi.host.ru

Received February 14, 2012

Abstract—The main stages in the production of biodiesel fuel from lipids of filamentous fungi belonging to the order Mucorales are described. Fungi of the family Cunninghamellaceae have been screened; the lipogenic activity of the examined strains has been assessed; and a producer generating up to 50% of lipids, represented by triacylglycerols, has been found. The substitution effect of a source of carbon and nitrogen with less expensive components (in particular, various industrial wastes) has been studied, as well as their influence on the quantity and major characteristics of the final product. An ecologically friendly method for extracting lipids from fungal mycelia, utilizing supercritical technologies, has been used. A correlation between the lipid content in the spore inoculum and the maximal lipid content in biomass has been discovered; this correlation is proposed for optimizing the biotechnology and increasing the yield of final products.

УДК 577.113

ВЛИЯНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РАСТЕНИЙ НА БИОСИНТЕЗ РЕЗВЕРАТРОЛА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ВИНОГРАДА АМУРСКОГО *Vitis amurensis* Rupr.

© 2013 г. К. В. Киселёв*, О. А. Шумакова**, А. Ю. Маняхин***

*Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток, 690022

e-mail: kiselev@biosoil.ru

**Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690090

***Горнотаежная станция ДВО РАН, Горнотаежное, 692533

Поступила в редакцию 3.10.2011 г.

Исследован биосинтез резвератрола при добавлении предшественника биосинтеза — фенилаланина (**Фен**). Показано, что добавление **Фен** достоверно увеличивало экспрессию генов фенилаланин-амиак-лиаз (**ФАЛ**), стильбенсинтаз (**СТС**) и продукцию резвератрола в 8.5 раза. Полученные данные по продукции резвератрола при добавлении **Фен** и кумаровой кислоты (**КК**) сравнены с известными аналогами.

DOI: 10.7868/S0555109913010078

В настоящее время одним из перспективных и активно развивающихся направлений в биотехнологии является поиск альтернативных источников получения биологически активных веществ (**БАВ**). Большинство из этих веществ обладают ценными фармакологическими свойствами и поэтому являются важнейшими компонентами различных лекарственных препаратов. Трудность промышленного получения **БАВ** — недостаток быстро восполняемых сырьевых источников. В настоящее время к таким источникам промышленного производства **БАВ** относятся клеточные культуры и генетически модифицированные микроорганизмы. Однако опыт получения клеточных культур показывает, что содержание в них целевых веществ чаще всего ниже, чем необходимо для эффективного производства [1]. Поэтому увеличение содержания **БАВ** в клетках растений *in vitro* с помощью различных биотехнологических приемов актуально на сегодняшний день.

Виноград содержит ряд **БАВ**, которые благоприятно воздействуют на организм человека. Среди таких веществ самое известное — это резвератрол: 3,5,4'-тригидроксистилен [1]. Резвератрол обнаружен во многих растениях, таких, как тутовое дерево, арахис, клюква и голубика. Виноград, в том числе и дикий виноград амурский *Vitis amurensis* Rupr., относят к основным источникам резвератрола [1]. Известно, что резвератрол обладает превентивными свойствами против некоторых видов рака, положительно влияет на сердечно-сосудистую систему, а также обладает высоким фармакологическим потенциалом в лечении

нейродегенеративных заболеваний [2–5]. Резвератрол выделяется среди полифенолов растений своей мощной антиоксидантной активностью, которая превосходит активность витамина Е [6, 7]. Кроме того, существуют данные о положительном эффекте резвератрола на продолжительность жизни организмов [8, 9]. В настоящее время на основе этого вещества уже создаются биологически активные добавки к пище. Резвератрол обладает высоким потенциалом для применения в фитотерапии и фармакологии [5].

На сегодняшний день нет дешевого и эффективного способа получения резвератрола. В растениях содержание этого вещества невелико, и необходимо довольно долгое время для их выращивания. Поэтому резвератрол, выделенный из растений, является дорогостоящим сырьем для промышленного производства **БАВ**. Клеточные культуры винограда, при условии их высокой продуктивности, могли бы стать альтернативным источником резвератрола. Однако известно, что содержание резвератрола в клеточных культурах растений обычно ниже необходимого для использования этих культур в промышленном производстве стильбенов [1, 10], поэтому следует индуцировать биосинтез резвератрола с помощью методов биотехнологии. Классическими методами индукции синтеза вторичных метаболитов в культурах клеток растений являются методы селекции и отбора наиболее продуктивных клеточных линий, варьирование состава питательных сред, добавление предшественников, а также обработка клеток разнообразными элиситорами.

Кроме клеточных культур, в настоящее время резвератрол получают при помощи добавления предшественника резвератрола к метаболически модифицированной *Escherichia coli*, экспрессирующей растительную стильбенсинтазу (СТС) и ку-марат-КоА-4-лигазу (ККЛ) [11].

Цель работы – исследование влияния предшественников фенольных соединений растений на продукцию резвератрола в культуре клеток винограда и ее сравнение с синтезом в генетически модифицированных микроорганизмах.

МЕТОДИКА

Растительный материал и клеточные культуры.

Использовали две модельные системы: клеточную культуру *V. amurensis* (V2, [12]) с низким содержанием резвератрола (не более 0.01% от сухой массы клеток) и культуру клеток *V. amurensis*, трансгенная по гену *rolB* из *Agrobacterium rhizogenes* (VB2, [12]), отличающаяся высоким уровнем биосинтеза резвератрола (~0.5–1.5% от сухой массы). Каллусная культура V2 получена в 2002 г. из молодого стебля взрослого дикорастущего растения *V. amurensis* Rupr. (*Vitaceae*), которое было собрано на юге Приморского края и определено в отделе ботаники Биолого-почвенного института ДВО РАН [12]. Трансгенная каллусная культура VB2 была получена в результате трансформации суспензионной культуры V2 штаммом *A. tumefaciens* GV3101/pMP90RK, несущим векторную конструкцию pRCV002-CaMV [12]. В конструкции ген *rolB* находится под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты 35S CaMV [13].

Использовали агаризованную модифицированную питательную среду по Мурасиге и Скугу с добавлением 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина, 2 мг/л α -нафтилуксусной кислоты, 0.2 мг/л тиамина, 0.5 мг/л никотиновой кислоты, 0.5 мг/л пиридоксина, 100 мг/л мезо-инозита, 100 мг/л пептона, 25 г/л сахарозы и 7 г/л агара. [14]. Питательную среду разливали в пробирки диаметром 20 мм высотой 200 мм по 15 мл. Интервал субкультивирования составлял 35–40 сут в темноте при $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Обработка фенилаланином (Фен). Фенилаланин (Фен, “Panheas”, Испания) растворяли в 50%-ном этиловом спирте. Растворы Фен добавляли в питательные среды в концентрации 0.1, 0.5 и 2 мМ в асептических условиях после автоклавирования (исходный раствор Фен 20 мг/мл).

Выделение нуклеиновых кислот и получение комплементарной ДНК (кДНК). кДНК получали, используя 1.5 мкг тотальной РНК, с помощью набора для обратной транскрипции (“Силекс М”, Россия). Для проведения обратно-транскрипционной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) использовали 50 мкл реакционной смеси, содержащей 1-кратный ОТ буфер, по 0.25 мМ каждого

из 4 дезоксинуклеозид трифосфатов, 0.2 мкМ праймера, последовательность которого включала 15 дезокситимидин трифосфатов (олиго-(dT)₁₅ праймер), 200 единиц активности обратной транскриптазы из вируса лейкемии мышей Молони. Реакцию проводили при 37°C в течение 1–2 ч. Образцы полученных продуктов (0.5 мкл) были затем амплифицированы при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Количественная оценка экспрессии генов ФАЛ и СТС. Для количественного анализа экспрессии генов ФАЛ и СТС использовали ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ). ПЦР РВ для генов был выполнен согласно рекомендациям, описанным Гиулетти и др. [15]. Геноспецифичные пары праймеров и TaqMan пробы представлены ранее в работе [16]. кДНК амплифицировали с помощью набора для ПЦР (“Синтол”, Россия), использовали iQ5 амплификатор с функцией ПЦР РВ (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, США) с оптической системой программного обеспечения, версия 2.0. Условия проведения ПЦР РВ подробно описаны ранее [17–19].

Определение содержания стильбенов в образцах ткани *V. amurensis*. Определение качественного и количественного содержания стильбенов производилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в Горно-таежной станции ДВО РАН, куда были переданы образцы высушенной ткани *V. amurensis* в соответствии с методикой, описанной ранее [20]. Количество резвератрола определяли путем сравнения со стандартом резвератрола (“Sigma-Aldrich”, США).

Статистическая обработка полученных результатов. Результаты были обработаны при помощи программы Statistica, версия 9.0. Все данные представлены, как среднее значение \pm стандартная ошибка. Полученные данные проверены по спаренному критерию Стьюдента. Уровень значимости в 0.05 был выбран, как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние Фен на рост и биосинтез резвератрола в клеточных культурах *V. amurensis*. Биосинтез резвератрола осуществляется фенилпропаноидным путем (рисунок), поэтому мы предположили, что увеличения продукции резвератрола растительными клетками можно добиться стимулированием фенилпропаноидного пути на разных этапах биосинтеза. Фенилаланин-аммиак-лиаза (ФАЛ, КФ 4.3.1.5) – первый фермент в этом пути катализирует дезаминирование Фен, превращая его в коричную кислоту, поэтому присутствие Фен – важный фактор для начала биосинтеза резвератрола.

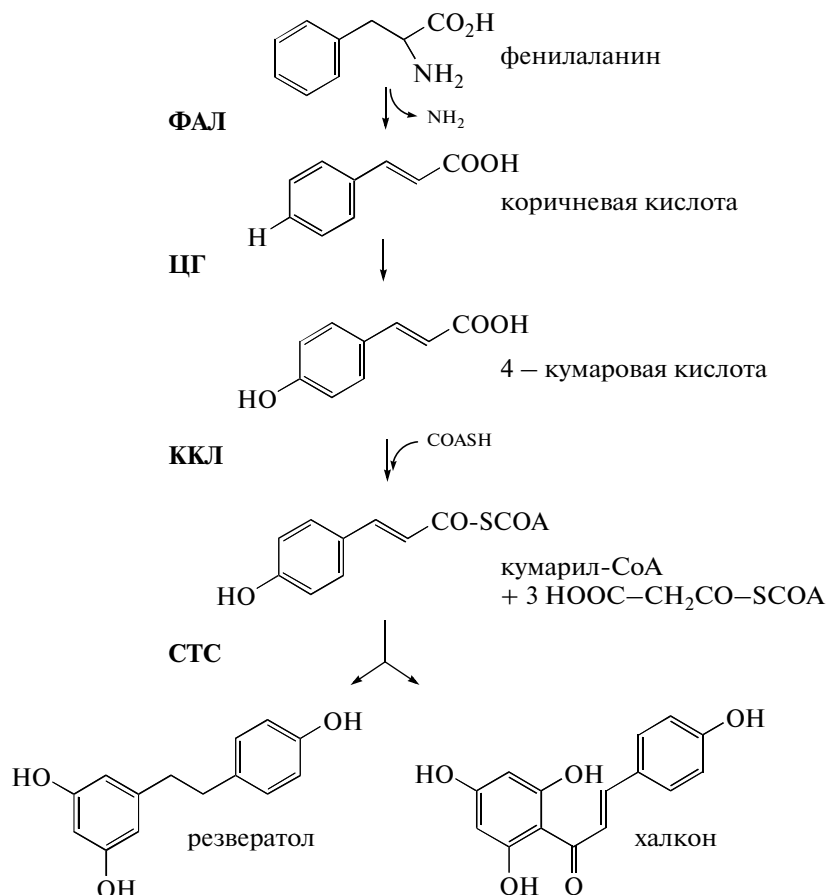


Схема биосинтеза резвератрола и халкона. ФАЛ – фенилаланин-аммиак-лиаза, ЦГ – циннамат-4-гидроксилаза, ККЛ – кумарат-КоА-4-лигаза, СТС – стильбенсинтаза, ХС – халконсинтаза.

Нами показано, что добавление Фен в концентрациях 0.5 и 2 мМ в питательные среды ингибировало прирост сырой биомассы как в контрольной культуре V2, так и в *rolB*-трансгенной культуре клеток VB2 (табл. 1). Содержание резвератрола в контрольной культуре V2 при добавлении Фен достоверно увеличилось в 6.3–14.5 раз. При этом необходимо заметить, что максимальная продукция резвератрола в контрольной культуре V2 (6.82 мг/л) наблюдалась при добавлении 0.1 мМ Фен. Также нами показано, что добавление 0.1 и 2 мМ Фен ведет к недостоверному увеличению продукции резвератрола в *rolB*-трансгенной культуре VB2 (17–20.7 мг/л, в 1.2–1.5 раза соответственно).

Несмотря на то, что степень увеличения содержания резвератрола выше в культуре V2, наибольшая продукция резвератрола среди всех проанализированных вариантов была именно в трансгенной VB2 культуре (20.7 мг/л), что в 3.1 раза выше, чем в V2 культуре при обработке Фен. Это обусловлено тем, что продукция резвератрола в трансгенной культуре VB2 без добавления предшественников фенольных соединений растений

изначально была выше в 17.5 раза, чем в контрольной культуре V2.

Последним ферментом в биосинтезе резвератрола и его производных в фенилпропаноидном пути является стильбенсинтаза (СТС, КФ 2.3.1.95), которая конденсирует 3 молекулы малонил-КоА с одной молекулой кумарил-КоА, конечным продуктом этой реакции является резвератрол (рисунок). Кумарил-КоА образуется в результате формирования ферментом циннамат-4-гидроксилаза (ЦГ) тиоэфирной связи между карбоксильной группой КК и коэнзимом А. Поэтому мы предположили, что добавление КК должно активировать последние этапы биосинтеза резвератрола, тем самым повысить продукцию резвератрола в культурах клеток *V. amurensis*. Основные результаты влияния обработки КК на продукцию биомассы клеток и резвератрола клеточными культурами винограда получены ранее [16].

Далее в клеточных культурах V2 и VB2, обработанных Фен, анализировали экспрессию генов ФАЛ и СТС, белковые продукты которых участвуют в биосинтезе резвератрола.

Таблица 1. Влияние Фен на рост и биосинтетическую продукцию клеточных культур винограда *V. amurensis* V2 и VB2

Продукция	Фен, мМ							
	V2				VB2			
	0	0.1	0.5	2	0	0.1	0.5	2
Сырая биомасса, г/л	208.9 ± ± 21.1	204.3 ± ± 26.0	119.2 ± ± 4.9**	110.7 ± ± 5.4**	75.9 ± ± 16.4	65.4 ± ± 17.3	49.0 ± ± 4.4	38.5 ± ± 4.0*
Сухая биомасса, г/л	8.3 ± ± 0.9	5.2 ± ± 0.6	8.1 ± ± 0.9	6.7 ± ± 0.7	5.5	5.7	2.8	6.7
Резвератрол, % от сухой массы	0.009 ± ± 0.001	0.131 ± ± 0.071*	0.071 ± ± 0.03*	0.057 ± ± 0.024*	0.254 ± ± 0.069	0.298 ± ± 0.071	0.339 ± ± 0.063	0.309 ± ± 0.132
Суммарная продукция резвератрола, мг/л	0.8 ± ± 0.2	6.8 ± ± 1.5*	5.8 ± ± 1.4*	3.8 ± ± 1.2	14.0 ± ± 2.2	17.0 ± ± 3.5	9.5 ± ± 1.9	20.7 ± ± 5.3

Примечание к таблицам 1–3. V2k, VB2k – экспрессия *rolB* и *ФАЛ* в культурах клеток V2 и VB2 без добавления Фен; V2-0.1, VB2-0.1 – экспрессия в культурах клеток V2 и VB2 при добавлении 0.1 мМ Фен; V2-0.5, VB2-0.5 – экспрессия в культурах клеток V2 и VB2 при добавлении 0.5 мМ Фен; V2-2, VB2-2 – экспрессия в культурах клеток V2 и VB2 при добавлении 2 мМ Фен; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, сравнивали с экспрессией генов *rolB* и *ФАЛ* в культурах клеток V2 и VB2 без добавления Фен.

Таблица 2. Данные об экспрессии генов *rolB* и *ФАЛ* в культурах V2 и VB2 при добавлении Фен, полученные методом ПЦР РВ

Ген	Фен							
	V2k	V2-0.1	V2-0.5	V2-2	VB2k	VB2-0.1	VB2-0.5	VB2-2
<i>rolB</i>	0	0	0	0	0.55 ± 0.21	0.56 ± 0.18	0.55 ± 0.22	0.63 ± 0.23
<i>ФАЛ1</i>	0.11 ± 0.04	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.26 ± 0.10	0.53 ± 0.20	0.43 ± 0.21	0.36 ± 0.11	0.36 ± 0.10
<i>ФАЛ2</i>	0.31 ± 0.09	0.68 ± 0.19	0.58 ± 0.13	0.82 ± 0.10*	0.42 ± 0.11	0.31 ± 0.08	0.37 ± 0.06	0.36 ± 0.14
<i>ФАЛ3</i>	0.10 ± 0.07	0.09 ± 0.05	0.77 ± 0.08**	0.51 ± 0.21	0.28 ± 0.17	0.24 ± 0.11	0.24 ± 0.14	0.25 ± 0.13
<i>ФАЛ4</i>	0.09 ± 0.04	0.17 ± 0.11	0.13 ± 0.05	0.21 ± 0.14	0.64 ± 0.20	0.24 ± 0.14	0.22 ± 0.15	0.23 ± 0.13
<i>ФАЛ5</i>	0.11 ± 0.06	0.12 ± 0.05	0.11 ± 0.05	0.33 ± 0.09	0.81 ± 0.19	0.36 ± 0.17	0.35 ± 0.16	0.29 ± 0.20

Влияние Фен на экспрессию генов *rolB*, *ФАЛ* и *СТС*. Уровень экспрессии генов *rolB*, *ФАЛ* и *СТС* был измерен при помощи ПЦР РВ в культурах клеток винограда при добавлении Фен. Экспрессия гена *rolB* в трансгенной культуре при добавлении Фен и КК значительно не изменялась (табл. 2; [16]), поэтому наблюдаемые изменения в VB2 культуре при добавлении предшественников мы склонны относить к влиянию вносимых веществ на экспрессию генов биосинтеза резвератрола.

Нами показано, что при добавлении Фен к контрольной культуре клеток V2 *V. amurensis* наблюдается тенденция на увеличение экспрессии всех генов *ФАЛ*, но достоверность степени увеличения экспрессии зависела от количества добавляемого Фен и гена *ФАЛ* (табл. 2). Так, мы наблюдали при добавлении 2 мМ Фен достоверное увеличение в 2.5 раза экспрессии гена *ФАЛ2*. Экспрессия *ФАЛ3* достоверно увеличилась в 7.8 раза при добавлении 0.5 мМ Фен в питательные среды культуры V2 (табл. 2).

При добавлении Фен в питательные среды контрольной клеточной культуры V2 также наблюдалась тенденция на увеличение экспрессии 9 из 10 генов *СТС*, которая зависела от количества добавляемого Фен и гена *СТС*. Концентрация 0.1 мМ Фен достоверно увеличила экспрессию генов *СТС4* и *СТС2* в 3.3–5 раз соответственно (табл. 3). Добавление 0.5 мМ Фен достоверно увеличило экспрессию генов *СТС1*, *СТС2*, *СТС3*, *СТС4*, *СТС6*, *СТС8* и *СТС10* 2.4–9.2 раза. Концентрация 2 мМ также достоверно увеличивала экспрессию *СТС4*, *СТС6*, *СТС8* и *СТС10*.

В трансгенной культуре VB2 при добавлении Фен наблюдалась тенденция на снижение экспрессии генов *ФАЛ* (табл. 2). Экспрессия генов *СТС* в клеточной культуре VB2 при добавлении Фен оставалась в пределах ошибки эксперимента, за исключением генов *СТС7* и *СТС5*, экспрессия которых при добавлении 0.5 мМ Фен достоверно увеличивалась в 3.9–4.1 раза соответственно (табл. 3).

Таблица 3. Данные об экспрессии генов *СТС* в культурах V2 и VB2 при добавлении Фен, полученные методом ПЦР РВ

Ген	Фен							
	V2k	V2-0.1	V2-0.5	V2-2	VB2k	VB2-0.1	VB2-0.5	VB2-2
<i>СТС1</i>	0.14 ± 0.04	0.41 ± 0.12	0.67 ± 0.19*	0.40 ± 0.12	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.20 ± 0.06	0.15 ± 0.04
<i>СТС2</i>	0.07 ± 0.02	0.34 ± 0.09*	0.79 ± 0.17**	0.37 ± 0.13	0.12 ± 0.04	0.13 ± 0.05	0.23 ± 0.09	0.24 ± 0.09
<i>СТС3</i>	0.05 ± 0.02	0.39 ± 0.21	0.44 ± 0.09**	0.37 ± 0.20	0.19 ± 0.04	0.18 ± 0.04	0.38 ± 0.14	0.32 ± 0.10
<i>СТС4</i>	0.01 ± 0.01	0.14 ± 0.02**	0.41 ± 0.10**	0.44 ± 0.25*	0.15 ± 0.08	0.16 ± 0.10	0.48 ± 0.25	0.15 ± 0.06
<i>СТС5</i>	0.12 ± 0.07	0.21 ± 0.04	0.23 ± 0.09	0.20 ± 0.6	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.04	0.67 ± 0.19*	0.41 ± 0.09*
<i>СТС6</i>	0.14 ± 0.04	0.37 ± 0.21	0.36 ± 0.14*	0.61 ± 0.19**	0.35 ± 0.09	0.28 ± 0.10	0.44 ± 0.13	0.43 ± 0.18
<i>СТС7</i>	0.14 ± 0.08	0.11 ± 0.05	0.12 ± 0.06	0.16 ± 0.05	0.19 ± 0.06	0.14 ± 0.04	0.73 ± 0.17*	0.22 ± 0.08
<i>СТС8</i>	0.02 ± 0.01	0.23 ± 0.15	0.19 ± 0.05*	0.45 ± 0.14*	0.09 ± 0.02	0.20 ± 0.12	0.36 ± 0.16	0.22 ± 0.11
<i>СТС9</i>	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.31 ± 0.19	0.13 ± 0.04	0.29 ± 0.14	0.28 ± 0.09	0.35 ± 0.14
<i>СТС10</i>	0.01 ± 0.01	0.22 ± 0.16	0.31 ± 0.19	0.22 ± 0.09*	0.17 ± 0.07	0.15 ± 0.06	0.33 ± 0.18	0.22 ± 0.07

Возможно, увеличение продукции резвератрола в контрольной культуре при добавлении Фен произошло за счет прямой активации фенилпропаноидного пути. Об этом свидетельствует достоверная активация экспрессии нескольких генов семейства *ФАЛ* (*ФАЛ2*, *ФАЛ3*). Продуктом экспрессии генов *ФАЛ* является фермент, который непосредственно дезаминирует Фен до коричной кислоты (рисунок) и тем самым увеличивает количество субстрата для дальнейшего каскада реакций фенилпропаноидного пути, что и приводит в конечном итоге к увеличению количества резвератрола. В трансгенной культуре VB2 фенилпропаноидный путь в норме находится в активированном состоянии, т.к. VB2 культура отличается повышенным содержанием резвератрола (табл. 1; [12, 14]) и экспрессией генов *ФАЛ* и *СТС* (табл. 2, 3 [14]), поэтому добавление Фен ведет к незначительному увеличению продукции резвератрола относительно увеличения в контрольной культуре V2.

Основные результаты влияния обработки КК на экспрессию генов *ФАЛ* и *СТС* получены ранее и представлены в [16]. При добавлении КК в питательные среды культур клеток *V. amurensis* V2 и VB2 экспрессия генов *ФАЛ* оставалась неизменной, либо наблюдалась тенденция на снижение экспрессии генов *ФАЛ* с повышением концентрации КК, экспрессия 2 из 10 генов *СТС* достоверно увеличивалась [16]. Таким образом, добавление КК не ведет к активации всего фенилпропаноидного пути, опосредованного увеличением экспрессии генов *ФАЛ*, как было при добавлении Фен, потому что экспрессия четырех генов *ФАЛ* из пяти достоверно ингибировалась [16]. Мы предполагаем, что добавление КК в питательные среды повысило содержание резвератрола через выборочное воздействие на экспрессию отдельных генов *СТС*, то есть через активацию послед-

него этапа в биосинтезе резвератрола — только отдельных реакций фенилпропаноидного пути.

Сравнение эффективности преобразования предшественников фенольных соединений в резвератрол в клетках растений и микроорганизмов. При добавлении 0.1 мМ Фен к контрольной культуре клеток винограда *V. amurensis* V2 продукция резвератрола увеличивалась в 8.5 раз (табл. 1), а при добавлении 0.1 мМ КК продукция резвератрола увеличилась в 16 раз [16]. Эти результаты показывают, что активация последних стадий фенилпропаноидного пути более эффективно действует на биосинтез резвератрола в клеточных культурах. Таким образом, мы показали, что эффективность КК в увеличении биосинтеза резвератрола выше, чем при добавлении Фен почти в 2 раза.

Недавно получены интересные для биотехнологического получения резвератрола результаты, где при добавлении КК к метаболически модифицированной *E. coli*, несущей на плазмиде перенесенные гены *ККЛ* и *СТС* из растений, выход резвератрола составил около 100 мг/л [11]. Мы решили сравнить уровень преобразования Фен и КК в резвератрол в клеточных культурах *V. amurensis* и в метаболически модифицированной *E. coli*. При добавлении 2 мМ Фен или 0.5 мМ КК [16] в культуру клеток винограда амурского в результате наибольшая продукция резвератрола в клетках винограда составила 0.09 мМ (20.7 мг/л) и 0.16 мМ (36.8 мг/л) соответственно. Необходимо при этом отметить, что в отличие от микроорганизмов, в норме в *rolB*-трансгенной культуре клеток в проводимых экспериментах было 0.06 мМ (14 мг/л, табл. 1) и 0.11 мМ резвератрола (25.8 мг/л, [16]), т.е. продукция резвератрола при добавлении Фен возросла на 0.03 мМ (6 мг/л), а при добавлении КК на 0.05 мМ (11 мг/л). Таким образом, эффективность преобразования пред-

шественников в резвератрол клетками винограда составила не более 10%. Метаболически модифицированная *E. coli* преобразует 1 мМ КК в 0.44 мМ резвератрола [11], следовательно, эффективность преобразования КК в резвератрол в бактериях составляет 44%. Таким образом, клетки винограда амурского более чем в 4 раза меньше преобразуют предшественники в резвератрол, чем клетки метаболически модифицированной *E. coli*. Эффективность преобразования резвератрола из добавляемых предшественников в клеточных культурах *V. amurensis* меньше, возможно, потому что в клетках растений есть ферменты как биосинтеза, так и его деградации до низкомолекулярных соединений или олигомеризации до более высокомолекулярных производных [21, 22].

Исследования были выполнены при финансовой поддержке грантов РФФИ (10-04-00189-а) и ДВО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kiselev K.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 90. № 2. P. 417–425.
2. Aggarwal B., Bhardwaj A., Aggarwal R., Seeram N., Shishodia S., Takada Y. // Anticancer Res. 2004. V. 24. № 5A. P. 2783–2840.
3. Li H., Yan Z.Y., Zhu J.A., Yang J., He J.S. // Neuropharmacology 2010. V. 60. № 2–3. P. 252–258.
4. Pervaiz S. // Faseb J. 2003. V. 17. № 14. P. 1975–1985.
5. Shankar S., Nall D., Tang S.N., Meeker D., Passarini J., Sharma J., Srivastava R.K. // Public Library of Science One. 2007. V. 6. № e16530.
6. Lastra C.A., Villegas I. // Biochem. Soc. Trans. 2007. V. 35. № 2. P. 1156–1160.
7. Chang H.C., Chen T.G., Tai Y.T., Chen T.L., Chiu W.T., Chen R.M. // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2011. V. 31. № 3. P. 842–854.
8. Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S.L., Tatar M., Sinclair D. // Nature. 2004. V. 430. № 7000. P. 686–689.
9. Giovannelli L., Pitozzi V., Jacomelli M., Mulinacci N., Laurenzana A., Dolara P., Mocali A. // J. Gerontol. Ser. A-Biol. Sci. Med. Sci. 2011. V. 66. № 1. P. 9–18.
10. Donnez D., Jeandet P., Clement C., Courot E. // Trends Biotechnol. 2009. V. 27. № 12. P. 706–713
11. Watts K.T., Lee P.C., Schmidt-Dannert C. // BioMed Central Biotechnol. 2006. V. 6. № 22.
12. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. // J. Biotechnol. 2007. V. 128. № 3. P. 681–692.
13. Spena A., Schmulling T., Koncz C., Schell J.S. // EMBO J. 1987. V. 6. № 13. P. 3891–3899.
14. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Bulgakov V.P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 82. № 4. P. 647–655.
15. Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. // Methods. 2001. V. 25. № 4. P. 386–401.
16. Shumakova O.A., Manyakhin A.Y., Kiselev K.V. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. V. 165. № 5–6. P. 1427–1436.
17. Kiselev K.V., Turlenko A.V., Zhuravlev Y.N. // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2010. V. 103. № 2. P. 197–204.
18. Kiselev K.V., Tyunin A.P., Manyakhin A.Y., Zhuravlev Y.N. // Plant Cell Tissue Organ. Cult. 2011. V. 105. № 1. P. 65–72.
19. Киселёв К.В., Булгаков В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 5. С. 618–624.
20. Dubrovina A.S., Manyakhin A.Y., Zhuravlev Y.N., Kiselev K.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 88. № 3. P. 727–736.
21. Chong J.L., Poutaraud A., Hugueney P. // Plant Sci. 2009. V. 177. № 3. P. 143–155.
22. Jeandet P., Douillt-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M. // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. № 10. P. 2731–2741.

Effect of Plant Stilbene Precursors on the Biosynthesis of Resveratrol in *Vitis amurensis* Rupr. Cell Cultures

K. V. Kiselev^a, O. A. Shumakova^b, and A. Yu. Manyakhin^c

^a Laboratory of Biotechnology, Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

^b Department of Biochemistry and Biotechnology, Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690090 Russia

^c Mountain Taiga Station, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Gornotaezhnoe, Primorskii krai, Ussuriisk region, 692533 Russia

e-mail: kiselev@biosoil.ru

Received October 3, 2011

Abstract—The biosynthesis of resveratrol after the application of a precursor for biosynthesis, i.e., phenylalanine (Phe), has been studied. The application of Phe has been shown to increase significantly the expression of the phenylalanine—ammonia—lyase (PAL) and stilbene synthase (STS) genes and enhance the production of resveratrol by 8.5 times. Data on resveratrol production after the addition of Phe and coumaric acid (CA) were compared with known analogs.

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ДИНАТРИЕВОЙ СОЛИ ЦИКЛОПЕНТЕНОВОГО β, β' -ТРИКЕТОНА НА АКТИВНОСТЬ ГИДРОЛАЗ И СОСТОЯНИЕ ЧАСТИЦ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ В ЛИСТЬЯХ ТАБАКА

© 2013 г. Л. А. Лапшина, А. В. Реунов, В. П. Нагорская, О. П. Шестак, В. Л. Новиков

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток, 690022

e-mail: antreunov@mail.ru

Поступила в редакцию 18.11.2011 г.

Определена активность гидролаз (протеазы, РНКазы) в незараженных и зараженных вирусом табачной мозаики листьях табака сорта Самсун, не обработанных и обработанных динатриевой солью 2-ацетил-4-гидроксикарбонил-метилтио-5-хлороциклопент-4-ен-1,3-диона (ДС). Показано, что обработка листьев этим соединением существенно повышала в них активность гидролаз по сравнению с необработанными листьями. В инфицированных листьях, обработанных за 1 сут до заражения ДС, наряду с повышенным уровнем гидролаз, выявлено большее количество подвергнутых деструктивным изменениям вирусных частиц, чем в зараженных необработанных листьях. Предполагается, что обусловленная ДС активация гидролаз способствует деструкции вирусных частиц и, таким образом, является одним из индуцированных этим соединением защитных механизмов клеток, препятствующих внутриклеточному накоплению вируса.

DOI: 10.7868/S055510991301011X

Важную роль в защите растений от вирусных заболеваний может играть применение биологически активных веществ, способных индуцировать устойчивость растений к вирусам [1]. Поэтому усилия многих исследователей направлены на выявление природных индукторов устойчивости растений, а также на синтез подобных соединений. Показано, что свойствами индукторов вирусостойчивости у растений обладают такие природные соединения, как фитогормоны [1], стероидные гликозиды [2], 1,3; 1,6- β -D-глюканы из грибов [3] и бурых водорослей [4], 1,3; 1,4- β -D-глюкан из лишайника [5], хитозан [6], олигосахариды, полученные из галактоглоукоманнана [7] и ксилоглюкана [8], каррагинаны из красных водорослей [9, 10], фукоидан из бурой водоросли [11], арахионовая кислота [12]. Также сообщалось, что антивирусную активность могут проявлять некоторые синтетические, преимущественно гетероциклические соединения [13–15].

Нами впервые проведены исследования по изучению фитовирусной активности синтетических циклопентеновых β, β' -трикетонов, являющихся структурно родственными редким вторичным метаболитам высших растений семейств Lauraceae, Myrtaceae и Piperaceae, таким, как калитрон [16], линдерон [17], луцидон [18] и корусканон В [19], а также метаболитам высших грибов, таким, как хризотрионы А и В из семейства Nuytorophoraceae [20]. Было установлено [21], что из 22 исследованных циклопентеновых трикетонов и их производных наибольшим антивирус-

ным эффектом в отношении вируса табачной мозаики (ВТМ) обладает динатриевая соль 2-ацетил-4-гидроксикарбонилметилтио-5-хлороциклопент-4-ен-1,3-диона (ДС). Однако механизмы антивирусного действия этого соединения остаются малоизученными.

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что существенную роль в защите растений от патогенов играют гидролазы, такие, как хитиназы и 1,3- β -глюканазы [22], протеазы [23] и РНКазы [24]. Хитиназы и 1,3- β -глюканазы обуславливают деградацию клеточных стенок патогенных грибов и бактерий [22]. Их антивирусное действие может быть связано с образованием олигосахаридов, функционирующих как сигнальные молекулы, запускающие различные защитные механизмы клеток [25]. Эндопроtease Р-69, индуцированная вироидом экзокортиса в растениях томатов, является одним из основных PR белков этого хозяина [26]. Вакуолярный процессурующий фермент, обнаруженный в зараженных ВТМ растениях табака, несущих ген устойчивости *N*, предположительно, играет первостепенную роль в вирус-индуцированном сверхчувствительном ответе [27]. РНКазы могут вовлекаться в противовирусную устойчивость растений, обусловленную различными факторами (действие гиббереллина, стероидных гликозидов, вакцинация слабыми штаммами и др.) [28]. PR белок-10, изолированный из растений *Capsicum annuum* L., обладает антивирусной и РНКазной активностями [29]. Антиви-

русным белкам из некоторых растений присуща высокая РНКазная активность [30, 31].

Нами развивается представление [1, 28], что важную роль в защите клеток от вирусов играет литический компартмент; сущность защиты состоит в деструкции вирусных частиц гидролазами (протеазы, РНКазы), в результате чего появляются “тонкие” и поперечно “разрезанные” вирионы.

Цель работы — исследование влияния ДС на активность гидролаз (протеазы, РНКазы) в здоровых и инфицированных ВТМ листьях табака, а также состояние вирусных частиц в листьях.

МЕТОДИКА

Получение вирусного препарата. Использовали обычный штамм ВТМ, поддерживаемый на растениях табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Самсун, выращиваемых в теплице. Очищенный препарат ВТМ получали по методике, разработанной ранее [32].

Определение активности гидролаз в листьях. Работа выполнена на 4-недельных растениях *N. tabacum* L. сорта Самсун, выращенных в теплице. Молодые листья (длина 5–6 см) разрезали по средней жилке и напыляли карборундом. Левые (опытные) половинки листьев натирали ДС в концентрации 2 мг/мл, а правые (контрольные) — водой, после чего промывали проточной водой и помещали во влажную камеру. Через 1 сут опытные и контрольные половинки листьев вновь напыляли карборундом и половину из них натирали суспензией ВТМ (1 мг/мл), а остальные водой. Затем их промывали и возвращали во влажную камеру. Активность ферментов определяли в 50 дисках диаметром 4 мм, выбитых через 4 сут из здоровых и зараженных листьев, и выражали в единицах оптической плотности. Опыты выполнены в 5-кратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили, используя *t*-критерий Стьюдента.

Активность протеаз. Для определения использовали метод, приведенный в работе [33]. Диски растирали в 5 мл 0.1 М Na-фосфатного буфера (рН 5.7), и гомогенаты центрифугировали 15 мин при 7300 g. Каждую пробу разливали в две пробирки по 2 мл, в одну из которых добавляли 1 мл 1%-ного казеина, а в другую (контрольную) — 1 мл дистиллированной воды. Реакцию останавливали путем добавления в пробирки по 2 мл 10%-ной ТХУ. Пробы выдерживали 15 мин на холоду, фильтровали и измеряли в них поглощение при 280 нм.

Активность РНКаз. Активность определяли, основываясь на методике [34]. Диски из листьев растирали в 1.5 мл дистиллированной воды и гомогенаты центрифугировали 30 мин при 6000 g. Супернатант (0.1 мл) добавляли в реакционную смесь, содержащую 0.5 мл 0.1 М Na-ацетатного буфера (рН 5.6) и 0.4 мл раствора дрожжевой РНК

(3 мг/мл). Аналогичные пробы, но без РНК, служили контролем. Полученные смеси выдерживали в течение 1 ч при 37°C. Реакцию останавливали, добавляя 1 мл 0.75%-ного раствора уранилацетата в 25%-ной хлорной кислоте. После 15-минутной инкубации при 2°C осадок удаляли центрифугированием при 6000 g. Затем 0.2 мл супернатанта вносили в 5 мл буфера и измеряли поглощение раствора при 260 нм.

Электронная микроскопия. Для электронно-микроскопического исследования частиц ВТМ в соке из обработанных и необработанных ДС инфицированных листьев применяли метод негативного контрастирования фосфорновольфрамовой кислотой (ФВК) [35]. Использовали те же зараженные ВТМ листья табака, в которых определялась активность гидролаз. На вольфрамовые сеточки, покрытые укрепленной углем формваровой пленкой-подложкой, наносили суспензию сока, полученного из листьев через 4 сут после заражения, и добавляли к ней каплю 2%-ной ФВК, рН 7.0. Через 2 мин образцы осторожно высушивали кусочком фильтровальной бумаги и просматривали в электронном микроскопе LIBRA-120 (“Carl Zeiss”, Германия). В отдельных опытах кусочки зараженных листьев, предназначенные для получения контрастированных ФВК препаратов сока, предварительно фиксировали 3 ч в 6.5%-ном растворе глутарового альдегида, приготовленном на Na-фосфатном буфере, рН 7.4. Измерение диаметра и длины негативно окрашенных ФВК вирусных частиц проводили на 20 произвольно выбранных полях электронного микроскопа при общем увеличении 150000. Были измерены диаметр и длина 300 вирусных частиц из опытных и 300 частиц из контрольных препаратов.

Иммуно-электронномикроскопические исследования частиц ВТМ в соке из инфицированных листьев проводили, используя антисыворотки, полученные в Биолого-почвенном институте ДВО РАН. Применяли метод, получивший название техники декорирования [35]. Кусочки зараженных листьев, обработанных либо не обработанных ДС, измельчали лезвием в капле дистиллированной воды, и на каплю помещали сеточку, покрытую напыленной углем формваровой пленкой-подложкой. Через 1 мин сеточку просушивали кусочком фильтровальной бумаги, помещали на каплю ВТМ-специфической антисыворотки и инкубировали во влажной камере в течение 15 мин при 37°C. В некоторых экспериментах использовали антисыворотку к X-вирусу картофеля (ХВК) или контрольную сыворотку. Приготовленные образцы тщательно промывали дистиллированной водой, просушивали фильтровальной бумагой, контрастировали 3–5 мин 2%-ной ФВК (рН 7.0) и исследовали в электронном микроскопе.

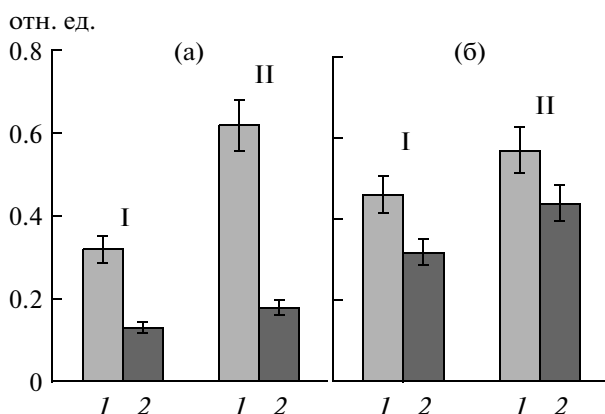


Рис. 1. Активность протеаз (а) и РНКаз (б) в здоровых (I) и зараженных ВТМ (II) листьях табака, обработанных ДС (1) и необработанных (2). Значимость различий при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Действие ДС на активность гидролаз в листьях. Данные, представленные на рис. 1а, 1б, свидетельствуют о том, что обработка листьев табака сорта Самсун (как здоровых, так и зараженных ВТМ) ДС сопровождается существенным увеличением в них, в сравнении с необработанным контролем, активности гидролитических ферментов (протеазы, РНКазы). В здоровых листьях, обработанных ДС в концентрации 2 мг/мл, активность протеаз была в 2.46 (рис. 1а), а РНКаз — в 1.44 (рис. 1б) раза выше, чем в контроле. При заражении не обработанных ДС листьев ВТМ активность протеаз в них была выше, чем в незараженном контроле, в 1.38 (рис. 1а), а РНКаз — в 1.37 (рис. 1б) раз. Заражение обработанных ДС листьев ВТМ вызывало повышение в них активности протеаз в 3.44 раза (рис. 1а), в сравнении с зараженными необработанными листьями, а РНКаз — в 1.3 раза (рис. 1б).

Влияние ДС на состояние вирусных частиц в листьях. Параллельно с определением активности гидролитических ферментов в не обработанных и обработанных ДС инфицированных ВТМ листьях мы исследовали состояние вирионов в негативно окрашенных ФВК препаратах, приготовленных из этих листьев.

Получены данные, что в таких препаратах, наряду с нормальными частицами ВТМ (диаметр 18 нм и длина 300 нм), наблюдались аномальные вирионы, диаметр и длина которых были существенно больше или меньше нормальных значений (рис. 2). В контрастированных ФВК препаратах, приготовленных из зараженных листьев, предварительно фиксированных глутаровым альдегидом, пропорция нормальных и аномальных вирионов существенно не отличалась в сравнении с препаратами из не фиксированных глутаро-

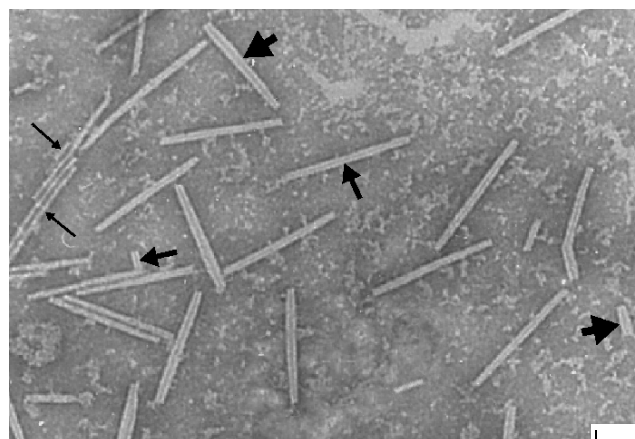


Рис. 2. Контрастированные ФВК частицы ВТМ из обработанных ДС листьев табака через 4 сут после заражения. Средние, толстые и тонкие стрелки показывают соответственно нормальные, набухшие и “тонкие” вирионы. Масштаб: 100 нм.

вым альдегидом листьев. Поэтому наличие аномальных вирусных частиц в исследованных препаратах не является артефактом.

Проведенные иммуно-электронномикроскопические исследования показали, что вирионы нормального диаметра, а также набухшие вирусные частицы полностью декорируются специфической антисывороткой (рис. 3). “Тонкие” частицы ВТМ утрачивали способность покрываться антителами, и лишь в некоторых участках, в которых диаметр вириона был сравнительно большим, могли быть ассоциированы с антисыворот-

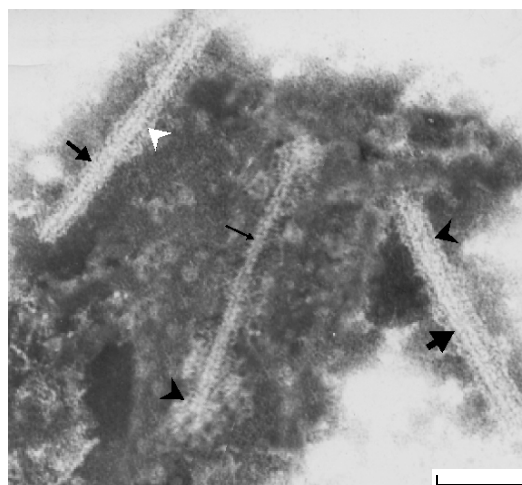


Рис. 3. Обработанные специфической антисывороткой и контрастированные ФВК частицы ВТМ из обработанных ДС листьев табака через 4 сут после заражения. Средние, толстые и тонкие стрелки показывают соответственно нормальные, набухшие и “тонкие” вирионы. Головки стрелок показывают ВТМ-специфическую антисыворотку. Масштаб: 100 нм.

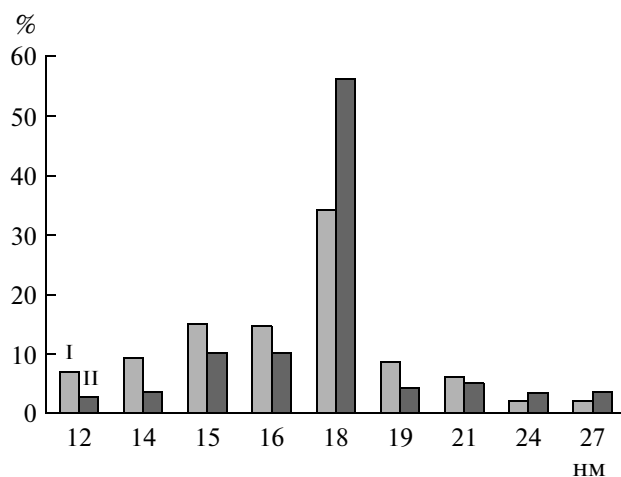


Рис. 4. Распределение частиц ВТМ по величине диаметра в препарате сока, полученного из обработанных (I) и необработанных (II) ДС листьев табака через 4 сут после заражения.

кой (рис. 3). Антисыворотка к ХВК и контрольная сыворотка не связывались с частицами ВТМ.

Присутствие в суспензиях набухших (толстых) и “тонких” вирионов можно объяснить следующим образом. После заражения в содержащих вирус участках клетки изменяются некоторые физико-химические характеристики (например, рН), в результате чего белковые субъединицы вирионов могут претерпевать конформационные модификации и подвергаться частичному разрыхлению и расплетанию. Разрыхление белковых субъединиц, вероятно, приводит к появлению набухших вирионов, а частичное расплетание полипептидных субъединиц – к “отрезанию” пептидных связей протеазами, в результате чего вирионы “истончаются”. Подобным образом объяснялась деструкция белков аденовируса 2 [36]. Тот факт, что тонкие частицы ВТМ, в отличие от вирионов нормального диаметра, утрачивают способность связываться со специфической антисывороткой, видимо, обусловливается частичным протеолизом капсидного белка, сопровождающимся элиминацией детерминантных групп, ответственных за связывание с антителами.

Проведенный анализ распределения частиц ВТМ по диаметрам показал, что препараты, приготовленные из обработанных ДС листьев, содержали значительно больше “тонких” вирионов, чем препараты, полученные из необработанных листьев (рис. 4). Так, в суспензиях из обработанных ДС листьев наблюдали 34.4% вирусных частиц нормального диаметра, 19.2% набухших и 46.4% “тонких” частиц. В суспензиях из зараженных необработанных листьев обнаружено 56.4% вирионов нормального диаметра, 16.6% набухших и 27% “тонких”.

Наличие в суспензии вирионов, длина которых превышала 300 нм, видимо, обусловлено спо-

собностью вирионов стыковаться друг с другом, что отмечалось ранее [37]. Иногда в препаратах наблюдались “короткие” вирионы, имеющие нормальный диаметр (рис. 2). Присутствие таких вирионов, по-видимому, связано с незавершенностью их сборки. Значительно чаще обнаруживались “короткие” частицы ВТМ, диаметр которых был больше или меньше нормального (рис. 2). Появление таких частиц, вероятно, можно объяснить тем, что вследствие нарушения стабильности белковой оболочки вирусная РНК становится доступной действию РНКаз, в результате чего происходит фрагментирование (поперечное “разрезание”) вирионов. Получены данные, что обработка листьев ДС способствует образованию подобных фрагментированных вирионов. Так, в суспензиях из листьев, обработанных ДС, содержится 55.15%, а в суспензиях из необработанных листьев – 40.14% “коротких” частиц.

Представленные данные об увеличении в зараженных листьях под действием ДС количества “тонких” и фрагментированных вирусных частиц свидетельствуют о существовании корреляции между повышением активности гидролаз (протеазы, РНКазы) и внутриклеточной деструкцией вирионов. Мы полагаем, что повышение активности гидролаз, способствующее разрушению вирусных частиц, является одним из индуцированных ДС защитных механизмов клеток, ограничивающих, как было показано нами ранее [38], накопление в них вируса.

Следует подчеркнуть, что при обработке ДС повышается активность гидролаз в здоровых растительных тканях. Вероятно, повышение литической активности клеток под действием ДС является фактором, способствующим разрушению потенциального вирусного патогена и, таким образом, стимулирующим вирусостойчивость растительных тканей.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантом ДВО РАН № 09-111-А-05-149.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Реунов А.В. Вирусный патогенез и защитные механизмы растений. Владивосток: Дальнаука, 1999. 175 с.
2. Кинтя П.К., Лазурьевский Г.В., Балашова Н.Н., Балашова И.Т., Суружюу А.И., Лях В.А. Строение и биологическая активность стероидных гликозидов ряда спиростана и фуростана. Кишинев: Штиинца, 1987. 142 с.
3. Rouhier P., Kopp M., Begot V., Bruneteau M., Fritig B. // *Phytochemistry*. 1995. V. 39. № 1. P. 57–62.
4. Reunov A.V., Lapshina L.A., Nagorskaya V.P., Elyakova L.A. // *J. Phytopathol.* 1996. V. 144. № 1. P. 247–249.
5. Stübler D., Buchenauer H. // *J. Phytopathol.* 1996. V. 144. № 1. P. 37–43.
6. Чирков С.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 1. С. 5–13.

7. Slovákova L., Lišková D., Capek P., Kubačková M., Kákoniová D., Karácsonyi Š. // Eur. J. Plant Pathol. 2000. V. 106. № 6. P. 543–553.
8. Šubíková V., Slovákova L., Farkaš V. // Z. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 1994. B. 101. № 1. S. 128–131.
9. Reunov A.V., Nagorskaya V.P., Lapshina L.A., Yermak I.M., Barabanova A.O. // J. Plant Diseases and Protection. 2004. V. 111. № 2. P. 165–172.
10. Барабанова А.О., Ермак И.М., Реунов А.В., Нагорская В.П., Соловьева Т.Ф. // Раст. ресурсы. 2006. Т. 42. № 4. С. 80–86.
11. Лапшина Л.А., Реунов А.В., Нагорская В.П., Звягинцева Т.Н., Шевченко Н.М. // Физиология растений. 2006. Т. 53. № 2. С. 274–279.
12. Рожнова Н.А., Одинцова Т.И., Геращенко Г.А. // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. С. 870–875.
13. Fraser R.S.S., Whenham R.J. // J. Gen. Virol. 1978. V. 39. № 1. P. 191–194.
14. Balazs E., Kiraly Z. // Phytopathol. Z. 1981. B. 100. № 4. S. 356–360.
15. Schuster G. // Phytopathol. Z. 1987. B. 119. № 3. S. 262–271.
16. Birch A.J. // J. Chem. Soc. 1951. № 11. P. 3026–3030.
17. Kiang A.K., Lee H.H., Sim K.Y. // J. Chem. Soc. 1962. № 11. P. 4338–4345.
18. Lee H.H. // Tetrahedron Lett. 1968. V. 9. № 40. P. 4243–4246.
19. Li X.-C., Ferreira D., Jacob M.R., Zhang Q., Khan S.I., ElSohly H.N., Nagle D.G., Smillie T.J., Khan I.A., Walker L.A., Clark A.M. // J. Amer. Chem. Soc. 2004. V. 126. № 22. P. 6872–6873.
20. Gilardoni G., Clericuzio M., Tosi S., Zanoni G., Vidari G. // J. Natur. Prod. 2007. V. 70. № 1. P. 137–139.
21. Лапшина Л.А., Шестак О.П., Реунов А.В., Новиков В.Л., Анисимов М.М. // Раст. ресурсы. 2006. Т. 42. № 1. С. 107–113.
22. Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M. // Annu. Rev. Phytopathol. 2006. V. 44. P. 135–162.
23. Van der Hoorn, R.A.L. // Annu. Rev. Plant Biol. 2008. V. 59. P. 191–223.
24. Трифонова Е.А., Кочетов А.В., Шумный В.К. // Усп. соврем. биол. 2007. Т. 127. № 1. С. 13–24.
25. Ryan C.A. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 25. P. 8879–8883.
26. Vera P., Conejero V. // Plant Physiol. 1988. V. 87. № 1. P. 58–63.
27. Hatsugai N., Kuroyanagi M., Yamada K., Meshi T., Tsuda S., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I. // Science. 2004. V. 305. № 5685. P. 855–858.
28. Реунов А.В., Реунов А.А. Литическая функция клетки. М.: Наука, 2008. 181 с.
29. Park C.J., Kim K.J., Shin R., Park J.M., Shin Y.C., Paek K.H. // Plant J. 2004. V. 37. № 2. P. 186–198.
30. Begam M., Narwal S., Roy S., Kumar S., Lodha M.L., Kapoor H.C. // Biochemistry (Moscow) 2006. V. 71. Suppl. 1. P. S44–S48.
31. Чудхари Н.Л., Ядав О.П., Лодха М.Л. // Биохимия. 2008. Т. 73. № 3. С. 336–341.
32. Otsuki Y., Takebe I., Onho T., Fukuda M., Okada Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 74. № 5. P. 1913–1917.
33. Алексеенко Л.П. // Современные методы в биохимии. М., Медицина, 1968. С. 115–130.
34. Татарская Р.И., Абросимова-Амельянич Н.М., Аксельрод А.И., Коренько А.А., Ниетро Н.Я., Баев А.А. // Биохимия. 1966. Т. 31. № 5. С. 1017–1026.
35. Королев М.Б. // Электронная микроскопия вирусов и вирусных инфекций. Итоги науки и техники. Сер. Вирусология. М.: ВИНТИ, 1980. С. 114–157.
36. Everitt E., Persson M.J., Wohlfart C. // FEMS Microbiol. Lett. 1988. V. 49. № 2. P. 229–233.
37. Esau K. Viruses in Plant Hosts. Form, Distribution and Pathological Effects. Madison, Wis.: Univ. Wisconsin Press, 1967. 225 p.
38. Лапшина Л.А., Реунов А.В., Нагорская В.П., Шестак О.П., Новиков В.Л. // Изв. РАН. Сер. биол. 2010. № 5. С. 625–630.

Effect of Cyclopentene β,β' -Triketone Disodium Salt on the Activity of Hydrolases and the State of Tobacco Mosaic Virus Particles in Tobacco Leaves

L. A. Lapshina, A. V. Reunov, V. P. Nagorskaya, O. P. Shestak, and V. L. Novikov

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

e-mail: antreunov@mail.ru

Received November 18, 2011

Abstract—The activity of hydrolases (protease, RNase) in uninfected and tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves of the Samsun variety, untreated and treated with disodium salt of 2-acetyl-4-hydroxycarbonyl-methylthio-5-chlorocyclopent-4-en-1,3-dione (DS), was determined. It was shown that treatment of leaves with this compound significantly increased the activity of hydrolases in them compared to untreated leaves. In infected leaves treated with DS one day before infection, along with an increased level of hydrolases, one revealed more viral particles exposed to destructive changes in infected, rather than untreated, leaves. It is assumed that the DS-caused activation of hydrolases promotes the destruction of viral particles and is therefore one of the cell defense mechanisms induced by this compound that prevents the intracellular accumulation of virus.

УДК 616.9; 608.3:576.08; 57.085.23; 57.047

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ЦИТОПАТОГЕННОСТИ ВИРУСОВ В МАКРОФАГАХ

© 2013 г. Н. Г. Плехова**, Л. М. Сомова*, Н. В. Крылова*, Г. Н. Леонова*,
И. Н. Ляпун*, И. С. Смирнов**

*Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Владивосток, 690087

**Дальневосточный федеральный университет, г. Владивосток, 690950

e-mail: pl_nat@hotmail.com

Поступила в редакцию 27.09.2011 г.

Приведены результаты исследования метаболизма макрофагов при их заражении вирусами, различающимися по вирулентности. Для оптимизации оценки цитопатогенного действия вирусов на макрофаги предложен индекс реактивности клеток, который позволил выявить степень вирусного воздействия в условных единицах. Применение высокочувствительных методов определения функциональной активности макрофагов и выявление корреляционной связи между ее изменениями и морфологическими особенностями клеток можно отнести к объективным способам индикации не только репродукции вирусов, но и дифференцировки типов и степени их цитопатогенного действия.

DOI: 10.7868/S0555109913010157

Клетки моноцитарного происхождения в силу доступности методов их выделения, фракционирования и культивирования из периферической крови служат удобной моделью для изучения ряда общих цитофизиологических закономерностей. Функциональные свойства клеток моноцитарного происхождения настолько многообразны, что их неполноценность, как следствие или причина патологического процесса, со временем неизбежно формирует системное поражение организма, сопровождающееся иммунологической недостаточностью [1–3]. В процессе дифференцировки из промиелоцита в моноцит на поверхности плазматической мембраны образуются многочисленные рецепторы, принимающие участие в процессах адгезии, эндо- и фагоцитоза, межклеточного взаимодействия и восприятия регуляторных воздействий [4]. Популяция моноцитов у человека идентифицируется по экспрессии специфического рецептора – кластера дифференцировки 14 (cluster of differentiation – CD), а субпопуляции – по степени его выраженности на мембране, а также наличия дополнительного рецептора – CD16 [5]. Субпопуляция моноцитов, имеющая высокую степень экспрессии рецептора CD14 и отсутствие – CD16, относится к “классическим”, составляющим у здоровых взрослых людей 90–95% от общего числа моноцитов, а субпопуляция с экспрессией CD16 (CD14⁺, CD16⁺) – к “провоспалительным” [6].

Система мононуклеарных фагоцитов филогенетически относится к древней линии защиты

организма. На каждой эволюционной ступени видов от простейших одноклеточных до млекопитающих выявляются клетки, способные к фагоцитозу [7]. Среди представителей позвоночных не выявлено существенных различий в характеристиках фагоцитирующих клеток, что определяет эти клетки как объекты для постоянного воздействия различных инфекционных агентов, в том числе вирусов. При длительном сосуществовании фагоцитов и вирусов возникают условия для адгезии вирусных частиц к поверхности макрофагов. Показано, что в процессе прикрепления вирусов, например флавивирусов – Денге и клещевого энцефалита и полиовируса, принимает участие гепарансульфатный протеогликан – рецептор макрофагов [8–11].

В зависимости от проявляемых свойств инфекционного агента происходит активация клетки. Прямое противовирусное действие макрофагов реализуется при активации следующих основных механизмов микробицидности: кислородзависимое, кислороднезависимое и нитроксидобразующее. Кислороднезависимые механизмы активируются в процессе слияния фагосом и лизосом, а кислородзависимые механизмы играют ведущую роль в деструкции объекта фагоцитоза. Этот процесс происходит при стимулировании комплекса НАДФ-оксидазы, также известной как фагоцитарная оксидаза или оксидаза кислородного взрыва. При ее участии происходит образование активных форм кислорода: супероксидного анион-радикала O₂⁻,

пероксида водорода H_2O_2 , гидроксильного радикала OH^\cdot и др. Исследования недавних лет показали, что в стимулированных вирусами и провоспалительными цитокинами макрофагах, наряду с продукцией активных метаболитов кислорода, происходит образование оксида азота [12, 13]. Оксид азота (NO) — это газовая молекула со свойствами свободного радикала, имеющая неспаренный электрон, что придает ей высокую активность к реакции с кислородом, супероксидным анион-радикалом и металлами гемсодержащих и негемовых белков [14]. В макрофагах образование NO осуществляется двумя путями — нитроксидсинтазным, при окислении аминокислоты L-аргинин в присутствии фермента синтазы оксида азота, и нитритредуктазным, действующим в условиях дефицита кислорода при активации нитритредуктазных систем, связанных с гемсодержащими белками — гемоглобином, миоглобином, цитохромоксидазой и др. [15]. Таким образом, нитроксидобразующая активность моноцитов (макрофагов) малоизученная при вирусных инфекциях, представляет определенный интерес, в точки зрения этих клеток в защите организма.

Способность вируса вызывать специфическую морфологическую и функциональную патологию зараженных им клеток, культивируемых вне организма, называется цитопатогенностью. Различают 3 типа цитопатогенного эффекта вирусов: цитолитический, трансформирующий, индуктивный [7]. Цитолитический эффект характеризуется общей деструкцией клетки, которой предшествуют морфологические изменения клеточных органелл и разрушение митохондрий. При трансформирующем эффекте зараженная вирусом клетка приобретает способность к неограниченной пролиферации. Индуктивный цитопатический эффект характеризуется способностью вируса стимулировать инфицированные клетки к продукции цитокинов.

Феномен цитопатического эффекта используют для диагностики, идентификации и титрования вирусов в культуре клеток. При сравнении в строго контролируемых условиях нескольких штаммов вирусов их цитопатогенное действие может иметь количественное выражение, а его степень измеряется в количестве вирусных частиц, необходимых для заражения культуры клеток. При поддержании штаммов вирусов в лабораторных условиях их свойства часто изменяются как в сторону усиления, так и ослабления, и определение цитопатогенных свойств вирусов приобретает особенный смысл, связанный с постановкой различных научных экспериментов.

Цель работы — сравнительное исследование особенностей метаболизма макрофагов при заражении вирусами, различающимися по степени

вирулентности, и морфологических изменений этих клеток.

МЕТОДИКА

Первичную культуру макрофагов получали из перитонеальной полости беспородных белых мышей. Для экспериментов использовали концентрацию 2×10^6 кл./мл в среде состава института памяти Рузвелл Парка (Roswell Park Memorial Institute medium — RPMI) (фирма “Sigma”) с 5% эмбриональной бычьей сывороткой (фирма “ICN”). Суспензию клеток разносили по 100 мкл в лунки иммунологического плоскодонного планшета. После 40 мин инкубации в термостате при $37^\circ C$ в смешанной атмосфере с присутствием 5% CO_2 неадгезированные клетки дважды отмывали теплой средой RPMI и в 200 мкл среды, включающей 5% эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мкм глутамин и 0.2 мкм гентамицина, оставляли на 3 сут для окончательной дифференцировки клеток.

Для заражения клеток был взят высоковирулентный штамм “Primorye-73” (P-73) вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), выделенный из мозга умершего больного клещевым энцефалитом, и два штамма Primorye-202 и Primorye-69 (P-202 и P-69), выделенные из крови больных лихорадочной формой заболевания. Также использовали вирусы сем. Picornaviridae: вакцинный штамм LSc2ab вируса полиомиелита типа 1 (полиовирус); кишечный цитопатогенный вирус-сирота человека (Enteric Cytopathic Human Orphan — ECHO) типа 11, вариант В, штамм “Каримов”, сибирский, увеатропный и вирус Коксаки В типа 1, прототипный штамм Conn. 5 (вирус Коксаки В1). Эти вирусы отличались по степени цитопатогенности, определенной на чувствительных к ним перевиваемых культурах клеток. Наиболее цитопатогенным был полиовирус (LD_{100}), затем вирус Коксаки В1 (LD_{70}) и последний по степени цитопатогенности — энтеровирус ECHO11 (LD_{10}). В экспериментах использовали вируссодержащую культуральную жидкость перевиваемых клеток, зараженных вирусами, содержащую 2 Ig титра цитопатогенного действия при 50% гибели клеток ($ТЦД_{50}$). Инкубацию клеток с вирусами проводили в течение 60 мин, после чего для удаления неадгезированных вирусных частиц монослой клеток промывали дважды средой RPMI и продолжали инкубировать до 24 ч.

Оценка динамики накопления вирусного антигена в клетках проводилась непрямой методом флуоресцирующих антител (нМФА). Для этого, монослой клеток фиксировали в 100° охлажденном метиловом спирте при минус $20^\circ C$ в течение 30 с, с целью определения вирусного антигена на фиксированные клетки наслаивали поликло-

нальную сыворотку иммуноглобулинов мыши против использованных для заражения макрофагов вирусов в разведении 1 : 64 и объеме 5–20 мкл. Неспецифическое свечение исключалось путем инкубирования образцов в течение 1 ч в 3% растворе альбумина на основе рабочего буфера. Препараты выдерживали во влажной камере в течение 30 мин в термостате при 37°C, потом промывали рабочим буферным раствором с твином. В качестве флуоресцирующей сыворотки для выявления антигенов вирусов использовали Zenon Labeling Kit Alexa Fluor 546 (фирма “Sigma”) против иммуноглобулина мыши IgG1.

Образцы просматривали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа (ЛСКМ). Для измерений использовали водноиммерсионный объектив ($\times 40$) C – Plan-Apochromat (числовая апертура 1.4), обеспечивающий разрешение около 0.3 мкм в плоскости объектива и около 0.6 мкм вдоль оптической оси объектива при сканирующем возбуждении. Размер конфокальных изображений составлял 1024×1024 вокселей, а время измерения одного изображения – около 25 с. Для регистрации в клетках меченного вирусного антигена использовали возбуждение 543 нм (~20 мкВт на образце, 100%). Световое излучение клеток проходило через одно из трех дихроичных зеркал: NT 80/20, NFT 545; после чего, с помощью дихроичного зеркала NFT 545 и узкополосного фильтра BP 560–615, выделяли спектральный диапазон 560–615 нм, соответствующий эмиссии Alexa Fluor 546. Измеряли спектры флуоресценции образцов, интенсивность свечения выражали в условных единицах, время наблюдения составило до 1 сут.

Определение содержания метаболитов оксида азота (NO) – нитритов (NO_2^-). После инкубирования при 37°C зараженных вирусом клеток надосадок и монослой клеток замораживали и хранили при минус 20°C. К разрушенным макрофагам добавляли по 100 мкл Грисс реактива, который состоял из равных объемов 0.1% N-(1-нафтил)этилендиамина дигидрохлорида и 1% p-аминобензидин-сульфаниламида (фирма “ICN”), на основе 2.5% -ного раствора фосфорной кислоты [16]. После 10 мин контакта определялась оптическая плотность полученных субстратов на спектрофотометре Multiscan Titertek Plus (“Flow lab.”, Финляндия) при 540 нм. В качестве контроля использовали образцы с раствором субстрата незараженных клеток.

Определение активности АТФазы и 5'-нуклеотидазы. К монослою клеток добавляли по 20 мкл субстрата для АТФазы (8 мг АТФ на 1 мл трис-HCl-буфера pH 7.8, содержавшего 87 мг NaCl, 28.7 мг KCl, 52 мг $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) и 5'-нуклеотидазы (4 мг АМФ на 1 мл такого же буфера, содержащего 87 мг NaCl и 70 мг MgCl_2), образцы оставля-

ли на 30 и 60 мин [17]. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл смеси аскорбиновой и молибденовой кислот в соотношении 1 : 1. Через 20 мин оптическая плотность субстратов измерялась на спектрофотометре при длине волны 620 нм.

Определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) использовали метод Лойда в собственной модификации [18].

К фиксированному монослою клеток добавляли 100 мкл субстрата для сукцинатдегидрогеназы – метилтиазолилтетразолий бромид (МТТ, 3-[4,5-диметилтиазолил-2]-2,5-дифенил тетразолиум бромид, фирма “ICN”) 2 мг/мл на основе фосфатного буфера pH 7.2 с 0.4% MnCl_2 . Монослой клеток с субстратами инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Гранулы диформаза растворяли добавлением 100 мкл изопропилового спирта, подкисленного 0.04 М HCl, в течение 20 мин. Оптическая плотность субстратов определялась на спектрофотометре при длине волны для лактатдегидрогеназы 492 и сукцинатдегидрогеназы 540 нм. В качестве контроля использовали образцы с раствором субстрата незараженных клеток.

Результаты спектрофотометрического исследования выражали в виде индекса стимулирования (Т), который вычислялся, как отношение разности между средними показателями оптической плотности растворов, содержащих продукты реакции зараженных и незараженных вирусами клеток, к среднему показателю оптической плотности раствора для незараженных клеток в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектрофотометрический анализ клеток, проведенный с помощью лазерной конфокальной микроскопии, показал, что наибольшее количество вирусного антигена ВКЭ определялось в макрофагах, зараженных штаммом Р-69 ВКЭ (рис. 1а). В этих же пределах выявлялось содержание антигена в клетках, инфицированных штаммом Р-202 (рис. 1б), тогда как при заражении клеток вирулентным штаммом ВКЭ Р-73, количество антигенсодержащих клеток статистически достоверно было ниже (рис. 2а). Таким образом, установлено, что наиболее активно макрофаги поглощали слабовирулентные штаммы ВКЭ. В отношении вирусов сем. Picornaviridae наибольшее количество антигена обнаруживалось в образцах клеток, инфицированных энтеровирусом ЕСНО11, затем вирусом Коксаки В1 и полиовирусом (рис. 2б).

Определение активности ферментов плазмалеммы макрофагов, к которым относят 5'-нуклеотидазу (5'-рибонуклеотидфосфогидролаза, КФ 3.1.3.5.), позволяет оценить степень стимулирова-

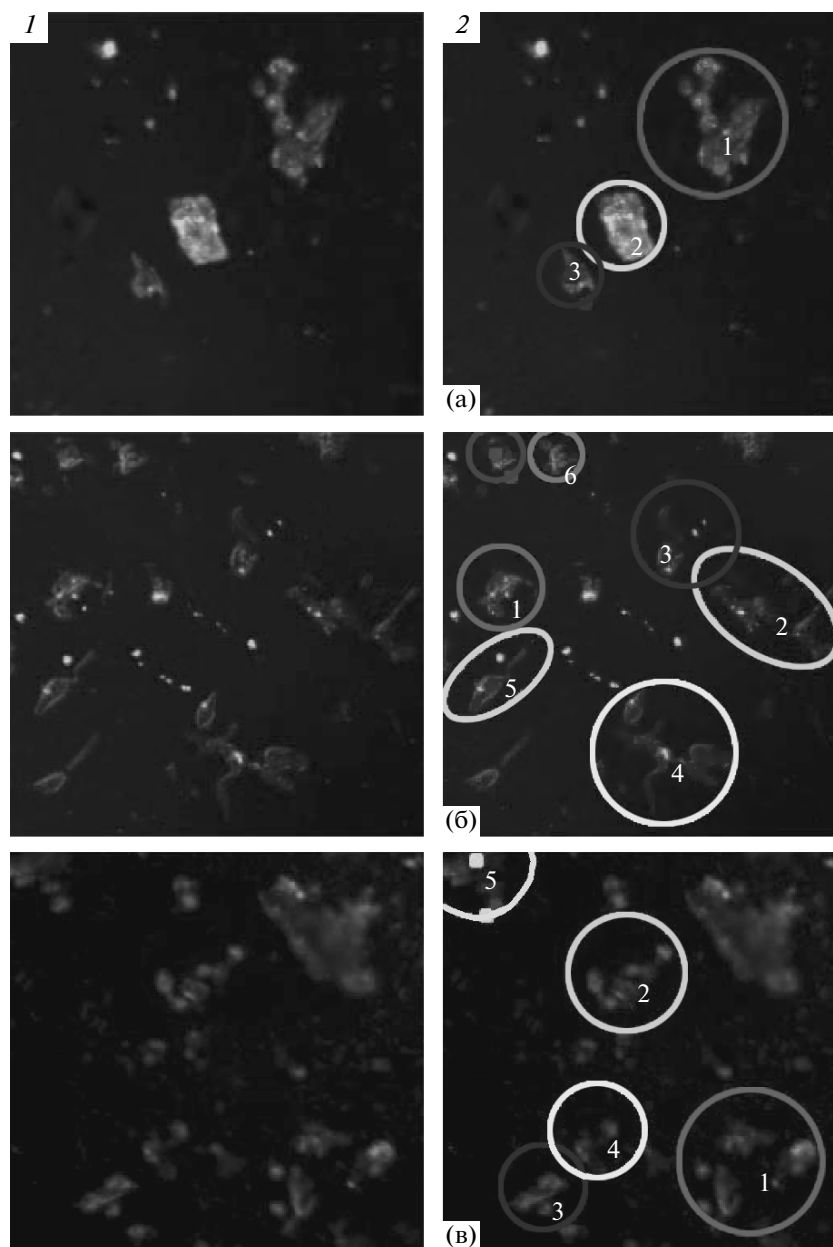


Рис. 1. Лазерная сканирующая микроскопия культуры клеток, зараженных вирусами; а – штаммом ВКЭ Р-69; б – штаммом ВКЭ Р-202; в – штаммом ВКЭ Р-73, 1 ч после заражения, ув. ×800.

1 – специфическое свечение клеток, 2 – области измерения интенсивности флуоресценции.

ния клеток. Нами было выявлено повышение активности фермента в начальные сроки после заражения (4 ч) макрофагов, которые были инфицированы слабовирулентными штаммами ВКЭ Р-69 и Р-202 и энтеровирусом ЕСНО11 (рис. 3а, б). Максимальные значения активности 5'-нуклеотидазы отмечались в клетках, после 3 ч заражения штаммом ВКЭ Р-69. Индекс стимуляции составил $37.2 \pm 2.1\%$. Для животных, инфицированных вирулентным штаммом ВКЭ Р-73, этот показатель был равен $4.5 \pm 0.9\%$. В дальнейшем активность 5'-нуклеотидазы снижалась. Необходимо

отметить высокую активность этого фермента в клетках, зараженных энтеровирусом ЕСНО 11. По-нашему мнению, резкое повышение в начальные сроки инфицирования активности 5'-нуклеотидазы указывает на повышение пуринового обмена в фагоцитах в ответ на внедрение этих вирусов в клетки.

При исследовании активности аденозинтрифосфатазы (АТФаза, КФ 3.6.1.37) обнаружено достоверное изменение внутриклеточного содержания фермента в макрофагах, инфицированных

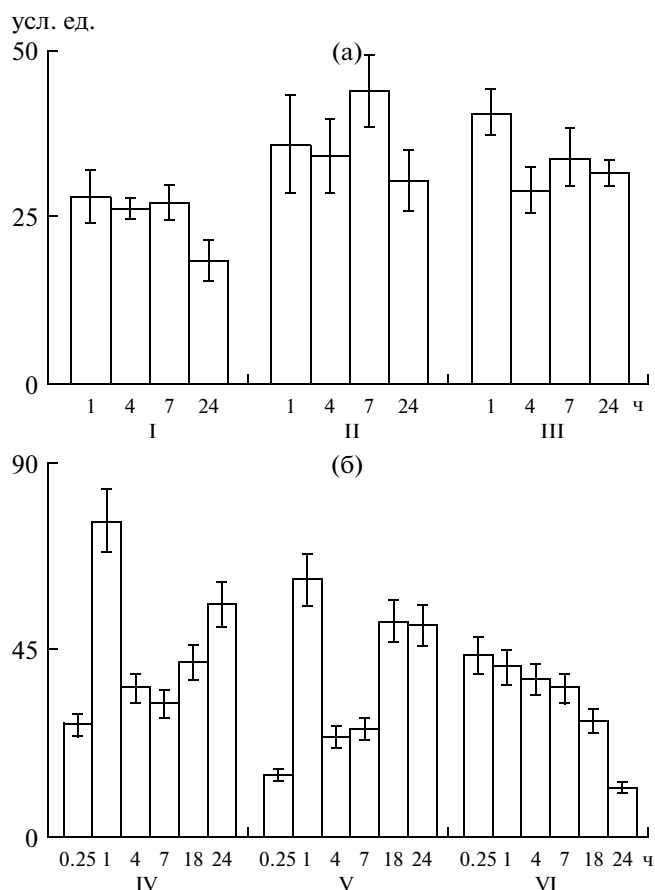


Рис. 2. Интенсивность свечения (усл. ед.) антигена ВКЭ (а) и вирусов сем. Picornaviridae (б) в условных единицах в зависимости от срока инкубирования (ч). I – штамм ВКЭ Р-73; II – штамм ВКЭ Р-69; III – штамм ВКЭ Р-202; IV – Коксаки В1; V – полиовирус; VI – энтеровирус ЕСНО 11.

слабовирулентными штаммами ВКЭ и энтеровирусом ЕСНО11 (рис. 3в, г). Необходимо отметить, что при контакте с энтеровирусом ЕСНО11 в макрофагах в течение всего периода наблюдения обнаруживались, по сравнению с клетками, инфицированными остальными вирусами, максимальные значения активности АТФазы. Индекс стимулирования после 3 ч инкубирования достигал $24.7 \pm 1.6\%$. Таким образом, полученные данные по активности АТФазы указывают на выраженное стимулирование макрофагов в ответ на заражение вирусами, обладающими сниженным цитопатогенным действием на клетки.

Наблюдаемое нами повышение внутриклеточного содержания ферментов макрофагов, которые обычно расходуются клетками при различных пространственных преобразованиях плазмалеммы, связано с репродукцией вирусов. Известно, что в течение процесса репликации вирусов многих семейств обнаруживается ингибирование экспрессии генов клетки-хозяина [19]. Одной из при-

чин этого считают образование в ресурсах клеток высокого уровня ферментов, таких, как нуклеозид трифосфатаз и нуклеотидаз, используемых при синтезе вирусных компонентов. Причем нуклеозидтрифосфаты, которые синтезируются при участии 5'-нуклеотидаз, служат строительными блоками для вирусной РНК или функционируют в качестве коферментов. Наряду с этим цитоплазматическая область АТФазы принимает участие в реакционном цикле фосфорилирования (дефосфорилирования) при переносе синтезированных нуклеотидов. Вероятно, увеличение показателей внутриклеточного содержания 5'-нуклеотидазы и АТФазы в зараженных вирусами макрофагах отражает наличие синтеза вирусных нуклеотидов в фагоцитах.

Для определения цитотоксического действия инфекционных агентов на клетки используется тест, основанный на уменьшении количества метилтиазолилтетразолия бромид (МТТ), включенного в клетки. Преобразование МТТ в формазан происходит с помощью сукцинатдегидрогеназы (СДГ, КФ 1.3.5.1) митохондрий, отражающих жизнеспособность клеток.

В течение 1 сут после заражения, по сравнению с контролем, установлено понижение активности СДГ в макрофагах, зараженных ВКЭ, энтеровирусом Коксаки В1 и полиовирусом (рис. 4а). Различие между показателями активности этого фермента в клетках, зараженных штаммами ВКЭ, отличающимися по степени вирулентности, статистически было недостоверным. Необходимо отметить, что достоверное повышение внутриклеточного содержания СДГ выявлялось только в макрофагах, зараженных энтеровирусом ЕСНО 11. Так, после 2 ч инкубирования индекс стимулирования достигал значения $36.1 \pm 1.7\%$, после чего снижался и вновь повышался к концу срока наблюдения ($42.3 \pm 1.8\%$). Напротив, количество этого фермента в макрофагах, зараженных энтеровирусом Коксаки В1, находилось в пределах контрольных значений, а в клетках, инфицированных полиовирусом и ВКЭ, снижалось. Минимальные показатели выявлялись через 4 ч после заражения и составили -7.8 ± 0.5 и -20 ± 1.7 соответственно, что указывало на цитотоксическое действие этих вирусов.

В литературе последних лет особое значение в ряде кислородзависимых метаболитов, помимо активных форм кислорода, придается нитроксидным радикалам. При этом указывается на то, что уровень продукции активных форм NO в этих клетках коррелирует с такими классическими критериями стимулирования, как усиленная продукция активных форм кислорода и микробицидность. Нестабильность и высокая реакционная способность молекулы оксида азота (NO) являются главными причинами методических трудно-

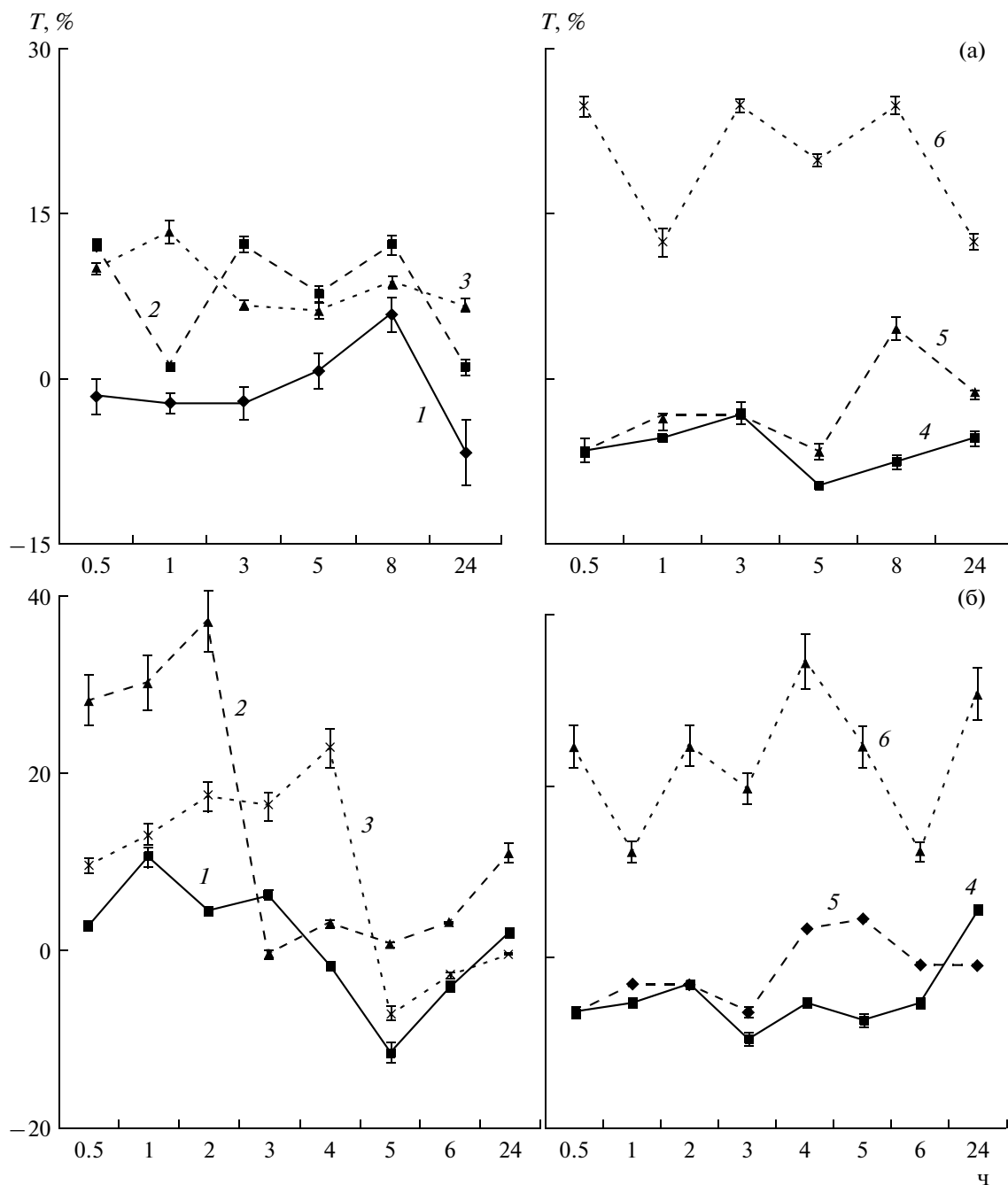


Рис. 3. Активность ферментов 5'-нуклеотидазы (а) и АТРазы (б) в макрофагах, зараженных вирусами. По оси ординат Т – индекс стимулирования в процентах.

1 – штамм ВКЭ Р-73; 2 – штамм ВКЭ Р-69; 3 – штамм ВКЭ Р-202; 4 – Коксаки В1; 5 – полиовирус; 6 – энтеровирус ЕСНО 11.

стей при его количественной оценке. Для исследования активности нитроксидзависимой системы макрофагов, инфицированных вирусами, мы использовали метод косвенного выявления нитрит-аниона при помощи реактива Грисса.

При изучении функциональной активности макрофагов установлено, что содержание метаболитов NO, по сравнению с показателями для не-

зараженных клеток, повышалось через 2 ч после инфицирования вирусами (рис. 4б). В этот период индекс стимулирования для клеток, зараженных вирулентным штаммом Р-73, составил $0.9 \pm 0.1\%$, тогда как для макрофагов, инфицированных слабовирулентными штаммами Р-69 и Р-202 – $6.7 \pm 0.4\%$ и $1.78 \pm 0.1\%$ соответственно. В дальнейшем показатели содержания метаболитов NO в

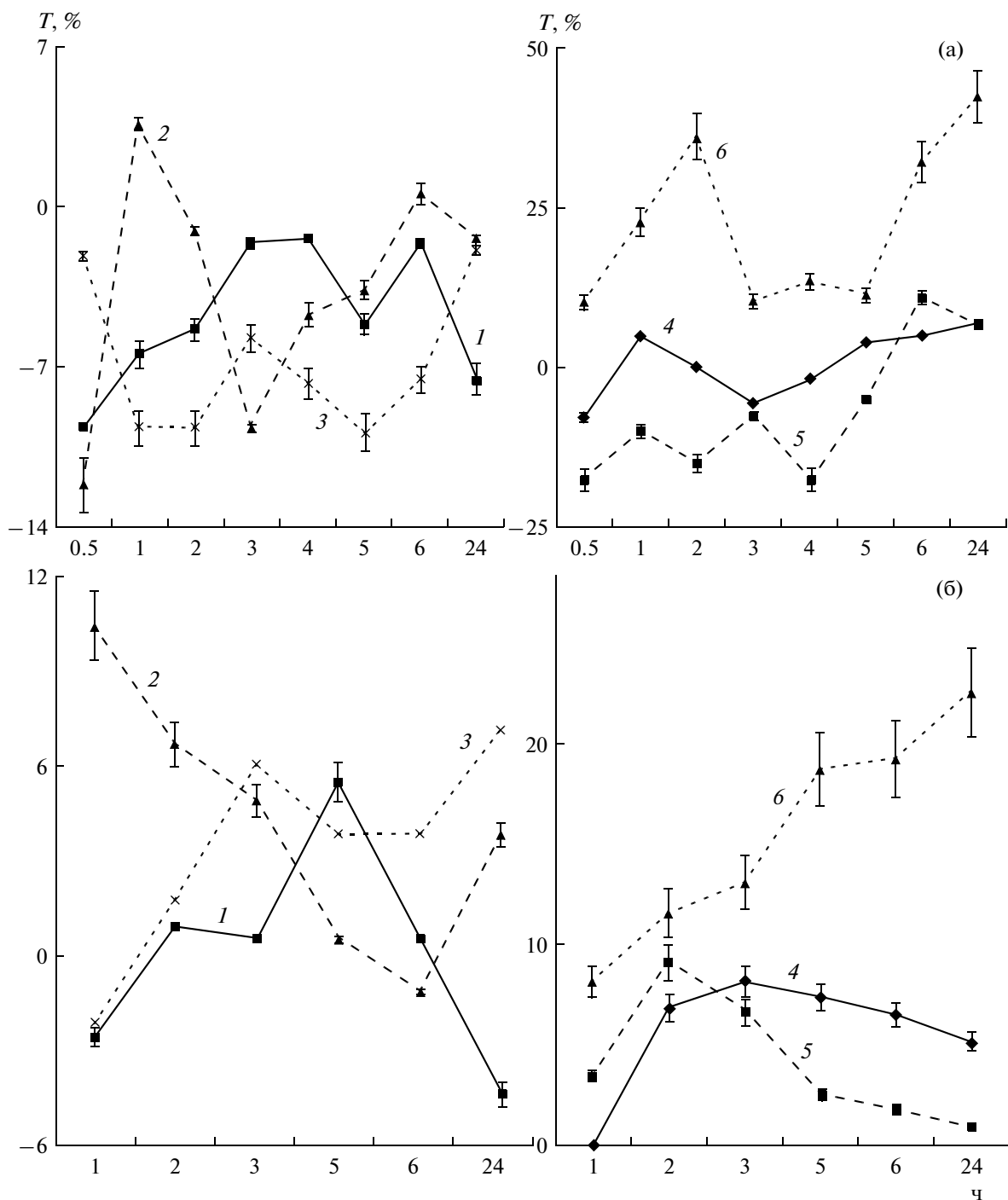


Рис. 4. Активность ферментов сукцинатдегидрогеназы (а) и продукции оксида азота (б) в макрофагах, зараженных вирусами. По оси ординат Т – индекс стимуляции в процентах.
 1 – штамм ВКЭ Р-73; 2 – штамм ВКЭ Р-69; 3 – штамм ВКЭ Р-202; 4 – Коксаки В1; 5 – полиовирус; 6 – энтеровирус ЕСНО 11.

макрофагах, зараженных слабовирулентными штаммами ВКЭ, превышали таковые для клеток, инфицированных вирулентным штаммом Р-73 почти в 2 раза. Таким образом, максимальная NO-образующая активность клеток выявляется в

начальные сроки после заражения и зависит от свойств раздражающего агента. Интерес представляют также данные исследования содержания метаболитов NO в макрофагах, инфицированных энтеровирусами и полиовирусом. Повы-

Показатели индекса реактивности клеток (ИРК), зараженных вирусами

ИРК, зараженных штаммами вирусов	Ферменты			Метаболиты оксида азота NO	ИРК _{ср}
	АТФаза	5'-нуклеотидаза	сукцинатдегидрогеназа		
ВКЭ Р-73	99	99	91	99	97
ВКЭ Р-69	120	108	100	116	111
ВКЭ Р-202	110	109	101	109	107
Энтеровирус Коксаки В1	94	91	100	100	96
Полиовирус	97	91	93	93	93
Энтеровирус					
ЕСНО11	120	114	122	109	116

шение количества нитритов отмечалось в начальные сроки инкубирования, снижаясь в последующем в макрофагах, зараженных энтеровирусом Коксаки В1 и полиовирусом, и повышаясь в клетках, контактировавших с энтеровирусом ЕСНО 11.

С целью оптимизации оценки цитотоксического действия вирусов на макрофаги нами был использован индекс реактивности клеток (ИРК) в условных единицах. Этот показатель вычисляется на основании значений оптической плотности субстратов в цитохимических реакциях, связанных с изменением функциональной активности клеток после воздействия на них вирусов. ИРК равен соотношению среднеарифметического показателя активации клеток (ПАК), зараженных вирусом, к аналогичному показателю для незараженных макрофагов, умноженном на 100. Целую часть значений ИРК, полученных по каждому параметру функциональной активности, суммировали, делили на количество ИРК и выражали в условных единицах. Суммарное определение ИРК_{ср} (по временным промежуткам и 4 параметрам реактивности клеток) четко показывает различие в степени цитопатогенности вирусов (таблица), тогда как сравнение отдельных значений ИРК не дает возможности в полной степени судить об этом. На предложенный нами показатель был оформлен патент на изобретение "Способ определения степени цитопатогенности вирусов" и получен приоритетный номер № 2011112215 от 30.03.2011.

На модели *in vitro* при заражении макрофагов различными видами вирусов, а также штаммами ВКЭ, отличающимися по степени вирулентности, нами была проверена целесообразность применения разработанного критерия. Из представленной таблицы видно, что наибольшим цитопатогенным действием обладали полиовирус (93 усл. ед.), затем энтеровирус Коксаки В1 (96 усл. ед.) и высоковирулентный штамм ВКЭ Р-73 (97 усл. ед.). Меньшей степенью цитопатогенности обладали энтеровирус ЕСНО 11 (116 усл. ед.) и слабовиру-

лентные штамм ВКЭ Р-69 и Р-201 (111 и 107 усл. ед. соответственно).

Таким образом, предложенный нами показатель, позволяет выразить реагирование макрофагов в цифровых результатах, что более точно отражает воздействие вирусов на клетки, так как степень цитопатогенности вирусов определяется на основании цитохимической реакции клеток в ответ на заражение с привлечением инструментального объективного подсчета данных, что позволяет оценить цитопатогенность вирусов в условных единицах. Возможность одновременного определения в одном образце ряда параметров, а также объективность учета результатов с помощью спектрофотометрии позволяет дать комплексную оценку функционального состояния клеток, инфицированных вирусами, и с помощью показателя ИРК_{ср} судить о степени цитопатогенности конкретного вируса. Данная модель проста в постановке, легко воспроизводима и позволяет в короткие сроки (до 1 сут), определить цитопатогенность вирусов.

Зависимость функциональной активности клетки от вирулентных свойств вирусов была показана и другими авторами. Так, при заражении макрофагов слабовирулентным, не способным воздействовать на нервную ткань организма, штаммом полиовируса, было определено, что количество клеток, содержащих вирусный антиген, было выше, чем в случае инфицирования высоковирулентным, способным воздействовать на нервную ткань организма, штаммом [20]. Анализ результатов ультраструктурного исследования макрофагов, зараженных Бразильскими флавивирусами (желтая лихорадка, Росио, Бассаквара и вируса Сан Луи энцефалита), выявил цитопатологические изменения после 3 сут инфицирования [21]. Эти изменения были однотипными при заражении клеток разными вирусами и выражались преимущественно в гипертрофии полостей гладкой и шероховатой эндоплазматической сети, увеличении количества свободных рибосом. При изучении функцио-

нальной активности макрофагов, зараженных указанными вирусами, была обнаружена зависимость продукции ими цитокинов (интерлейкин 1 β , фактор некроза опухоли α , фактор трансформации роста β , интерферон 1 α) и оксида азота (NO) от вида вируса, использованного для инфицирования клетки [22]. Авторами был сделан вывод о селективной способности тестируемых Бразильских флавивирусов регулировать синтез макрофагами цитокинов и NO. В отношении ВКЭ было показано, что макрофаги более чувствительны к нейроинвазивному вирулентному для мышей штамму [23]. Однако при этом с помощью электронной микроскопии не были определены морфологические изменения клеток, связанные с их активацией. Вирусные частицы преимущественно локализовались в эндоплазматической сети и других цитозольных структурах клеток, тогда как при заражении макрофагов ослабленным, не способным воздействовать на нервную ткань организма, штаммом на фоне отсутствия репродукции ВКЭ обнаруживались четко выраженные морфологические изменения, свидетельствующие о стимулировании клеток.

Таким образом, основываясь на литературных и собственных данных, можно сделать вывод о зависимости реакции макрофагов не только от вида вирусов, которыми они были инфицированы, но и от их вирулентных свойств. Анализ результатов нашего исследования метаболической активности макрофагов, зараженных вирусами, показывает, что период активации генома вируса в цитоплазме клетки-хозяина сопровождается первоначальным повышением активности клеточных ферментов, а период транскрипции РНК вируса и синтез его компонентов совмещен с наибольшей ферментативной активностью макрофагов. При этом, учитывая, что биосинтез компонентов вирусной частицы осуществляется с участием ферментов клетки-хозяина, то статистически достоверный сдвиг подобной активности может рассматриваться как показатель цитопатогенного воздействия вируса на клетки.

В целом, применение высокочувствительных методов определения активности ферментов и выявление корреляционной связи между ее изменениями и особенностями взаимодействия вирусов с клетками можно отнести к важным способам идентификации не только репродукции вирусов, но и дифференцировки типов их цитопатогенного действия, а также разграничения его степени.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Международного научно-технического центра (государственный контракт 4006).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фрейдлин И.С. Система моноклеарных фагоцитов. М.: Медицина, 1984. 272 с.
2. Маянский Д.Н., Маянский А.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука, 1989. 344 с.
3. Тоголян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. СПб: Наука, 2000. 232 с.
4. Barbosa C.M., Leon C.M., Nogueira-Pedro A., Wasinsk F., Araújo R.C., Miranda A., Ferreira A.T., Paredes-Gameiro E.J. // Cell Death Dis. 2011. V. 2. № 2. P. e165.
5. Ziegler-Heitbrock H.W. // J. Leukoc. Biol. 2000. V. 67. № 4. P. 603–606.
6. Mizuno K., Toma T., Tsukiji H., Okamoto H., Yamazaki H., Ohta K., Kasahara Y., Koizumi S., Yachie A. // Clin. Exp. Immunol. 2005. V. 142. № 2. P. 461–470.
7. Cooper E.L. // Cur. Pharmaceut. Des. 2002. V. 8. № 4. P. 99–110.
8. Temonen M., Lankinen H., Vapalahti O., Ronni T., Julkunen I., Vaehri A. // Virol. 1995. V. 206. № 1. P. 8–15.
9. Siczekarski S.B., Whittaker G.R. // Traffic. 2003. V. 4. № 5. P. 333–337.
10. Gavrilovskaya I.N., Brown E.J., Ginsberg M.H., Mackow E.R. // J. Virol. 1999. V. 73. № 5. P. 3951–3959.
11. Schlegel A., Giddings T.H. Jr., Ladinsky M.S., Kirkegaard K. // J. Virol. 1996. V. 70. № 5. P. 6576–6588.
12. Fang F.C., Vazquez-Torres A. // Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2002. V. 282. № 5. P. 941–943.
13. Amano F., Noda T. // FEBS Lett. 1995. V. 368. № 3. P. 425–428.
14. Jourdeuil D., Jourdeuil F.L., Kutchukian P.S., Musah R.A., Wink D.A., Grisham M.B. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 7. P. 28799–28805.
15. Рейтов В.П. // Вестн. Рос. Акад. мед наук. 2000. Т. 4. № 3. С. 35–41.
16. Schulz K., Kerber S., Kelm M. // Nitric Oxide. 1999. V. 3. № 3. P. 225–234.
17. Кириллчева Г.Б., Кириллчева А.А., Туманян М.А. // Иммуномодуляторы в инфекционной патологии. М.: Изд-во НИИЭМ, 1988. С. 55–56.
18. Лойда З., Госсрай Р., Шублер Т. Гистохимия ферментов лабораторные методы. М.: Мир, 1982. 272 с.
19. Knipe D.M. Fundamental Virology / Eds. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, Philadelphia: a Lippincott-Raven Publishers, 1996. P. 239–265.
20. Freistadt M.S., Eberle K.E. // J. Virol. 1996. V. 70. № 9. P. 6486–6492.
21. Barros V.E., Thomazini J.A., Figueiredo L.T. // J. Microsc. 2004. V. 216. № 1. P. 5–14.
22. Barros V.E., Ferreira B.R., Livonesi M., Figueiredo L.T. // Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo. 2009. V. 51. № 3. P. 141–147.
23. Růžek D., Vancová M., Tesarová M., Ahantarig A., Kopecký J., Grubhoffer L. // J. Gen. Virol. 2009. V. 90. № 7. P. 1649–1658.

Biochemical Markers of Virus Cytopathogenicity in Macrophages

N. G. Plekhova^b, L. M. Somova^a, N. V. Krylova^a, G. N. Leonova^a, I. N. Lyapun^a, and I. S. Smirnov^b

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

^b *Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690950 Russia*

e-mail: pl_nat@hotmail.com

Received September 27, 2011

Abstract—The results of macrophage metabolism studies at their infection by viruses differing in the level of virulence are presented. With the purpose of optimizing the estimation of viral cytopathogenic effects on macrophages, an index of cell reactions, which allows one to reveal the degree of virus influence in standard units, is offered. Generally, the application of high-sensitivity methods for functional activity determination and identification of the correlative communication between its changes and morphological features of cells can be prescribed to objective identification methods of not only viral reproduction, but also differentiation of types and the degree of their cytopathogenic effects.

УДК 543.544:547.913

АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭФИРНЫХ МАСЕЛ ОРЕГАНО, ТИМЬЯНА И ЧАБЕРА

© 2013 г. Е. С. Алинкина, Т. А. Мишарина, Л. Д. Фаткуллина

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

e-mail: katrinalinka@gmail.com

Поступила в редакцию 26.03.2012 г.

В модельных реакциях со стабильным свободным 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил-радикалом изучены антирадикальные свойства близких по качественному составу, но различающихся по количественному содержанию основных компонентов эфирных масел тимьяна (*Thymus vulgare*), орегано (*Origanum vulgare*) и чабера (*Satureja hortensis*) и сопоставлены со свойствами синтетического антиоксиданта ионола. Скорости реакций компонентов эфирных масел с радикалом были практически одинаковы для эфирных масел и вдвое больше, чем скорость реакции ионола. Величины антирадикальной эффективности также были близки между собой для всех эфирных масел, но на порядок меньше, чем для ионола.

DOI: 10.7868/S0555109913010029

Благодаря наличию бактерицидных, противогрибковых, инсектицидных и противопаразитарных свойств эфирные масла (ЭМ) пряно-ароматических растений широко использовали уже в средние века. В последние годы интерес к изучению свойств этих природных биологически активных соединений существенно вырос, так как стали актуальными проблемы, связанные с безопасностью многих синтетических веществ, используемых в различных областях жизнедеятельности человека [1, 2]. Так, исследования показали, что многие эфирные масла являются антиоксидантами, равными по эффективности синтетическим антиоксидантам, при этом они и продукты их метаболизма безопасны для здоровья. Все эти качества значительно расширяют границы изучения и применения натуральных эфирных масел [3–7].

ЭМ представляют собой многокомпонентные смеси летучих веществ с характерным ароматом, присущим тем растениям, из которых они были выделены. Основными компонентами ЭМ являются соединения терпенового ряда: моно- и сесквитерпеновые углеводороды, альдегиды, кетоны, спирты, сложные эфиры, оксиды, а также производные фенолов. В некоторых эфирных маслах обнаружено незначительное количество серо- и азотсодержащих гетероциклических соединений, ароматических соединений, образующихся из аминокислот. Эфирные масла лука, чеснока, горчицы, хрена и других растений содержат значительное количество серосодержащих диалкилполисульфидов и алкилизотиоцианатов. Показано, что сильными антибактериальными и антиоксидантными свойствами обладают эфирные масла,

содержащие замещенные фенолы — эвгенол, тимол, карвакрол [8, 9]. Два последних соединения являются основными компонентами эфирных масел, полученными из орегано (*Origanum vulgare*), тимьяна (*Thymus vulgare*) и чабера (*Satureja hortensis*). Эти растения относятся к семейству Яснотковых (лат. Lamiaceae), включающее в себя около 3500 видов, среди которых множество пряно-ароматических (базилик, мята, Melissa, котовник, иссоп, розмарин, шалфей, майоран, чабрец и др.). Все они обладают приятным интенсивным ароматом, активно используются в кулинарии, многие из них имеют лечебные свойства, известные еще с древних времен. Большое число работ подтверждает наличие антибактериальной и противовоспалительной активности у таких растений и их эфирных масел [10, 11]. Недавние исследования показали способность эфирных масел чабера и орегано тормозить процессы старения у млекопитающих, оказывать благоприятное действие на уровень полиненасыщенных жирных кислот в мозге стареющих животных [12].

Цель работы — изучение антирадикальных свойств эфирных масел тимьяна (*Thymus vulgare*), орегано (*Origanum vulgare*) и чабера (*Satureja hortensis*) и их сравнение с синтетическим антиоксидантом — ионолом.

МЕТОДИКА

2,2-Дифенил-1-пикрилгидразил — радикал (ДФПГР) и ионол (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол) получены из “Sigma-Aldrich” (Германия).

Таблица 1. Состав ЭМ орегано, тимьяна и чабера (%)

Индекс удерживания	Соединение	Орегано	Тимьян	Чабер
925	α -туйен	0.39	1.02	1.00
933	α -пинен	2.06	1.46	0.70
946	Камфен	0.58	1.15	0.53
961	Сабинен	0.50	0.42	0.62
974	β -пинен	1.55	1.94	0.43
983	β -мирцен	–	–	1.70
1000	α -фелландрен	–	0.24	0.28
1012	α -терпинен	0.92	0.81	1.91
1015	p-цимен	13.00	20.75	10.73
1023	1,8-цинеол	0.22	1.50	0.86
1026	Лимонен	–	–	1.02
1038	Оцимен	–	–	0.20
1052	γ -терпинен	8.73	1.049	11.48
1056	Сабинен гидрат	–	0.15	0.47
1085	Линалоол	2.38	5.21	0.54
1152	Изоборнеол	0.32	1.94	1.86
1165	4-терпинеол	–	1.20	0.88
1175	α -терпинеол	–	0.50	0.18
1240	Борнилацетат	–	0.62	5.93
1271	Тимол	4.23	45.11	17.48
1283	Карвакрол	63.28	2.36	32.23
1420	β -кариофиллен	1.64	1.72	4.19
1431	α -бергамотен	–	–	0.52
1491	Миристицин	–	–	0.74
1496	Бициклогермакрен	–	–	1.82
Сумма фенолов, %		67.51	47.47	49.71

Эфирные масла, использованные в работе, были промышленными продуктами, произведенными компанией Lionel Hitchen Ltd., (Англия).

Хромато-масс спектрометрический анализ компонентов эфирных масел. Газово-хроматографический анализ (ГХ-МС) проводили на приборе HP 5890/5980 (“Hewlett Packard”, США) с кварцевой капиллярной колонкой HP-1 (25 м × 0.30 мм, слой фазы 0.25 мкм) при программировании температуры от 50 до 250°C со скоростью 4°/мин. Температура инжектора и масс-детектора составляла 250°C. Масс-спектры получали в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70 эВ. Идентификацию компонентов осуществляли путем сравнения величин индексов удерживания и масс-спектров, полученных при анализе образцов, с индексами и спектрами стандартов, определенными нами на этой же колонке, а также взятыми из библиотек масс-спектров NBS и Wiley 275. Количественное содержание компонентов определяли из площадей пиков,

полученных в ходе ГХ анализа в аналогичных условиях с пламенно-ионизационным детектором методом простой нормировки. Состав компонентов эфирных масел приведен в табл. 1.

Определение антирадикальной активности эфирных масел и ионола. Для определения антирадикальной активности к 1 мл 200 мкМ метанольного раствора ДФПГР добавляли метанольные растворы антиоксидантов (ионол, эфирные масла тимьяна, орегано и чабера) до достижения выбранных концентраций и доводили объем до 2 мл. Исходная концентрация ДФПГР во всех реакционных смесях составляла 1×10^{-4} М (39.4 мг/л), такие растворы имели оптическую плотность около 1. Мы исследовали четыре серии модельных реакций, в которых концентрации субстратов варьировались в следующих пределах: эфирные масла 2–1000 мг/л и ионол 1–100 мг/л. Для получения кинетических кривых восстановления ДФПГР антиоксидантами реакционные смеси помещали в кварцевые

кюветы (10 мм) с плотно закрывающимися крышками и регистрировали оптическую плотность на спектрофотометре СФ-2000 (ЗАО «ОКБ Спектр», Россия) при 515 нм при комнатной температуре в темноте через каждые 5 мин в течение 120 мин.

Для растворов ДФПГР в метаноле был построен график линейной зависимости оптической плотности от концентрации ДФПГР. По этому графику определили величину молярного коэффициента поглощения ϵ , который был равен 10010 л/моль см (толщина кюветы 1 см). По величине оптической плотности рассчитывали концентрацию остающегося радикала в модельных реакциях.

Каждую серию кинетических измерений проводили трижды, математическую обработку результатов осуществляли с помощью программ Microsoft Excel 2007 и SigmaPlot 10. Стандартное отклонение средних величин из 3 измерений не превышало 3% (относительных).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выполненное нами *in vivo* изучение биологической активности эфирных масел чабера и орегано показало, что регулярный прием малых доз (около 0.3 мкг/сут) масла чабера с едой или питьевой водой на 30% увеличивал продолжительность жизни мышей высокоракетной линии АКР и снижал частоту заболевания лейкозом [12, 13]. Было установлено, что такой же систематический прием здоровыми мышами линии Valb малых доз эфирного масла орегано увеличивал среднюю продолжительность их жизни на 120 сут или на 17%. При этом найдено, что прием масла на протяжении жизни не вызывал токсических эффектов, не влиял на массу тела, размеры иммуннокомпетентных органов и формулу крови [14, 15]. Эфирное масло действовало как природный антиоксидант, значительно снижая в крови, печени и мозге мышей содержание продуктов перекисного окисления липидов и увеличивая их устойчивость к окислению. В отсутствие экзогенного окислительного стресса прием масла приводил к модуляции ферментативной защитной системы, индукции защитных ферментов, значительно улучшал баланс антиоксидантных ферментов печени, оказывал позитивное влияние на антиоксидантный статус и формировал устойчивость к окислительному стрессу [15]. Найдено, что в мозге мышей в возрасте 24 мес, принимавших эфирное масло орегано, сохранялось высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот, в том числе крайне важной докозгексаеновой кислоты, тогда как в контрольной группе уровень этих кислот с увеличением возраста уменьшался на 10–20% [13, 15]. Такое действие на организм млекопитающих связано с наличием у эфирных ма-

сел различных видов биологической активности, в том числе антиоксидантной. Полученные *in vivo* биологические эффекты обусловили наш интерес к детальному изучению эфирных масел чабера и орегано, в том числе их способности взаимодействовать со свободными радикалами, которые могут приводить к развитию окислительного стресса и всех сопутствующих ему нарушений в здоровье.

Основными соединениями в изученных ЭМ были карвакрол и тимол (табл. 1), которые представляют собой изомерные фенолы с метильным и изопропильным заместителями. Сходство их строения определяет наличие близкой биологической активности, в частности антиоксидантной, которая была подтверждена в тестах *in vitro* и *in vivo*, а также на культурах клеток [16–18]. Тем не менее, незначительные различия в структуре изомеров приводили к количественным различиям в их активности. Так, в работе [16] показано, что антиоксидантная активность (АОА) тимола и карвакрола в двух липидных системах была разной: в одной из них активнее был карвакрол, в другой, наоборот – тимол. При этом АОА эфирных масел, содержащих эти фенолы, была выше, чем индивидуальных соединений. Это подтверждает тот факт, что такое свойство соединений, как АОА в значительной степени зависит от строения веществ, качественного и количественного состава модельных систем и от метода ее оценки [19].

Для определения антирадикальной активности (АРА) мы выбрали широко известную реакцию со стабильным ДФПГР [20–22]. Для сравнения антирадикальных свойств использовали величины EC_{50} , которые эквивалентны количеству антиоксиданта (ЭМ, ионола), необходимому для восстановления половины радикала. Из кинетических кривых восстановления радикала в модельных растворах с различными концентрациями ЭМ или ионола были построены линейные зависимости степени восстановления радикала за 30 мин от концентрации ЭМ. По ним рассчитали концентрацию ЭМ, при которой степень восстановления радикала составляла 50% (EC_{50}), полученные величины в г/л приведены в табл. 2. Как видно, величины EC_{50} для всех трех ЭМ были близки и составляли от 0.223 до 0.262 г/л. Следует отметить, что по данным работы [17] величина EC_{50} для индивидуального карвакрола составляла 0.267 г/л, а тимола – 0.269 г/л. Таким образом, величины EC_{50} для эфирных масел были меньше и различались между собой в большей степени, чем для индивидуальных фенолов. Это означает, что антирадикальная активность эфирных масел была выше, чем карвакрола и тимола. В то же время сравнение полученных данных для масел и индивидуальных фенолов подтверждает наше предположение, что антирадикальные свойства изучен-

Таблица 2. Кинетические и физико-химические характеристики процесса восстановления ДФПГР-радикала ионолом и ЭМ орегано, тимьяна и чабера

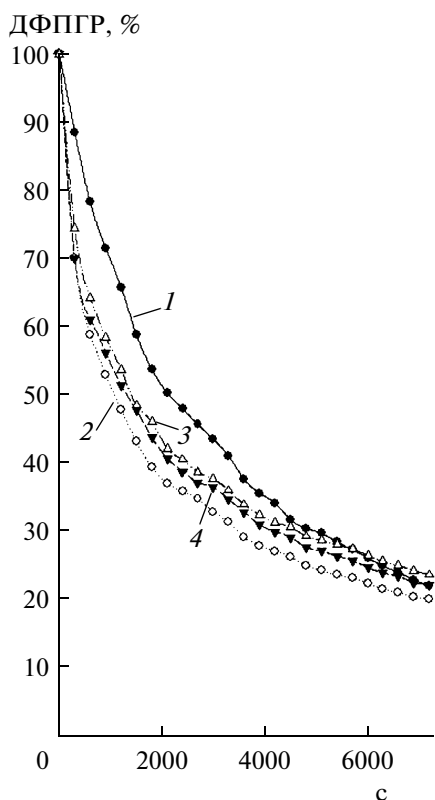
Кинетические и физико-химические параметры реакции	ЭМ орегано	ЭМ тимьяна	ЭМ чабера	Ионол
Уравнения 1	$y = 96.84 - 0.0693x$, $R^2 = 0.9352$	$y = 96.44 - 0.0655x$, $R^2 = 0.9103$	$y = 97.43 - 0.0602x$, $R^2 = 0.9428$	$y = 99.82 - 0.0300x$, $R^2 = 0.9997$
Уравнения 2	$y = 34.82 - 0.0021x$, $R^2 = 0.9860$	$y = 39.78 - 0.0025x$, $R^2 = 0.9893$	$y = 41.5 - 0.0025x$, $R^2 = 0.9946$	$y = 43.53 - 0.0029x$, $R^2 = 0.9890$
Содержание активных антирадикальных соединений, вступивших в реакцию (эквивалент ДФПГР, нмоль/мл)	67.12	62.47	60.92	62.49
Содержание антирадикальных соединений, вступивших в реакцию, мкг/мл	10.08	9.38	9.15	13.75
Исходная концентрация эфирного масла и ионола в модельной реакции, мкг/мл	300	300	300	10
Суммарное содержание фенолов в ЭМ, %	67.51	47.47	49.71	—
Суммарное содержание карвакрола и тимола в модельной реакции, мкг/мл	202.5	142.4	149.1	—
Концентрация фенолов, которые вступили в реакцию, %	5.0	6.6	6.1	137.5
Время окончания первой стадии, с	923	899	969	2077
EC ₅₀ , г/л	0.223	0.245	0.262	0.018
T ₅₀ , с	1080	1320	1380	2100
AE, л/г с	4.15×10^{-3}	3.09×10^{-3}	2.77×10^{-3}	2.65×10^{-2}

ных масел определяют эти два фенола. Согласно данным ГЖХ анализа, исследуемые ЭМ различаются по содержанию и соотношению тимола и карвакрола (табл. 1). Так, в ЭМ орегано суммарное содержание двух фенольных соединений было максимальным и составляло 67.51%, в масле тимьяна — 47.47% и в ЭМ чабера — 49.71% (табл. 2). При этом соотношение карвакрол : тимол также было разным: в масле орегано оно составляло 15 : 1, тимьяна — 1 : 19, в ЭМ чабера — 1.8 : 1.

На рисунке приведены кинетические кривые восстановления радикала компонентами эфирных масел и ионолом. Концентрации ЭМ были 300 мкг/мл, ионола — 10 мкг/мл. Как видно, процесс восстановления радикала имел две стадии — первую быструю, вторую — медленную, обе стадии описываются линейными уравнениями 1 и 2 псевдопервого порядка, которые приведены в табл. 2. Решение уравнений 1 и 2 для каждого масла и ионола позволило нам найти время окончания первой стадии и концентрацию восстановленного за этот период радикала. Результаты обработки кинетических кривых приведены в табл. 2. Коэффициенты при x в уравнениях 1 пропорцио-

нальны скорости первой быстрой стадии реакции, как видно, она максимальна для ЭМ орегано и минимальна для ЭМ чабера. Для ионола скорость первой стадии реакции в два раза меньше, чем для всех эфирных масел. На второй стадии скорости реакций всех антиоксидантов были близки (уравнение 2, табл. 2).

Содержание активных антирадикальных компонентов, вступивших в реакцию 1, приведено в табл. 2 и, как видно, этот параметр варьировал от 61 до 67 нмоль/мл (в эквиваленте радикала) и убывал в порядке: ЭМ орегано > ионол = ЭМ тимьяна > ЭМ чабера. С учетом того, что каждое из эфирных масел содержало по два активных антирадикальных компонента — карвакрол и тимол с молекулярной массой 150 а.е.м., было рассчитано содержание фенолов, вступивших в реакцию, оно составляло от 9.15 до 10.08 мкг/мл, а ионола — 13.75 мкг/мл. В реакционные смеси было добавлено по 300 мкг/мл эфирных масел и 10 мкг/мл ионола, реальное содержание суммы фенолов было меньше, оно уменьшалось в ряду ЭМ орегано > ЭМ чабера > ЭМ тимьяна и составляло 202.5, 149.1 и 142.4 мкг/мл соответственно. С учетом ре-



Кинетические кривые восстановления ДФПГР ионолом (1), ЭМ орегано (2), тимьяна (3) и чабера (4).

ального содержания фенолов получаем, что в реакции участвовало только 5% фенолов из ЭМ орегано, 6.6% из ЭМ тимьяна и 6.1% из ЭМ чабера. Из этих результатов можно сделать два вывода. Во-первых, антирадикальные активности карвакрола и тимола различались, более активным был тимол. Действительно, в ЭМ тимьяна доля тимола была намного больше, чем карвакрола, при этом содержание фенолов было минимальным, но их расход в ЭМ тимьяна был больше, чем в других маслах. С другой стороны, мы не смогли количественно описать взаимное влияние тимола и карвакрола в проявлении их антирадикальной активности. Это указывает на то, что не следует количественное содержание антиоксидантных компонентов в образце отождествлять с его общей антирадикальной активностью. Вероятно, для проявления антиоксидантных и антирадикальных свойств в эфирных маслах важно не только содержание отдельных компонентов с высокой активностью, но и их сочетание, а также присутствие других соединений [8]. Менее активные компоненты ЭМ также вносят свой вклад в общую АРА, например, монотерпеновые углеводороды, терпинолен, α - и γ -терпинены, благодаря которым ЭМ, не содержащие фенолов, способны проявлять относительно высокую АОА [23, 24]. В таких сложных многокомпонентных ком-

позициях, как ЭМ не исключена возможность как синергетического, так и антагонистического взаимодействия отдельных составляющих друг с другом, что, конечно же, может не изменить, но может и повысить или понизить общую АРА исследуемых ЭМ.

Механизм реакции ионола был сложным. По нашим данным, даже в первой быстрой стадии реакции одна молекула ионола реагировала более, чем с одной молекулами радикала, так как “эффективный” расход фенолов в этой реакции был 137% (табл. 2). Детальное изучение показало, что механизм реакции ДФПГР с ионолом включал быструю реакцию фенольной группы с радикалом, процессы делокализации H^+ , димеризации, комплексообразования, протекающих между образующимися полупродуктами, за счет которых одна молекула ионола восстанавливала 2.8 молекул радикала [20–22]. Такое же поведение было характерно для производных карвакрола и тимола, которые по своей АРА превосходили карвакрол [17]. Не менее сложными будут реакции радикала с компонентами эфирных масел, в которых одновременно может идти сразу несколько реакций с участием и компонентов ЭМ, и образующихся продуктов, способных как ускорять, так и замедлять процесс восстановления ДФПГР. Для описания таких систем мы использовали параметры, приведенные в табл. 2. Кроме величин EC_{50} и $T_{EC_{50}}$, мы использовали также характеристику, связывающую время восстановления половины радикала ($T_{EC_{50}}$) и необходимую для этого концентрацию субстрата (EC_{50}). Это величина антирадикальной эффективности (АЕ), которая рассчитывается по формуле, предложенной в [20].

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

Из табл. 2 видно, что для ЭМ значения АЕ различаются в 1.5 раза, а для ионола эта величина больше, чем для ЭМ в 5–10 раз. Однако стоит отметить, что $T_{EC_{50}}$ эфирных масел было в два раза меньше $T_{EC_{50}}$ ионола, что говорит о более высокой реакционной способности “быстрых” антирадикальных компонентов ЭМ.

На основе полученных данных можно сделать вывод, что хотя АРА ЭМ очень сильно зависит от состава, не всегда количественное содержание антиоксидантных компонентов в образце пропорционально его антирадикальной активности. Большое значение имеет соотношение компонентов, благодаря которому могут проявляться синергетические эффекты, обуславливающие более высокую АРА многокомпонентных смесей по сравнению с индивидуальными соединениями. Таким образом, все три ЭМ, несмотря на различия в количественном соотношении основных компонентов, близки по своим свойствам и прак-

тически не уступают синтетическому антиоксиданту ионолу, что дает возможность их использования в качестве эффективных природных антиоксидантов. Определение кинетических характеристик и выяснение механизмов синергетического и антагонистического действия антиоксидантов очень важно, так как это позволяет расширить круг доступных и высоко эффективных препаратов для различных отраслей промышленности, включая пищевую, фармацевтическую, косметическую и др.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kahl R., Kappus H. // Z. Lebensmitt. Unters. Forsch. 1993. V. 196. № 2. P. 329–338.
2. Cozzi R., Ricordy R., Aglitti T., Gatta V., Petricone P., De Salvia R. // Carcinogenesis. 1997. V. 18. P. 223–228.
3. Murcia M.A., Egea I., Romojaro F., Parras P., Jimenez A.M., Martinez-Tomea M. // J. Agric. Food Chem. 2004. V. 52. № 7. P. 1872–1881.
4. Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R. // Food Chem. 2005. V. 91. P. 621–632.
5. Wei A., Shibamoto T. // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. № 5. P. 1737–1742.
6. Zhelyazkov V.D., Cantrell C.L., Tekwani B. // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. № 2. P. 380–385.
7. El-Ghorab A., Shaaban H.A., El-Nassry K.F., Shibamoto T. // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. № 13. P. 5021–5025.
8. Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 6. С. 710–716.
9. Milos M., Makota D. // Food Chem. 2012. V. 131. P. 296–299.
10. Miguel M.G. // Flavour Fragr. J. 2010. V. 25. № 1. P. 291–312.
11. Ultee A., Bennink M.H.J., Moezelaar R. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 4. P. 1561–1568.
12. Бурлакова Е.Б., Ерохин В.Н., Мишарина Т.А., Фаткуллина Л.Д., Семенов В.А., Теренина М.Б., Воробьева А.К., Голощапов А.Н. // Изв. РАН. Сер. биол. 2010. Т. 37. № 6. С. 612–618.
13. Мишарина Т.А., Бурлакова Е.Б., Фаткуллина Л.Д., Теренина М.Б., Воробьева А.К., Ерохин В.Н., Голощапов А.Н. // Биомедицинская химия. 2011. Т. 57. № 6. С. 604–614.
14. Бурлакова Е.Б., Мишарина Т.А., Фаткуллина Л.Д., Теренина М.Б., Крикунова Н.И., Ерохин В.Н., Воробьева А.К. // Докл. РАН. 2011. Т. 437. № 3. С. 409–412.
15. Бурлакова Е.Б., Мишарина Т.А., Воробьева А.К., Алинкина Е.С., Фаткуллина Л.Д., Теренина М.Б., Крикунова Н.И. // Докл. РАН. 2012. Т. 444. № 6. С. 676–679.
16. Ruberto G., Baratta M.T. // Food Chemistry. 2000. V. 69. P. 167–174.
17. Mastelic J. // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. № 14. P. 3989–3996.
18. Slamenova D., Horvathova E., Wsolova L. // Neoplasma. 2008. V. 55. № 5. P. 394–399.
19. Мишарина Т.А., Алинкина Е.С., Фаткуллина Л.Д., Воробьева А.К., Медведева И.Б., Бурлакова Е.Б. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 1. С. 117–123.
20. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. // Lebensmittel. Wiss. Technology. 1995. V. 28. № 1. P. 25–30.
21. Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F. // J. Sci. Food Agric. 1998. V. 76. № 1. P. 270–276.
22. Huang D., Ou B., Prior R.L. // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 6. P. 1841–1856.
23. Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R. // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 91. № 3. P. 621–632.
24. Wang H.F., Yih K.H., Huang K.F. // J. Food Drug Analysis. 2010. V. 18. № 1. P. 24–33.

Antiradical Properties of Oregano, Thyme, and Savory Essential Oils

E. S. Alinkina, T. A. Misharina, and L. D. Fatkulina

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

e-mail: katrinalinka@gmail.com

Received March 26, 2012

Abstract—In model reactions with the stable free 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, the antiradical properties of essential oils of thyme (*Thymus vulgare*), oregano (*Origanum vulgare*), and savory (*Satureja hortensis*) that are similar in the qualitative composition, but differ in the quantitative content of the main components, were studied and compared with the properties of synthetic antioxidant ionol. The reaction rates of components of essential oils with the radical were almost identical for all essential oils and were twice the reaction rate of ionol. The antiradical efficiency values were close to each other for all essential oils and by an order of magnitude smaller than for ionol.

УДК 638.15

МЕТОД МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ БЫСТРОГО ОБНАРУЖЕНИЯ *Paenibacillus larvae* В ГНИЛОСТНОЙ МАССЕ СОТ И КОЛОНИЯХ БАКТЕРИЙ

© 2013 г. Н. В. Русенова*, П. Парванов*, С. Станилова**

*Факультет ветеринарной медицины, кафедра ветеринарной микробиологии инфекционных и паразитарных заболеваний, Тракийский университет, Стара Загора, 6000, Болгария

**Отдел молекулярной биологии медицинского факультета, Тракийский университет, Стара Загора, 6000, Болгария

e-mail: n_v_n_v@abv.bg~V

Поступила в редакцию 26.01.2012 г.

Разработан быстрый и чувствительный метод мультиплексной полимеразной цепной реакции для стандартной диагностики американского гнильца. Предложен новый подход для обнаружения *Paenibacillus larvae* в гнилостной массе. Исследовано 45 образцов такой массы из пчелиных сот, в которых предполагалось присутствие американского гнильца. В экспериментальную выборку также были включены следующие родственные культуры: эталонный штамм – *Paenibacillus larvae* (NBIM-CC 8478), культуры, выделенные из клинических образцов, 4 штамма близких видов бактерий. ДНК из бактериальных колоний выделяли стандартным методом, включающим нагревание и центрифугирование с использованием коммерческого набора (pgerGem). Выделение ДНК из гнилостной массы сот проводилось в соответствии со стандартной и модифицированной процедурами. Для проведения мультиплексной ПЦР были использованы три пары праймеров, специфичных к 16S рРНК, и одна пара праймеров, специфичная для гена металлопротеазы (35 кДа) *P. larvae* в различных комбинациях. Чувствительность разработанного метода мультиплексной ПЦР для гнилостной массы составила 100%, что значительно превышало показатель чувствительности стандартного протокола (45.2%). Разработанный метод мультиплексной ПЦР может быть успешно использован для быстрого обнаружения *Paenibacillus larvae* как в гнилостной массе, так и в колониях выделенных бактерий.

DOI: 10.7868/S0555109913010182

Американский гнилец (АГ) является одним из самых вредоносных бактериальных болезней пчел, поражающий медоносных пчел в личиночной стадии развития [1]. Возбудитель, *Paenibacillus larvae*, относится к грамположительным спорообразующим бактериям [2]. Споры *P. larvae* – единственная инфекционная форма этого организма очень устойчивы [3], 10 и даже менее спор может оказаться достаточно, чтобы вызвать заболевание молодых личинок [4].

АГ распространен по всему миру, поражение им пчел приводит к значительным экономическим потерям для пчеловодства [5, 6]. Распространению АГ способствуют стандартные пчеловодческие процедуры, международная торговля продуктами пчеловодства, грабеж или роение инфицированных пчелиных семей [7, 8]. Таким образом, своевременное обнаружение *P. larvae* имеет большое значение для предотвращения распространения инфекции.

Несмотря на выраженные симптомы АГ во многих странах, в том числе и в Болгарии, диагноз этого заболевания должен быть подтвержден лабораторным исследованием. Лабораторная диагностика АГ основана на анализе клинических признаков с последующим выделением и идентификацией возбудителя. Обычные методы микробиологического исследования требуют много времени и недостаточно надежны в тех случаях, когда в клинических образцах присутствуют другие спорообразующие бактерии. Коммерческие наборы для идентификации, хотя и доступны [9, 10], но и они требуют несколько дней для получения результатов. В последнее время на европейских пасеках были выделены и описаны другие генотипы штаммов *P. larvae*, отличающиеся морфологией колоний. Это может дополнительно осложнять использование рутинной диагностики [11]. Таким образом, необходимо создание быстрого и чувствительного метода обнаружения возбудителя для предупреждения и контроля АГ.

Таблица 1. Праймеры для выявления *P. larvae*

Праймер	Последовательность	Ген, ссылка	Длина фрагмента, п.н.
1.	5'-AAGTCGAGCGGACCTTGTGTTTC-3'	16S рPHK [19]	973
2.	5'-TCTATCTCAAACCGGTCAGAGG-3'		
3.	F3,5'-CGGGCAGCAAATCGTATTCAG-3'	ген металлопротеазы	273
4.	B1,5'-CCATAAAGTGTTGGGTCTCTAAGG-3'		
5.	E1,5'-GCAAGTCGAGCGGACCTTGTG-3'	16S рPHK[11]	965
6.	E2,5'-AAACCGGTCAGAGGGATGTCAAG-3'		
7.	F6,5'-GCACTGGAAACTGGGAGACTTG-3'	16S рPHK [11]	665
8.	B11,5'-CGGCTTTTGAGGATTGGCTC-3'		

В последнее время опубликованы [11–14] некоторые методы ПЦР для выявления различных патогенов, в том числе *P. larvae*. Тем не менее, информация по обнаружению *P. larvae* в гнилостной массе в специальной литературе методом мультиплексной ПЦР явно недостаточно.

Цель исследования – разработка быстрого, чувствительного и специфичного метода мультиплексной ПЦР для обнаружения *P. larvae* непосредственно в гнилостной массе и в выделенных колониях бактерий для рутинной диагностики.

МЕТОДИКА

Гнилостная масса и бактериальные штаммы. В экспериментах использовались 45 образцов гнилостной массы из пчелиных сот, где подозревалось наличие АГ, эталонный штамм *Paenibacillus larvae* NBIMCC 8478 (Национальный банк промышленных микроорганизмов и клеточных культур, София, Болгария), 66 клинических изолятов и 4 штамма родственных видов бактерий – *Brevibacillus laterosporus* (NBIMCC 8036), *Bacillus licheniformis* (NBIMCC 3346), *Paenibacillus alvei*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*. Последние 2 родственные бактерии были выделены из пчелиных сот и определены с помощью BioLog Gen III systems (США). Полевые штаммы выделяли на триптическом соевом агаре (“Fluka”, Швейцария) с добавлением 5% овечьей крови и инкубировали при 37°C в течение 72 ч в аэробных условиях.

Выделение ДНК из бактериальных штаммов. ДНК из тестированных штаммов выделяли двумя различными методами. Первый был ранее описан в работе [12] и приведен в ежегодном учебном руководстве [15], поэтому он считается стандартным. Бактериальные суспензии нагревали 20 мин при 95°C и центрифугировали 10 мин при 5000 g. Супернатант далее использовали в качестве образца ДНК в ПЦР-анализах. Вторую процедуру

проводили в соответствии с инструкциями производителя DNA Bacterial Extraction Kit PrepGem (“ZyGem”, США).

Выделение ДНК из гнилостной массы. ДНК из гнилостной массы выделяли двумя способами. Первый способ заключался в следующем: гнилостные массы из двух сотовых ячеек суспендировали в 1 мл стерильной дистиллированной воды и тщательно перемешивали. К 100 мкл этой суспензии добавляли в 900 мкл стерильной дистиллированной воды и интенсивно перемешивали, затем 100 мкл смеси использовали для извлечения ДНК стандартным методом, включающим нагревание и центрифугирование [12]. В соответствии со вторым методом разведение гнилостной массы вместо дистиллированной воды проводили в среде CASO (“Fluka”, Швейцария) и инкубировали 100 мкл каждого разведения в течение 1 ч при температуре 37°C на водяной бане и затем центрифугировали.

Все образцы ДНК хранились при температуре от –20°C до использования.

Выбор праймеров. В табл. 1 приведены выбранные праймеры, целевые гены и длина ожидаемого ампликона. Выбор праймеров основывался на ранее использовавшихся для выявления *P. larvae* [11, 19]. Праймеры были протестированы, как одна пара в стандартной ПЦР и в различных комбинациях в мультиплексной ПЦР. Были использованы следующие комбинации праймеров: 1-2/3-4, 3-4/5-6 и 3-4/7-8. Праймеры были получены от “Metabion” (Германия).

ПЦР-амплификации. В состав 20 мкл реакционной смеси для мультиплексной ПЦР входили: 1 × ПЦР-буфер (100 мМ трис-НСl, рН 8.8, 500 мМ КCl), 1.5 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого дНТФ, 0.25 мкМ каждого праймера, 1.0 ед. Taq-полимеразы и 1 мкл ДНК. Подходящая температура отжига для наших экспериментальных условий

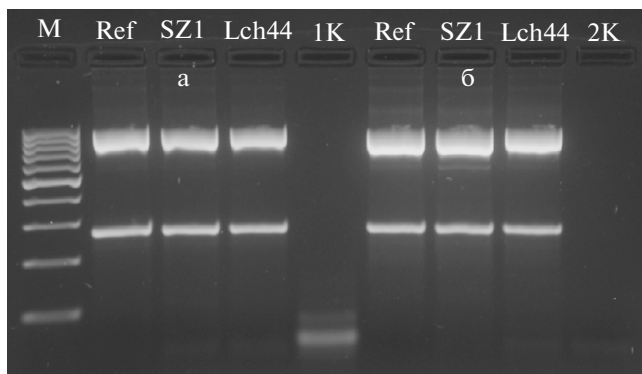


Рис. 1. Определение *P. larvae* методом мультиплексной ПЦР с помощью комбинации праймеров 1-2/3-4 (а) и 3-4/5-6 (б) в 1%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием: М – маркер (100 п.н.), Ref – контрольный штамм (NBIMCC 8478); SZ 1 и Lch 44 – “полевые” штаммы; 1К и 2К – нестандартный контроль из двух реакционных смесей.

определяется градиентом ПЦР. ПЦР-амплификацию проводили в системе Quanta Biotech QV-96 thermocycler (Англия). Процедура состояла из следующих стадий: денатурация при 94°C в течение 3 мин, затем следовали 30 циклов: денатурация при 94°C 1 мин, отжиг при 54°C 0.5 мин; наращивание ДНК при 72°C 1 мин, и завершение реакции происходит на последней стадии: наращивание 7 мин при 72°C. ПЦР-продукты (10 мкл) разделяли в 1,0%-ном геле агарозы с окрашиванием этидием бромидом (0.5 мкг/мл). Гели были визуализированы на УФ-трансиллюминаторе (ImageQuant 150, Тайвань) с помощью системы визуализации гелей. Реактивы для ПЦР – фирмы “Fermentas” (Литва).

Чувствительность и специфичность используемого протокола мультиплексной ПЦР. Чувствительность используемого протокола мультиплексной ПЦР определяли методом серийных разведений ДНК *P. larvae* (NBIMCC 8478) в пределах 120–15 нг/мкл. Специфичность реакции была протестирована также с родственными видами бактерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения *P. larvae* была проведена предварительная стандартная ПЦР с одной парой праймеров на целевые гены. В качестве положительного контроля использовали ДНК из колоний эталонного штамма бактерий. Оптимизированные условия проведения ПЦР позволили получить ожидаемую длину продуктов амплификации, а затем провести эксперименты методом мультиплексной ПЦР. Одну пару праймеров всегда использовали для выявления гена 16S рРНК *P. larvae*, другую для выявления гена предшественника ме-

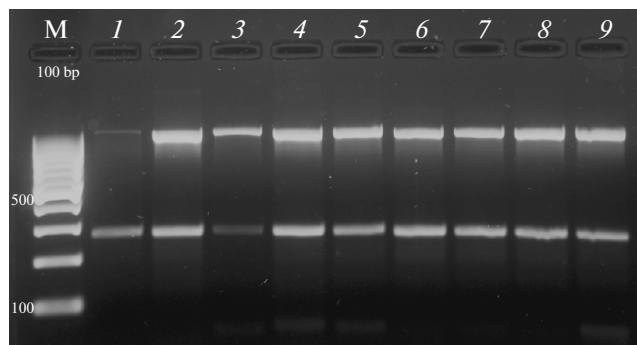


Рис. 2. Обнаружение *P. larvae* в 1%-ном агарозном геле после разделения продуктов ПЦР с комбинацией праймеров 1-2 (973 п.н.) и 3-4 (273 п.н.). М – 100 п.н. маркер; 1–9 – протестированные штаммы *P. larvae*.

таллопротеиназы (Mip). Результаты градиентной ПЦР показали, что 54°C является наиболее подходящей температурой отжига. Наилучшей комбинацией праймеров оказалась комбинация 1-2/3-4, хотя использование комбинации 3-4/5-6 также давало удовлетворительные результаты (рис. 1). Кроме того, все штаммы коллекции были протестированы с использованием праймеров 1-2 и 3-4. На рис. 2 показаны продукты ПЦР с ожидаемой длиной фрагментов, полученные с праймерами, 1-2 и 3-4. Очевидно, что фрагмент гена 16S рРНК штамма № 1 и ген Mip штамма № 3 не были амплифицированы в достаточной степени. Кроме того, необходимо принять во внимание, что концентрации ДНК в образцах варьировались от 30.8 до 143 нг/мкл.

При проведении контрольной ПЦР с родственными видами бактерий, никаких продуктов ПЦР получено не было. Предел обнаружения ДНК при использовании метода мультиплексной ПЦР был менее 15 нг/мкл.

Разработанный протокол мультиплексной ПЦР был использован для исследования гнилостной массы из сот, обработанной в соответствии со стандартной процедурой для выделения ДНК. Однако чувствительность метода оказалось низкой – только 45.2%. Именно поэтому стандартная процедура инкубации была изменена, как это описано в разделе “Методика”. Модификация привела к увеличению чувствительности используемого метода мультиплексной ПЦР до 100%. Визуализация продуктов ПЦР после электрофореза и обработки гнилостной массы была протестирована более чем на четырех системах: результаты варьировали от “едва детектируется” (1+), до “четко детектируются” ампликоны (4+). Специфичность реакции генов рРНК 16S в стандартной процедуре составила 29%, по сравнению с 100% в видоизмененной. Специфичность реак-

Таблица 2. Специфичность и чувствительность метода мультиплексной ПЦР для определения *P. larvae* в гниющей массе

ПЦР	Процедура выделения ДНК	
	стандартная	измененная
Чувствительность к амплифицированному гену	21.4%	90.5%
Чувствительность к 2 амплифицированным генам	45.2%	100%
Специфичность к 16S рРНК	29%	100%
Специфичность в гену Mlp	40.5%	90.5%

ции по отношению к гену Mlp была 40.5% и 90.5% соответственно (табл. 2). Эксперименты по выделению ДНК были проведены дважды. Результаты экспериментов с гнилой массой из сот приведены на рис. 3.

Быстрое обнаружение *P. larvae* имеет большое значение для предотвращения распространения инфекции и эффективной борьбы с ней. Кроме того, те убытки, которые терпят пчеловоды из-за распространения болезни компенсируются только на основании документа с лабораторно подтвержденным диагнозом. Наш клинический и лабораторный опыт подтверждает мнение Гиллиам [16], что во многих случаях, обнаружение *P. larvae* традиционными микробиологическими методами затруднено из-за загрязнения образца другими спорообразующими микроорганизмами, присутствующими в ульях. Именно поэтому амплификация целевых фрагментов бактериального генома все шире используется для обнаружения и диагностики [17]. К неоспоримым преимуществам ПЦР относятся также высокая специфичность, скорость выполнения анализа и хорошая воспроизводимость. Эти неоспоримые преимущества делают метод более привлекательным по сравнению со стандартным и с методами фенотипической идентификации.

При реклассификации *P. larvae* subsp. *larvae* и *P. larvae* subsp. *pulvificiens* в единый вид, анализ методом ПЦР может использоваться для более узких диагностических целей [18].

Таким образом, разработан протокол мультиплексной ПЦР для простого и быстрого обнаружения *P. larvae*, пригодный как для исследования отдельных колоний выделенных бактерий, так и гнилых масс с помощью стандартного метода ПЦР. Чтобы получить максимальную специфичность при амплификации были выбраны 2 различных гена 16S рРНК и Mlp. Комбинация праймеров 1-2/3-4 оказалась лучшей и характеризовалась отсутствием неспецифических продуктов

ПЦР, в отличие от других комбинаций, с которыми была проведена реакция мультиплексной ПЦР. Эти праймеры, специфичные для генов 16S рРНК *P. larvae*, были отобраны Гован с соавт. [19] из GenBank (accession № X60619) и ген Mlp из GenBank (№ AF111421) [11]. Амплификация фрагментов 16S рРНК и Mlp гена *P. larvae* из колоний бактерий была ранее описана в работах [11, 13], в которых использовали ступенчатую ПЦР. Результаты также показали, что одновременная амплификация двух разных генов — лучший выбор для обнаружения *P. larvae*, как это видно из рис. 2. Недостаточное количество копий одного гена может плохо визуализироваться в агарозном геле и привести к неправильной отрицательной оценке результата.

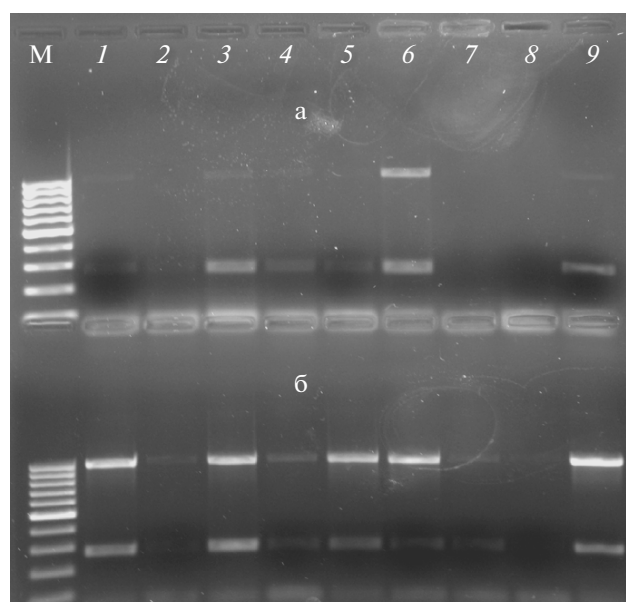


Рис. 3. Обнаружение *P. larvae* в гнилой массе с помощью стандартной (а) и модифицированной (б) процедур выделения ДНК. М — маркер (100 п.н.), 1–9 — протестированные штаммы *P. larvae*.

Разработанный протокол показал высокую чувствительность обнаружения ДНК — менее 15 нг/мкл. Комбинация праймеров 1-2/3-4 привела к образованию продуктов амплификации ДНК исключительно из родственных видов бактерий, что подтверждено также другими исследователями [20].

Наши попытки выявления *P. larvae* в гнилостной массе сот с использованием стандартного протокола показали относительно низкую чувствительность этого метода — только 45.2%, хотя из изучаемых образцов был выделен и идентифицирован возбудитель АГ методом мультиплексной ПЦР. Этот вывод противоречит данным, приведенным в работе [12], где ампликоны предполагаемой длины были обнаружены во всех тестируемых образцах АГ. В обоих случаях образцы были собраны из ульев, где наблюдались клинические признаки АГ. Авторы протестировали 4 различные комбинации двух пар праймеров, синтезированных на основе последовательности гена 16S рНК *P. larvae*, в том числе были использованы праймеры, синтезированные Гован с соавт. [19]. Очевидно, что это требовало изменения процедуры выделения ДНК, добавления дополнительной стадии инкубации при 37°C в течение по крайней мере 1 ч перед последующим 20 мин нагреванием при 95°C, что позволит увеличить чувствительность метода PCR до 100%. Несмотря на то, что ампликоны в некоторых образцах, обработанных по измененной процедуре, были обнаружены только на уровне (1+), эти данные были подтверждены дальнейшим выделением ДНК.

Суспензия гнилостной массы содержала в основном споры, около 2.5×10^9 [21], а также остатки вегетативных клеток. Во время инкубации в богатой питательной среде, таких как CASO, проницаемость оболочки спор изменялась и активизировались метаболические процессы прорастания [22]. При таких оптимальных условиях ДНК клеток, вероятно, переживала конформационные изменения в начале цикла деления, что облегчает доступ к соответствующим генам в условиях амплификации. Хан с соавт. [23] разработали метод проведения ультрабыстрой ПЦР для обнаружения *P. larvae*, однако реакция проводилась на специальных микрочипах в системе реального времени, не всегда доступной в диагностических лабораториях. ПЦР в реальном времени как стратегия для диагностики и скрининга АГ была разработана Мартинесом с соавт. [24], однако метод дорог и не применяется во многих развивающихся странах.

Разработанные протоколы мультиплексной ПЦР могут быть успешно использованы в повседневной диагностике для быстрого обнаружения

P. larvae в гнилостной массе и выделенных бактериальных колониях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Genersch E.* // J. Verbr. Lebensm. 2008. V. 3. № 4. P. 429–434.
2. *Genersch E., Forsgren E., Pentikäinen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J., Fries I.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 5. № 3. P. 501–511.
3. *Rauch S., Ashiralieva A., Hedtke K., Genersch E.* // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. № 3. 10. P. 3344–3347.
4. *Bailey L., Lee D.C.* // J. Gen. Microbiol. 1962. V. 29. № 4. P. 711–717.
5. *Ellis J.D., Munn P.A.* // *Bee World*. 2005. V. 86. № 4. P. 88–101.
6. *Fries I., Lindström A., Korpela S.* // Vet. Microbiol. 2006. V. 114. № 3–4. P. 269–274.
7. *Hornitzky M.A.Z.* // J. Apic. Res. 1998. V. 37. № 4. P. 261–265.
8. *Lindström A., Korpela S., Fries I.* // Apidologie. 2008. V. 39. № 5. P. 1–9.
9. *Carpana E., Marocchi L., Gelmini L.* // Apidologie. 1995. V. 26. № 1. P. 11–16.
10. *Dobbelaere W., De Graaf D.C., Peeters J.E., Jacobs F.J.* // J. Apic Res. 2001. V. 40. № 1. P. 37–40.
11. *Neuendorf S., Hedtke K., Tangen G., Genersch E.* // Microbiology. 2004. V. 150. № 7. P. 2381–2390.
12. *Dobbelaere W., De Graaf D.C., Peeters J.E.* // Apidologie. 2001. V. 32. № 4. P. 363–370.
13. *Kilwinski J., Peters M., Ashiralieva A., Genersch E.* // Vet. Microbiol. 2004. V. 104. № 1–2. P. 31–42.
14. *Lauro F.M., Favaretto M., Covolo L., Rassa M., Bertoloni G.* // Int. J. Food Microbiol. 2003. V. 81. № 3. P. 195–201.
15. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE Terrestrial Manual, 6th Edition, Paris. 2008. P. 395–404.
16. *Gilliam M.* // FEMS Microbiol. Lett. 1997. V. 155. № 1. P. 1–10.
17. *Vaneechoutte M., VanEldere J.* // J. Med. Microbiol. 1997. V. 46. № 3. P. 188–194.
18. *De Graaf D.C., Alippi A.M., Brown M., Evans J.D., Feldlaufer M., Gregorc A., Hornitzky M., Pernal S.F., Schuch D.M.T., Titěra D., Tomkies V., Ritter W.* // Lett. Appl. Microbiol. 2006. V. 43. № 6. P. 583–590.
19. *Govan V.A., Allsopp M.H., Davison S.* // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 5. P. 2243–2245.
20. *Piccini C., D'Alessandro B., Antúnez K., Zunino P.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 18. № 8. P. 761–765.
21. *Shimanuki H., Knox D.A.* Diagnosis of Honey Bee Diseases, U.S. Agriculture Handbook AH690, Beltsville, MD: US Department of Agriculture USA. 2000. 53 p.
22. *Moir A.* // J. Appl. Microbiol. 2006. V. 101. № 3. P. 526–530.
23. *Han S.H., Lee D.B., Lee D.W., Kim E.H., Yoon B.S.* // J. Invertebr. Pathol. 2008. V. 99. № 1. P. 8–13.
24. *Martnez J., Simon V., Gonzalez B., Conget P.* // Lett. Appl. Microbiol. 2010. V. 50. № 6. P. 603–610.

Development of Multiplex PCR for Fast Detection of *Paenibacillus larvae* in Putrid Masses and in Isolated Bacterial Colonies

N. V. Rusenova^a, P. Parvanov^a, and S. Stanilova^b

^a Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic diseases, Trakia University, Stara Zagora 6000, Bulgaria

^b Faculty of Medicine, Department of Molecular Biology, Trakia University, Stara Zagora 6000, Bulgaria
e-mail: n_v_n_v@abv.bg

Received January 26, 2012

Abstract—The present study was performed to develop a fast and sensitive multiplex polymerase chain reaction protocol for routine diagnostics of American foulbrood. A new approach for detection of *Paenibacillus larvae* in putrid masses was described. Forty five samples of putrid masses obtained from bee combs suspicious for American foulbrood, a reference strain *Paenibacillus larvae* (NBIMCC 8478), clinical isolates and 4 strains of closely related bacterial species were included in experiments. Bacterial colonies' DNA was isolated by heat and centrifugation method (standard procedure) and with prepGem commercial kit. DNA from putrid masses was isolated by standard and modified procedure. Three pairs of primers specific for 16S rRNA and one pair specific for 35 kDa metalloproteinase genes of *P. larvae* were tested as single pair and in different combinations as multiplex PCR. The sensitivity of the multiplex PCR protocol for putrid masses, developed in study was 100%, versus 45.2% for the standard protocol. The developed multiplex PCR protocol could be successfully used for rapid and specific detection of *Paenibacillus larvae* in both putrid masses and isolated bacterial colonies.

РЕЦЕНЗИИ

**В. К. ВОЙНИКОВ “МИТОХОНДРИИ РАСТЕНИЙ
ПРИ ТЕМПЕРАТУРНОМ СТРЕССЕ”. НОВОСИБИРСК,
АКАДЕМИЧЕСКОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО
“ГЕО”. 2011, 163 с.**

DOI: 10.7868/S0555109913010170

Книга написана профессором В.К. Войниковым — известным фитобиологом, специалистом в области физиологии, биохимии, генетики устойчивости растений к экстремальным температурным условиям среды обитания. Рецензируемая монография — одна из 12 монографических работ автора, посвященная изучению роли растительных митохондрий — энергетических “станций” растений, в ответе растительного организма на действие низкой температуры. Отправная точка этих исследований связана с изменением энергетического обеспечения клеток при действии стресса и переходу организма на новый уровень обмена веществ, обусловленного запрограммированной в течение эволюции наследственной (генетической) программой развития растительного организма.

Теоретический интерес к рассматриваемой проблеме тесно связан с ее важным практическим значением, так как открывает возможности повышения продуктивности и расширения ареала возделывания культурных растений путем повышения их устойчивости к холоду.

В книге обобщаются данные литературы и результаты исследований автора и сотрудников руководимой им лаборатории по проблеме холодо- и морозоустойчивости культурных растений с акцентом на физиологическую, биохимическую и генетическую роль митохондрий.

Монография состоит из 10 глав, а также “Введения”, “Заключения” и списка используемой литературы (364 источника). В водной части автор акцентирует внимание на важность изучения и понимания механизмов контроля функциональной активности митохондрий в экстремальных условиях среды, что позволит выявить звенья метаболизма, ответственные за устойчивость растения.

В главе 1 “Реакция растений на флуктуации температуры” эта мысль доказывается литературными данными о накоплении в растениях новых биологически активных соединений: специфических белков, адаптогенов и стресс-протекторов. Автор подчеркивает, что переход от стрессовых реакций к адаптационным сопровождается инги-

бированием генов, ответственных за контроль роста и развития растения в нормальных условиях среды, и активацией генов, повышающих устойчивость организма в изменившихся условиях среды обитания. Несомненную роль в этом играет энергетическая активность митохондрий и экспрессия генов, ответственных за синтез специфических (стрессовых) белков. В дальнейшем, в главах 2 и 3 раскрываются структурные и функциональные особенности как растительных, так и животных митохондрий и делается вывод, что эти органеллы чувствительны к экзогенным и эндогенным воздействиям и быстро вовлекаются в ответную реакцию тканей организмов на стрессовое воздействие. Используя широко применяемую в физиологии растений модель сравнения контрастных по устойчивости к экстремальным факторам сортов растений (например, устойчивый и неустойчивый к морозу сорта озимой пшеницы), автор показывает разнонаправленные изменения энергетической активности митохондрий в ответ на кратковременное действие холода: у неустойчивого к морозу сорта возрастает сопряженность процессов окисления и фосфорилирования и энергетической эффективности дыхания, а у митохондрий морозоустойчивых растений происходит ослабление сопряженности этих процессов. Однако в последнем случае происходит не снижение, а заметное повышение скорости фосфорилирования за счет увеличения дыхания митохондрий. Подобная закономерность обнаружена и в животных митохондриях и представляет собой, по мнению автора, “аварийный” механизм, который действует на первых этапах действия повреждающего фактора и имеет важное значение для последующего обеспечения репарационных процессов.

Раскрывая биохимические причины различного поведения митохондрий, выделенных из контрастных по устойчивости сортов растений, автор анализирует действие свободных жирных кислот (**СЖК**), обращая внимание на резкое увеличение содержания этих соединений, особенно ненасыщенных жирных кислот, при действии гипотермии. Этому посвящена глава 4 “Состав липидов митохондрий и их энергетическая актив-

ность при низкой температуре”, в которой детально рассматривается роль мембранных липидов митохондрий при низкотемпературном воздействии. Обнаружено несколько закономерностей, объясняющих биохимическую роль СЖК в функциональной активности митохондрий при действии холода: СЖК могут разобщать окислительное фосфорилирование и выступать как субстраты окисления, ингибировать в мембранах митохондрий фермент адениннуклеотидтранслоказу и активировать фермент фосфолипазу A_2 . Эти процессы ведут к снижению степени сопряженности процессов окисления и фосфорилирования при переходе митохондрий в низкоэнергетическое состояние при гипотермии.

Глава 5 посвящена рассмотрению данных, связанных с изучением термостабильности и функциональной активности отдельных комплексов дыхательной цепи митохондрий. Автор доказывает, что при гипотермии стабильно высокой термоустойчивостью и функциональной активностью обладают III и IV комплексы дыхательной цепи митохондрий и низкой – комплекс I и связанный с ним дегидрогеназы субстратов цикла трикарбоновых кислот.

Результаты исследований автора по так называемой “митохондриальной поре” (МП), локализованной на внутренней мембране митохондрий, изложены в главе 6. Известно, что неспецифическая проницаемость внутренней мембраны митохондрий, связанная с открытием под влиянием ионов кальция МП, имеют для животных клеток негативные метаболические последствия – клеточная смерть, разобщение окислительного фосфорилирования, активация процессов окислительного стресса и др. Исследования автора с сотрудниками позволили установить, что в митохондриях озимых злаков функционирует циклоспорин А-чувствительная (ингибирует открытие МП) и Ca^{2+} -зависимая МП (активирует открытие поры). Другой важный результат связан с установлением участия комплекса I и ротенон-нечувствительных НАДН-дегидрогеназ в образовании МП, что ведет к увеличению проницаемости мембраны митохондрий.

Связь низкотемпературного стресса в растениях с другими видами стрессовых реакций обсуждается в главе 7. В первую очередь, это процессы, связанные с обезвоживанием клеток и развитием окислительных процессов. Следствием этого является перекисное окисление липидов (ПОЛ), обсуждаемое в главе 8. Особое внимание автор уделяет ПОЛ в митохондриях, в которых имеются физиологические условия и все необходимые соединения для протекания этих процессов и, в частности, субстраты – ненасыщенные жирные кислоты. Активация ПОЛ и других окислительных процессов в митохондриях при гипотермии

ведет к накоплению АФК и нарушению окислительного фосфорилирования, неспецифической проницаемости внутренней мембраны, разбалансированию про- и антиоксидантного равновесия в органеллах, поступления и оттока эффективно регулятора обменных процессов иона Ca^{2+} .

Наличие в митохондриях мощной антиоксидательной системы позволяет организму регулировать уровень АФК и интенсивность процессов ПОЛ и таким образом смягчать или снимать отрицательное действие гипотермии и других неблагоприятных факторов. Составной частью этой системы являются белки, разобщающие окисление и фосфорилирование в митохондриях, и связанный с этим термогенез в клетках во время гипотермии (главы 9 и 10). Необходимо отметить существенный вклад автора монографии в доказательство существования в митохондриях растений разобщающих белков и явления термогенеза, ранее известных только для животных митохондрий. Митохондриальные разобщающие белки (UCP – uncoupling proteins), были открыты в начале 60-х годов прошлого столетия при изучении митохондрий бурого жира млекопитающих. Автор подчеркивает, что обнаруженные в настоящее время в растениях UCP-подобные белки индуцируются холодом и могут считаться стрессовыми белками.

В книге подробно описываются свойства и функции стрессового белка БХШ 310, обнаруженного и изученного в лаборатории автора. Показано, что содержание этого белка увеличивается при действии на проростки озимых злаков холода. Выявлены 2 формы БХШ 310 – конститутивная и стрессовая. Делается вывод, что БХШ 310 озимых злаков в дополнение к альтернативной цианидрезистентной оксидазе и другим UCP-подобным митохондриальным белкам, является частью антиоксидантной системы растений и кодируется ядерным геномом. Основная функция этих белков – участие в защите растений от холода путем разобщения процессов окисления и фосфорилирования, при котором происходит выделение тепла (термогенез) и локальное повышение температуры тканей. Подробно этот вопрос обсуждается в главе 10, в которой приводятся результаты исследований автора по изучению различных стрессовых разобщающих белков, в т.ч. и БХШ 310, на их способность вызывать термогенез у растений. Обращается внимание на то, что формирование холодоустойчивости у растений протекает при участии большого числа белков, контролирующих энергетическое обеспечение клеток при гипотермии, а также другие связанные с устойчивостью звенья метаболизма. Кроме UCP-белков, это – ферменты, шапероны, дегидрины, антифризные белки, многофункциональные белки, регулирующие трансляцию и транскрипцию. Установлено, что синтез этих белков экспресси-

руется при действии низкой температуры и во время закаливания растений.

В “Заключении” подводятся итоги исследований по обсуждаемой проблеме: подчеркиваются особенности энергообеспечения при кратковременном воздействии холодом (до 1 ч) и более продолжительном (до 3–4 ч) у незакаленных и предварительно закаленных к холоду проростков озимых и роль перехода митохондрий в низкоэнергетическое состояние, обусловленного действием СЖК. Роль термогенеза, вызванного действием разобщающих белков, связывается с необходимостью для растения адаптационной перестройки метаболизма в условиях стрессового воздействия. Поскольку большинство изученных к настоящему времени стрессовых белков являются водорастворимыми, то в перспективе автор считает необходимым более широкое изучение структурных белков мембран, их роли при гипотермии. Взаимо-

действие энергетической и информационной систем растительных клеток при воздействии холодом — другая важная часть дальнейших исследований.

Книга хорошо иллюстрирована схемами, таблицами. Однако, на наш взгляд, в ней не хватает общей схемы, которая показывала бы физиологические, биохимические и генетические связи устойчивости растений с митохондриями на основе обсуждаемых в монографии знаний по этой проблеме. Оценивая в целом монографию, следует отметить своевременность и важность обобщения результатов исследований по данной проблеме.

Монография будет полезна и интересна физиологам и биохимикам растений, генетикам и студентам ВУЗов биологического профиля.

А.К. Глянько