

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	АНТРАХИНОНЫ ГРИБОВ (ОБЗОР) Гесслер Н.Н., Егорова А.С., Белозерская Т.А.	109	1
<input type="checkbox"/>	ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ПОЛИАМИНОВ С ПОМОЩЬЮ БИОТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ БЫСТРО ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА Лисицкая К.В., Сокуева Н.А., Малышева Ю.Г., Иванов А.В., Шишкин С.С., Сяткин С.П.	124	0
<input type="checkbox"/>	КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ ERWINIA CAROTOVORA, ТРАНСАМИНИРУЮЩИХ ФЕНИЛПИРУВАТ Палоян А.М., Степанян Л.А., Дадаян С.А., Амбарцумян А.А., Алебян Г.П., Сагиян А.С.	129	0
<input type="checkbox"/>	РЕКОМБИНАНТНЫЕ ШТАММЫ ESCHERICHIA COLI, ДЕФИЦИТНЫЕ ПО ПУТЯМ СМЕШАННОКИСЛОТНОГО БРОЖЕНИЯ, СПОСОБНЫЕ К БЫСТРОМУ АЭРОБНОМУ РОСТУ НА ГЛЮКОЗЕ ПРИ СНИЖЕННОМ ЭФФЕКТЕ КРЭБТРИ Моржакова А.А., Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г.	136	2
<input type="checkbox"/>	ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ НЕКОТОРЫХ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА L-АЛАНИНА У ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ BREVIBACTERIUM FLAVUM Мелконян Л.О., Аветисова Г.Е., Амбарцумян А.А., Чахалян А.Х., Сагиян А.С.	144	0
<input type="checkbox"/>	НАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ESCHERICHIA COLI MG1655 С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ МУТАНТОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ГИСТИДИН Дорошенко В.Г., Лобанов А.О., Федорина Е.А.	149	0
<input type="checkbox"/>	НОВЫЕ НАДФН-СПЕЦИФИЧНЫЕ L-АСПАРАТАТ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ МЕЗОФИЛЬНЫХ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS И BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM Куваева Т.М., Каташкина Ж.И., Киверо А.Д., Смирнов С.В.	155	0
<input type="checkbox"/>	ВОЗДЕЙСТВИЕ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ НА КЛЕТОЧНУЮ СТЕНКУ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ E. COLI Кобзев Е.Н., Киреев Г.В., Ракицкий Ю.А., Мартовецкая И.И., Чугунов В.А., Холоденко В.П., Храмов М.В., Акишев Ю.С., Трушкин Н.И., Грушин М.Е.	164	1
<input type="checkbox"/>	БИОСИНТЕЗ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРОВАЛЕРАТА С РАЗНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ ПРИ РОСТЕ METHYLOBACTERIUM EXTORQUENS G-10 НА СМЕСИ МЕТАНОЛА И ПЕНТАНОЛА Ежов В.А., Доронина Н.В., Троценко Ю.А.	171	3
<input type="checkbox"/>	ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЧАЛА Голубев В.И.	175	0
<input type="checkbox"/>	INHIBITORY EFFECT OF COMPONENTS FROM STREPTOMYCES SPECIES ON α-GLUCOSIDASE AND α-AMYLASE OF DIFFERENT ORIGIN Meng P., Xie C., Geng P., Qi X., Zheng F., Bai F.	181	0
<input type="checkbox"/>	BIOCHEMICAL PARAMETERS OF SACCHAROPOLYSPORA ERYTHRAEA DURING FEEDING AMMONIUM SULPHATE IN ERYTHROMYCIN BIOSYNTHESIS PHASE Zou X., Li W.J., Zeng W., Hang H.F., Chu J., Zhuang Y.P., Zhang S.L.	190	0
<input type="checkbox"/>	ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ГЛЮКАНЫ СЕМЯН КАРДАМОНА НАСТОЯЩЕГО ELETARIA CARDAMOMUM Оленников Д.Н., Рохин А.В.	197	0
<input type="checkbox"/>	АЭРОБНЫЕ МЕТИЛОБАКТЕРИИ КАК ОСНОВА БИОСЕНСОРА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ДИХЛОРМЕТАНА Плеханова Ю.В., Фирсова Ю.Е., Доронина Н.В., Троценко Ю.А., Решетиллов А.Н.	203	2
<input type="checkbox"/>	ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ И ЙОДИДНОГО ЭЛЕКТРОДА Каракус Е., Пекиардимчи Ш., Килич Е.	209	0
<input type="checkbox"/>	АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ СТАБИЛЬНЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ЗАДАННОГО РАЗМЕРА Муха Ю.П., Еременко А.М., Смирнова Н.П., Михиенкова А.И., Корчак Г.И., Горчев В.Ф., Чунихин А.Ю.	215	2
<input type="checkbox"/>	ПОЗДРАВЛЯЕМ ЕЛЕНУ ПЕТРОВНУ ФЕОФИЛОВУ С ЮБИЛЕЕМ	224	0

УДК 547.673:577.13

АНТРАХИНОНЫ ГРИБОВ (ОБЗОР)

© 2013 г. Н. Н. Гесслер*, А. С. Егорова*, Т. А. Белозерская*.*.*

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

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

e-mail: tabinbi@mail.ru

Поступила в редакцию 17.05.2012 г.

Обзор посвящен характеристике антрахинонов — группы пигментов хиноидной природы, часто встречающихся у грибов. Рассмотрены распространение антрахинонов у грибов, пути их биосинтеза и биологическая активность.

DOI: 10.7868/S0555109913020050

Антрахиноны являются самой большой группой природных пигментов хиноидной природы. В растениях, грибах и лишайниках найдено около 700 представителей этой группы. Они часто придают окраску, обычно желтую, оранжевую или коричневую, мицелию микроскопических грибов, плодовым телам макроскопических грибов, а также лишайникам [1]. В текстильной промышленности антрахиноны грибов широко используются как красители для натуральных и синтетических волокон [2–6]. В микроэлектронике антрахиноны нашли применение в качестве полупроводников [7, 8].

Многие антрахиноны проявляют противомикробные, противопаразитарные, инсектицидные, фунгицидные, противовирусные свойства [9–11]. Они находят применение как противораковые средства [12, 13]. Антрахиноны являются действующими компонентами многих растительных сборов, используемых в качестве лекарственных средств, где они оказывают слабительное, диуретическое, противораковое, эстрогенное, иммуномодулирующее и другие действия [14–16]. Эндوفитные грибы, сосуществуя с растением, не вызывают болезни хозяина, но способствуют образованию вторичных метаболитов, в том числе и антрахинонов, что во многом определяет характер использования растения в медицинских целях. Сами эндوفитные грибы также являются источниками антрахинонов [17–20]. Участие микроскопических грибов (*Eurotium* spp., *Debaryomyces* spp., *Aspergillus* spp., *Verticillium* spp., *Pichia* spp. и др.) в процессе ферментации брускового чая Фужуан, традиционного напитка в некоторых провинциях Китая, обеспечивает продукту не только неповторимый цвет и аромат, но и придает чаю противодизентерийное действие за счет образования антрахинонов [20].

Однако в высоких концентрациях некоторые антрахиноны могут проявлять токсичное дей-

ствие, являясь мутагенами и канцерогенами [21, 22], поэтому их обычно применяют в малых дозах в комплексе с другими биологически активными веществами в составе растительных сборов. Контаминация продуктов сельского хозяйства микроскопическими грибами может приводить к их загрязнению микотоксинами, в том числе и антрахиноновой природы [23–26].

Совершенствование методов идентификации природных соединений позволило установить строение вновь выделенных антрахинонов, проявляющих широкий спектр биологической активности, что является базой для создания эффективных средств борьбы с патогенными грибами, насекомыми-вредителями, сорными травами, а также препаратов с противовирусной, противораковой и иммуномодулирующей активностью.

В обзоре рассматриваются пути биосинтеза антрахинонов у грибов и их распространение среди представителей грибного царства. Значительное внимание уделяется характеристике биологической активности грибных антрахинонов.

Строение антрахинонов. В основе молекулы антрахинонов лежит структура, образованная слиянием трех бензольных колец (рисунок). Многообразие природных антрахинонов достигается за счет различных заместителей, например: -ОН, -СН₃, -ОСН₃, -СН₂ОН, -СНО, -СООН и других, а также восстановления карбонильных групп (до антронов и антраценонов) и восстановления двойных связей в бензольном кольце (с образованием гидроантрахинонов) [27, 28]. Как правило, имеется несколько боковых заместителей в бензольных кольцах антрахинонов грибов. Особенно распространены у грибов 1,8-дигидрокси- и 1,5,8- или 1,6,8-тригидроксипроизводные антрахинона [29, 30]. Формулы некоторых встречающихся у грибов антрахинонов, названия грибов, у которых эти антрахиноны обнаружены, а также их биологическая активность представле-

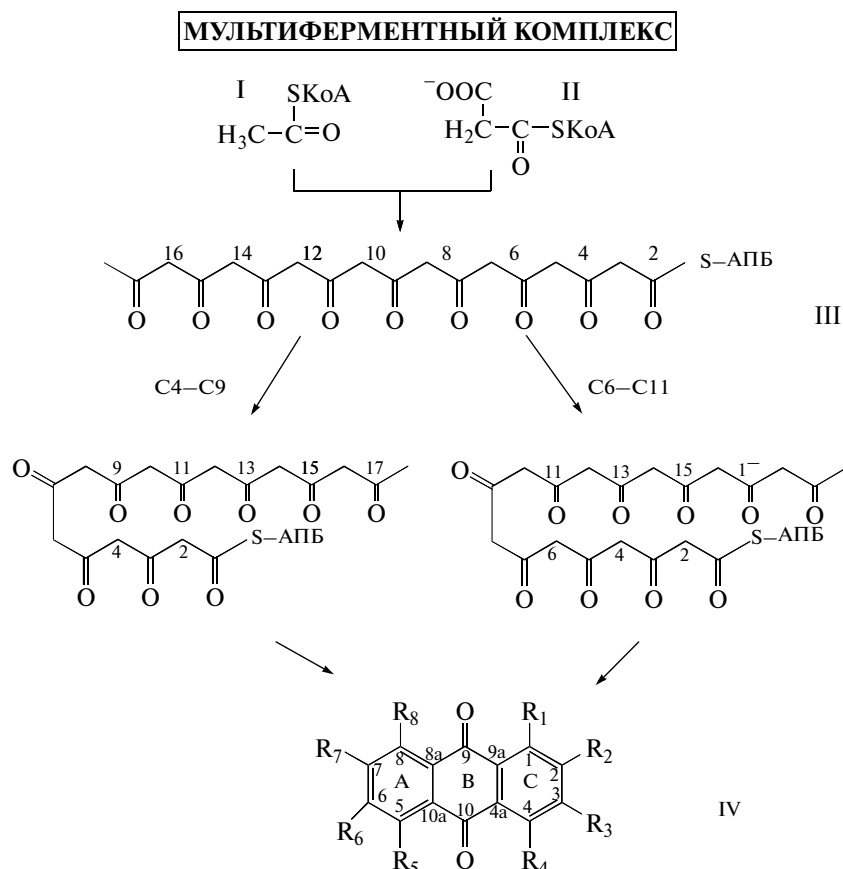


Схема циклизации β -поликетидной цепи в ходе синтеза антрахинонов у грибов. I – ацетил-КоА, II – малонил-КоА, III – β -поликетидная цепь, IV – антрахинон (R_1 – R_8 – боковые заместители). АПБ – ацил-переносающий белок.

ны в таблице. В тексте рядом с названием антрахинона в круглых скобках приводится порядковый номер, соответствующий его положению в таблице.

Антрахиноны могут присутствовать как в свободном виде, так и в виде гликозидов, гликопиранозидов или других комплексов, присоединяющихся по О- или С-связи боковой цепи, что делает их водорастворимыми. Характерные для антрахинонов грибов димерные структуры образуются из более простых трехчленных антрахинонов путем образования С–С-связей, например в молекулах алтерпорриолов (14), руброскирина (17), лютеоскирина (19) и др. (таблица) [27]. У макромицетов *Cortinarius* и *Dermocybe* из предшественников артрохризона и торосахризона в зависимости от места образования С–С-связи могут образовываться димеры 7,10' – флегмацины (18), 5,5' – атровирины или 7,7' – флавоманнины [31–35]. В составе димеров могут присутствовать не только мономерные антрахиноны, но нафтохиноны и другие продукты поликетидного синтеза. Структура руфооливациновых пигментов (20) включает в себя нафталеновое производное и 1,2- или 1,4-антрахинон, связанные через атомы углерода 4' и 10' [36].

Важной характеристикой антрахиноновых соединений являются их электронные спектры поглощения. Незамещенный антрахинон обладает слабой желтой окраской; в электронном спектре поглощения присутствует небольшой пик в области 405 нм. Сильное поглощение в ультрафиолетовой области обусловлено наличием хромофора, образованного системой конъюгированных двойных связей, и носит сложный характер. Наличие заместителей вызывает батохромный сдвиг максимума поглощения и появление полос поглощения в красноволновой области. Присутствие заместителей в 1,4-положениях вызывает более значительный батохромный сдвиг и значительно усиливает окраску, чем заместители в 1,5- и 1,8-положениях. Антрахиноны образуют с солями металлов комплексы – лаки, дающие характерную окраску. Окраска продуктов реакции зависит от положения ОН-групп в молекуле антрахинона и используемого реактива. Например, со спиртовым раствором ацетата магния 1,2-диоксипроизводные образуют лаки, окрашенные в фиолетовый цвет, 1,4-диоксипроизводные – в пурпурный цвет, 1,8-диоксипроизводные – в красно-оранжевый цвет [37]. Реакция может использоваться для

Строение и биологическое действие антрахинонов грибов

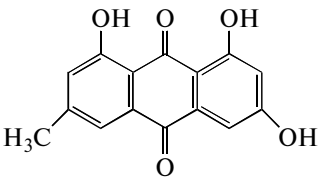
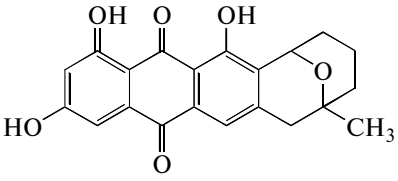
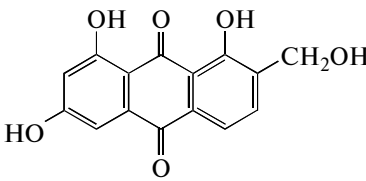
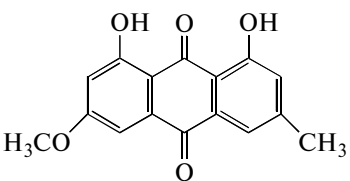
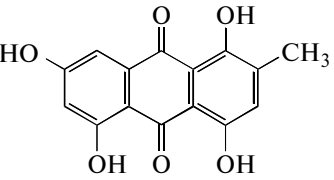
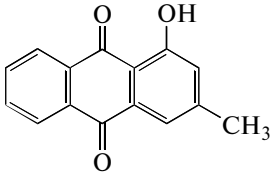
№	Название, формула	Продуценты	Биологическое действие
1	Эмодин (1,3,8-тригидрокси-6-метилантрахинон) 	<i>Aspergillus</i> sp. [9, 51], <i>Pyrenochaeta terrestris</i> [51], <i>Trichoderma</i> sp. [65], <i>Dermocybe sanguinea</i> [3], <i>Phoma</i> sp. [73]	Антибактериальное, фунгицидное [65, 113], нарушение митохондриального дыхания [131], ингибитор протеинкиназ [105], противовоспалительное [133, 139], противораковое [132, 142], гепатопротектор [11, 141]
2	Аверуфин (3,4,5,6-тетрагидро-7,9,11-тригидрокси-2-метил-2,6-эпокси-2Н-антра (2,3-β)оксонин-8,13-дион) 	<i>A. versicolor</i> [41], <i>A. parasiticus</i> [55, 131]	Микотоксин, нарушение митохондриального дыхания [131]
3	Версиколорин (1,6,8-тригидрокси-2-гидрокси-метилантрахинон) 	<i>A. versicolor</i> , <i>A. parasiticus</i> [41, 55]	Микотоксин [41]
4	Фисцион (1,8-дигидрокси-6-метокси-3-метилантрахинон) 	<i>Eurotium</i> sp. [90], <i>A. glaucus</i> [91], <i>Dermocybe sanguinea</i> [2, 3]	Гепатопротектор [141], противовоспалительное [133], антибактериальное, фунгицидное [110]
5	Катенарин (1,4,5,7-тетрагидрокси-2-метилантрахинон) 	<i>Eurotium</i> sp. [90], <i>Helminthosporium catenarium</i> [91], <i>A. glaucus</i> [21, 92], <i>Drechslera</i> sp. [70]	Токсичное [21, 92], антибактериальное [70]
6	Пахибазин (1-гидрокси-3-метилантрахинон) 	<i>Trichoderma</i> sp. [107], <i>Pachybasium candidum</i> [43], <i>Phoma</i> sp. [73]	Фунгицид [107]

Таблица. Продолжение

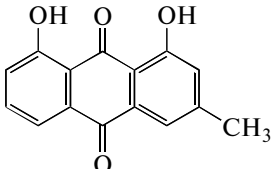
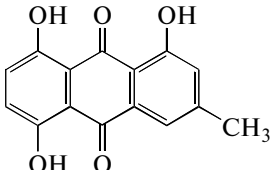
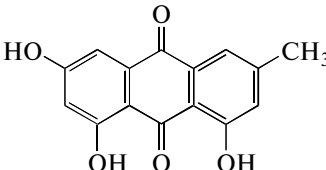
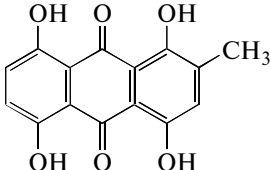
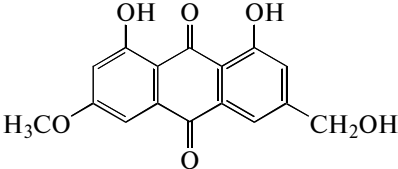
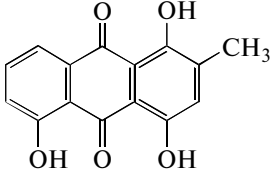
№	Название, формула	Продуценты	Биологическое действие
7	Хризофанол (1,8-дигидрокси-3-метилантрахинон) 	<i>Aspergillus</i> sp. [59], <i>Trichoderma</i> sp. [107], <i>Phoma</i> sp. [73], <i>P. islandicum</i> [73], <i>P. pachybasium</i> [73], <i>Drechslera teres</i> [60], <i>D. holmii</i> , <i>D. ravenelii</i> [71]	Гербицид [72], противовоспалительное [136], гепатопротектор [141], антибактериальное [109]
8	Гельминтоспорин (1,5,8-тригидрокси-3-метилантрахинон) 	<i>Curvularia lunata</i> [68, 69], <i>D. holmii</i> , <i>D. ravenelii</i> [71], <i>Cochliobolus sativus</i> [70]	Фитотоксичное [74]
9	Куестин (4,5,7-тригидрокси-2-метилантрахинон) 	<i>Eurotium</i> sp. [90], <i>P. frequentans</i> [85]	Антибактериальное [113], ингибитор Cdc25B фосфатазы [106]
10	Цинодонтин (1,4,5,8-тетрагидрокси-2-метилантрахинон) 	<i>Drechslera</i> sp. [14], <i>Curvularia lunata</i> [68, 69], <i>Pyrenochaeta terrestris</i> [73]	Фунгицид [14], фитотоксичное [73]
11	Фаллацинол (1,8-дигидрокси-3-гидроксиметил-6-метоксиантрахинон) 	<i>Dermocybe</i> sp. [28], <i>Caloplaca</i> sp., <i>Laurera benguelensis</i> [97, 98]	Антибактериальное, фунгицидное [97]
12	Исландицин (1,4,5-тригидрокси-2-метилантрахинон) 	<i>Penicillium islandicum</i> [40]	Мутагенное, токсичное, антибактериальное [113]

Таблица. Продолжение

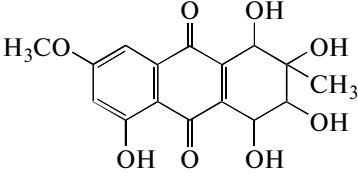
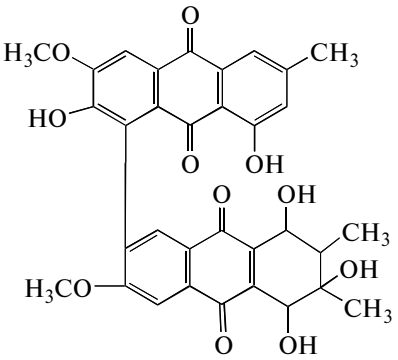
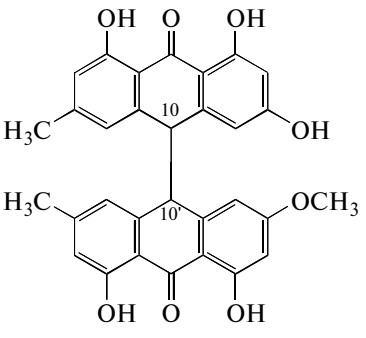
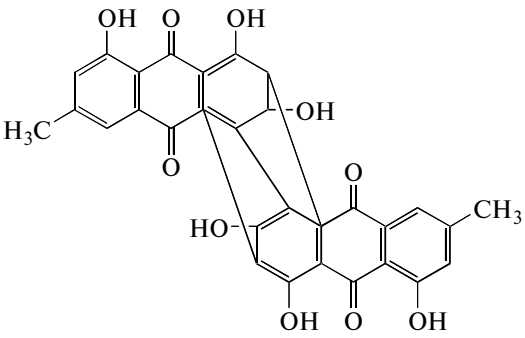
№	Название, формула	Продуценты	Биологическое действие
13	Алтерсоланол А (1,2,3,4,5-пентагидрокси-7-метокси-2-метил-1,2,3,4-тетрагидроантрахинон) 	<i>Alternaria</i> sp. [76, 94], <i>Ampelomyces</i> sp. [19, 63]	Фитотоксичное, блокатор переноса электронов дыхательной цепи [124], ингибирование протеинкиназ [63, 103]
14	Алтерпорриол С (5,5'-димер макроспорина и алтерсоланола С) 	<i>Alternaria</i> sp. [75–77], <i>Ampelomyces</i> sp. [63, 103]	Ингибирование протеинкиназ [63, 103], антибактериальное [63]
15	10,10'-димер эмодина и фисциона 	<i>A. varicolor</i> [53, 89], <i>A. glaucus</i> [21, 92]	Токсичное [21, 92]
16	Ругулозин (1,7,9,15,1',4'-гексагидрокси-3,11-диметил-5,6,8,13,14,16-гексагидро-6,13а,5а,14-(1,2,3,4)-бутан-тетрациклоокта(1,2-б;5,6-б')динафтален) 	<i>P. rugulosum</i> , <i>P. tardum</i> , <i>P. brunneum</i> , <i>Endothia parasitica</i> [43, 87]	Разобщение окислительного фосфорилирования [126], нефротоксичное, канцерогенное [43, 87]

Таблица. Продолжение

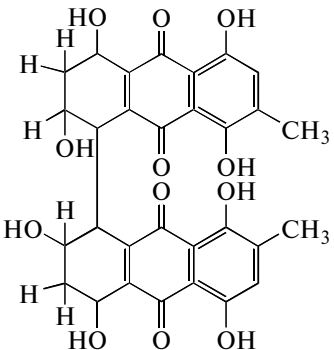
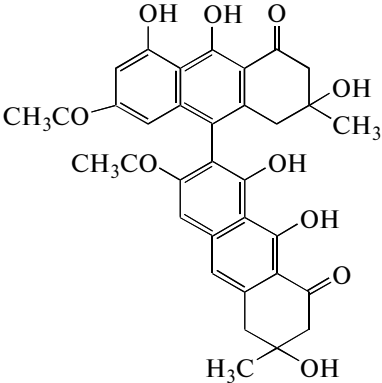
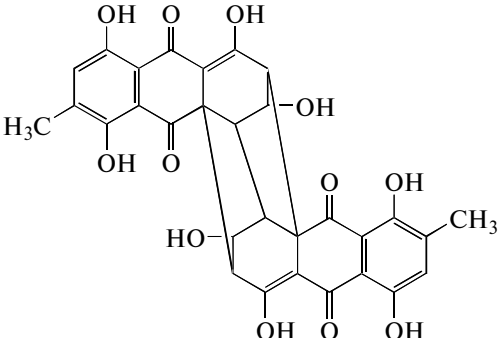
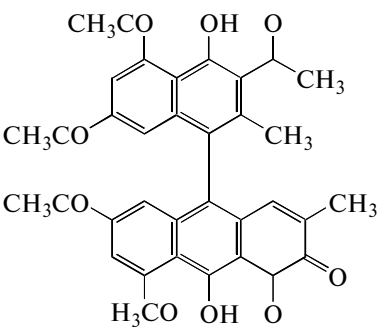
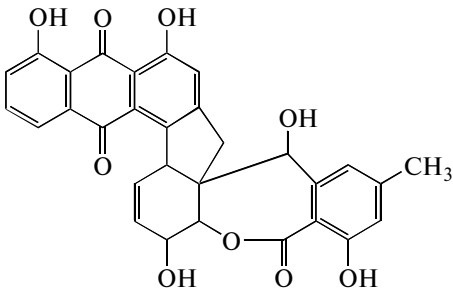
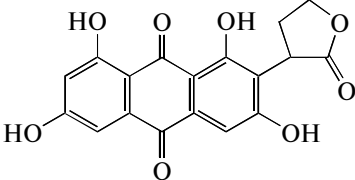
№	Название, формула	Продуценты	Биологическое действие
17	Руброскирин (1,1'-бис-2,4,5,8,-тетрагидрокси-7-метил-1,2,3,4-тетрагидроантрохинон) 	<i>Penicillium</i> sp. [43, 87]	Нарушение митохондриального дыхания [126], гепатокарценогенное [87, 88]
18	Флегмацин (7-10' димер торосахризона и атросахризона) 	<i>Cortinarius</i> sp., <i>Dermocybe</i> sp. [21, 28]	Токсичное, антибактериальное [112]
19	Лютеоскирин (8,8'-бис-7-гидроксиатенарин) 	<i>P. islandicum</i> [26]	Канцерогенное, гепатотоксичное мутагенное [88, 126]
20	Руфооливацин А (димер нафтохинонового производного и торосахризона) 	<i>Cortinarius rufo-olivaceus</i> [36]	Токсичное [36]

Таблица. Окончание

№	Название, формула	Продуценты	Биологическое действие
21	Рубеллин А (1,8,11,15,18-пентагидрокси-13-метил-5,5с,8,8а,9,15,16,19-октагидробензоафто(2',3':5,6)флуорено(1,9а-б)оксипин-5,10,19-трион) 	<i>Ramularia collo-cygni</i> [120, 121]	Фитотоксичное [120, 121]
22	Пецилохинон А (2,2'-димер 1,3,6,8-тетрагидроксиантрахинона и бутиролактона) 	<i>Paecilomyces fumoroseus</i> , <i>P. carneus</i> [78, 79]	Ингибирование протеин-тирозинкиназ [78, 79]

уточнения положения гидроксильных групп в боковых цепях антрахинона.

Большое значение для выявления строения природных антрахинонов имеют современные методы анализа – ПМР-, ЯМР-, УФ-, ИК- и масс-спектрометрия, круговой дихроизм и др. [27, 28, 31, 36, 38, 39].

Биосинтез антрахинонов. Пути синтеза антрахинонов различаются у растений и грибов. Так, в отличие от растений, для которых характерны шикиматный и ацетатно-малонатный пути, у грибов соединения поликетидной природы преимущественно синтезируются по ацетатно-малонатному пути.

Вторичные метаболиты грибов, образующиеся из ацетата и малоната, сильно различаются по своему строению (предшественники меланинов, афлатоксины, нафтохиноны, антрахиноны и др.). Исследования с ^{14}C -ацетатом, введенным в среду выращивания *Penicillium islandicum*, подтвердили включение метки в эмодин и исландицин [40]. У *Aspergillus versicolor* при добавлении ^{14}C -ацетата происходило включение меченого углеродного атома в аверуфин (2) и версиколорин (3) [41]. Показано, что у *A. parasiticus* метка из $[2-^{13}\text{C}]$ -малоната включалась в аверуфин [42]. Совместное участие ацетатных и малонатных единиц в синтезе антрахинонов было показано в опытах с *Penicillium brunnerum*, в которых были использованы меченые ^{14}C -ацетат и ^{14}C -малонат. Антраценовые ядра пигмента ругулозина (16) также образуются

из одной ацетатной и семи малонатных единиц [43]. Более поздние эксперименты подтвердили включение метки из ацетата в димерные дигидроантраценоны флегмацинового типа у *Cortinarius sinapicolor* [34, 35].

Синтез поликетидных соединений контролируется нередуцирующими поликетидсинтазами – мультиферментными комплексами, осуществляющими региоселективную циклизацию β -поликетидной цепи с образованием различных ароматических структур. В этом процессе в качестве “затравки” выступает молекула ацетил-КоА, к которой последовательно присоединяются молекулы малонил-КоА. В процессе конденсации происходит отщепление свободной карбоксильной группы и в результате образуется неустойчивое соединение – β -поликетидная цепь, которая служит предшественником многих хинонов (рисунок). Циклизация с образованием трех колец завершается образованием стабильного предшественника антрахинонов. В состав мультиферментного комплекса входят ацил-переносящий белок (АПБ), трансацилаза, осуществляющая выбор в качестве стартовой единицы ацетил-КоА (СТА), кетосинтаза (КС), катализирующая декарбоксилирующую конденсацию и последовательно присоединяющая малонил-КоА для удлинения цепи, малонил-КоА трансацилаза (МТА), доставляющая следующие малонильные остатки, и доменного белка-шаблона (БШ), определяющего региоселективность циклизации поликетидной цепи и конечную структуру

ру продукта (рисунок) [44]. В качестве дополнительных доменов в мультиферментном комплексе присутствуют метилтрансферазы и редуктазы. В зависимости от региоселективности циклизации первого кольца и размера конечного продукта различают 5 основных групп БШ в составе нередуцирующих поликетидсинтаз. Группа I – обеспечивает циклизацию по C2–C7 атомам и катализирует образование моноциклических соединений; группа II – циклизация C2–C7 и синтез бициклических соединений; группа III – циклизация C2–C7 и синтез полициклических продуктов, группа IV циклизация C4–C9 и синтез полициклических продуктов, группа V – циклизация по C6–C11 атомам и синтез полициклических продуктов [44, 45]. Синтез антрахинонов осуществляется с участием БШ-доменов групп IV (например, норсолориновой кислоты у *A. parasiticus*) и V (эмодин и аспертецина у *A. nidulans*, атрохризона у *A. terreus*) [45] (рисунок). Нередуцирующие поликетидсинтазы подавляют спонтанную циклизацию реакционной поликетидной цепи и контролируют региоселективность образования сложных поликетидных соединений. Внедрение меченных углеродных атомов из ацетата в молекулу хризофанол (7) у актиномицетов и гриба *Drechslera catenaria* происходит по-разному, что указывает на различие способов циклизации поликетидной цепи у грибов и актиномицетов [46]. Введение или удаление боковых замещающих групп на поздних стадиях биосинтеза создает разнообразие природных антрахинонов. Метильные группы антрахинонов происходят из метионина (через S-аденозилметионин) [28, 31, 34, 47].

Распространение антрахинонов у грибов и их биологическая активность. Антрахиноны широко распространены у представителей царства грибов. Выявлено наличие антрахинонов у *Aspergillus* spp., *Eurotium* spp., *Fusarium* spp., *Drechslera* spp., *Penicillium* spp., *Emericella purpurea*, *Curvularia lunata*, *Mycosphaerella rubella*, *Microsporium* sp. и др. Состав хиноидных пигментов одного и того же вида может варьировать в зависимости от места обитания. Так, было показано, что состав комплекса пигментов штаммов *P. funiculosum*, выделенных из дерново-подзолистой, бурой горнолесной, песчано-пустынной почв и выщелоченного чернозема, различался [48]. Свет видимой части спектра значительно снижал как накопление биомассы, так и образование пигментов у микелиальных грибов *Isaria farinose*, *E. nidulans*, *F. verticillioides* и *P. purpurogenum* [6]. Антрахиноны и другие фенольные вещества являются предшественниками темно-окрашенных гуминоподобных пигментов в почве [49].

Наиболее широко распространенным в природе антрахиноном является эмодин (1), который выделен из грибов, лишайников, а также цветковых растений и насекомых. Эмодин служит важ-

ным интермедиатом в биосинтезе других соединений грибов [47, 50, 51]. Этот антрахинон очень характерен для *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., способных контаминировать агропродукты [52–54].

Антрахиноны аверуфин (2) и версиколорин (3) у *A. versicolor* и *A. parasiticus* являются предшественниками микотоксина стеригматоцистина [55–57]. В спорах *A. nidulans* обнаружен димерный антрахинон аскохинон [58]. Из *Aspergillus* sp. выделен также другой распространенный антрахинон – хризофанол (7) [59]. Хризофанол синтезируется возбудителем заболевания зерна ячменя *Drechslera teres*, вызывая его розовое окрашивание [60]. Метилирование эмодина по 8-гидроксигруппе приводит к образованию куестина (9) у *A. terreus* [47]. Эмодин, эндокроцин и цинодонтин (10) обнаружены у *Pyrenochaeta terrestris*, эмодин и эндокроцин у *A. aculeatus* [51].

Ксеротолерантный гриб *E. purpurea* (телеоморфная форма рода *Aspergillus purpureus*) образует нетоксичные водорастворимые желтые пигменты эпурпурины, некоторые из которых относятся к антрахинонам [61, 62].

Среди биологически активных соединений эндофитного гриба *Ampelomyces* sp. из растения *Urospermum picroides*, используемого в народной медицине в качестве противовоспалительного средства, присутствуют 3-О-метилалатернин, макроспорин и алтеросоланолы (13) [63].

Симбионты жуков-короедов грибы *Geosmithia* sp. продуцируют гидроксильированные антрахиноны 1,3,6,8-тетрагидроксиантрахинон, 1-ацетил-2,3,6,8-тетрагидроксиантрахинон (родолампрометрин) и 1-ацетил-2,4,5,7,8-пентагидроксиантрахинон, проявляющие антимикробную и противовоспалительную активность [64].

Антрахиноны *Trichoderma* spp. подавляют рост многих почвенных патогенных бактерий и грибов и способствуют росту растений. Среди продуцируемых антрахинонов обнаружены пахибазин (6), хризофанол, эмодин, ω -гидроксипахибазин, 1,5- и 1,7-дигидрокси-3-гидроксиметил-9,10-антрахиноны [65].

Плодовые тела представителей родственных родов макромицетов *Cortinarius/Dermocybe*, а также рода *Tricholoma* образуют темно-оранжевый пигмент фаллацинол (11), а также ярко-желтый димерный антрахинон флавоманнин и зеленые дигидроантраценоны – торосахризон и атрохризон. Присутствие антрахинонов в форме антраценонов (восстановленное кольцо Б) достаточно характерно для грибов. Эти соединения используются в качестве красителей [31, 66, 67].

Curvularia lunata является продуцентом цинодонтин (10), гельминтоспорина (8) и хризофанол (таблица) [68]. Цинодонтин используют для получения красителей Disperse Blue 7 и Acid Green 28,

в молекуле которых присутствует метильная группа в 3-положении [68, 69]. Цинодонтин накапливается также в культуре *Drechslera avenae* (патогенного для дикого овса *Avena sterilis*, но безвредного для других растений) и родственных видов, используемых для получения фунгицидных препаратов [14, 70, 71].

Многие виды *Phoma* (*P. sorgina*, *P. herbarum*, *P. exigua*, *P. macrostoma*, *P. foveata*) секретируют антрахиноновые пигменты, проявляющие гербицидные свойства, что позволяет использовать их для борьбы с сорными травами [72]. Основным действующим веществом с гербицидными свойствами признан димер, состоящий из тороса-хризона-8-О-метилового эфира и эмодин-1-О-метилового эфира [5]. Ранее в культуре фитопатогенного гриба *P. foveata* были идентифицированы пахибазин, хризофанол, эмодин [73].

Различные производные гелминтоспорина (8), выделенные из *Cochliobolus sativus*, ингибировали рост растений, а в микросомах печени крыс подавляли холестерол-ацилтрансферазную активность [74].

Alternaria spp. продуцируют макроспорин, гидроксидантрахиноны алтерсоланолы (13) и их димеры (14) – алтерпорриолы [75–77]. У филогенетически близких видов *Ulocladium* sp. эти пигменты не обнаружены [76].

Красный водорастворимый пигмент, синтезируемый энтомопатогенным грибом *Isaria farinosa* (несовершенная стадия *Cordyceps militaris*), также имеет антрахиноновую природу, его строение и токсичность интенсивно изучаются в настоящее время [6]. Пецилохиноны (22), выделенные из *Raecilomyces carneus*, способны ингибировать протеин-тирозинкиназы (в микромолярных концентрациях) [78–79].

Fusarium oxysporum, выделенный из корней заболевших лимонных деревьев, продуцирует антрахиноны, не имеющие гидроксильных заместителей в 1,4-положениях и замещенные по 2- или 3-положениям ацетильными или 1-гидроксиэтильными группами [80]. Из экстракта мицелия гриба *Chrysosporthe cubensis*, патогенного для эвкалиптов и гвоздичных деревьев, выделены скирин и оксискирин, димерные антрахиноны, в состав которых входит эмодин [81].

Необычный аза-антрахинон фомазарин наряду с цинодонтином выделен из фитопатогенного гриба *Pyrenochaeta terrestris*, вызывающего порошение корней чеснока и кукурузы [82].

P. oxalicum – продуцент водорастворимого красного пигмента антрахиноновой природы, используется в пищевой промышленности [83]. Пигмент из *P. oxalicum* обладает противораковой активностью [84]. *P. frequentans* (Westling) способен синтезировать куестин и куестинол [85], а *P. janthinellum* – исландицин [86]. Многие

виды *Penicillium* являются продуцентами гепатокарциногенных димерных антрахинонов, например ругулозина (16), руброскирина (17) и лютеоскирина (19) [87, 88].

Необычные фармакологические свойства вторичных метаболитов морских грибов, в том числе и синтезируемых ими антрахинонов, давно привлекают внимание исследователей [89]. Эти грибы являются частью сообщества, образованного водорослями, губками, кораллами и животными. Они могут вести сапрофитный образ жизни, но чаще обнаруживаются как симбионты. Многие представители рода *Eurotium* (*E. amstelodami*, *E. repens*, *E. chevalieri*, *E. rubrum*, *E. herbariorum* и др.), обитающие в соленой воде, способны синтезировать антрахиноны фисцион (4), флуороглауцин, алатернин, катенарин (5), куестин (9), куестинол [90, 91]. Токсичность и мутагенность морских видов рода *Aspergillus* обусловлена присутствием фисциона, фисционантрона, эритроглауцина, эмолина, димера эмодин-фисциона (15), куестинола, катенарина, руброкристина, аспергиолидов А и Б и др. [21, 92]. Изоляты *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135, выделенные из кораллов морской веер, продуцируют фузарантрахинон, проявляющий антимикробную активность [93]. Представители *Alternaria* sp., выделенные из кораллов *Sarcophyton* sp., являются продуцентами гидроалтерсоланолов, дигидроалтерсоланола и антраноидных димеров алтерпорриолового типа, обладающих антибактериальной активностью и проявляющих цитотоксичную активность для клеток HeLa и KB [94]. Представитель рода *Microsphaeropsis*, выделенный из морских губок, синтезирует 1,3,6,8-тетрагидроксиантрахиноны, ингибирующие протеин-тирозинкиназы [95]. Антрахиноны *Microsporium* sp. интенсивно изучаются в связи с проявляемой противораковой активностью [13, 89].

Лишайники, как и грибы, обладают способностью синтезировать различные антрахиноны [54, 96–98]. Предполагается, что наличие этих соединений способствует их выживаемости в условиях низких температур, интенсивного и длительного ультрафиолетового облучения. В лишайниках рода *Parmeliaceae*, занимающих обширные пространства лесотундры, обнаружены широко распространенные среди грибов антрахиноны – хризофанол, исландицин (12), цинодонтин, эмодин, 5-гидроксиэмодин и др. [96]. Методом иммунофлуоресцентного анализа эмодин также обнаружен у *Cladonia* sp., *Cetraria islandica*, *Evernia mesomorpha*, *Brioria chhlybeiformis*, *Usnea filipendula*, *U. subfloridana* [54].

Биологическая активность антрахинонов грибов. Как уже отмечалось ранее, антрахиноны обладают широким спектром биологической активности, включая бактериостатическое, противогрибковое, противовирусное, гербицидное,

инсектицидные действия. Предположительно, эти соединения у грибов участвуют в межвидовых взаимодействиях. Так, антрахиноны, синтезируемые эндофитными грибами, выступают в качестве защитных соединений растения-хозяина от насекомых или других микроорганизмов [99, 100]. Антрахиноны могут действовать как прямые антагонисты патогенных микроорганизмов или повышать устойчивость растения-хозяина [100]. Красный пигмент цинодонтин, выделяемый *Drechslera avenae* (патотип *Avena sterilis*, дикого овса), проявляет фунгитоксичность по отношению к *Sclerotinia minor*, *S. sclerotiorum* и *Botrytis cinerea*, а также *Verticillium dahliae*. Фунгитоксичность цинодонтина проявлялась в тех же концентрациях, что и у промышленных фунгицидов — дихлорана и карбендазима [14]. Сравнение фунгитоксичности разных производных антрахинонов на *B. cinerea* показало, что наличие метильной группы в кольце А усиливало фунгитоксичное действие [101]. Антрахиноны не вызывали окисления липидов мембран и не индуцировали образования активных форм кислорода, наблюдавшиеся при применении промышленных дикарбоксимидных фунгицидов [101], что указывает на иной механизм действия.

Фаллацинол (11) впервые был обнаружен в *Dermyces* sp. [102], а также выделен из лишайников рода *Caloplaca*. Этот антрахинон проявляет антибактериальные и фунгицидные свойства [97, 98].

Гриб *Stemphylium globuliferum* является патогенным для многих видов растений, но с марокканской блошиной мятой *Mentha pulegium* сосуществует как эндофит. Выделяемые из *S. globuliferum* антрахиноны — димеры алтерпорриолового типа — проявляют ингибирующую активность в отношении 24 протеинкиназ при концентрациях 0.64–1.4 мкг/мл [103]. У эндофитного гриба *Amphelomyces* sp. также выделены алтерсоланола, ингибирующие протеинкиназы; другой антрахинон этого гриба — 3-О-метилалатернин — при концентрации 50 мкг/мл полностью ингибировал образование биопленок *Staphylococcus epidermidis*, а макроспорин — на 50% [104].

Протеинкиназы играют ключевую роль в реакции клеток на сигналы, отвечающие за пролиферацию и трансформацию клеток. Способность ингибировать протеинкиназы была выявлена и у многих антрахинонов грибов. Так, ранее было показано, что эмодин ингибировал протеин-тирозинкиназы [11, 105]. Тетрагидроксиантрахиноны *Microspheeropsis* sp., симбионта *Aplysina aerophoba*, ингибировали рецепторы тирозинкиназ, протеинкиназы С-ε (PKC-ε), циклинзависимой киназы 4 (CDK4) и эпидермального фактора роста (EGF) [95], пецилохиноны гриба *Paecilomyces carneus* — ингибиторы v-abl тирозинкиназы [78, 79], алтерсоланола и алтерпорриолы также ингиби-

ровали протеинкиназную активность [104]. Способность ингибировать Cdc25B фосфатазу и подавлять рост культуры раковых клеток проявляли эмодин, куестин, фисцион [106].

У антрахинонов *Trichoderma harzianum* антифунгальная активность выражена сильнее, чем противобактериальная [107]. Наиболее активным соединением оказался 1,5-дигидрокси-3-гидроксиметил-9,10-антрахинон [107]. Представители рода *Trichoderma* подавляли рост фитопатогенных грибов *Rhizoctonia solani* и *B. cinerea*, а основные антрахиноны рода *Trichoderma* — пахибазин и эмодин — также действовали губительно на *R. solani* и *B. cinerea* [108]. Было показано, что антрахиноны рода *Trichoderma* участвуют в процессе патогенеза, способствуя закручиванию гиф вокруг уничтожаемого гриба [108]. Взаимодействие гиф *T. harzianum* с *R. solani* или повышение концентрации экзогенного эмодина или пахибазина увеличивало также уровень цАМФ в мицелии *T. harzianum*, что указывало на регуляторные функции антрахинонов в этом процессе [108].

Антибактериальные свойства проявляют многие антрахиноны — эмодин, фисцион, куестин, хризофанол, катенарин, алтерсоланола [9, 11, 109–111]. Антрахиноны австралийских грибов рода *Cortinarius* были губительны для *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* [112]. Тетрагидроксиантрахиноны *Alternaria solani* также проявляли выраженную антибактериальную активность [76]. Грамположительные бактерии были более чувствительны к действию антрахинонов [9]. Катенарин и эмодин ингибировали ДНК-зависимую РНК-полимеразу *E. coli* [113]. Ряд природных антрахинонов проявляют выраженную противовирусную активность [114].

Характерной чертой антрахинонов, выделяемых грибами рода *Aspergillus*, является способность стимулировать синтез экзопротеаз [115]. Выделение антрахинонов грибами рода *Aspergillus* стимулируется при совместном культивировании грибов разных видов [116].

Наличие хиноидной структуры позволяет антрахинонам участвовать в окислительно-восстановительных реакциях, проявляя антиоксидантные или прооксидантные свойства. Способность некоторых антрахинонов (например, алатернин) предотвращать окисление линолевой кислоты показано в тестах *in vitro* [117, 118]. Прооксидантное и токсичное действие многих антрахинонов может объясняться образованием семихинонового радикала [119].

Токсичные антрахиноны патогенного гриба *Mycosphaerella rubella* и *Ramularia collo-cygni* — рубеллины (21) — вызывали окисление ненасыщенных жирных кислот на свету и способствовали развитию болезни на листьях растений [120–122]. Их действие было обусловлено образованием

синглетного кислорода [121]. Алтерсоланол А проявлял фитотоксичность и ингибировал рост культуры клеток *Nicotiana rustica*. В митохондриях, выделенных из *N. rustica*, в присутствии алтерсоланола А наблюдалось стимулирование окисления НАДН [123]. Алтерсоланол действовал так же, как акцептор электронов с препаратами диафоразы [124]. Антрахиноны могут проявлять и антиоксидантные свойства. Эндофитный гриб *Eurotium rubrum*, живущий в тканях мангрового растения *Hibiscus tiliaceus*, продуцирует бис-дигидроантраценон эурорубин и *seco*-антрахиноны 3,2-О-метил-9-дегидроксиэуротинон и 4,2-О-метил-4-О-(α -D-рибофуранозил)-9-дегидроксиэуротинон, выступающие ловушками радикалов [125].

Некоторые антрахиноны могут проявлять нефротоксичное, гепатотоксичное и канцерогенное действия. Сюда относятся микотоксин ругулозин, продуцируемый *Penicillium cyclopium*, *P. variable*, *P. canescens*, лютеоскирин и эритроскирин, характерные для *P. islandicum* [87, 88, 126]. Эти соединения проявляют гепатотоксическое действие, нарушают окислительное фосфорилирование, в концентрации 0.5 мкг/мл оказывают онкогенное действие на культуру клеток эмбрионов мышей [88]. Исследование цитотоксичности на культуре клеток V-79 показало, что антрахиноны (эмодин, антралин, хризаробин, дантрон и др.) могут ингибировать рост на 50% в пределах концентраций от 0.2 до 20 мкг/мл, причем цитотоксичность существенно зависела от строения антрахинона. Антрахиноны с карбонильными группами в 9- и 10-положениях были менее токсичны, чем соединения с одной карбонильной группой в 9-положении. Положение заместителей в боковых цепях также оказывало влияние на этот процесс [127]. У млекопитающих биотрансформация эмодина до более токсичных метаболитов 2-гидроксиэмодина и ω -гидроксиэмодина происходила с участием цитохрома P450 [128].

Проверка мутагенности на разных тест-системах выявила способность 1,3-гидроксиантрахинонов (пурпурин и эмодин) трансформировать клетки штамма *Salmonella* TA1537, но эти соединения не оказывали влияния на фибробласты мышей и гепатоциты крысы [129]. Более поздние исследования также показали, что мнение о мутагенности антрахинонов, вероятно, преувеличено и связано с высокой чувствительностью представителей рода *Salmonella* к действию антрахинонов, а также с наличием токсичных примесей в испытываемых образцах антрахинонов [130].

Было показано, что эмодин и эмодинантрон являются сильными разобщающими агентами, причем для нарушения митохондриального дыхания необходимо присутствие гидроксильных групп в β -положении [51, 131]. Фисцион (О-метилованное производное эмодина в β -положе-

нии) разобщающего действия не оказывал. Аверуфин — метаболический предшественник стеригматоцистина и афлатоксина В1 — имеет гидроксильную группу в β -положении антрахинового ядра в дополнение к 1,8-дигидроксильным группам, таким же, как у эмодина, и способен нарушать окислительное фосфорилирование в митохондриях [131]. Руброскирин, бис-антрахинон *P. islandicum*, в концентрации 10 мкМ также оказывал разобщающий эффект на митохондриях крыс, тогда как лютеоскирин и ругулозин таким действием не обладали [126].

Некоторые грибные антрахиноны обладают противораковым действием [132–134]. Механизм противоракового действия антрахинонов, по-видимому, связан с активированием каспазного каскада и развитием апоптоза. Нарушение митохондриального дыхания в присутствии антрахинонов является важным этапом их антиканцерогенного действия [132, 135]. Антрахиноны (например, эмодин, хризофанол) могут проявлять противовоспалительное действие, механизм которого связан с подавлением активности NF- κ B/caspase-1 *in vitro* and *in vivo* [11, 136]. Являясь ингибитором гликозилирования белков, эмодин обладает противодиабетическим действием [137], а также полезен при некоторых неврологических заболеваниях [138–140]. Этот антрахинон проявляет гепатопротекторное действие [141]. На культуре клеток гепатоцитов было показано, что эмодин и в меньшей степени хризофанол защищали клетки от алкогольной интоксикации, повышая уровень глутатиона в них [59]. Эмодин подавлял образование метастазов, являлся блокатором фосфорилирования рецептора 2 (KDR/Flk-1) [142, 143].

Структура из трех колец, лежащая в основе молекулы антрахинонов, допускает возможность интеркаляции этих соединений с участками ДНК. Потенциальная токсичность антрахинона зависит от его способности связывать ДНК и может быть прогнозирована методом резонансного светового рассеивания [144, 145].

Антрахиноны нашли применение в аналитической работе. Модификация дезоксинуклеозидов или дезоксинуклеозидтрифосфатов путем присоединения молекулы антрахинона по 5-положению пиримидина или 7-положению 7-дезаденина позволяет получить подходящий субстрат для полимеразы и введения метки в ДНК [146]. Антрахиноны могут использоваться в качестве метки пептидов путем их присоединения к N-концу. Подобные соединения применялись как ингибиторы топоизомеразы, фармакологической мишени для предотвращения развития онкологических заболеваний [147].

Разнообразие соединений антрахиноновой природы в грибах, широкий спектр проявляемой ими активности в сочетании с развитием методов

их идентификации способствовало нахождению новых соединений, перспективных для медицины и агрохимии. Однако функции антрахинонов в живых клетках остаются во многом не изученными. Способность антрахинонов проявлять антибактериальные, антифунгицидные, антивирусные, инсектицидные и гербицидные свойства согласуются с предположением об их участии в межвидовых взаимодействиях. В настоящее время выявлено большое разнообразие антрахинонов у эндофитных грибов и морских грибов-симбионтов, живущих на кораллах, водорослях, губках и др. Наличие сведений о способности некоторых антрахинонов ингибировать протеинкиназы, включая тирозинкиназы, изменять уровень цАМФ в клетках, вызывать апоптоз указывает на их возможное участие в передаче внутрисклеточного сигнала.

Таким образом, антрахиноны грибного происхождения издавна используются в народной медицине как биологически активные соединения с широким спектром действия. В настоящее время исследование свойств новых антрахинонов расширяет арсенал лекарственных препаратов, главным образом фунгицидов, противораковых средств, иммуномодуляторов. Кроме того, контаминация продуктов сельского хозяйства микроскопическими грибами может приводить к образованию токсичных антрахинонов и вызывать отравления. С целью мониторинга возможного заражения продуктов микроскопическими грибами проводится совершенствование методов выявления контаминантов и методов экспресс-анализа следовых количеств антрахинонов в продуктах [54, 144, 145].

Важным направлением применения антрахинонов грибного происхождения является их использование в качестве натуральных красителей, что позволяет сократить экологически вредное производство синтетических красителей. Антрахиноны находят применение в микроэлектронике и современных нанотехнологиях [7].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов М.: Мир, 1986. 425 с.
2. Raisanen R., Nousiainen P., Hynnianen P.H. // Textile Res. J. 2001. V. 71. № 11. P. 922–927.
3. Raisanen R., Nousiainen P., Hynnianen P.H. // Textile Res. J. 2001. V. 71. № 11. P. 1016–1022.
4. Perumal K., Stalin V., Chandrasekareenthiran S., Sumathi E., Saravanakumar A. // Textile Res. J. 2009. V. 79. № 13. P. 1178–1187.
5. Quereshi S., Khan A.A., Pandey A.K. // Химия природных соединений. 2011 V. 47. № 4. С. 465–467.
6. Velmurugan P., Lee Y.H., Nanthakumar K., Kamala-Kannan S., Dufosse L., Mapari S.A., Oh B.-T. // J. Basic Microbiol. 2010. V. 50. № 6. P. 581–590.
7. Файн В.Я. 9,10-Антрахиноны и их применение. М.: Центр фотохимии РАН, 1999. 92 с.
8. Chaichit N., Sihanonth P., Petsom A., Sangyanich P. // Dyes and pigments. 2008. V. 77. № 3. P. 653–656.
9. Anke H., Kolthoum I., Zaehner H., Laatsch H. // Arch. Microbiol. 1980. V. 126. № 3. P. 223–230.
10. Kanokmedhakul S., Kanokmedhakul K. Phonkkered N., Soyong K., Kongsaree P., Suksamrarn A. // Planta medica. 2002. V. 68. № 9. P. 834–836.
11. Srinivas G., Babykutty S., Sathiadevan P.P., Srinivas P. // Med. Res. Reviews. 2007. V. 27. № 5. P. 591–608.
12. Newman D.J., Cragg G.M. // Curr. Opinion Investigation. Drags. 2009. V. 10. № 12. P. 1280–1296.
13. Zhang C., Kim S.K. // Adv. Food Nutr. Res. 2012. V. 65. P. 415–421.
14. Chrysayi-Tokousbalides M., Kastanias M.A. // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 17. P. 4920–4923.
15. Semple S.J., Pyke S.M., Reynolds G.D., Flower R.L. // Antiviral. Res. 2001. V. 49. № 3. P. 169–178.
16. Perchellet E.M., Magill M.J., Huang X., Dalke D.M., Hua D.H., Perchellet J.P. // Anticancer Drugs. 2000. V. 11. № 3. P. 339–352.
17. Huang W.-Y., Cai Y.-Z., Xing J., Corke H., Sun M. // Economic Botany. 2007. V. 61. № 1. P. 14–30.
18. Borges W.S., Pupo M.T. // J. Braz. Chem. Soc. 2006. V. 17. № 5. P. 929–934.
19. Aly A.H., Debbab A., Kjer J., Proksch P. // Fungal Diversity. 2010. V. 41. № 1. P. 1–16.
20. Xu A., Wang Y., Wen J., Liu P., Liu Z. // Internat. J. Food Microbiol. 2011. V. 146. № 1. P. 14–22.
21. Bachmann M., Luethy J., Schlatter C. // J. Agric. Food Chem. 1979. V. 27. № 6. P. 1342–1347.
22. Nemeikaite-Ceniene A., Sergediene E., Nivinskas H., Cenas N. // Z. Naturforsch. C. 2002. B. 57. № 9–10. S. 822–827.
23. Sanakawa U. // The Biosynthesis of mycotoxins / Ed. P. Steyn. N. Y.: Acad. Press, 1980. P. 357–394.
24. Fujimoto H. // Encyclopedia of Dairy Sciences. 2 Ed. / Eds. J. Fuquay, P. Fox, P. McSweeney. Chiba, Japan: Teikyo Heisei University, 2011. P. 792–800.
25. Saito M., Enomoto M., Tatsuno T., Uruguchi K. Fungal Toxins / Eds. A. Ciegler, S. Kadis, S.J. Ahl. London: Academic Press, 1971. P. 299–380.
26. Enomoto M., Ueno I. // Mycotoxins. / Ed. I.F.H. Purchase. Amsterdam: Elsevier, 1974. P. 303–326.
27. Музычкина П.А. Природные антрахиноны. Биологические свойства и физико-химические характеристики / Ред. Г.А. Толстикова. М.: ФАЗИС, 1998. 864 с.
28. Gill M., Gimenez A. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1990. P. 1159–1167.
29. Birk I.R.C., Rhee C. // Biochem. J. 1966. № 1. V. 98. P. 112–116.
30. Файн В.Я. Электронные спектры поглощения и строение 9,10-антрахинонов. М.: Центр фотохимии. РАН. Изд-во: Компания “Спутник”. 2003. 230 с.
31. Gill M. // Natural Prod. Rep. 1999. V. 16. № 2. P. 301–317.

32. Muller M., Lamottke K., Steglich W., Busemann S., Reichert M., Bringmann G., Spiteller P. // Eur. J. Org. Chem. 2004. V. 2004. № 23. P. 4850–4855.
33. Elsworth C., Gill M., Milanovic N.M. // Australian J. Chem. 1999. V. 52. № 9. P. 867–874.
34. Elsworth C., Gill M., Gimenez A., Milanovic N., Raudies E. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1999. № 1. P. 119–125.
35. Gill M., Gimenez A., Jhingran A.G., Milanovic N.M., Palfreyman A.R. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1998. № 12. P. 3431–3435.
36. Gao J.-M., Qin J.-C., Pescitelli G., Di Pietro S., Ma Y.-T., Zhang A.-L. // Org. Biomol. Chem. 2010. V. 8. № 15. P. 3543–3551.
37. Файн В.Я., Зайцев Б.Е., Рябов М.А. // Координационная химия. 2004. Т. 30. № 5. С. 360–364.
38. Ayers S., Graf T.N., Adcock A.F., Kroll D.J., Shen Q., Swanson S.M., Matthew S., Carcache de Blanco E.J., Wani M.C., Darveaux B.A., Pearce C.J., Oberlies N.H. // J. Antibiot. (Tokyo). 2011. V. 65. № 1. P. 3–8.
39. Stodulkova E., Man P., Kolarik M., Fleiger M. // J. Chromatogr. 2010. A. V. 1217. № 40. P. 6296–6302.
40. Gatenbeck S. // Acta Chem. Scand. 1958. V. 12. № 10. P. 1211–1214.
41. Hsien D.P.H., Singh R., Yao R.C., Bennett W. // Appl. Environ. Microbiol. 1978. V. 35. № 5. P. 980–982.
42. Chandler I.M., Simpson T.J. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1987. № 1. P. 17–18.
43. Shibata S., Ikekata T. // Chem. Pharm. Bull. 1963. V. 11. № 3. P. 368–372.
44. Javidpour P., Korman T.P., Shkya G., Tsai S.-C. // Biochemistry. 2011. V. 50. № 21. P. 4638–4649.
45. Li Y., Chooi Y.-H., Sheng Y., Valentine J., Tang Y. // J. Amer. Chem. Soc. 2011. V. 133. № 46. P. 15773–15785.
46. Bringmann G., Noll T.F., Gulder T.A.M., Grune M., Dreyer M., Wilde C., Pankewitz F., Hilker M., Payne G.D., Jones A.L., Goodfellow M., Fiedler H.-P. // Nature Chem. Biol. 2006. V. 2. № 8. P. 429–433.
47. Chen Z.-G., Fujii I., Ebizuka Y., Sankawa U. // Arch. Microbiol. 1992. V. 58. № 1. P. 29–34.
48. Колесников М.П., Мирчинк Т.Г., Лурье Н.Ю. // Почвоведение. 1984. № 2. С. 71–76.
49. Saiz-Jimenez C., Haider K., Martin J.P. // Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 1975. V. 39. № 3. P. 649–653.
50. Sankawa U., Ebizuka Y., Shibata S. // Tetrahed. Lett. 1973. V. 14. № 23. P. 2125–2128.
51. Kurobane I., Vining L.C., McInnes A.G. // J. Antibiot. (Tokyo). 1979. V. 32. № 12. P. 1256–1266.
52. Wells J.M., Cole R.J., Kirksey J.W. // Appl. Microbiol. 1975. V. 30. № 2. P. 26–28.
53. Wang W., Zhu T., Tao H., Lu Z., Fang Y., Gu Q., Zhu W. // J. Antibiot. (Tokyo). 2007. V. 60. № 10. P. 603–607.
54. Кононенко Г.П., Буркин А.А., Толмашева Т.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 1. С. 81–87.
55. Berger Y. // Phytochemistry. 1980. V. 19. P. 2279–2780.
56. Kawai K., Nozara Y., Maebayshi Y., Yamazaki M., Hamasaki T. // Appl. Environ. Microbiol. 1984. V. 47. № 3. P. 481–483.
57. Ubbink-Kok T., Andersen J., Konings W. // Antimicrob. Agents Chemother. 1986. V. 30. № 1. P. 147–151.
58. Brown D., Salvo J. // Appl. Environ. Microbiol. 1978. V. 35. № 5. P. 980–982.
59. Qian Z.-J., Zhang C., Li Y.-X., Je J.-Y., Kim S.-K., Jung W.-K. // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011. V. 2011. № 452621.
60. Львова Л.С., Орлова Н.Ю., Бекдаурова Г.И., Хасанов Б.А., Глухова Л.А. // Труды ВНИЗ. 1991. № 117. С. 52–55.
61. Mapari S.A., Meyer A.S., Thrane U., Frisvad J.C. // Microb. Cell Factories. 2009. V. 8. № 24.
62. Hideyuki T., Koohei N., Ken-ichi K. // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 1996. V. 44. № 8. P. 2227–2230.
63. Aly A.H., Edrada-Ebel R., Wray V., Muller W.E., Kozytska S., Hentschel U., Proksch P., Ebel R. // Phytochemistry. 2008. V. 69. № 9. P. 1716–1725.
64. Stodulkova E., Kolarik M., Kresinova Z., Kuzma M., Sulc M., Man P., Novak P., Marsik P., Lanada P., Olsavska J., Chudickova M., Pazoutova S., Cerny J., Bella J., Flieger M. // Folia Microbiol. 2009. V. 54. № 3. P. 179–187.
65. Liu S.-Y., Lo C.-T., Shibu M. A., Leu Y.-L., Jen B.-Y., Peng K.-C. // J. Agric. Food Chem. 2009. V. 57. № 16. P. 7288–7292.
66. Velsek J., Cejpek K. // Czech. J. Food Sci. 2011. V. 29. № 2. P. 87–102.
67. Gill M. // Natural Prod. Rep. 1996. V. 13. № 4. P. 513–528.
68. Hobson D.K., Wales D.S. // J. Soc. Dyers Colour. 1998. V. 114. № 1. P. 42–44.
69. Hobson D.K., Edwards R.L., Wales D.S. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 1997. V. 70. № 3. P. 343–348.
70. Engstom K., Brishammar S., Bengtsson M., Andersson R. // Mycol. Res. 1993. V. 97. № 3. P. 381–384.
71. Van Eijk G.W., Roeymans H.J. // Experiment. Mycol. V. 1981. V. 5. № 4. P. 373–375.
72. Rai M., Deshmukh P., Gade A., Ingle A., Kovics G.J., Irinyi L. // Critical Rev. Microbiol. 2009. V. 35. № 3. P. 182–196.
73. Bick I.R., Rhee C. // Biochem J. 1966. V. 98. № 1. P. 112–116.
74. Barbosa L.C.A., Nogueira L.B., Maltha C.R.A., Teixeira R.R., Silva A.A. // Molecules. 2009. V. 14. № 2. P. 160–173.
75. Stoessl A. // Can. J. Chem. 1969. V. 47. № 5. P. 767–776.
76. Andersen B., Dongo A., Pryor B.M. // Mycol. Res. 2008. V. 112. № 2. P. 241–250.
77. Lazarovits G., Steele R.W., Stoessl A. // Z. Naturforsch. Sect. C. 1988. B. 43c. № 11–12. S. 813–817.
78. Fredenhagen A., Mett H., Meyer T., Buchdunger E., Regenass U., Roggo B., Petersen F. // J. Antibiot. (Tokyo). 1995. V. 48. № 11. P. 1355–1358.

79. *Petersen F., Fredenhagen A., Mett H., Lydon N.B., Delmendo R., Jenny H.B., Peter H.H.* // J. Antibiot. (Tokyo). 1995. V. 48. № 3. P. 191–198.
80. *Baker R.A., Tatum J.H.* // J. Ferment. Bioeng. 1998. V. 85. № 3. P. 359–361.
81. *Micales J.A., Stipes R.J., Bonde M.R.* // Mycologia. 1987. V. 79. № 5. P. 707–720.
82. *Birch A.J., Butler D.N., Effenberger R., Rickards R.W., Simpson T.J.* // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1979. P. 807–815.
83. *Sardaryan E., Zihlova H., Strnad R., Cermakova Z.* // Pigments in Food, more than colours / Ed. L. Dufosse. Quimper, France: Universite de Bretagne Occidentale Publ., 2004. P. 207–208.
84. *Mapari S.A., Nielsen K.F., Larsen T.O., Frisvad J.C., Meyer A.S., Thrane U.* // Curr. Opin. Biotechnol. 2005. V. 16. № 2. P. 231–238.
85. *Mahmoodian A., Stickings C.E.* // Biochem. J. 1964. V. 92. № 4. P. 369–374.
86. *Marinho A.M.R., Rodrigues-Filho E., Moitinho M.L.R., Santos L.S.* // J. Brazil. Chem. Soc. 2005. V. 16. № 3. P. 280–283.
87. *Ueno Y., Sato N., Ito T., Ueno I., Enomoto M., Tsunoda H.* // J. Toxicol. Sci. 1980. V. 5. № 4. P. 295–302.
88. *Ueno Y., Habano W., Yamaguchi H., Masuda T., Morimura S., Nemoto K., Kojima S., Tashiro F.* // Food Chem. Toxicol. 1991. V. 29. № 9. P. 607–13.
89. *Rateb M.E., Ebel R.* // Natural Prod. Rep. 2011. V. 28. № 2. P. 290–344.
90. *Butinar L., Zalar P., Frisvad J.C., Grunde-Cimerman N.* // FEMS Microbiol. Ecol. 2005. V. 51. № 2. P. 155–166.
91. *Parameswaran P.S., Gawas D., Tilvi S., Naik C.G.* // National seminar on new frontiers in marine research. Proc. MBR 2004. New Delhi (India): National Institute of Ocean Technology, Chennai (India), 2004. P. 3–9.
92. *Du L., Zhu T., Liu H., Fang Y., Zhu W., Gu Q.* // J. Natural Prod. 2008. V. 71. № 7. P. 1837–1842.
93. *Trisuwan K., Khamthong N., Rukachaisirikul., Phongpaichit S., Preedanon S., Sakayaroj J.* // J. Natural Prod. 2010. V. 73. № 9. P. 1507–1511.
94. *Zheng C.-J., Shao C.-L., Guo Z.-Y., Chen J.-F., Deng D.-S., Yang K.-L., Chen Y.-Y., Fu X.-M., She Z.-G., Lin Y.-C., Wang C.-Y.* // J. Natural Prod. 2012. V. 75. № 2. P. 189–197.
95. *Brauers G., Edrada R.A., Ebel R., Proksch P., Wray V., Berg A., Grafe U., Schachtele C., Totzke F., Finkenzeller G., Marme D., Kraus J., Munchbach M., Michel M., Bringmann G., Schaumann K.* // J. Natural Prod. 2000. V. 63. № 6. P. 739–745.
96. *Кривошекова О.Е., Степаненко Л.С., Мищенко Н.П., Денисенко В.А., Максимов О.Б.* // Химия природ. соединений. 1983. Т. 2003. № 3. С. 283–289.
97. *Manojlović N.T., Novaković M., Stevović V., Solujić S.* // Pharmac. Biol. 2005. V. 43. № 8. P. 718–722.
98. *Manojlović N.T., Marković Z., Gritsanapan W., Boonpragob K.* // Russ. J. Phys. Chem. A. 2009. V. 83. № 9. P. 1554–1557.
99. *Guo B., Wang Y., Sun X., Tang K.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. V. 44. № 2. P. 153–158.
100. *Benitez T., Rincon A.M., Limon M.C., Codon A.C.* // Int. Microbiol. 2004. V. 7. № 4. P. 249–260.
101. *Mendoza L., Araya-Maturana R., Cardona W., Delgado-Castro T., García C., Lagos C., Cotoras M.* // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 26. P. 10080–10084.
102. *Gill M., Morgan P.M.* // ARKIVOC. 2001. V. 7. № 2. P. 145–156.
103. *Debbab A., Ebel R., Edrada-Ebel R.A., Wray V., Kubbutat M.H.G., Proksch P.* // Planta Medica. 2009. V. 75. № 9. P. 884–891.
104. *Debbab A., Aly A.H., Edrada-Ebel R., Wray V., Pretsch A., Pescitelli G., Kurtan T., Proksch P.* // Europ. J. Org. Chem. V. 2012. № 7. P. 1351–1359.
105. *Jayasuriya H., Koonchanok N.M., Geahlen R., McLaughlin J.L., Chang C.J.* // J. Natural Prod. 1992. V. 5. № 4. P. 696–698.
106. *Choi S.-G., Kim J., Sung N.-D., Son K.-H., Cheon H.-G., Kim K.-R., Kwon B.-M.* // Natur. Prod. Res.: Formerly Natur. Prod. Lett. 2007. V. 21. № 6. P. 487–493.
107. *Liu S.-Y., Lo C.-T., Shibu M.A., Leu Y.-L., Jen B.-Y., Peng K.-C.* // J. Agric. Food Chem. 2009. V. 57. № 16. P. 7288–7292.
108. *Lin Y.-R., Lo C.-T., Liu S.-Y., Peng K.-C.* // J. Agric. Food Chem. 2012. V. 60. № 9. P. 2123–2128.
109. *Coopoosamy R.M., Magwa M.L.* // Afr. J. Biotechnol. 2006. V. 5. № 16. P. 1508–1510.
110. *Tamkou J.D.D., Tala M.F., Wabo H.K., Kuate J.R., Tane P.* // J. Ethnopharmacol. 2009. V. 124. № 4. P. 571–575.
111. *Yagi A., Okamura N., Haraguchi H., Abo T., Hashimoto K.* // Phytochemistry. 1993. V. 33. № 1. P. 87–91.
112. *Beattie K.D., Rouf R., Gander L., May T.W., Ratkowsky D., Donner C.D., Gill M., Grice I.D., Tiralongo E.* // Phytochemistry. 2010. V. 71. № 8–9. P. 948–955.
113. *Anke H., Koltoum I., Zaehner H., Laatsch H.* // Arch. Microbiol. 1980. V. 126. № 3. P. 231–236.
114. *Sydiskis R.J., Owen D.G., Lohr J.L., Rosler K.-H.A., Blomster R.N.* // Antimicrob. Agents Chemother. 1991. V. 35. № 12. P. 2463–2466.
115. *Егоров Н.С., Колесников М.П., Ландау Н.С., Буюк Л.И.* // Докл. АН СССР. 1979. Т. 245. № 6. С. 1497–1500.
116. *Буюк Н.С., Ландау Н.С., Колесников М.П., Егоров Н.С.* // Микробиология. 1983. Т. 52. № 5. С. 750–754.
117. *Choi J.S., Chung H.Y., Jung H.A., Park H.J., Yokoza-wa T.* // J. Agric. Food Chem. 2000. V. 48. № 12. P. 6347–6351.
118. *Wakulinski W., Kachlicki P., Sobiczewski P., Schollenberger M., Zamorski Cz., Lotocka B., Sarova J.* // J. Pathol. 2003. V. 151. № 1. P. 74–79.
119. *Ueno I., Sekijima M., Hoshino M., Ohya-Nishiguchi H., Ueno Y.* // Free Radical Res. 1995. V. 23. № 1. P. 41–50.
120. *Heiser I., Hess M., Schmidtke K.-U., Vogler U., Miethbauer S., Liebermann B.* // Physiol. Mol. Plant Pathol. 2004. V. 64. № 3. P. 135–143.
121. *Miethbauer S., Heiser I., Liebermann B.* // J. Phytopathol. 2003. V. 151. № 11–12. P. 665–668.
122. *Arnone A., Nasini G., Camarda L., Assante A.* // Gazz. Chim. Ital. 1989. V. 119. № 1. P. 35–39.

123. Miethbauer S., Haase S., Schmidtke K.-U., Gunther W., Heiser I., Liebermann B. // *Phytochemistry*. 2006. V. 67. № 12. P. 1206–1213.
124. Haraguchi H., Abo T., Fukuda A., Okamura N., Yagi A. // *Phytochemistry*. 1996. V. 43. № 5. P. 989–992.
125. Li D.-L., Li X.-M., Wang B.-G. // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 19. № 7. P. 675–680.
126. Mori S., Sugihara Y., Kitagawa A., Nozawa Y., Ogihara Y. // *Mycotoxin Res.* 1996. V. 12. № 2. P. 91–98.
127. Bondy G.S., Armstrong C.L., Dawson B.A., Héroux-Metcalf C., Neville G.A., Rogers C.G. // *Toxicol. in Vitro*. 1994. V. 8. № 3. P. 329–335.
128. Mueller S.O., Stopper H., Dekant W. // *Drug Metab. Dispos.* 1998. V. 26. № 6. P. 540–554.
129. Westendorf J., Marquardt H., Poginsky B., Dominiak M., Schmidt J., Marquardt H. // *Mutat. Res.* 1990. V. 240. № 1. C. 1–12.
130. Butterworth B.E., Mathre O.B., Ballinger K.E., Adalsteinsson O. // *Int. J. Toxicol.* 2004. V. 23. № 5. P. 335–344.
131. Kawai K., Nozawa Y., Maebayashi Y., Yamazaki M., Hamasaki T. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1984. V. 47. № 3. P. 481–483.
132. Huang Q., Lu G.D., Shen H.M., Chung M.C.M., Ong C.N. // *Med. Res. Rev.* 2007. V. 27. № 5. P. 609–630.
133. Ghosh S., Sarma M.D., Patra A., Hazra B. // *J. Pharm. Pharmacol.* 2010. V. 62. № 9. P. 1158–1166.
134. Chun-Guang W.U., Jun-Qiang Y.I., Bei-Zhong L., Dan-Ting J., Chong W., Liang Z., Dan Z., Yan W. // *Eur. J. Pharmacol.* 2010. V. 627. № 1–3. P. 33–41.
135. Chiang J.H., Yang J.S., Ma C.Y., Yang H.Y., Huang H.Y., Hsia T.C., Kuo H.M., Wu P.P., Lee T.H., Chung J.G. // *Chem. Res. Toxicol.* 2011. V. 24. № 1. P. 20–29.
136. Kim S.J., Kim M.C., Lee B.J., Park D.H., Hong S.H., Um J.Y. // *Molecules*. 2010. V. 15. № 9. P. 6436–6451.
137. Jang D.S., Lee G.Y., Kim Y.S., Lee Y.M., Kim C.S., Yoo J.L., Kim J.S. // *Biol. Pharm. Bull.* 2007. V. 30. P. 2201–2210.
138. He Z.H., He M.F., Ma S.C., But P.P.H. // *J. Ethnopharmacol.* 2009. V. 121. № 2. P. 313–317.
139. Wu Y., Tu X., Xia H., Huang H., Wan J., Cheng Z., Liu M., Chen G., Zhang H., Fu J., Liu Q., Liu D.X. // *Life Sci.* 2007. V. 81. № 17–18. P. 1332–1338.
140. Liu T., Jin H., Sun Q.R., Xu J.H., Hu H.T. // *Brain Res.* 2010. V. 1347. № 1. P. 149–160.
141. Zhao Y.L., Wang J.B., Zhou G.D., Shan L.M., Xiao X.H. // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2009. V. 104. № 5. P. 463–469.
142. Krivobok S., Seigle-Murandi F., Steiman R., Manin D.R., Betina V. // *Mutat. Res.* 1992. V. 279. № 1. P. 1–8.
143. Kwak H.-H., Park M.-J., Park C.-M., Moon S.-I., Yoo D.-H., Lee H.-C., Lee S.-H., Kim M.-S., Lee H.-W., Shin W.-S., Rark I.-C., Rhee C.H., Hong S.-I. // *Internat. J. Cancer*. 2006. V. 118. № 11. P. 2711–2720.
144. Awasthi P., Dogra S., Awasthi L.K., Barthwal R. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2011. V. 696. № 3. P. 385–400.
145. Yang X.-M., Li J.-S., Li Q.-Q., Yan L.-J. // *Asian J. Chem.* 2011. V. 23. № 8. P. 3631–3634.
146. Balintová J., Pohl R., Horáková P., Vidláková P., Havran L., Fojta M., Hocek M. // *Chem. Europ. J.* 2011. V. 17. № 50. P. 14063–14073.
147. Giles G.I., Sharma R.P. // *J. Peptide Sci.* 2005. V. 11. № 7. P. 417–423.

Fungal Anthraquinones (Review)

N. N. Gessler^a, A. S. Egorova^a, and T. A. Belozerskaya^{a, b}

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

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

e-mail: tabinbi@mail.ru

Received May 17, 2012

Abstract—The review is devoted to the characteristics of anthraquinones—a group of pigments of quinoid nature often found in fungi. The distribution of anthraquinones in fungi, the routes of their biosynthesis, and their biological activity are considered.

УДК 616.006

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ПОЛИАМИНОВ С ПОМОЩЬЮ БИОТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ БЫСТРО ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. К. В. Лисицкая*, Н. А. Сокуева**, Ю. Г. Мальшева***, А. В. Иванов*, С. С. Шишкин*, С. П. Сяткин***

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

**Technoinfo Ltd., Москва, 121248

***Российский университет дружбы народов, Москва, 117198

Поступила в редакцию 17.05.2012 г.

На основе быстро пролиферирующих культивируемых клеток человека (линии LNCaP и PC-3) разработана новая биотест-система, с помощью которой охарактеризованы два известных синтетических полиамина — α -дифторметилорнитин (ДФМО) и метилглиоксальбис(гуанилгидразон) (МГБГ), а также 4 новых синтетических аналога — дифенил-содержащие амины (ДФСА-1–ДФСА-4) с молекулярными массами (Да): ДФСА-1 – 725.5; ДФСА-2 – 755.5; ДФСА-3 – 655.5; ДФСА-4 – 681.5. В этой биотест-системе ДФМО (0.1–400 мкМ) не проявил функциональной активности, тогда как у МГБГ был зарегистрирован цитостатический эффект (100–200 мкМ). ДФСА-1, -2 и -4 оказывали подобный эффект при концентрациях 10 мкМ и выше, а ДФСА-3 — при концентрации 50 мкМ и выше. При этом ДФСА-1 с наибольшим антипролиферативным действием представляется особенно перспективным цитостатическим агентом.

DOI: 10.7868/S0555109913020086

Природные полиамины и их синтетические аналоги известны как биологически активные вещества, способные оказывать существенное влияние на рост и развитие самых разных организмов, регулируя пролиферацию прокариотических и эукариотических клеток, причем последние могут принадлежать как растениям, так и животным [1–4]. Установлено, что полиамины вовлечены в целый ряд внутриклеточных процессов, например в обеспечение стресс-устойчивости у растений и апоптоза у животных [2, 4, 5]. При этом некоторые полиамины нарушают функционирование клеточных геномов на разных уровнях, в частности, достаточно специфично изменяют экспрессию определенных генов и влияют на активность ферментов [2, 4, 6]. Естественно, большой интерес вызывают вопросы, связанные с изучением роли полиаминов в регуляции молекулярных механизмов регуляции клеточной пролиферации у человека и возможности целенаправленного влияния на эти процессы синтетическими аналогами полиаминов [1, 5, 6].

Цель исследования — разработка биотест-системы на основе быстро пролиферирующих культивируемых клеток человека и определение с ее помощью функциональной активности двух известных и четырех новых синтетических аналогов полиаминов.

МЕТОДИКА

В работе исследовали следующие синтетические препараты полиаминов: ДФМО (α -дифторметилорнитин, ММ 183 Да) и МГБГ (метилглиоксальбис (гуанилгидразон), ММ 184 Да), а также 4 новых соединения — дифенил-содержащие амины (ДФСА-1–ДФСА-4) с молекулярными массами (Да): ДФСА-1 – 725.5; ДФСА-2 – 755.5; ДФСА-3 – 655.5; ДФСА-4 – 681.5 (рис. 1). Все препараты синтетических аналогов полиаминов были получены от Е.В. Неборак и проф. С.П. Сяткина (Медицинский факультет РУДН, кафедра биохимии, г. Москва). Кроме того, в качестве стандартного цитостатика использовали четырежды перекристаллизованный акриламид фирмы “Sigma” (США).

Для создания биотест-системы использовали две линии культивируемых и быстро пролиферирующих клеток человека — LNCaP и PC-3. Образец линии LNCaP был получен от д.б.н. И.Г. Шемякина (ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболенск), а клетки линий PC-3 (№ ACC 465) закуплены в German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Германия). Для наращивания необходимой биомассы клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), а также гентамицина и пирувата натрия

(“Панэко”, Россия) и (“Biowest”, Франция), в пластиковых матрасах (“Costar”, США и “Nunc”, Дания) с использованием CO₂-инкубатора (“Sanyo”, Япония). Манипуляции, требующие стерильных условий, выполняли в ламинарном шкафу второго класса защиты (“Jouan”, Франция). При проведении пересевов клеток и для получения клеточной суспензии в качестве диссоциирующих агентов использовались растворы Версена и трипсина (“Панэко”, Россия).

Клеточные панели для тестирования функциональной активности изготавливали, осуществляя посев клеточной суспензии на 96-лучночные планшеты (“Nunc”, Дания) при посевной дозе 5×10^4 кл. в лунке. Клетки инкубировали в течение 24 ч для обеспечения их прикрепления к поверхности пластика. Однородность клеточных культур в каждой лунке анализировали после окрашивания красителями DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндолил) и йодистым пропидием с помощью цитофлуориметра CellReporter™ (“Genetix/Molecular Devices”, Англия).

Для определения функциональной активности синтетических аналогов полиаминов готовили растворы препаратов с концентрацией 40 мМ на 0.5% растворе диметилсульфоксида (ДМСО) и стерилизовали их в условиях культурального бокса с использованием фильтров с диаметром пор 0.22 мкм. После стерилизации эти растворы добавляли к среде RPMI-1640, содержащей 5% ЭТС, создавая из них набор культуральных сред с концентрациями исследуемого соединения от 0.1 до 400 мкМ. Далее на 2 сут культивирования удаляли из лунок обычную культуральную среду (RPMI-1640, с 5% ЭТС) и добавляли в них по 100 мкл сред с возрастающими концентрациями полиаминов, приготовленных как описано выше. При этом, как минимум, в трех лунках дублировалась каждая изучаемая концентрация исследуемого полиамина. Затем созданная клеточная панель культивировалась в течение 24, 48 или 96 ч, после чего количественное определение пролиферативной активности клеток в лунках выполняли с помощью наборов WST-1 (“Millipore”, США) по прописям фирмы-изготовителя. Для каждой изучаемой концентрации исследуемого полиамина определяли среднее значение оптической плотности и стандартные отклонения. Контрольными показателями были результаты измерений в лунках, где культивировались клетки в среде с 5% ЭТС и 0.5% ДМСО без добавления полиаминов. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов программы Microsoft Office Excel 2007. Для выявления цитотоксического действия полиаминов также проводили микрофотографирование клеток при помощи микроскопа Биолам П2-1 (“Ломо”, Россия) с фотонасадкой.

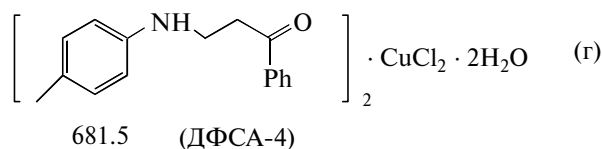
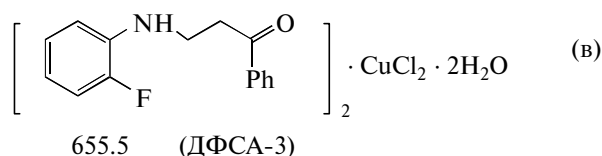
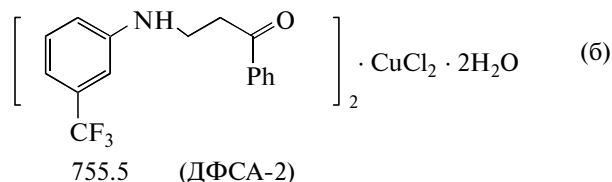
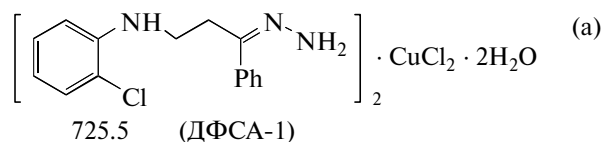


Рис. 1. Химические формулы изучавшихся дифенил-содержащих аминов ДФСА-1 (а), ДФСА-2 (б), ДФСА-3 (в), ДФСА-4 (г). Символом Ph в формулах обозначен второй фенильный радикал.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки линий LNCaP и PC-3, выведенные из метастазов рака простаты, к настоящему времени хорошо охарактеризованы [7] и по имеющимся данным способны *in vitro* активно пролиферировать с образованием монослоя на поверхности культурального пластика, отвечая изменениями пролиферативной активности при различных воздействиях, влияющих на обмен полиаминов [8, 9]. Принимая во внимание указанные свойства клеточных линий LNCaP и PC-3, их использовали при формировании биотест-системы, предназначенной для определения функциональной активности синтетических аналогов полиаминов. Чтобы обеспечить возможность количественного определения изменений пролиферативной активности клеток, в системе применили тест-наборы WST-1, поскольку они основываются на способности митохондриальных ферментов в живых клетках превращать соли тетразолия в формазан с изменением спектра поглощения. Как следствие, результат определения в каждой пробе концентрации формазана (которую измеряют спектрофотометрически с использованием планшетного

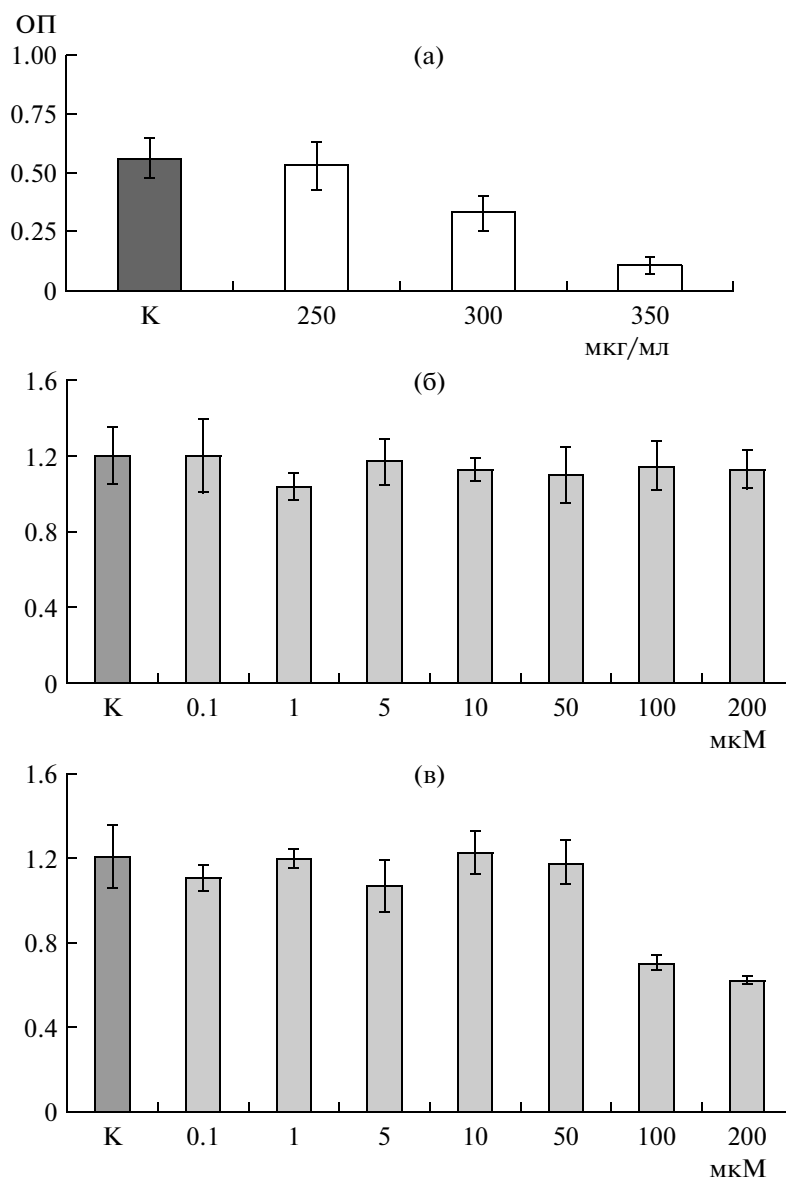


Рис. 2. Биологическое действие акриламида (24 ч) и препаратов полиаминов (48 ч) на культивируемые клетки рака простаты; а – акриламид (мкг/мл), б – ДФМО (мкМ), в – МГБГ (мкМ).

ридера при длине волны 450 нм) коррелирует с количеством метаболически активных клеток, отражающем достигнутый уровень пролиферативной активности. При этом протокол применения наборов WST-1 не включает проведение отмывки и фиксации клеток, что является особенно важным для быстро пролиферирующих клеточных линий, поскольку их клетки обычно слабо прикреплены к поверхности планшета и могут частично смываться с пластика при отмывках.

Работоспособность сформированной биотест-системы была изучена при воздействиях акриламида (маркерного амина, обладающего цитотоксическим действием) и двух известных синтетических полиаминов ДФМО и МГБГ (рис. 2). В ре-

зультате на выбранных клеточных культурах при сравнительно короткой экспозиции (24 ч) регистрировался характерный цитотоксический эффект акриламида (подтвержденный результатами микроскопии). При этом ДМФО (при концентрациях от 0.1 до 200 мкМ) даже за 96 ч не оказал влияния на пролиферативную активность, а у МГБГ за то же время наблюдалось дозозависимое ингибирование клеточного роста при концентрациях 100–200 мкМ.

Однородность клеточных культур в каждой лунке анализировали после окрашивания красителями DAPI и йодистого пропидия с помощью цитофлуориметра CellReporter™ (“Genetix/Molecular Devices”, Англия). Полученные результаты

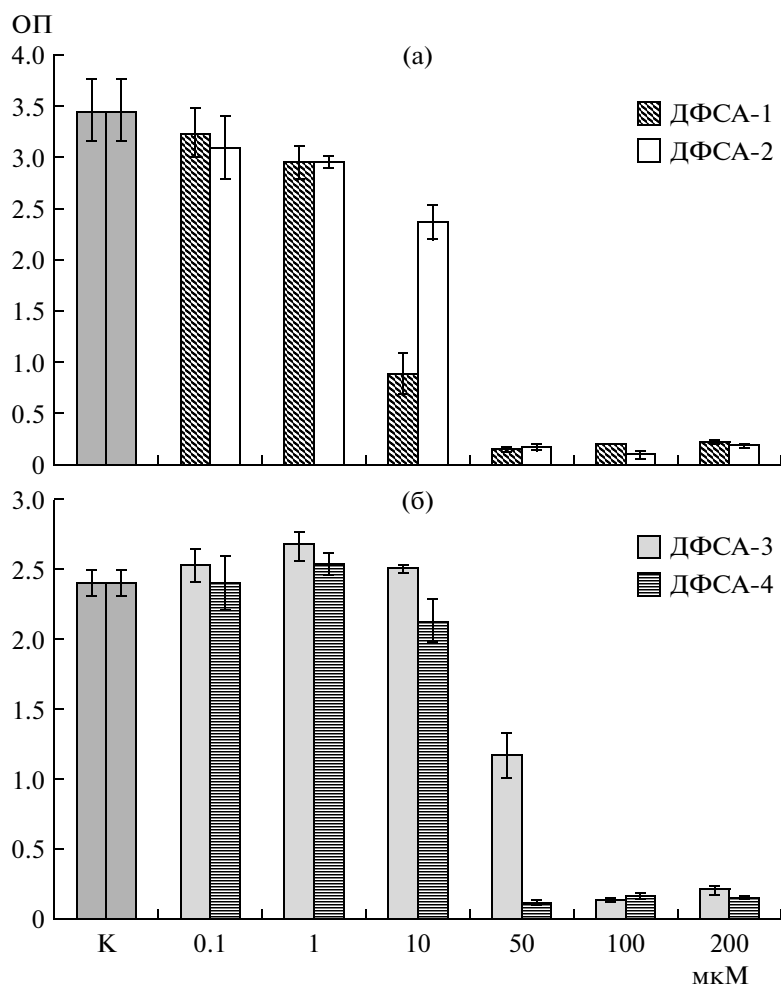


Рис. 4. Биологическое действие препаратов (мкМ) ДФСА-1 и ДФСА-2 (а), ДФСА-3 и ДФСА-4 (б) на культивируемые клетки рака простаты.

показали, что в лунках сформированной панели для тестирования клетки находятся в состоянии, близком к монослою (рис. 3а), и по своим размерам клетки достаточно однородны, поскольку кривая, характеризующая их распределение по размерам, практически соответствовала Гауссовскому распределению (рис. 3б). При этом количественный анализ соотношения живых и умерших клеток в контрольных лунках (ряды 2 и 3 по вертикали) и в лунках с добавлением ДФМО (ряды 8–11) показал отсутствие значимых различий (рис. 3в). В то же время МГБГ вызывал явное дозозависимое увеличение доли умерших клеток при концентрациях 100 и 200 мкМ этого полиамина в пробах (в рядах 4–7 лунки F и G).

В целом, из полученных результатов следовало, что сформированная биотест-система пригодна для определения функциональной активности синтетических полиаминов и с использованием наборов WST-1, и с помощью цитофлуориметра CellReporter™. Как следствие, данная система была

применена для изучения свойств 4 новых синтетических аналогов полиаминов (ДФСА-1–ДФСА-4), которые были синтезированы на кафедре биохимии РУДН.

Все указанные соединения ингибировали клеточную пролиферацию: препараты ДФСА-1, ДФСА-2 и ДФСА-4 оказывали ингибирующий эффект при концентрациях 10 мкМ и выше, а препарат ДФСА-3 при концентрации 50 мкМ и выше (рис. 4). При этом препараты ДФСА-3 и ДФСА-4 при малых концентрациях (в частности, 1 мкМ) проявляли незначительное стимулирующее влияние на клеточную пролиферацию (~5–10%).

Поскольку, (как видно из рис. 1) в молекулах ДФСА-1–ДФСА-4 присутствует хлорид меди, то можно было предположить, что выявленное цитотоксическое действие обусловлено ионами меди. Однако по имеющимся данным, хлорид меди проявлял цитотоксический (и цитостатический) эффект на культурах клеток млекопитающих (вклю-

чая человека) при концентрациях выше 500 мкМ, а при концентрациях ниже 500 мкМ такого эффекта не наблюдалось [10]. Следовательно, цитостатический эффект, зарегистрированный в наших экспериментах у соединенийДФСА-1–ДФСА-4 при концентрациях на порядок меньших, не связан с присутствующим хлоридом меди.

Можно сделать заключение о том, что сформированная биотест-система обеспечила экспресс-анализ нескольких синтетических аналогов полиаминов. Среди них у препаратаДФСА-1 было выявлено наибольшее антипролиферативное действие, которое позволяет рассматривать это соединение как наиболее перспективный цитостатический агент.

Работа была поддержана Государственным контрактом № 14.740.11.0762.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wallace H.M., Niiranen K. // *Amino Acids*. 2007. V. 33. № 2. P. 261–265.
2. Huang Y., Marton L.J., Woster P.M., Casero R.A. // *Essays Biochem.* 2009. V. 4. № 46. P. 95–110.
3. Carmo A.M., Silva F.M., Machado P.A., Fontes A.P., Pavan F.R., Leite C.Q., Leite S.R., Coimbra E.S., Da Silva A.D. // *Biomed. Pharmacother.* 2011. V. 65. № 3. P. 204–209.
4. Marco F., Alcazar R., Tiburcio A.F., Carrasco P. // *OMICS*. 201. V. 15. № 11. P. 775–781.
5. Minois N., Carmona-Gutierrez D., Madeo F. // *Aging (Albany N.Y.)*. 2011. V. 3. № 8. P. 716–732.
6. Wu Y., Steinbergs N., Murray-Stewart T., Marton L.J., Casero R.A. // *Biochem. J.* 2012. V. 442. № 3. P. 693–701.
7. Cooper C.R., Chay C.H., Gendernalik J.D., Lee H.L., Bhatia J., Taichman R.S., McCauley L.K., Keller E.T., Pienta K.J. // *Cancer*. 2003. V. 97 (Suppl. 3). P. 739–747.
8. Kramer D.L., Diegelman P., Jell J., Vujcic S., Merali S., Porter C.W. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 7. P. 4241–4251.
9. Burns M.R., Graminski G.F., Weeks R.S., Chen Y., O'Brien T.G. // *J. Med. Chem.* 2009. V. 52. № 7. P. 1983–1993.
10. Masuda A., Eguchi G. // *Cell Struct. Funct.* 1984. V. 9. № 1. P. 25–35.

Identification of the Functional Activity of Synthetic Polyamine Analogues Using a Biotest System Based on Highly Proliferating Cultured Human Cells

K. V. Lisitskaya^a, N. A. Sokueva^b, Yu. G. Malysheva^c, A. V. Ivanov^a,
S. S. Shishkin^a, and S. P. Syatkin^c

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

e-mail: lisksenia@mail.ru

^b *Technoinfo Ltd., Moscow, 121248 Russia*

^c *Peoples' Friendship University, Moscow, 117198 Russia*

Received May 17, 2012

Abstract—A new biotest system was developed based on highly proliferating human cell cultures (lines LNCaP and PC-3). With the help of this system, two known synthetic polyamines— α -difluoromethylornithine (DFMO) and methylglyoxalbis(guanylhydrazon) (MGBG)—as well as four new synthetic analogues difenylcontaining amines (DFCA-1–DFCA-4) with molecular weights of 725.5 (DFCA-1), 755.5 (DFCA-2), 655.5 (DFCA-3), and 681.5 Da (DFCA-4) were tested. In this biotest system, DFMO (0.1–400 μ M) did not reveal functional activity, whereas for MGBG a cytotoxic effect was registered (100–200 μ M). DFCA-1, DFCA-2, and DFCA-4 had a similar effect at concentrations of 10 μ M and higher; DFCA-3, at a concentration of 50 μ M and higher. Thus, DFCA-1 has a higher level of antiproliferating activity and may be considered as the most potent cytostatic agent.

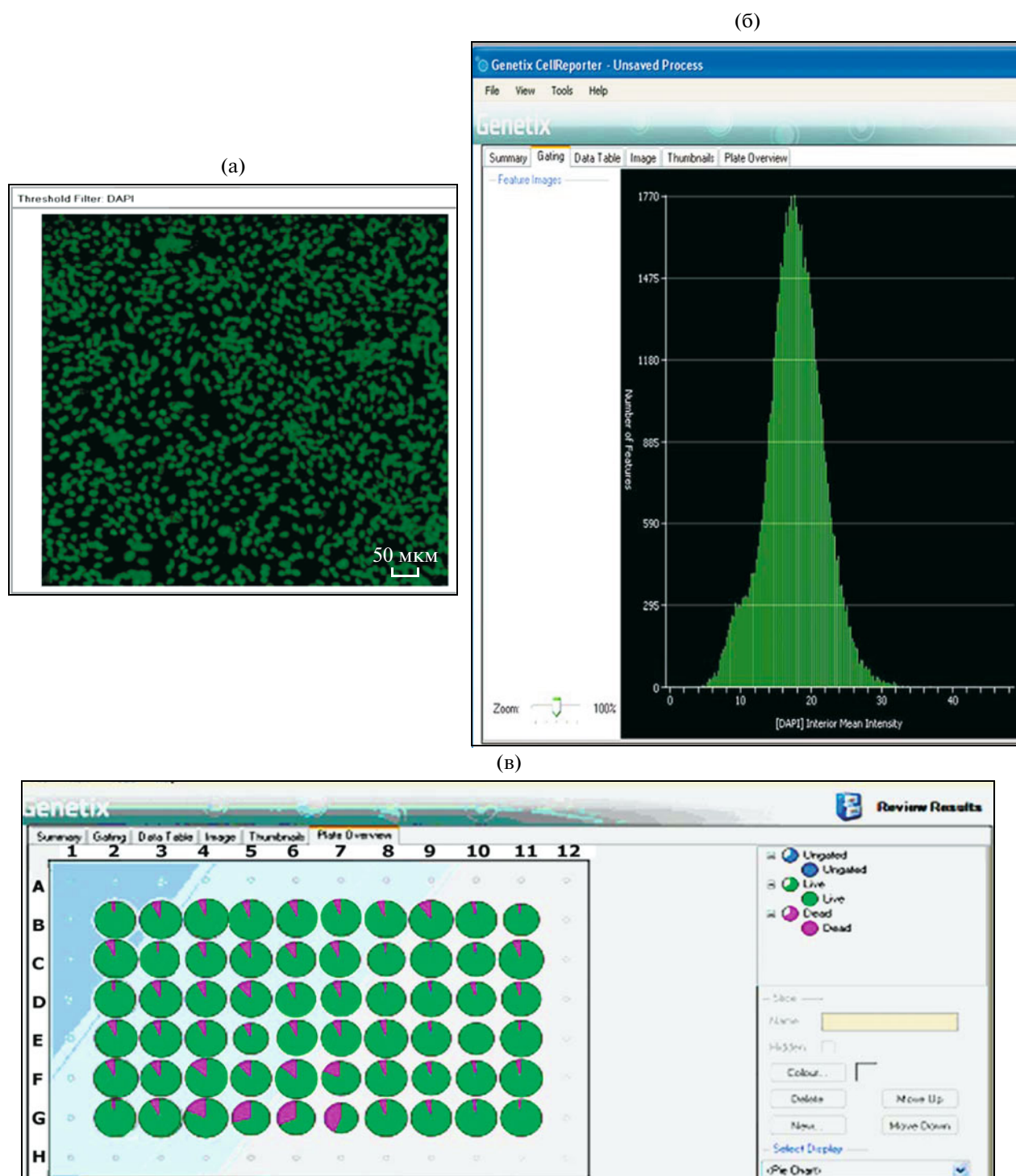


Рис. 3. Результаты автоматического анализа биологических эффектов ДФМО и МГБГ с помощью цитофлуориметра CellReporter™ (“Genetix/Molecular Devices”, Англия): (а) – монослой клеток (фото), окрашенных красителем DAPI, при флуоресцентном сканировании после возбуждения флуоресценции при длине волны 358 нм и регистрации испускания при 461 нм; (б) – кривая распределения клеток по средней интенсивности свечения; (в) – схематическое изображение процентного соотношения живых (зеленое окрашивание) и мертвых (розовое окрашивание) клеток в соответствующих лунках.

УДК 577.152.2

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ *Erwinia carotovora*, ТРАНСАМИНИРУЮЩИХ ФЕНИЛПИРУВАТ

© 2013 г. А. М. Палоян, Л. А. Степанян, С. А. Дадаян, А. А. Амбарцумян, Г. П. Алебян, А. С. Сагиян

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА, Ереван 0056, Армения

e-mail: anipaloyan@yahoo.com, armbiotech@gmail.com

Поступила в редакцию 7.08.2012 г.

Рассчитаны K_m для L-фенилаланина, L-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты и соответствующих кетокилот, а также V_{max} для пар субстратов: L-фенилаланин – 2-кетоглутарат, L-фенилаланин – оксалоацетат, L-глутаминовая кислота – фенилпируват и L-аспарагиновая кислота – фенилпируват для аминотрансфераз PAT1, PAT2 и PAT3 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ИНМИА № 8724, катализирующих переаминирование фенилпирувата. Аминотрансфераза PAT3 ингибировалась 2-кетоглутаратом ($K_s = 10.23 \pm 3.20$ мМ) и оксалоацетатом ($K_s = 3.73 \pm 1.99$ мМ). Конкурентным ингибитором PAT1 являлся L-β-(N-бензиламино)аланин при использовании в качестве субстрата L-фенилаланина ($K_i = 0.32 \pm 0.07$ мМ, $K_m = 0.45 \pm 0.1$ мМ, $V_{max} = 11.6 \pm 0.4$ ед./мг) при концентрации 2-кетоглутарата в реакционной среде 25 мМ. L-β-(N-метиламино)аланин – бесконкурентный ингибитор для PAT3 при той же паре субстратов ($K_i = 138.4 \pm 95.4$ мМ, $K_m = 13.7 \pm 3.9$ мМ, $V_{max} = 18.6 \pm 4.1$ ед./мг) и концентрации 2-кетоглутарата 2 мМ в реакционной среде.

Исследованы L-стереоизомеры некоторых небелковых аналогов ароматических аминокислот в качестве субстратов для PAT1, PAT2 и PAT3.

DOI: 10.7868/S055510991302013X

С тех пор, как в 1937 г. А.Е. Браунштейн и М.Г. Крицман [1] открыли реакцию трансаминирования, выделено, очищено и изучено множество аминотрансфераз. Аминотрансферазы – пиридоксальфосфат-зависимые ферменты [КФ 2.6.1] и катализируют обратимую реакцию трансаминирования, в которой происходит перенос альфа-аминогруппы с аминокислоты на 2-кетокислоту с образованием кетокислоты и аминокислоты по механизму пинг-понг-би-би.

Исследуемые в данной работе аспартат- и ароматические аминотрансферазы, хорошо изучены у *Escherichia coli* [2–5], *Bacillus subtilis* [6, 7], *Bacillus* sp. [8], коринеформных бактерий [9, 10], представителей рода *Pseudomonas* [11, 12], *Klebsiella aerogenes* [13], актиномицета *Amuocolatopsis methanolica* [14], лактококка *Lactococcus lactis* [15], архебактерий [16], гипертермофильных архебактерий *Thermococcus litoralis* [17], *Pyrococcus horikoshii* [18] и *Pyrococcus furiosus* [19].

Реакции, катализируемые аминотрансферазами, участвуют в биосинтезе различных аминокислот у многих микроорганизмов и вызывают повышенный интерес исследователей возможностью осуществления аналогичных процессов в прикладных целях для синтеза ароматических аминокислот из их синтетических предшественников. Практический интерес представляет способ получения L-фенилаланина. Реакция может осуществ-

ляться как в живых клетках микроорганизмов, так и иммобилизованными клетками и ферментами аспартат и/или ароматическими аминотрансферазами [20–22].

Ранее нами был разработан способ получения L-фенилаланина из фенилпируватной кислоты с применением аминотрансфераз *Erwinia carotovora* [23]. Также нами были выделены, очищены и охарактеризованы ферменты *E. carotovora*, трансаминирующие фенилпируват [24].

Цель работы – изучение каталитических свойств и субстратной специфичности ферментов *E. carotovora*, трансаминирующих фенилпируват.

МЕТОДИКА

В работе были использованы аминотрансферазы PAT1 (phenylalanine transaminase 1), PAT2 и PAT3 *E. carotovora* способ выделения и очистки которых описан [24]. В работе было выдвинуто предположение, что PAT1 и PAT2 являются ароматическими аминотрансферазами а PAT3 – аспартат-аминотрансферазой.

Все кинетические исследования проводились в реакционной среде объемом 200 мкл, содержащей: аминокислоты и кетокислоты, (концентрации указаны ниже), 0.05 мМ пиридоксальфосфат (ПДФ), 0.1 М трис-НСl буфер, рН 8.5, и ферментный препарат в необходимом количестве. Скоро-

сти реакций определяли по накоплению продуктов-кетокислот – фенилпирувата, 2-кетоглутарата или оксалоацетата. Концентрацию фенилпирувата определяли, измеряя оптическое поглощение в присутствии 1.0 М NaOH ($\epsilon_{320} = 17\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) [3]. Концентрацию 2-кетоглутарата и оксалоацетата рассчитывали по окислению НАДН ($\epsilon_{320} = 6220\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) в присутствии глутаматдегидрогеназы или малатдегидрогеназы соответственно. Концентрацию белка определяли методом Гровса и Дейвиса [25].

Для реакций с обычным механизмом пинг-понг би-би значения кажущихся констант Михаэлиса – K_{m1} и K_{m2} и максимальной скорости реакции – V_{max} определяли из уравнения (1) [26], измеряя активности ферментов в реакционной среде с 16 сочетаниями концентраций аминокислоты (1.0, 2.5, 3.75, 10.0 мМ) и кетокислоты (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 мМ). Кинетические параметры реакций аминотрансфераз РАТ1, РАТ2 и РАТ3 исследовали для пар субстратов: L-фенилаланин – оксалоацетат, L-фенилаланин – 2-кетоглутарат, L-аспарагиновая кислота – фенилпируват и L-глутаминовая кислота – фенилпируват, за исключением реакций, катализируемых РАТ3, в которых наблюдалось субстратное ингибирование (пары субстратов L-фенилаланин – оксалоацетат, L-фенилаланин – 2-кетоглутарат).

$$v = \frac{V_{max}S_1S_2}{K_{m1}S_1 + K_{m2}S_2 + S_1S_2} \quad (1)$$

Где: v – скорость реакции, S_1 и S_2 – концентрации аминокислоты и кетокислоты, соответственно, K_{m1} и K_{m2} – константы Михаэлиса для аминокислоты и кетокислоты, соответственно.

В случаях субстратного ингибирования (ингибирование РАТ3 2-кетоглутаратом и оксалоацетатом) K_m для фенилаланина определяли из простого уравнения Михаэлиса–Ментен при концентрациях L-фенилаланина – 1.0; 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 40.0 и 50.0 мМ и максимальной неингибирующей концентрации кетокислоты (2-кетоглутарат – 2.0 и оксалоацетат – 2.0 мМ). При субстратном ингибировании K_m и K_s (коэффициент субстратного ингибирования) для кетокислот определяли из уравнения (2) [26] при концентрациях кетокислот – 0.25, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, и 12.5 мМ и концентрации L-фенилаланина – 50.0 мМ.

$$v = \frac{SV_{max}}{K_m + S + \frac{S^2}{K_s}} \quad (2)$$

Для выявления ингибирующего действия L-β-(N-бензиламино)аланина и L-β-(N-метиламино)аланина активность ферментов измеряли при наличии в реакционной среде 10 мМ L-фенилала-

нина, 5.0 мМ 2-кетоглутарата и 5.0 мМ тестируемой небелковой аминокислоты при рН 8.5.

При изучении механизма ингибирования РАТ1 L-β-(N-бензиламино)аланином K_m , K_I и V_{max} определяли из уравнения конкурентного ингибирования (3) [26], измеряя активность фермента при сочетании 16 различных концентраций L-фенилаланина (1.0, 2.5, 3.75, 10.0 мМ) и L-β-(N-бензиламино)аланина (0, 0.625, 2.5, 6.25 мМ) при наличии в реакционной среде 10 мМ 2-кетоглутарата.

$$v = \frac{V_{max}}{K_m + \frac{K_m I}{K_I} + S} \quad (3)$$

При изучении механизма ингибирования РАТ3 L-β-(N-метиламино)аланином K_m , K_I и V_{max} определяли из уравнения бесконкурентного ингибирования (4) [26], выведенного нами по алгоритму, описанному у Кинга и Альтмана [27], измеряя активность фермента при 16 различных сочетаниях концентраций L-фенилаланина (8.0, 20.0, 30.0, 80.0 мМ) и L-β-(N-метиламино)аланина (0, 2.5, 10.0, 25.0 мМ) при наличии в реакционной среде 2.0 мМ 2-кетоглутарата.

$$v = \frac{V_{max}S}{K_m + S + \frac{SI}{K_I}} \quad (4)$$

Во всех приведенных выше кинетических исследованиях полученные результаты анализировали графически для выявления механизмов реакций [26]. Далее значения соответствующих кинетических параметров и их стандартные ошибки рассчитывали методом многомерного линейного регрессионного анализа с использованием разработанных нами программ на языке Gauss 4.0.

Субстратную специфичность РАТ1, РАТ2 и РАТ3 *E. carotovora* при использовании в качестве субстратов вновь синтезированных небелковых аминокислот определяли при концентрации доноров аминокислот 25.0 мМ, а в качестве акцептора аминокислот использовали 25.0 мМ 2-кетоглутаровую кислоту (2.0 мМ для РАТ3). Активность ферментов определяли по скорости накопления L-глутаминовой кислоты. Концентрацию L-глутаминовой кислоты определяли качественно – методом тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинках “Silufol” (Чехия) [28] и количественно – с помощью глутаматдегидрогеназы по восстановлению НАД в трис-гидразиновом буфере.

В работе использовали следующие материалы и реактивы: трис, ПЛФ, НАДН, НАД, глутаматдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, 2-кетоглутаровая кислота и оксалоацетат фирмы “Serva” (Германия); L-β-(2-Br-фенил)аланин, L-β-(4-Br-фенил)аланин, L-α-метил-β-(2-Br-фенил)аланин, L-β-гидрокси-β-(3-Br-2-метоксифенил)аланин, L-α-метил-

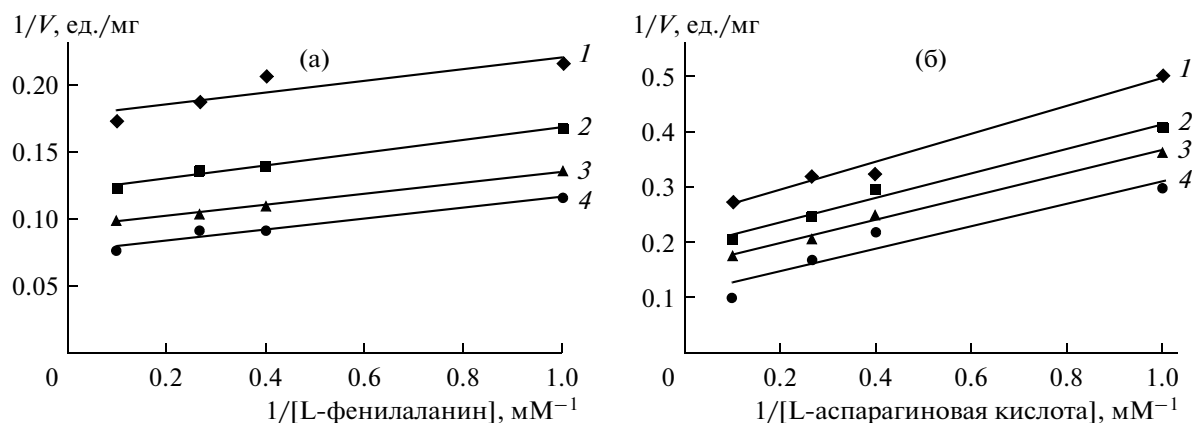


Рис. 1. Зависимость скорости реакции от концентраций субстратов аминотрансферазы *E. carotovora* в координатах Лайнуивера–Берка. а – концентрации оксалоацетата: 1 – 0.5, 2 – 1.0, 3 – 2.0, 4 – 5.0 мМ; б – концентрации фенилпирувата: 1 – 0.5, 2 – 1.0, 3 – 2.0, 4 – 5.0 мМ.

фенилаланин, L-β-(2-F-фенил)аланин, L-β-(4-F-фенил)аланин, L-α-F-фенилаланин, L-O-бензил-тирозин, L-β-(N-бензиламино)аланин, L-β-(N-метиламино)аланин, L-O-бензил-α-метил-тирозин, L-(2-F)-триптофан синтезированы в НПЦ “Армбиотехнология”, остальные реактивы произведены в странах СНГ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен анализ кинетических параметров (K_m , V_{max}) аминотрансфераз РАТ1, РАТ2 и РАТ3 *E. carotovora* [25], участвующих в переаминировании фенилпирувата. Реакции переаминирования исследовались для пар субстратов: L-фенилаланин – 2-кетоглутарат, L-фенилаланин – оксалоацетат, L-аспарагиновая кислота – фенилпируват и L-глутаминовая кислота – фенилпируват. Для РАТ1 и РАТ2 зависимость скоростей реакций от концентрации варьируемого субстрата при постоянном значении косубстрата в координатах Лайнуивера–Берка представлены параллельными прямыми линиями для различных значений косубстрата, что указывает на протекание реакции по механизму типа пинг-понг би-би, как и в случае других аминотрансфераз [29, 30]. Типичные результаты для аминотрансферазы РАТ1 в случае пар субстратов L-фенилаланин – оксалоацетат и L-аспарагиновая кислота – фенилпируват представлены на рис. 1.

Значения K_m и V_{max} для аминотрансфераз РАТ1 и РАТ2, рассчитанные многомерным линейным регрессионным анализом с применением программного пакета Gauss 4.0, приведены в табл. 1 и 2 соответственно.

При исследовании стационарной кинетики аминотрансферазы РАТ3 *E. carotovora* для пар субстратов L-аспарагиновая кислота – фенилпируват и L-глутаминовая кислота – фенилпируват также наблюдался механизм реакции типа пинг-понг-би-би, свойственный аминотрансферазам. Для этих пар субстратов параметры стационарной кинетики рассчитывали аналогично вышеприведенным результатам (табл. 3). Однако в случае пар субстратов L-фенилаланин – 2-кетоглутарат и L-фенилаланин – оксалоацетат наблюдалось субстратное ингибирование фермента соответствующими кетокислотами. Результаты исследований ингибирования РАТ3 представлены на рис. 2 и в табл. 3.

Различия в значениях V_{max} для аминотрансферазы РАТ3 в реакциях дезаминирования L-фенилаланина (табл. 3) объясняются тем, что расчет V_{max} при лимитирующих концентрациях кетокислоты дает пониженные значения исследуемого параметра, тогда как расчет V_{max} из уравнения субстратного ингибирования при насыщающих концентрациях аминокислоты является истинным зна-

Таблица 1. K_m и V_{max} для некоторых пар субстратов аминотрансферазы РАТ1 *E. carotovora*

Аминокислота	Кетокислота	K_m аминокислоты, мМ	K_m кето-кислоты, мМ	V_{max} , ед./мг
L-фенилаланин	2-кетоглутарат	1.15 ± 0.27	2.84 ± 0.43	12.21 ± 1.27
L-фенилаланин	Оксалоацетат	0.71 ± 0.08	0.83 ± 0.08	15.06 ± 0.66
L-глутаминовая кислота	Фенилпируват	3.07 ± 1.33	0.75 ± 0.44	12.69 ± 3.60
L-аспарагиновая кислота	Фенилпируват	4.34 ± 0.95	1.25 ± 0.33	15.10 ± 2.37

Таблица 2. K_m и V_{max} для некоторых пар субстратов аминотрансферазы PAT2 *E. carotovora*

Аминокислота	Кетокислота	K_m аминокислоты, мМ	K_m кетокислоты, мМ	V_{max} , ед./мг
L-фенилаланин	2-кетоглутарат	1.34 ± 0.44	1.31 ± 0.37	4.05 ± 0.67
L-фенилаланин	Оксалоацетат	0.53 ± 0.07	0.50 ± 0.06	8.34 ± 0.39
L-глутаминовая кислота	Фенилпируват	3.56 ± 0.71	0.97 ± 0.28	5.93 ± 0.85
L-аспарагиновая кислота	Фенилпируват	1.85 ± 0.50	0.56 ± 0.22	6.29 ± 1.01

Таблица 3. Параметры стационарной кинетики для некоторых пар субстратов аминотрансферазы PAT3 *E. carotovora*

Аминокислота	Кетокислота	K_m аминокислоты, мМ	K_m кетокислоты, мМ	K_S кетокислоты, мМ	V_{max} , ед./мг	V_{max} , ед./мг
L-фенилаланин	2-кетоглутарат	$11.72 \pm 2.74^*$	$0.42 \pm 0.18^{**}$	$10.23 \pm 3.20^{**}$	$13.79 \pm 1.11^*$	$22.01 \pm 3.02^{**}$
L-фенилаланин	Оксалоацетат	$13.83 \pm 5.64^*$	$0.71 \pm 0.54^{**}$	$3.73 \pm 1.99^{**}$	$18.69 \pm 2.91^*$	$30.68 \pm 10.7^{**}$
L-глутаминовая кислота	Фенилпируват	7.08 ± 2.15	5.54 ± 1.68			61.92 ± 15.2
L-аспарагиновая кислота	Фенилпируват	0.67 ± 0.51	3.11 ± 1.00			13.26 ± 2.94

* Данные рассчитаны по простой кинетике Михаэлиса–Ментен при наивысших неингибирующих концентрациях кетокислоты.

** Данные рассчитаны по кинетике субстратного ингибирования при насыщающих концентрациях аминокислоты.

чением максимальной скорости ферментативной реакции.

Нами было изучено влияние L- β -(N-бензил-амино)аланина и L- β -(N-метиламино)аланина на скорость реакции трансминирования, катализируемой аминотрансферазами *E. carotovora*. L- β -(N-бензиламино)аланин с $[I]_{50} = 3.92$ мМ и L- β -(N-метиламино)аланин с $[I]_{50}$ более 5.0 мМ проявляли ингибирующее действие на аминотрансферазы PAT1 и PAT3, соответственно. Механизм ингибирования PAT1 L- β -(N-бензиламино)аланином и PAT3 L- β -(N-метиламино)аланином был изучен более детально. Результаты изучения ингибирования PAT1 L- β -(N-бензил-

амино)аланином при насыщающей концентрации кетокислоты 10 мМ представлены на рис. 3.

Из рис. 3а следует, что кривые зависимости $1/V$ от I (концентрация ингибитора) представляют прямые линии, пересекающиеся в верхнем левом квадранте координатной плоскости. Одновременно из рис. 3б следует, что кривые зависимости S/V от I представляют параллельные прямые линии. В целом результаты графического анализа указывают на конкурентный тип ингибирования PAT1 L- β -(N-бензиламино)аланином. Кинетические параметры ингибирования (K_I , K_m , V_{max}) рассчитывали методом многомерной линейной регрессии. Были получены следующие значения па-

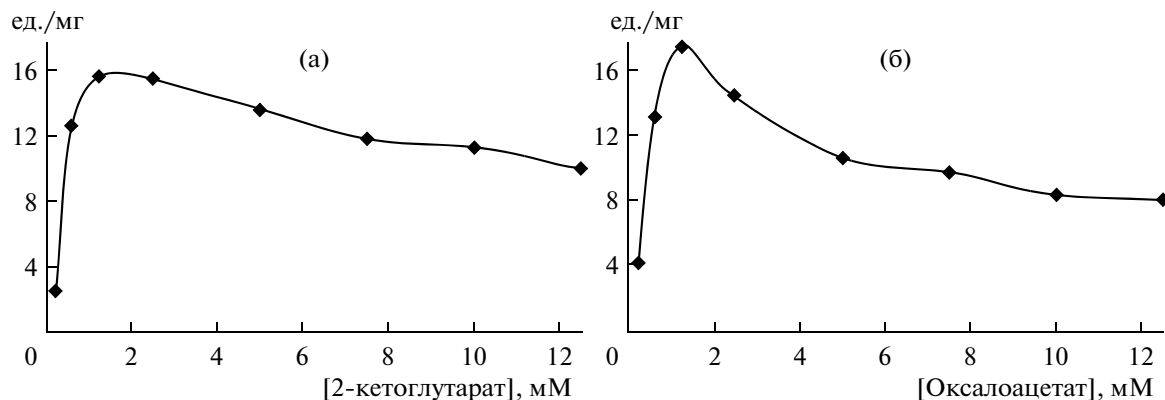


Рис. 2. Зависимость скорости реакции аминирования 2-кетоглутарата (а) и оксалоацетата (б) аминотрансферазой PAT3 *E. carotovora* от концентрации субстратов.

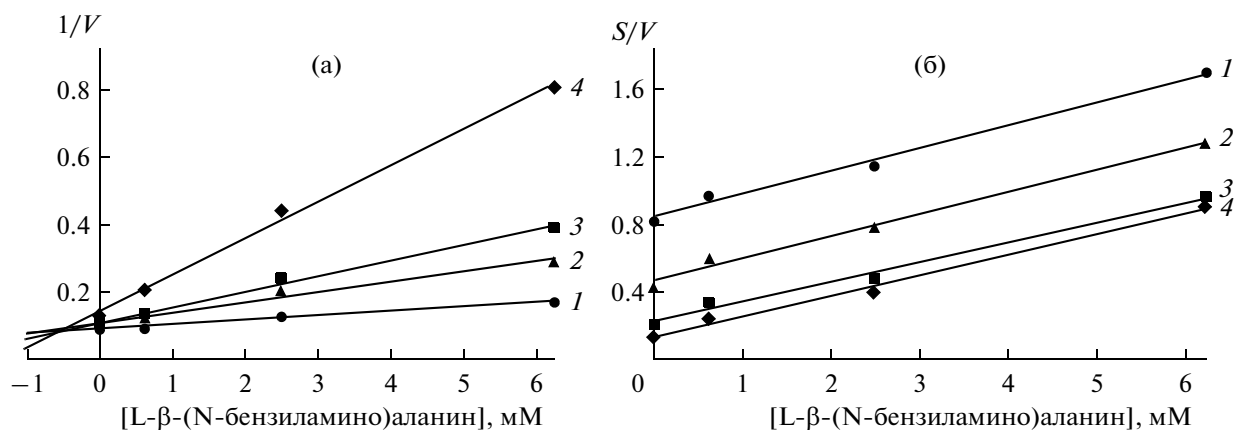


Рис. 3. Зависимость $1/V$ (а) и S/V (б) от концентрации L- β -(N-бензиламино)аланина при концентрациях L-фенилаланина: 1 – 10.0, 2 – 3.75, 3 – 2.5, 4 – 1.0 мМ.

раметров: $K_1 = 0.32 \pm 0.07$ мМ, $K_m = 0.45 \pm 0.1$ мМ, $V_{max} = 11.6 \pm 0.4$ ед./мг.

Аналогичным образом при концентрациях кетокислоты 2.0 мМ ПАТ3 бесконкурентно ингибировалась L- β -(N-метиламино)аланином (конкуренцию рассматривали по отношению к L-фенилаланину). Были получены следующие значения параметров: $K_1 = 138.4 \pm 95.4$ мМ, $K_m = 13.7 \pm 3.9$ мМ, $V_{max} = 18.6 \pm 4.1$ ед./мг.

Результаты исследования субстратной специфичности ферментов в реакциях аминирования 2-кетоглутарата приведены в табл. 4. В качестве доноров аминной группы были проверены следующие небелковые аминокислоты: L- β -(2-Вг-фенил)аланин, L- β -(4-Вг-фенил)аланин, L- α -метил- β -(2-Вг-фенил)аланин, L-гидрокси- β -(3-Вг-4-метоксифенил)аланин, L- α -метил-фенилаланин, L- β -(2-F-фенил)аланин, L- β -(4-F-фенил)аланин, L- α -F-фенилаланин, L-O-бензил-тирозин, L-O-бензил- α -метил-тирозин, L-2-F-триптофан. В табл. 4 приведены данные только для тех небелковых аминокислот, которые были донорами аминной группы.

Изучена аффинность субстратов — L-фенилаланина, L-глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты, фенилпирувата, 2-кетоглутарата и оксалоацетата к аминотрансферазам ПАТ1, ПАТ2 и ПАТ3 *E. carotovora*, участвующим в переаминировании фенилпирувата. Исследования показали близость значений соответствующих констант Михаэлиса для ароматических аминотрансфераз ПАТ1 и ПАТ2. Причем у обоих ферментов значения K_m для L-фенилаланина и для фенилпирувата, измеренные в присутствии различных пар ко-субстратов, совпадали в пределах ошибки эксперимента. Аспаратаминотрансфераза ПАТ3 отличается от ароматических аминотрансфераз *E. carotovora* как высоким значением K_m для L-фенилаланина (11.72 ± 2.74 мМ и 13.83 ± 5.64 мМ

для разных пар ко-субстратов), так и субстратным ингибированием — 2-кетоглутаратом ($K_s = 10.23 \pm 3.20$ мМ) и оксалоацетатом ($K_s = 3.73 \pm 1.99$ мМ). Для ПАТ3 значения K_m для L-фенилаланина и для фенилпирувата, измеренные в присутствии различных пар ко-субстратов, совпадали в пределах ошибки эксперимента.

В табл. 5 обобщены результаты сравнения K_m для указанных субстратов ароматических и аспаратаминотрансфераз, выделенных из различных организмов.

Из приведенных данных следует, что у одних и тех же организмов L-фенилаланин, L-глутаминовая кислота и фенилпируват проявляли более высокую аффинность к ароматическим аминотрансферазам, а L-аспарагиновая кислота, оксалоацетат и 2-кетоглутарат проявляют более высокую аффинность к аспаратаминотрансфе-

Таблица 4. Субстратная специфичность ферментов *E. carotovora*, трансминирующих фенилпируват, с 2-кетоглутаровой кислотой в качестве акцептора аминокислотной группы

Субстрат	Удельная активность, ед./мг		
	ПАТ1	ПАТ2	ПАТ3
L- β -фенилаланин	12.0	4.0	13.5
L- β -(2-Вг-фенил)аланин	5.7	4.7	12.6
L- β -(4-Вг-фенил)аланин	7.0	4.8	29.0
L- α -метил- β -(2-Вг-фенил)аланин	0.0	0.0	4.7
L- β -(2-F-фенил)аланин	6.3	8.9	14.6
L- β -(4-F-фенил)аланин	5.0	0.6	4.7
L-O-бензил-тирозин	0.0	0.0	5.9
L-2-F-триптофан	7.1	4.7	15.1

Таблица 5. Сравнение K_m некоторых субстратов ароматических и аспартат-аминотрансфераз *E. carotovora* и других организмов

Штамм	Тип аминотрансферазы	K_m , мМ						Источник литературы
		L-Фенилаланин	L-Глутаминовая кислота	L-Аспарагиновая кислота	Фенилпируват	2-Кетоглутарат	Оксалоацетат	
<i>E. carotovora</i>	Аром.* (РАТ1)	0.9	3.1	4.3	1.0	2.8	0.8	Данная работа
	Аром. (РАТ2)	0.9	3.4	1.9	0.8	1.3	0.5	
	Асп.** (РАТ3)	12.8	7.1	0.7	4.3	0.4	0.7	
<i>E. coli</i> ATCC 8739	Аром.	3.3	—	—	—	2.5	3.1	[3]
	Асп.	2.2	—	4.4	—	0.1	0.4	
<i>E. coli</i> K12	Аром.	0.1	0.3	5.0	0.1	0.2	3.8	[5]
	Асп.	0.6	0.9	0.5	0.7	0.2	0.6	
<i>B. subtilis</i>	Аром.	9.8	—	—	—	38.0	—	[6]
<i>K. aerogenes</i> W-70	Аром.	83.0	—	—	1.6	<0.1	<0.1	[13]
<i>B. linens</i>	Аром.	1.3	—	8.4	—	—	—	[10]
	Асп.	6.2	—	3.8	—	—	—	
<i>M. aeolicus</i>	Аром. (ArAT-I)	0.4	—	—	—	0.6	—	[16]
	Аром. II)	1.2	—	—	—	0.6	—	
	Асп.	—	—	3.7	—	0.5	—	
<i>T. cruzi</i> Tul 0	Аром.	20.1	—	—	—	38.7	19.2	[31]
<i>P. furiosus</i>	Аром.	1.3	—	—	—	0.9	—	[19]
	Асп.	—	—	4.2	—	0.5	—	

* Аром. — ароматическая аминотрансфераза.

** Асп. — аспартаминотрансфераза.

разе. Примечательны низкие аффинности L-фенилаланина и оксалоацетата по отношению к ароматическим аминотрансферазам *B. subtilis* и *T. cruzi*, а также низкая аффинность L-фенилаланина к ароматической аминотрансферазе *K. aerogenes*.

Интересен факт субстратного ингибирования аспартаминотрансферазы *E. carotovora* оксалоацетатом и 2-кетоглутаратом с K_S 3.73 ± 1.99 мМ и 10.23 ± 3.20 мМ соответственно. Ингибирование аспартаминотрансферазы 2-кетоглутаратом наблюдалось также у *Methanococcus aeolicus* [16].

Что же касается влияния L-β-(N-бензиламино)аланина и L-β-(N-метиламино)аланина на аминотрансферазы, то следует отметить, что они оказывали схожее ингибирующее действие на аминотрансферазы, выделенные из *Citrobacter freundii* [32].

Активность РАТ1, РАТ2 и РАТ3 *E. carotovora* исследовалась в реакциях переаминирования 2-кетоглутарата некоторыми аналогами L-фенилаланина, L-тирозина и L-триптофана. L-β-(2-Вг-фенил)аланин, L-β-(4-Вг-фенил)аланин, L-β-(2-

F-фенил)аланин и L-2-F-триптофан оказались хорошими субстратами для всех трех аминотрансфераз, L-α-метил-β-(2-Вг-фенил)аланин и L-О-бензил-тирозин являлись субстратами только для РАТ3, а L-β-(4-F-фенил)аланин был субстратом для РАТ1 и РАТ3. Ранее была показана субстратная специфичность ароматической аминотрансферазы *Pseudomonas putida* к рацематам (4-F-фенил)аланина, (2-F-фенил)аланина и (4-Вг-фенил)аланина [14]. Следовательно, указанные аналоги ароматических аминокислот могут быть стереоселективно синтезированы с применением указанных аминотрансфераз при наличии соответствующих кетокислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Браунштейн А.Е., Крицман М.Г. // Энзимология. 1937. Т. 2. С. 129–137.
2. Collier R.H., Kohlhaw G. // J. Bacteriology. 1972. V. 112. № 1. P. 365–371.

3. Mavrides C., Orr W. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 11. P. 4128–4133.
4. Gelfand D.H., Steinberg R.A. // J. Bacteriology. 1977. V. 130. P. 429–440.
5. Powell J.T., Morrison J.F. // J. Biochemistry. 1978. V. 87. P. 391–400.
6. Weigent D.A., Nester E.W. // J. Biochemistry. 1976. V. 251. № 22. P. 6974–6980.
7. Nester E.W., Montoya A.L. // J. Bacteriology. 1976. V. 26. № 2. P. 699–705.
8. Sung M., Tanizawa K., Tanaka H., Kuramitsu S., Kagamiyama H., Soda K. // J. Bacteriology. 1990. V. 172. № 3. P. 1345–1351.
9. Fazal A.M., Jensen R.A. // J. Bacteriology. 1979. V. 140. № 2. P. 580–587.
10. Lee C., Desmazeaud M.J. // J. General Microbiology. 1985. V. 131. P. 459–467.
11. Whitaker R.J., Gaines C.G., Jensen R.A. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 22. P. 13550–13556.
12. Ziehr H., Kula M-R. // J. Biotechnology. 1985. V. 3. № 1–2. P. 19–31.
13. Paris C.G., Magasanik B. // J. Bacteriology. 1981. V. 145. № 1. P. 266–271.
14. Abou-Zeid A., Euverink G.J.W., Hessels G.I., Jensen R.A., Dijkhuizen L. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 4. P. 1298–1302.
15. Rijnen L., Bonneau S., Yvon M. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 11. P. 4873–4880.
16. Xing R.Y., Whitman W.B. // J. Bacteriology. 1992. V. 174. № 2. P. 541–548.
17. Andreotti G., Cubellis M.V., Nitti G., Sannia G., Mai X., Marino G., Adams M.W.W. // Eur. J. Biochem. 1994. V. 220. P. 543–549.
18. Matsui I., Matsui E., Sakai Y., Kikuchi H., Kawarabayasi Y., Urai H., Kawaguchii S., Kuramitsu S., Harata K. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 7. P. 4871–4879.
19. Ward D.E., De Vos W.M., Van Der Oost // J. Archaea. 2002. V. 1. P. 133–141.
20. Cardenas-Fernandez M., Lopez C., Alvaro G., Lopez-Santin J. // J. Biochemical Engineering. 2012. V. 63. P. 15–21.
21. Патент США. 1988. № 4783403.
22. Патент США. 1988. № 4745059.
23. Патент Армении. 2010. № 2479A.
24. Палоян А.М., Амбарцумян А.А., Алебян Г.П. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 1. С. 123–129.
25. Peterson G. // Methods Enzymol. 1983. V. 91. № 1. P. 95–119.
26. Корниш-Боуден Э. // Основы ферментативной кинетики. Мир: Москва, 1979. 280 с.
27. King E.L., Altman C. // J. Phys. Chem. 1956. V. 60. P. 1375–1378.
28. Курхнер Ю. // Тонкослойная хроматография. Т. 1. Мир: Москва, 1981. 261 с.
29. Velick S.F., Vavra J. // J. Biol. Chem. 1962. V. 237. № 7. P. 2109–2122.
30. Ambartsumyan A.A., Bezirdzhyan Kh.O. // Biochemistry (Moscow). 1994. V. 59. № 9. P. 1027–1032.
31. Montemartini J.A., Santome J.J., Cazzulot, Nowicki C. // J. Biochem. 1993. V. 292. P. 901–906.
32. Оганесян А.М. // Биолог журн. Армении. 2009. Т. 64. № 4. С. 101–104.

Catalytic Properties of Enzymes from *Erwinia carotovora* Involved in Transamination of Phenylpyruvate

A. M. Paloyan, L. A. Stepanyan, S. A. Dadayan, A. A. Hambardzumyan,
Gh. P. Halebyan, and A. S. Saghyan

Scientific and Production Center Armbiotechnology, National Academy of Sciences of Armenia,
14 Gyurjan str., Yerevan, 375056 Armenia

e-mail: anipaloyan@yahoo.com

Received August 7, 2012

Abstract— K_m for L-phenylalanine, L-glutamic acid, L-aspartic acid, and the corresponding keto acids were calculated, as well as V_{max} was measured for the following pairs of substrates: L-phenylalanine–2-ketoglutarate, L-phenylalanine–oxaloacetate, L-glutamic acid–phenylpyruvate, and L-aspartic acid–phenylpyruvate for aminotransferases PAT1, PAT2, and PAT3 from *Erwinia carotovora* catalyzing transamination of phenylpyruvate. The ping-pong bi–bi mechanism was shown for the studied aminotransferases. The substrate inhibition (K_s) of PAT3 with 2-ketoglutarate and oxaloacetate was 10.23 ± 3.20 and 3.73 ± 1.99 mM, respectively.

УДК 577.121

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ШТАММЫ *Escherichia coli*, ДЕФИЦИТНЫЕ ПО ПУТЯМ СМЕШАННОКИСЛОТНОГО БРОЖЕНИЯ, СПОСОБНЫЕ К БЫСТРОМУ АЭРОБНОМУ РОСТУ НА ГЛЮКОЗЕ ПРИ СНИЖЕННОМ ЭФФЕКТЕ КРЭБТРИ

© 2013 г. А. А. Моржакова, А. Ю. Скороходова, А. Ю. Гулевич, В. Г. Дебабов

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

e-mail: skorokhodova@genetika.ru

Поступила в редакцию 16.07.2012 г.

Сконструированы и охарактеризованы штаммы *Escherichia coli*, дефицитные по путям смешаннокислотного брожения, способные к быстрому аэробному росту на глюкозе, не сопряженному с выраженным бактериальным эффектом Крэбтри. Основные пути образования уксусной и молочной кислот, а также этанола, были инактивированы в штаммах за счет делеций генов *ackA*, *pta*, *poxB*, *ldhA* и *adhE*. Фосфоенолпируватзависимая фосфотрансферазная система транспорта и фосфорилирования глюкозы была инактивирована в штаммах в результате делеции гена *ptsG*. Возможность альтернативного транспорта и фосфорилирования углеводного субстрата была обеспечена за счет конститутивной экспрессии в клетках рекомбинантов генов *galP* и *glk*, кодирующих низкоаффинный H^+ -симпортер D-галактозы и глюкокиназу соответственно. Полученные штаммы SGM1.0 Δ ptsG P_{lac}galP и SGM1.0 Δ ptsG P_Lglk P_{lac}galP при культивировании в минимальной среде, содержащей 2.0 и 10.0 г/л глюкозы, демонстрировали способность к быстрому аэробному росту, сопровождающемуся секрецией лишь незначительных количеств уксусной и следовых количеств пировиноградной кислот.

DOI: 10.7868/S0555109913020116

Благодаря хорошо изученному метаболизму и доступному генно-инженерному инструментарию бактерии вида *Escherichia coli* традиционно используются в качестве базового микроорганизма для создания штаммов-продуцентов различных биологически активных и промышленно значимых веществ. Дополнительным преимуществом этих бактерий является способность к эффективному и быстрому росту даже в минимальных солевых средах, содержащих дешевые источники углерода. Так, в частности, глюкоза, один из наиболее предпочтительных для клеток *E. coli* субстратов, благодаря своей дешевизне может быть эффективно использована как для накопления биомассы рекомбинантных штаммов-продуцентов, так и для последующей продукции целевых веществ.

Общим принципом конструирования рекомбинантных штаммов-продуцентов промышленно значимых соединений является инактивация путей конкурентной утилизации ключевых метаболитов предшественников, участвующих в биосинтезе целевого вещества. Среди интермедиатов центрального метаболизма, являющихся предшественниками в синтезе целого ряда высокоценных веществ, особый интерес представляет сохранение для участия в целевых биосинтетических реакциях пировиноградной кислоты и ацетил-КоА.

С целью сбережения данных метаболитов, в первую очередь, инактивируют основные пути их нецелевого расходования клетками, сопровождающегося, в общем случае, экскрецией в среду органических кислот и этанола. Значительную часть этих путей представляют собой реакции, участвующие в процессе смешаннокислотного брожения. Так, основные побочные пути утилизации ацетил-КоА – образование из этого метаболита уксусной кислоты и этанола. Для прекращения синтеза этих веществ из ацетил-КоА, общепринятыми являются инактивация генов *ackA* и *pta*, кодирующих ацетаткиназу (КФ 2.7.2.1) и фосфотрансацетилазу (КФ 2.3.1.8), а также гена *adhE*, кодирующего, соответственно, бифункциональную алкоголь-, альдегиддегидрогеназу (КФ 1.1.1.1/1.2.1.3) [1]. В случае пировиноградной кислоты инактивируют гены *ldhA* и *poxB*, кодирующие лактатдегидрогеназу (КФ 1.1.1.28) и пируватоксидазу (КФ 1.2.5.1), участвующие в превращении исходного метаболита, соответственно, в молочную и уксусную кислоты [1].

Известно, что в результате таких модификаций скорость роста на глюкозе полученных рекомбинантных штаммов снижается. Так, в частности, в случае инактивации генов *pta* и/или *ackA* снижение скорости роста соответствующих штаммов обусловлено невозможностью генерации до-

полнительной молекулы АТФ при синтезе уксусной кислоты [2–4]. Вместе с тем, быстрое накопление биомассы рекомбинантного штамма и последующий синтез целевого вещества значительной массой клеток, находящихся в стационарной фазе, технологически более выгоден, значительно повышая продуктивность (г/л · ч). При этом быстрый аэробный рост клеток *E. coli* дикого типа в средах с глюкозой обусловлен именно формированием дополнительной молекулы АТФ в ходе образования из ацетил-КоА уксусной кислоты и сопровождается значительным выделением клетками данного вещества. Последний феномен получил название “бактериального эффекта Крэбтри” [5] или же “эффекта избыточного метаболизма”. Этот эффект возникает из-за дисбаланса между интенсивностью гликолиза и скоростью оборачиваемости цикла трикарбоновых кислот и сопровождается экскрецией “лишней” неметаболизированной глюкозы в виде производных тех или иных терминальных интермедиатов гликолиза. Таким образом, следствием эффекта избыточного метаболизма при выращивании клеток рекомбинантных штаммов-продуцентов в средах с глюкозой является накопление в культуральной жидкости побочных веществ, затрудняющее дальнейшую очистку и выделение целевого продукта. Так, при инактивации в рекомбинантных штаммах основных путей биосинтеза уксусной кислоты за счет делеций генов *ackA*, *pta* и *poxB* эффект Крэбтри проявляется в накоплении в средах культивирования пировиноградной и молочной кислот [4]. Дополнительная инактивация в клетках рекомбинантов гена *ldhA*, отвечающего за образование молочной кислоты, приводит к доминантной экскреции пировиноградной кислоты [6]. Накопление значительных количеств пировиноградной кислоты в последнем случае является результатом действия фосфоенолпируватзависимой фосфотрансферазной системы транспорта сахаров (ФСТ). Активная ФСТ, при транспорте глюкозы в клетку, эффективно превращает в пировиноградную кислоту фосфоенолпируват (ФЭП), выступающий донором фосфатной группы при фосфорилировании глюкозы. Инактивация ФСТ сахаров в клетках *E. coli* дикого типа снижает эффективность потребления глюкозы, интенсивность гликолиза и приводит к отмене “бактериального эффекта Крэбтри” [6, 7], предотвращая, тем самым, накопление в средах культивирования побочных продуктов. Вместе с тем, однако, инактивация ФСТ значительно снижает скорость роста клеток в средах, содержащих глюкозу [7].

Ранее была продемонстрирована возможность мутантных PTS⁻ штаммов *E. coli* к эффективному росту на минимальной среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода [8, 9]. Анализ мутантов показал, что некоторые из них

обладали повышенным уровнем экспрессии гена *galP*. Известно, что GalP является низкоаффинным Н⁺-симпортером D-галактозы, способным, в частности, к транспорту глюкозы [10]. Глюкоза, поступающая в клетки штаммов с инактивированной ФСТ по механизму углевод/Н⁺-симпорта, должна быть фосфорилирована для дальнейшего участия в метаболизме. Такое фосфорилирование в клетках *E. coli* осуществляется глюкокиназой Glk [11, 12], использующей в качестве источника фосфата АТФ, а не ФЭП. Вместе с тем восстановление за счет экспрессии генов *galP* и *glk* ростовых параметров PTS⁻ штаммов *E. coli* в минимальных средах, содержащих глюкозу в качестве единственного источника углерода, сопровождается интенсификацией бактериального эффекта Крэбтри. Так, показатели секреции уксусной кислоты PTS⁻ GalP+ Glk+ производными штамма *E. coli* W3110 при росте в минимальной среде с глюкозой двукратно превышают показатели, демонстрируемые в аналогичных условиях родительским штаммом [8].

На сегодняшний день нет сведений о выраженности эффекта Крэбтри и его проявлениях при росте на глюкозе рекомбинантных штаммов *E. coli* с инактивированными путями нецелевого расхода пировиноградной кислоты и ацетил-КоА и содержащими альтернативную ФСТ систему транспорта и фосфорилирования глюкозы (GalP, Glk).

Цель работы – получение и характеристика рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*, дефицитных по путям смешаннокислотного брожения, способных к быстрому росту на глюкозе в аэробных условиях на фоне сниженного эффекта Крэбтри.

МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы, плазмиды и среды. Используемые в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл.1. Бактерии культивировали аэробно при 37°C на качалке при 250 об/мин в богатых средах LB, SOB, SOC и минимальной среде M9 [13], содержащей 2.0 или 10.0 г/л глюкозы, при необходимости с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

Реагенты. Использовали препараты рестриктаз и T4 ДНК-лигазы (“Fermentas”, Литва), ДНК полимеразы Taq (“Fermentas”, Литва) и Phusion (“Finnzymes”, Финляндия). Олигонуклеотиды (табл. 2) синтезировали в ЗАО “Синтол” (Россия). Полученные ПЦР-продукты очищали электрофорезом в агарозном геле и выделяли с помощью QIAquick Gel Extraction Kit “Qiagen” (США). Компоненты питательных сред, соли и другие реагенты были производства “Panreac” (Испания) и “Sigma” (США).

Таблица 1. Используемые в работе штаммы и плазмиды

Объект	Генотип	Ссылка
Штамм		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
SGM0.1	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pta$, $\Delta proxB$, $\Delta ldhA$	[16]
SGM1.0	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pta$, $\Delta proxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$	Данная работа
SGM1.0 $\Delta ptsG$	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pta$, $\Delta proxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$	»
SGM1.0 $\Delta ptsG$ P _{tac} galP	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pta$, $\Delta proxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, P _{tac} galP	»
SGM1.0 $\Delta ptsG$ P _L glk	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pta$, $\Delta proxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, P _L glk	»
SGM1.0 $\Delta ptsG$ P _L glk P _{tac} galP	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA-pta$, $\Delta proxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, P _L glk, P _{tac} galP	»
Плаزمида		
pMW118-($\lambda attL$ -Cm- $\lambda attR$)	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , $\lambda attL$ - <i>cat</i> - $\lambda attR$ cassette	[15]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , P _{araB} - λgam - <i>bet-exo</i>	[14]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P _R - λxis - <i>int</i> , <i>cIts857</i>	[17]
pDR540	pBR322, <i>bla</i> , <i>galK</i> , P _{lac}	GenBank U13847

Таблица 2. Используемые в работе олигонуклеотидные праймеры

Название	Последовательность
P1	5'-tatggctgtactaatgctgctgaacttaacgcactcgctcaagttagtagtataaaaaagctgaac-3'
P2	5'-ttaagcggatttttctgctttttctcagcttttagctgaagcctgcttttttataactaagttgg-3'
P3	5'-cagtgagtgtagcgcgag-3'
P4	5'-gaagccgttatagtgccctcag-3'
P5	5'-tatgtttaagaatgcatttgctaactgcaaaaggctcgctcaagttagtagtataaaaaagctgaac-3'
P6	5'-ttagtggttacggatgactcatcctcctcggttttgaagcctgcttttttataactaagttgg-3'
P7	5'-ccatactcaggagcactctc-3'
P8	5'-catctggctgccttagtctc-3'
P9	5'-tgcgacagatctctcacctaccaacaatgcc-3'
P10	5'-cattctcaactgctccgctaaagtcaaaataattcttacggccaatgcttctgttc-3'
P11	5'-ttgccagctgcaaaaaggcatcgctgcaattggcgcctcaagttagtagtataaaaaagctgaac-3'
P12	5'-ctagtaagatctgaagcctgcttttttataactaagttgg-3'
P13	5'-ttctattccttagcggggtc-3'
P14	5'-cccacatcaccgactaatgc-3'
P15	5'-gaccatagatctccctgttgacaattaatcatcggctcgataatg-3'
P16	5'-tttttagcgtcaggcatgatgccctccaataggtcgctcacaattccacacattatac-3'
P17	5'-agttgttacattctttcagtaaagtcttaattgccgctcaagttagtagtataaaaaagctgaac-3'
P18	5'-gattacaccaaccacaacagac-3'
P19	5'-cgtcattgcctgtttgaccg-3'

Конструирование штаммов. Все хромосомные модификации осуществляли с использованием методики, разработанной Даценко и Ваннер [14]. Линейные фрагменты ДНК для инактивации генов *adhE* и *ptsG*, содержащие маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием пар праймеров P1, P2 и P5, P6 и плазмиды pMW118-($\lambda attL$ -Cm- $\lambda attR$) [15] в качестве матрицы.

Полученные фрагменты ДНК были по отдельности интегрированы в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46. Факт соответствия предполагаемых и полученных экспериментально структур хромосом отобранных штаммов, с индивидуально инактивированными генами *adhE* и *ptsG*, подтверждали ПЦР анализом с помощью пар локус-специфичных праймеров P3, P4; P7, P8 соответственно.

Конструирование фрагмента ДНК для замены нативной регуляторной области гена *glk* осуществлялось в несколько стадий. На первом этапе с использованием в качестве матрицы геномной ДНК фага лямбда был получен фрагмент ДНК, содержащий в начале участок узнавания *Bgl*II, промотор P_L , и 36 нуклеотидов, комплементарных области предшествующей кодирующей части гена *glk*. ПЦР проводили с использованием праймеров P9 и P10. На втором этапе фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, маркер Cm^R и 36 нуклеотидов, гомологичных участку ДНК, расположенному на 35 нуклеотидов ранее кодирующей области гена *glk*, был получен при помощи ПЦР с использованием праймеров P11 и P12 и плазмиды pMW118-($\lambda attL$ - Cm - $\lambda attR$). Полученные фрагменты ДНК были обработаны эндонуклеазой рестрикции *Bgl*II и лигированы T4 ДНК-лигазой [13]. Продукт лигирования амплифицировали с использованием праймеров P10 и P11. Полученный ПЦР-продукт был использован для интеграции в хромосому. Соответствие запланированной и экспериментально полученной нуклеотидной последовательности нового регуляторного элемента, введенного перед кодирующей областью гена *glk*, было подтверждено в полученных клогах секвенированием с помощью праймеров P13 и P14.

Аналогичным образом нативный промотор гена *galP* был заменен укороченным вариантом промотора P_{tac} , обеспечивающим конститутивную транскрипцию в $LacI^+$ штаммах *E. coli*. Использовали праймеры P15, P16, P17, P12 и плазмиды pDR540 и pMW118-($\lambda attL$ - Cm - $\lambda attR$) в качестве матриц. Соответствие запланированной и экспериментально полученной нуклеотидной последовательности нового регуляторного элемента, введенного перед кодирующей областью гена *galP*, было подтверждено в полученных клогах секвенированием с помощью праймеров P18 и P19.

Штаммы SGM1.0, SGM1.0 Δ ptsG, SGM1.0 Δ ptsG $P_{tac}galP$, SGM1.0 Δ ptsG P_Lglk и SGM1.0 Δ ptsG P_Lglk $P_{tac}galP$ были получены серией P1-зависимых трансдукций соответствующих модификаций в ранее сконструированный штамм SGM0.1 [16]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами (*attachment*) фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [17].

Определение скорости роста. Клетки штаммов выращивали в течение ночи при 37°C в среде M9, содержащей 2.0 г/л глюкозы. В свежую среду M9, содержащую 2.0 или 10.0 г/л глюкозы, добавляли необходимое количество ночной культуры до $OP_{600} \approx 0.04$. Культуры выращивали при 37°C на роторной качалке при 250 об/мин 9 ч. Оптическую плотность растущей культуры измеряли через 3, 5, 7, 9 ч при длине волны 600 нм. Скорость

роста определяли по графику изменения оптической плотности культур от времени. Логарифмические части кривых роста аппроксимировали уравнением $OP = A \exp(\mu T)$.

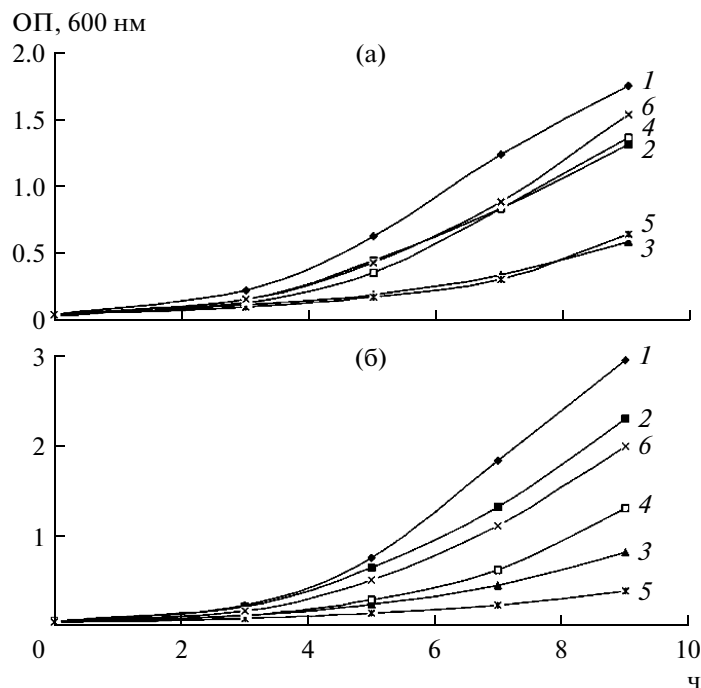
Аналитические методы. Концентрацию органических кислот и остаточной глюкозы в культуральной жидкости определяли методом ВЭЖХ с использованием системы HPLC "Waters" (США). Для измерения концентраций органических кислот использовали колонку ReproSil-Pur C18-AQ "Dr. Maisch" (Германия) с детекцией при длине волны 210 нм. Для измерения концентрации глюкозы система была укомплектована рефрактометрическим детектором "Waters" 2414 и колонкой Spherisorb-NH2 "Waters" (США). Концентрацию этанола определяли методом ГХ с пламенно-ионизационным детектором на колонке Omega-Wax "Supelco" (30 м, 0.25 мм в.д., 0.25 мкм толщина пленки) (США). Использовали хроматограф "Shimadzu" GC-17A (Япония), оснащенный автосамплером AOC-20i.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе было исследовано влияние альтернативной ФСТ системы транспорта и фосфорилирования глюкозы (*GalP*, *Glk*) на характеристики аэробного роста рекомбинантных штаммов *E. coli*, дефицитных по путям смешаннокислотного брожения, в минимальной среде, содержащей глюкозу в качестве единственного источника углерода.

Инактивация основных путей образования уксусной, молочной кислоты, этанола, а также ФСТ сахаров в штаммах была осуществлена в результате делеций генов *ackA*, *pta*, *poxB*, *ldhA*, *adhE* и *ptsG* соответственно. Альтернативный транспорт глюкозы в клетки штаммов был обеспечен за счет конститутивной экспрессии генов *galP* и *glk* при замене в хромосоме регуляторных областей соответствующих генов необходимыми по силе промоторами. Для транскрипции гена *glk* был использован "сильный" промотор P_L , в силу того, что эффективность роста клеток с инактивированной ФСТ системой на глюкозе повышается при увеличении активности глюкокиназы [12]. Для транскрипции гена *galP* был выбран более "слабый" промотор P_{tac} , поскольку сверхпродукция мембранных белков, в частности транспортеров сахаров, сопряжена с токсичным эффектом [18]. Модификации $P_{tac}galP$ и P_Lglk были внесены в штамм SGM1.0 Δ ptsG с помощью P1-зависимой трансдукции раздельно или совместно.

Для определения скорости роста штаммов *E. coli* MG1655, SGM1.0, SGM1.0 Δ ptsG, SGM1.0 Δ ptsG $P_{tac}galP$, SGM1.0 Δ ptsG P_Lglk , SGM1.0 Δ ptsG P_Lglk $P_{tac}galP$ при аэробной утилизации глюкозы, как единственного источника углерода, соответствующие культуры выращивали в минимальной соле-



Кривые роста исследуемых штаммов при выращивании в минимальной среде M9, содержащей 2.0 (а) и 10.0 (б) г/л глюкозы.

1 – MG1655, 2 – SGM1.0, 3 – SGM1.0ΔptsG, 4 – SGM1.0ΔptsG P_{tacgalP}, 5 – SGM1.0ΔptsG P_{Lglk}, 6 – SGM1.0ΔptsG P_{Lglk} P_{tacgalP}.

вой среде M9, содержащей углеводный субстрат в количестве 2.0 или 10.0 г/л. Типичные кривые роста клеток представлены на рисунке, значения скорости роста – в табл. 3.

Скорость роста штамма SGM1.0, в котором инактивированы пути образования уксусной, молочной кислоты и этанола, составляла 90% скорости роста штамма *E. coli* дикого типа MG1655 независимо от использованной концентрации глюкозы в среде. В то же время клетки штамма SGM1.0ΔptsG, лишённые ФСТ и в результате неспособные быстро усваивать глюкозу, демонстрировали скорость роста, составляющую 60% от скорости роста штамма MG1655. Полученный ре-

зультат согласуется с известными данными литературы, описывающими скорости роста ΔptsG производных штаммов *E. coli* дикого типа на минимальных солевых средах с 2.0 г/л глюкозы, составляющими от 66 [19] до 84% [20] от показателей родительских штаммов. Относительно более выраженное снижение скорости роста штамма SGM1.0ΔptsG в сравнении со штаммом дикого типа MG1655 объясняется, в данном случае, вкладом в общее снижение ростовых характеристик рекомбинантного штамма инактивацией путей смешаннокислотного брожения.

В минимальной среде, содержащей 2.0 г/л глюкозы, скорость роста штаммов SGM1.0ΔptsG P_{tacgalP} и SGM1.0 была практически одинакова – 0.44 и 0.43 ч⁻¹ соответственно. Данный факт позволял судить о том, что при малых концентрациях глюкозы для восстановления скорости роста рекомбинантных штаммов с инактивированной ФСТ достаточно обеспечения возможности альтернативного транспорта субстрата за счет активации экспрессии гена *galP* путем замены его природной регуляторной области на относительно “слабый” *tac* промотор. С другой стороны, индивидуальное обеспечение конститутивной экспрессии гена *glk*, при использовании даже “сильного” P_L промотора, не способствовало повышению скорости роста штамма SGM1.0ΔptsG. Известно, что глюкокиназа, кодируемая геном *glk*, способна

Таблица 3. Скорость роста штаммов в минимальной среде M9 с глюкозой

Штамм	μ, ч ⁻¹	
	2.0 г/л	10.0 г/л
MG1655	0.49	0.55
SGM1.0	0.43	0.49
SGM1.0ΔptsG	0.30	0.33
SGM1.0ΔptsG P _{tacgalP}	0.44	0.40
SGM1.0ΔptsG P _{Lglk}	0.30	0.26
SGM1.0ΔptsG P _{Lglk} P _{tacgalP}	0.44	0.48

Таблица 4. Концентрация метаболитов, секретируемых исследуемыми штаммами при аэробном выращивании в минимальной среде М9, содержащей 2.0 г/л (11.1 мМ) глюкозы

Штамм	Уксусная кислота, мМ			Пировиноградная кислота, мМ		
	5 ч	7 ч	9 ч	5 ч	7 ч	9 ч
MG1655	5.1	6.7	11.2	0	0	0
SGM1.0	0	3.8	4.8	0.2	2.6	7.4
SGM1.0ΔptsG	0	0	0	0	0	0
SGM1.0ΔptsG P _{tac} galP	0	3.5	4.1	0	0	0
SGM1.0ΔptsG P _L glk	0	0	0	0	0	0
SGM1.0ΔptsG P _L glk P _{tac} galP	0	4.0	4.2	0	0.1	0.4

Таблица 5. Концентрация метаболитов, секретируемых исследуемыми штаммами, при аэробном выращивании в минимальной среде М9, содержащей 10.0 г/л (55.5 мМ) глюкозы

Штамм	Уксусная кислота, мМ			Пировиноградная кислота, мМ		
	5 ч	7 ч	9 ч	5 ч	7 ч	9 ч
MG1655	5.7	9.8	15.3	0	0	0
SGM1.0	3.3	4.5	5.7	1.6	5.3	14.0
SGM1.0ΔptsG	0	0	3.5	0	0	0
SGM1.0ΔptsG P _{tac} galP	0	0	4.0	0	0	0
SGM1.0ΔptsG P _L glk	0	0	0	0	0	0
SGM1.0ΔptsG P _L glk P _{tac} galP	0	3.8	4.2	0	0	0.6

катализировать фосфорилирование глюкозы лишь при наличии субстрата в клетке, тогда как в случае штамма SGM1.0ΔptsG P_Lglk транспорт данного моносахарида из среды оставался лимитированным. Действительно, совместная экспрессия генов *glk* и *galP* в штамме SGM1.0ΔptsG P_Lglk P_{tac}galP привела к полному восстановлению роста по отношению к штамму SGM1.0. Можно было предположить, что в случае штамма SGM1.0ΔptsG P_{tac}galP практически полное восстановление скорости роста в сравнении с родительским штаммом обеспечивалось базальной активностью глюкокиназы, достаточной для фосфорилирования глюкозы транспортируемой в клетку низкоаффинным H⁺-симпортером из среды с невысоким содержанием субстрата.

Так же, как и при концентрации глюкозы в среде 2.0 г/л, усиления экспрессии лишь гена *glk* было недостаточно для увеличения скорости роста культуры штамма SGM1.0ΔptsG и в среде, содержащей 10.0 г/л глюкозы. Менее эффективным в отношении восстановления роста штамма SGM1.0ΔptsG при концентрации глюкозы 10.0 г/л оказалось и индивидуальное усиление экспрессии гена *galP*, скорость роста штамма SGM1.0ΔptsG P_{tac}galP в данных условиях составила лишь 80% от скорости роста штамма SGM1.0. Интересно отметить, что в случае инактивации в штаммах *E. coli* дикого типа ФСТ за счет делеции генов *ptsHI-crr*

оперона, конститутивная экспрессия гена *galP* со сравнимых по силе с P_{tac} промоторов обеспечивала восстановление скорости роста мутантных штаммов относительно предков дикого типа до ~89% при содержании глюкозы в среде 2.0 г/л [8], и до ~60% при концентрации глюкозы 5.0 г/л [12]. Для полноценного восстановления ростовых характеристик таких PTS⁻ штаммов требовалась обязательная совместная экспрессия в них генов *galP* и *glk*. При культивировании штамма SGM1.0ΔptsG в среде, содержащей 10.0 г/л глюкозы, восстановление скорости роста до значения, характерного для штамма SGM1.0, было достигнуто также при обеспечении конститутивной экспрессии в штамме как гена *galP*, так и гена *glk*.

Исследование эффекта Крэбтри у штамма MG1655 и его сконструированных производных, дефицитных по путям смешаннокислотного брожения, проводили, анализируя спектры и концентрации метаболитов, секретируемых штаммами при аэробном росте в минимальной среде, содержащей глюкозу в качестве единственного источника углерода. Концентрации метаболитов, секретируемых исследуемыми штаммами при аэробном выращивании в минимальной среде М9, содержащей 2.0 и 10.0 г/л глюкозы, представлены в табл. 4 и табл. 5.

При выращивании на глюкозе штамма *E. coli* дикого типа MG1655 эффект Крэбтри выражался классическим накоплением в средах культивирования значительных количеств уксусной кислоты. У штамма SGM1.0 с инактивированными основными путями биосинтеза уксусной кислоты, молочной кислоты и этанола, доминантным продуктом, секретиремым в среду с течением времени, становилась пировиноградная кислота, что согласуется с известными данными литературы [6]. Остаточная секреция штаммом SGM1.0 и некоторыми его производными уксусной кислоты с учетом инактивации основных путей ее биосинтеза объяснялась, по-видимому, действием альтернативных ферментов, таких, как ацил-КоА-тиоэстераза YciA (КФ 3.1.2.20) [21], ацетальдегиддегидрогеназа MhpF (КФ 1.2.1.10) [22] и альдегид-дегидрогеназа AldB (КФ 1.2.1.4) [23].

Инактивация ФСТ сахаров, снижающая эффективность потребления глюкозы, приводила к полной отмене эффекта Крэбтри при выращивании штамма SGM1.0ΔptsG в среде, содержащей 2.0 г/л глюкозы. В случае культивирования штамма при повышенной концентрации глюкозы (10.0 г/л) отмечалось некоторое накопление в среде уксусной кислоты на поздней стадии роста культуры. Данный факт может быть обусловлен относительно более высокой скоростью роста штамма в среде, содержащей повышенную концентрацию субстрата, и связан с эффектом увеличения объемной скорости потребления глюкозы частично возросшей клеточной массой. Аналогичными причинами может быть обусловлено и более раннее накопление уксусной кислоты в среде культивирования штамма SGM1.0ΔptsG P_{tac}galP при концентрации глюкозы 2.0 г/л, способствующей несколько более быстрому росту штамма. Вместе с тем PTS⁻ штамм SGM1.0ΔptsG P_{tac}galP при скоростях роста, сравнимых со скоростями роста PTS⁺ штамма SGM1.0, в отличие от родительского штамма, не секретировал в ходе роста в среду культивирования пировиноградную кислоту, а количество уксусной кислоты, накопленной штаммом, было невелико ~0.2 г/л. Данный факт свидетельствовал о значительном снижении эффекта Крэбтри при относительно быстром росте штамма SGM1.0ΔptsG P_{tac}galP в минимальной среде, содержащей как низкие (2.0 г/л), так и высокие (10.0 г/л) концентрации глюкозы.

Штамм SGM1.0ΔptsG P_{Lglk} P_{tac}galP, при выращивании в минимальных средах с 2.0 или 10.0 г/л глюкозы, также демонстрировал значительное снижение проявления эффекта Крэбтри, поскольку секретировал в среду незначительные количества уксусной (~0.2 г/л) и лишь следовые (~0.05 г/л) количества пировиноградной кислоты. При этом характеристики роста штамма SGM1.0ΔptsG P_{Lglk}

P_{tac}galP полностью соответствовали таковым родительского штамма SGM1.0.

Таким образом, за счет инактивации фосфоенолпируватзависимой системы транспорта сахаров и обеспечения возможности альтернативного транспорта и фосфорилирования субстрата, сконструированы и охарактеризованы штаммы *E. coli* SGM1.0ΔptsG P_{tac}galP и SGM1.0ΔptsG P_{Lglk} P_{tac}galP, дефицитные по путям смешаннокислотного брожения и способные к быстрому аэробному росту на глюкозе со сниженными проявлениями бактериального эффекта Крэбтри.

Благодаря своим характеристикам полученные штаммы могут служить базовой платформой для создания эффективных продуцентов, осуществляющих биосинтез целевого вещества в стационарной фазе в среде, не содержащей значительных количеств побочных продуктов, образованных на стадии выращивания биомассы.

Авторы выражают благодарность сотруднице ГосНИИгенетика Антоновой С.В. за проведение хроматографических анализов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 16.512.11.2037) с использованием оборудования Центра коллективного пользования ФГУП “ГосНИИгенетика” (ГК № 16.552.11.7029).”

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kern A., Tilley E., Hunter I.S., Legisa M., Glieder A. // J. Biotechnol. 2007. V. 129. № 1. P. 6–29.
2. Chang D.E., Shin S., Rhee J.S., Pan J.G. // J. Bacteriol. 1999. V. 181. № 21. P. 6656–6663.
3. Dittrich C.R., Bennett G.N., San K.Y. // Biotechnol. Prog. 2005. V. 21. № 4. P. 1062–1067.
4. De Mey M., Lequeux G.J., Beauprez J.J., Maertens J., Van Horen E., Soetaert W.K., Vanrolleghem P.A., Vandamme E.J. // Biotechnol. Prog. 2007. V. 23. № 5. P. 1053–1063.
5. Veit A., Polen T., Wendisch V.F. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 74. № 2. P. 406–421.
6. Sauer U., Eikmanns B.J. // FEMS Microbiol. Rev. 2005. V. 29. № 4. P. 765–794.
7. Flores S., Gosset G., Flores N., de Graaf A.A., Bolívar F. // Metab. Eng. 2002. V. 4. № 2. P. 124–137.
8. Hernandez-Montalvo V., Martínez A., Hernandez-Chavez G., Bolívar F., Valle F., Gosset G. // Biotechnol. Bioeng. 2003. V. 83. № 6. P. 687–694.
9. Flores N., Flores S., Escalante A., de Anda R., Leal L., Malpica R., Georgellis D., Gosset G., Bolívar F. // Metabolic. Eng. 2005. V. 7. № 2. P. 70–87.
10. McDonald T.P., Walmsley A.R., Henderson P.J. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. № 24. P. 15189–15199.
11. Wang Q., Wu C., Chen T., Chen X., Zhao X. // Biotechnol. Lett. 2006. V. 28. № 2. P. 89–93.

12. Сливинская Е.А., Рыбак К.В., Каташкина Ж.И., Машко С.В., Козлов Ю.И. // Биотехнология. 2007. № 5. С. 24–37.
13. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
14. Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
15. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Мол. биология. 2005. Т. 39. № 5. С. 823–831.
16. Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Моржакова А.А., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. Т. 47. № 4. С. 415–423.
17. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М., Зименков Д.В., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Мол. биология. 2009. Т. 43. № 3. С. 547–557.
18. Drew D., Fröderberg L., Baars L., de Gier J.W. // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1610. № 1. P. 3–10.
19. Picon A., de Mattos M.J., Postma P.W. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 35. № 4. P. 213–218.
20. Chou C.H., Bennett G.N., San K.Y. // Biotechnol. Bioeng. 1994. V. 44. № 8. P. 952–960.
21. Zhuang Z., Song F., Zhao H., Li L., Cao J., Eisenstein E., Herzberg O., Dunaway-Mariano D. // Biochemistry. 2008. V. 47. № 9. P. 2789–2796.
22. Ferrández A., Garcá J.L., Díaz E. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 8. P. 2573–2581.
23. Ho K.K., Weiner H. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 3. P. 1067–1073.

Recombinant *Escherichia coli* Strains Deficient in Mixed Acid Fermentation Pathways and Capable of Rapid Aerobic Growth on Glucose with a Reduced Crabtree Effect

A. A. Morzhakova, A. Yu. Skorokhodova, A. Yu. Gulevich, and V. G. Debabov

State Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 117545 Russia

e-mail: skorokhodova@genetika.ru

Received July 16, 2012

Abstract—In this study, we constructed and characterized *Escherichia coli* strains deficient for mixed acid fermentation pathways, which are capable of rapid aerobic growth on glucose without pronounced bacterial Crabtree effect. The main pathways of production of acetic and lactic acids and ethanol in these strains were inactivated by a deletion of the *ackA*, *pta*, *poxB*, *ldhA*, and *adhE* genes. The phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of glucose transport and phosphorylation was inactivated in the strains by a deletion of the *ptsG* gene. The possibility of alternative transport and phosphorylation of the carbohydrate substrate was ensured in recombinants by constitutive expression of the *galP* and *glk* genes, which encode the low-affinity H⁺-symporter of *D*-galactose and glucokinase, respectively. SGM1.0Δ*ptsG* P_{tac}*galP* and SGM1.0Δ*ptsG* P_l*glk* P_{tac}*galP* strains were capable of rapid aerobic growth in a minimal medium containing 2.0 and 10.0 g/l of glucose and secreted only small amounts of acetic acid and trace amounts of pyruvic acid.

УДК 579.871.8; 579.253.4; 579.222.7; 577.112.382.3

ИЗУЧЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ НЕКОТОРЫХ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА L-АЛАНИНА У ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ *Brevibacterium flavum*

© 2013 г. Л. О. Мелконян, Г. Е. Аветисова, А. А. Амбарцумян, А. Х. Чахалян, А. С. Сагиян

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА Ереван, Армения, 0056
e-mail: arthambardzumyan@gmail.com, arm_biotech@yahoo.com

Поступила в редакцию 7.08.2012 г.

Изучены механизмы сверхсинтеза L-аланина у штаммов-продуцентов *Brevibacterium flavum*.

Показано, что β-Cl-L-аланин является ингибитором ключевых ферментов синтеза L-аланина – аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы. У родительского штамма-продуцента *B. flavum* AA5 со сниженной активностью аланинрацемазы (≥98%) получены устойчивые к β-Cl-L-аланину высокоактивные штаммы-продуценты *B. flavum* GL1 и GL18. Показано, что повышение уровня синтеза L-аланина у новых продуцентов является следствием снятия ингибирования аланин-трансаминазы конечным продуктом, а также дерепрессии аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы.

DOI: 10.7868/S0555109913020098

Аланин – аминокислота, широко распространенная в природе, важный источник энергии для головного мозга и центральной нервной системы, участвует в метаболизме сахаров и органических кислот. L-аланин применяется в медицинской промышленности для производства инфузионных растворов и биохимических тестовых наборов, в пищевой промышленности в качестве пищевой добавки, в химическом синтезе и т.д. Как главный компонент шелка, аланин используется в производстве искусственных нитей [1]. Основными производителями этой аминокислоты являются Япония и Германия [2–4].

Биосинтез L-аланина достаточно детально изучен у коринеформных бактерий. В частности, показано, что L-аланин может синтезироваться из пировиноградной кислоты (основной путь) с участием аланин-трансаминазы (КФ 2.6.1.2, L-аланин:2-оксоглутарат аминотрансфераза) и из L-валина с помощью валин:пируват-трансаминазы (КФ 2.6.1.66, L-валин:пируват аминотрансфераза) [5]. Выявлены и изучены гены, кодирующие синтез этих ферментов. Установлено, что валин:пируват-трансаминаза у различных микроорганизмов кодируется одним геном *avtA*, а аланин-трансаминаза кодируется разными генами, в частности, у *Escherichia coli* – это гены *alaB*, *alaA*, *alaC*, а у *Corynebacterium glutamicum* – *alaT*, *Cg12844* [6–8].

Однако изучение механизмов регуляции синтеза L-аланина и поиск путей получения высокоактивных штаммов-продуцентов продолжает оставаться актуальной задачей [9].

Ранее нами сообщалось об изучении активности аланинрацемазы (КФ 5.1.1.1), аланин-трансамина-

зы и валин:пируват-трансаминазы у штамма дикого типа *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 и аланинрацемазы у ауксотрофных по D-аланину штаммов *B. flavum* AA1 и AA2, продуцирующих 17.5 и 20.4 г/л L-аланина соответственно [10].

Цель работы – изучение влияния мутаций, приводящих к сверхсинтезу L-аланина, на регуляцию синтеза и активность ключевых ферментов биосинтеза: аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы у штаммов-продуцентов *B. flavum*.

МЕТОДИКА

В работе использованы дикий штамм *B. flavum* ATCC 14067 (ВКПМ В-42), устойчивый к D,L-α-аминомасляной кислоте (D,L-α-АМК-г), ауксотрофный по D-аланину (D-ala⁻) штамм-продуцент *B. flavum* AA5 (ВКПМ В-3991) и полученные на его основе устойчивые к β-Cl-L-аланину штаммы-продуценты – *B. flavum* GL1 и GL18.

Исследуемые штаммы выращивали на мясопептонном агаре (МПА) и минимальной среде Гловера, содержащей (%): NH₄Cl – 0.5, NH₄NO₃ – 0.1, Na₂SO₄ – 0.2, K₂HPO₄ – 0.3, MgSO₄ · 7H₂O – 0.025, KH₂PO₄ – 0.1, агар-агар-1.5. Необходимые добавки вносили в следующие концентрации: глюкоза – 1.0 %, FeSO₄ · 7H₂O – 0.001%, MnSO₄ · 5H₂O – 0.001%, дестибиотин – 500 мкг/л, тиамин – 70 мкг/л, D-аланин – 100 мкг/мл.

Штаммы хранили на МПА при 4–7°C.

Обработку культур мутагеном N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином (НГ, 300 мкг/мл) проводили в цитратном буфере, pH 5.5, в течение 30 мин при 30°C по стандартной методике [11].

Устойчивые мутанты отбирали высевом обработанных культур на минимальную среду, содержащую соответствующее количество аналога. Выросшие колонии повторно пересеивали на среду с аналогом для получения чистых клонов.

Бактериальную массу для получения ферментных препаратов выращивали на синтетической среде следующего состава (%): сахароза — 5.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3.0; KH_2PO_4 — 0.1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1; мел — 3.0; pH 7.0 — 7.5. При выращивании ауксотрофных штаммов добавляли D-аланин до конечной концентрации 100 мкг/мл. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера емкостью 500 мл на качалке Innova 43 Shaker “New Brunswick Scientific” (США) при 250 об/мин и 30°C 24 ч. Выращенную биомассу собирали центрифугированием при 6000 g.

За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта за 1 мин.

В экспериментах по изучению влияния некоторых аминокислот и их аналогов на биосинтез ферментов использовали обработанные толуолом клетки (ОТК). Обработку проводили по модифицированной методике [12]: в пробирках емкостью 1.5 мл 50–100 мг клеток (сырая масса) встряхивали в трис-НСI буфере, pH 8.3, содержащем 2.0% толуола, а затем осаждали центрифугированием при 10000 g 3 мин. Осажденные клетки суспендировали в том же буфере и использовали для определения ферментативной активности.

В остальных экспериментах в качестве ферментов использовали неочищенные гомогенаты, полученные после ультразвуковой дезинтеграции клеток. Для разрушения клеток бактериальную суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин при температуре 4°C (50 Вт, 20 кГц) на дезинтеграторе “Labsonic 2000” (Германия), после чего центрифугировали при 9000 g [13].

Концентрацию белка определяли методом Гровса и Дейвиса по разнице поглощения света при длине волны 224 и 236 нм [14].

Активность аланинрацемазы определяли модифицированным методом, описанным в работе [15]. Реакционная смесь (0.3 мл) содержала: 100 мМ трис-НСI буфер, pH 8.3, 15 мМ L-аланин и необходимое количество фермента. Реакцию останавливали, помещая смесь в кипящую водяную баню на 7 мин. Образовавшийся D-аланин определяли ферментативным способом с использованием оксидазы D-аминокислоты и пероксидазы [16].

Активность аланин-трансаминазы определяли модифицированным методом, описанным в работе [17]. Реакционная смесь (0.4 мл) содержала: 100 мМ трис-НСI-буфер, pH 8.9, 100 мМ глутаминовую кислоту, 50 мМ Na-пируват, 0.1 мМ пиридоксаль-5-фосфат, 5.0 мМ меркаптоэтанол и необходимое количество фермента. Реакцию оста-

навливали, добавляя 2.5 мл дистиллированной воды и помещая смесь в кипящую водяную баню на 7 мин. Образованную в ходе реакции 2-кетоглутаровую кислоту определяли по окислению НАДН глутаматдегидрогеназой [16].

Активность валин:пируват-трансаминазы определяли методом Амбарцумяна и Безирджяна [13]. Реакционная смесь (0.4 мл) включала: 100 мМ трис-НСI-буфер, pH 8.0, 100 мМ L-аланин, 40 мМ 2-кетоиэвалериат, 0.1 мМ пиридоксаль-5-фосфат, 5.0 мМ меркаптоэтанол и необходимое количество фермента. Реакцию останавливали, добавляя 2.5 мл дистиллированной воды и помещая смесь в кипящую водяную баню на 7 мин. Образованный в ходе реакции пируват определяли по окислению НАДН лактатдегидрогеназой.

Для изучения ингибирования трансаминазы указанные выше реакции проводили в присутствии D-аланина, L-валина, D,L- α -аминокислоты (D,L- α -АМК), L-циклосерина и β -Cl-L-аланина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение активности аланинрацемазы, аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы. Ранее в НИТИА, ныне НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА был получен устойчивый к D,L- α -АМК, ауксотрофный по D-аланину штамм-продуцент *B. flavum* AA5, который в условиях ферментации в колбах на качалке синтезировал 43.8 г/л L-аланина [9].

Для выявления механизма сверхсинтеза L-аланина у этого штамма и поиска путей повышения синтеза была изучена активность аланинрацемазы. Исследования показали, что по сравнению с диким типом, у штамма-продуцента *B. flavum* AA5 активность этого фермента была снижена почти на 99%.

Сопоставление полученных нами данных с приведенными в статье [10] позволило заключить, что независимо от последовательности получения ауксотрофности по D-аланину у ранее описанных D-ala⁻ штаммов *B. flavum* AA1 (ВКПМ В-3061), *B. flavum* AA2 (ВКПМ В-3062) и у штамма *B. flavum* AA5, мутация устойчивости к D,L- α -АМК не влияла на активность аланинрацемазы.

Таким образом, полученные данные подтвердили отсутствие активности аланинрацемазы у продуцентов *B. flavum*, ауксотрофных по D-аланину, в результате чего они синтезируют значительное количество L-аланина, в отличие от штамма дикого типа, содержащего этот фермент и накапливающего в среде рацемат аланина.

Для исследования влияния мутации устойчивости к D,L- α -АМК на активность аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы было изучено действие D-аланина, L-валина, D,L- α -АМК,

Таблица 1. Активности аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы у штамма дикого типа *B. flavum* ATCC 14067 и штамма-продуцента *B. flavum* AA5

Аминокислота	IC ₅₀ , мМ			
	аланин-трансаминаза		валин:пируват-трансаминаза	
	ATCC 14067	AA5	ATCC 14067	AA5
D-аланин	–	–	–	–
L-валин	–	–	–	–
D,L- α -АМК	68	68	>80	>80
L-циклосерин	1.3	2.3	4.1	3.1
β -Cl-L-аланин	0.155	0.155	>20	>20

L-циклосерина и β -Cl-L-аланина на активность ферментов в неочищенном гомогенате клеток исходного штамма *B. flavum* ATCC 14067 и *B. flavum* AA5. Данные приведены в табл. 1.

Из значений IC₅₀, приведенных в табл. 1, следует, что D,L- α -АМК, L-циклосерин и β -Cl-L-аланин ингибируют активность аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы. При этом как в случае штамма дикого типа, так и его мутанта – продуцента L-аланина, указанные вещества почти в одинаковой степени ингибировали активность ферментов.

Исходя из полученных данных, β -Cl-L-аланин был наиболее сильным ингибитором для аланин-трансаминазы, а L-циклосерин – для обеих трансаминаз.

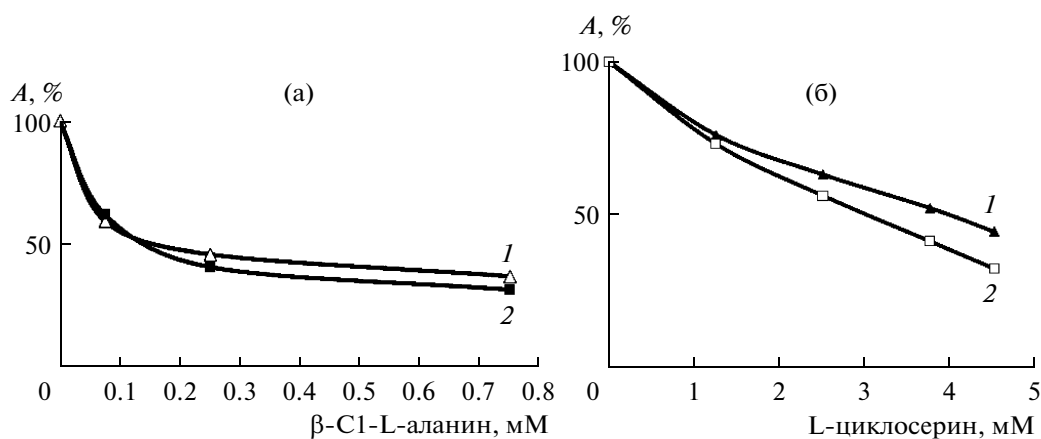
Действие β -Cl-L-аланина на активность аланин-трансаминазы представлено на рисунке (а). Действие L-циклосерина на активность валин:пируват-трансаминазы представлено на рисунке (б).

С использованием мутагена НГ, были получены мутанты штамма-продуцента *B. flavum* AA5, устойчивые к β -Cl-L-аланину. Из коллекции му-

тантов были отобраны два штамма – *B. flavum* GL1, устойчивый к 0.025 мг/мл β -Cl-L-аланина и *B. flavum* GL18, устойчивый к 0.05 мг/мл β -Cl-L-аланина, которые синтезировали около 54 и 61 г/л L-аланина, соответственно. Штаммы депонированы в Центре депонирования микробов НАН Армении под регистрационными номерами ИНМИА 11841 (*Brevibacterium flavum* GL1) и ИНМИА 11842 (*Brevibacterium flavum* GL18).

Учитывая сильный ингибирующий эффект β -Cl-L-аланина, для выяснения механизмов повышения синтеза L-аланина у новых штаммов, было изучено его влияние на активность аланин-трансаминазы у *B. flavum* GL1 и GL18. В качестве контроля в экспериментах был использован родительский штамм – *B. flavum* AA5. Показано, что у родительского штамма 50%-ное ингибирование активности этого фермента достигалось при концентрации β -Cl-L-аланина 0.16 мМ, а у штаммов-продуцентов *B. flavum* GL1 и GL18 при концентрации 1.96 мМ и более 5.0 мМ β -Cl-L-аланина соответственно.

Таким образом, у новых штаммов, устойчивых к β -Cl-L-аланину, значительно снижена степень ин-



Ингибирование активности (А, %) аланин-трансаминазы β -Cl-L-аланином (а) и валин:пируват-трансаминазы L-циклосерином (б).

1 – *B. flavum* ATCC 14067; 2 – *B. flavum* AA5.

Таблица 2. Влияние некоторых аминокислот на синтез аланин-трансаминазы у штаммов-продуцентов L-аланина (ATCC 14067, AA5, GL1, GL18)

Аминокислота	Активность аланин-трансаминазы							
	ATCC 14067		AA5		GL1		GL18	
	ед./мг	%	ед./мг	%	ед./мг	%	ед./мг	%
контроль	0.360	100.0	0.317	100.0	0.178	100.0	0.442	100.0
L-аланин, 20 мМ	0.368	102.2	0.385	121.5	0.207	116.3	0.621	140.5
D-аланин, 20 мМ	0.059	16.4	0.345	108.8	0.175	98.3	0.633	143.2
L-валин, 20 мМ	0.325	90.3	0.115	36.3	0.182	102.2	0.340	76.9
D,L- α -АМК, 20 мМ	0.382	106.1	0.255	80.4	0.425	238.8	0.342	77.4
β -Cl-L-аланин, 2 мМ	0.184	51.1	0.242	76.3	0.207	116.3	0.540	122.2

Таблица 3. Влияние некоторых аминокислот на синтез валин:пируват-трансаминазы у штаммов-продуцентов L-аланина (ATCC 14067, AA5, GL1, GL18)

Аминокислота	Активность валин:пируват-трансаминазы							
	ATCC 14067		AA5		GL1		GL18	
	ед./мг	%	ед./мг	%	ед./мг	%	ед./мг	%
контроль	0.083	100.0	0.032	100.0	0.032	100.0	0	0
L-аланин, 20 мМ	0.086	103.6	0.048	150.0	0.032	100.0	0.015	—
D-аланин, 20 мМ	0.014	16.9	0.063	196.9	0	0	0.120	—
L-валин, 20 мМ	0.104	125.3	0.023	71.9	0.035	109.4	0.047	—
D,L- α -АМК, 20 мМ	0.091	109.6	0.052	162.5	0.190	593.8	0.049	—
β -Cl-L-аланин, 2 мМ	0.027	32.5	0.033	103.1	0.088	275.0	0.100	—

гибирования аланин-трансаминазы. Это нарушение регуляции активности фермента, по-видимому, и привело к повышению синтеза L-аланина.

Синтез аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы. Было изучено влияние L-аланина, D-аланина, L-валина, D,L- α -АМК, β -Cl-L-аланина на синтез ключевых ферментов у штаммов-продуцентов L-аланина – аланин-трансаминазу и валин:пируват-трансаминазу. Учитывая, что β -Cl-L-аланин в опытах по определению активности ферментов проявлял сильное ингибирующее действие, этот аналог был использован в сравнительно низкой концентрации. Усредненные данные 5 опытов приведены в табл. 2 и 3. Анализ данных, приведенных в табл. 2, свидетельствует о том, что по сравнению со штаммом дикого типа, у которого наблюдалась репрессия аланин-трансаминазы D-аланином и β -Cl-L-аланином, у штамма-продуцента *B. flavum* AA5 репрессия D-аланином отсутствовала, сохранялась репрессия β -Cl-L-аланином и D,L- α -АМК и обнаруживалась значительная репрессия L-валином. При этом L-аланин оказывал дерепрессирующее действие.

У штамма-продуцента *B. flavum* GL1 с дополнительной мутацией устойчивости к 0.025 мг/мл

β -Cl-L-аланина, по сравнению с *B. flavum* AA5, репрессия фермента L-аланином, D-аланином, L-валином, β -Cl-L-аланином не наблюдалась. Сильное дерепрессирующее действие оказывала только D,L- α -АМК. В то же время, у *B. flavum* GL18 сохранялась репрессия D,L- α -АМК и частично была снята репрессия L-валином. Слабая дерепрессия наблюдалась β -Cl-L-аланином, а D-аланин и L-аланин оказывали значительное дерепрессирующее действие.

Таким образом, можно заключить, что устойчивость к β -Cl-L-аланину у высокопродуктивных штаммов *B. flavum* приводила к снятию репрессии синтеза аланин-трансаминазы веществами, которые или связаны с синтезом L-аланина, или являются аналогами этой аминокислоты. Дерепрессия аланин-трансаминазы в значительной степени увеличивалась в присутствии D-аланина, L-аланина, D,L- α -АМК и β -Cl-L-аланина.

У штамма дикого типа (табл. 3) наблюдалась сильная репрессия валин:пируват-трансаминазы D-аланином и β -Cl-L-аланином, как и в случае аланин-трансаминазы. У штамма-продуцента *B. flavum* AA5 мутации ауксотрофности по D-аланину и устойчивости к D,L- α -АМК привели к снятию ре-

прессии валин:пируват-трансаминазы β -Cl-L-аланином и к сильной дерепрессии D-аланином, L-аланином и D,L- α -АМК.

У штамма *B. flavum* GL1, устойчивого к β -Cl-L-аланину, наблюдалась значительная дерепрессия D,L- α -АМК, β -Cl-L-аланином и полная репрессия D-аланином. У *B. flavum* GL18 в контрольных условиях активность валин:пируват-трансаминазы не наблюдалась, на фоне чего все исследуемые вещества оказывали дерепрессирующее действие. При этом D-аланин и β -Cl-L-аланин в наибольшей степени дерепрессировали синтез валин:пируват-трансаминазы.

Таким образом, установлено, что у полученных нами высокоактивных штаммов-продуцентов *B. flavum* сверхсинтез L-аланина обусловлен нарушением биосинтеза L-аланина как на генном уровне в результате разрегуляции синтеза ферментов аланин-трансаминазы и валин:пируват-трансаминазы, так и на уровне активности этих ферментов путем снятия ингибирования конечным продуктом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kimura H., Kishi S., Shoji A., Sugisawa H., Deguch K. Proc. The 15th European Experimental NMR Conference. Leipzig: University of Leipzig, 2000. P. 12–17.
2. Ikeda M. // Adv. Biochem. Eng/Biotechnol. 2003. V. 79. P. 1–35.
3. Kumagai H., Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. The prokaryotes / Ed. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. 3 Ed. New York : Springer, 2006. V. 1. chapter 3.2. P. 756–765.
4. Алебян Г.П., Амбарцумян А.А., Папоян А.О., Алебян М.Г., Григорян А.А., Дюкова К.Г., Сагиян А.С. // Биотехнология. 2008. № 1. С. 29–45.
5. Marienhagen J., Eggeling L. // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. № 24. P. 7457–7462.
6. Kim S.H., Schneider B.L., Reitzer L. // J. Bacteriol. 2010. V. 192. № 20. P. 5304–5311.
7. Marienhagen J., Kennerknecht N., Sahm H., Eggeling L. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 22. P. 7639–7646.
8. Yoneyama H., Hori H., Lim S.J., Murata T., Ando T., Isogai E., Katsumata R. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2011. V. 75. № 5. P. 930–938.
9. Патент США. 1992. № 5124257.
10. Гайбакаян Л.Д., Аветисова Г.Е., Азизян А.Г., Амбарцумян А.А., Давтян М.А. // Биотехнология. 2003. № 1. С. 44–48.
11. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976. 438 с.
12. McGilvrey D., Umbarger H.E. // J. Bacteriol. 1974. V. 120. № 2. P. 715–723.
13. Амбарцумян А.А., Безирджян Х.О. // Биохимия. 1994. Т. 59. № 9. С. 1378–1384.
14. Peterson G.L. // J. Methods Enzymol. 1983. V. 91. P. 95–119.
15. Badet B., Roise D., Walsh C.T. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 22. P. 5188–5194.
16. Асатиани В.С. Новые методы биохимической фотометрии. М. 1965. 327 с.
17. Segal H.L., Beattie D.S., Hopper S. // J. Biol. Chem. 1962. V. 237. № 6. P. 1914–1920.

Regulation of Key Enzymes of L-Alanine Biosynthesis by *Brevibacterium flavum* Producer Strains

L. O. Melkonyan, G. E. Avetisova, A. A. Ambartsumyan, A. Kh. Chakhalyan, and A. S. Sagiyan

NPO Armbiotekhnnologiya, National Academy of Sciences of Armenia, Yerevan, 0056 Armenia

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

Received August 7, 2012

Abstract—The mechanisms of L-alanine overproduction by *Brevibacterium flavum* producer strains were studied. It was shown that β -Cl-L-alanine is an inhibitor of some key enzymes involved in the synthesis of L-alanine, including alanine transaminase and valine–pyruvate transaminase. Two highly active *B. flavum* GL1 and GL18 producer strains, which are resistant to the inhibitory effect of β -Cl-L-alanine, were obtained using a parental *B. flavum* AA5 producer strain, characterized by a reduced activity of alanine racemase ($\geq 98\%$). It was demonstrated that the increased L-alanine synthesis efficiency observed in the producer strains developed in this work is associated with the absence of inhibition of alanine transaminase by the end product of the biosynthesis reaction, as well as with the effect of derepression of both alanine transaminase and valine–pyruvate transaminase synthesis by the studied compound.

УДК 577.21

НАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ *Escherichia coli* MG1655 С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ МУТАНТОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ГИСТИДИН

© 2013 г. В. Г. Дорошенко, А. О. Лобанов, Е. А. Федорина

Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика (ЗАО "АГРИ"), Москва, 117545

e-mail: Vera_Doroshenko@agri.ru

Поступила в редакцию 14.02.2012 г.

В результате последовательных направленных модификаций хромосомы из лабораторного штамма *Escherichia coli* MG1655⁺ с известной первичной структурой получен штамм MG1655⁺*hisG*^r *hisL*⁻Δ Δ*purR*, способный продуцировать гистидин из глюкозы с весовым коэффициентом конверсии ~12%. Устойчивая к ретроингибированию АТФ-фосфорибозил-трансфераза, кодируемая мутантным аллелем *hisG*^r (E271K), явилась определяющим фактором для продукции гистидина. Дальнейшее увеличение продукции было достигнуто в результате увеличения уровня экспрессии мутантного *his* оперона, содержащего *hisG*^r, посредством удаления аттенюатора (*hisL*⁻Δ). Аналогичное увеличение экспрессии *his* оперона дикого типа к накоплению гистидина не приводило. Удаление гена транскрипционного регулятора *purR* увеличило накопление биомассы в условиях проведения ферментации, сохранив специфическую продукцию гистидина (на клетку).

DOI: 10.7868/S0555109913020037

Незаменимая аминокислота гистидин в настоящее время производится микробиологическим синтезом из глюкозы или мелассы и применяется для профилактики и лечения различных заболеваний [1, 2]. В качестве бактериальных продуцентов гистидина используют мутанты, полученные на основе *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* [1, 3].

Биосинтез гистидина, исследованный первоначально в *Salmonella typhimurium* и *E. coli* [4], во многом сходен для всех организмов его продуцирующих [5]. Путь биосинтеза гистидина из его предшественников фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ) и АТФ, образующихся в центральном метаболизме, включает десять реакций (рис. 1). Ферменты биосинтеза кодируются генами, входящими в *E. coli* в состав оперона – *hisLGDCBHAFI*. Первая из биосинтетических реакций катализируется АТФ-фосфорибозилтрансферазой (КФ 2.4.2.17) – продуктом гена *hisG*. В клетках *E. coli* фермент HisG находится в равновесии между активной димерной и неактивными формами, образованными из димеров: гексамерной и т.д. [6]. Гексамер HisG доминирует в присутствии гистидина, за счет чего происходит ретроингибирование фермента, а также в присутствии АМФ, продукта реакции фосфорибозил-АТФ, и при высоких концентрациях АТФ [6].

Кроме того, биосинтез гистидина контролируется на уровне транскрипции оперона *hisLGDCBHAFI* [5]. Инициация транскрипции регулируется гуанозин тетрафосфатом, а элонгация – механизмом

аттенюации транскрипции, реагирующим на количество аминоацелированной гистидином тРНК^{His} (рис. 2а).

Для достижения сверхсинтеза гистидина в клетке необходимо, в первую очередь, нарушить регуляцию его биосинтеза конечным продуктом – гистидином. Известные продуценты, как правило, получали генетико-селекционным путем, отбирая мутанты, способные к росту в присутствии аналогов гистидина, ингибирующих, в частности, активность HisG дикого типа (2-триазоаланин), репрессирующих транскрипцию *his* оперона, связываясь с тРНК^{His} (1,2,4-триазол-3-аланин) или ингибирующих гистидил-тРНК синтетазу (2-метилгистидин) [7–9].

Мутации, приводившие к снятию ретроингибирования HisG (*hisG*^r), были картированы в дистальной части гена *hisG* [10]. Однако данные о первичной структуре таких мутантов к началу настоящей работы отсутствовали. Мутации, нарушающие аттенюацию транскрипции *his* оперона, локализовались как непосредственно в области аттенюатора, так и в шести локусах за пределами *his* оперона [4]. В таких мутантах наблюдалось снижение общего внутриклеточного пула тРНК^{His} или была снижена эффективность ее аминоацелирования гистидином [5].

Продуктивность отобранных мутантов в дальнейшем улучшали с помощью методологии геной инженерии, вводя в клетки рекомбинантные плазмиды как с генами биосинтеза гистидина, так и с

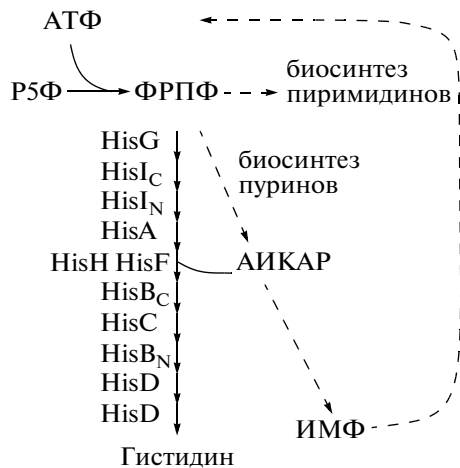


Рис. 1. Биосинтез гистидина в *E. coli*. Биосинтетические реакции обозначены по ферментам их осуществляющим. Для бифункциональных ферментов подстрочными буквами С или N обозначены карбоксильная или аминная части, осуществляющие данную реакцию. Соединения, указанные на схеме: P5Ф – рибозо-5-фосфат, ФРПФ – фосфорибозилпирофосфат, АИКАР – аминокимидазол карбоксиламид рибонуклеотид, ИМФ – инозин монофосфат.

генами ферментов, необходимых для синтеза метаболитических предшественников гистидина [1, 3].

Цель работы – получение продуцента гистидина в результате прецизионной модификации бактериального генома известной исходной структуры и исследование роли каждой модификации в достигаемом уровне продукции.

МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы *E. coli* и условия выращивания культур. Штамм MG1655^{rph⁺ilvG15}, обозначенный в работе как MG1655⁺, был предоставлен И.В. Бирюковой [11]. Штамм VKPM В-7270 был получен из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (<http://www.genetika.ru/vkpm>). Штамм BW25113Δ*hisG*::Km^r был из Кио коллекции (Япония) [12].

Клетки растили на средах LB, SOB, M9 [13]. В минимальную среду M9 добавляли гистидин – 50 мг/л, аденозин – 100 мг/л. Ампициллин добавляли до концентрации 200 мкг/мл, хлорамфеникол – до 25 мкг/мл, канамицин – до 40 мкг/мл.

Для оценки способности штаммов продуцировать гистидин проводили ферментацию в пробирках. Для этого одну петлю (3 мм) клеток со свежеработанной чашки (LB) вносили в пробирку (13 × 150 мм), содержащую 3 мл среды LB, и инкубировали с аэрацией (250 об/мин) при 30°C 3 ч. Затем по 200 мкл культуры переносили в пробирку (18 × 200 мм) с ферментационной средой следующего состава (г/л): глюкоза – 40,

CaCO₃ – 30, дрожжевой экстракт – 2, (NH₄)₂SO₄ – 16, K₂HPO₄ · 3H₂O – 0.6, FeSO₄ · 7H₂O – 0.005, MnSO₄ · 5H₂O – 0.005. Культивирование проводили при 30°C (250 об/мин) до полного потребления глюкозы (30–36 ч). Массу сухих клеток рассчитывали по оптической плотности (ОП₆₀₀): 1.0 OD₆₀₀ = 0.45 г сухих клеток/л.

Культивирование клеток штаммов MG1655⁺*hisG*^r и MG1655⁺*hisG*^r *hisL*'-Δ для протеомики проводили в колбах (0.7 л) на среде M9 с аденозином при 200 об/мин, 37°C.

Конструирование штаммов. Мутация *hisG*^r из штамма VKPM В-7270 была введена в клетки MG1655⁺ в две стадии с помощью P1 трансдукции [14]. Первоначально ген *hisG* инактивировали, замещая на Δ*hisG*::Km^r из BW25113Δ*hisG*::Km^r. Штамм MG1655⁺Δ*hisG*::Km^r не рос на среде M9 без добавления гистидина. Замещение Δ*hisG*::Km^r на *hisG*^r восстанавливало рост на минимальной среде. Модификация аттенюатора *his* оперона, обозначенная как *hisL*'-Δ, и делеция гена *purR* были получены с помощью системы Red фага λ [15] с модификациями [16]. В требуемое место хромосомы с замещением необходимой последовательности интегрировали фрагмент, полученный с помощью полимеразной цепной реакции. Интегрированный фрагмент содержал ген *cat* (маркер Cm^r), фланкированный *attL* и *attR* бактериофага λ, и в случае *hisL*'-Δ та же последовательность сопряжения *trpED* (рис. 2б). Интеграцию проводили в клетках, предварительно трансформированных плазмидой rKD46, любезно предоставленной проф. Ваннером (США). Маркер Cm^r удаляли с помощью сайт-специфической рекомбиназы фага λ. После удаления Cm^r маркера оставался *attB* (см. рис. 2б, например). Для амплификации интегрированных фрагментов в качестве матрицы использовали плазмиду pMW118-λ*attL*-Cm^r-λ*attR*. Фрагмент для *hisL* получали в результате двух последовательных ПЦР, используя праймер 1 (5'-ATTACAGAGACTTTTATGACACGCGTTCAATTAAACGCTCAAGTTAGTATAAAAAGCTGA-3') и праймер 2 (5'-GTC-TGTCATCAGAAAGTCTCCTGTGAAGCCTGCTT-TTTTATACTAAGTTG-3') в первой реакции, праймеры 1 и 3 (5'-CTGCATAGCTATGCGTAAACGAGTGTGTCTGTTCATCAGAAAGTCTCCTG-3') во второй реакции.

Все проведенные модификации бактериальной хромосомы подтверждали секвенированием.

Определение концентрации гистидина. Концентрации гистидина в культуральной жидкости определяли с помощью тонкослойной хроматографии [17], используя оборудование фирмы “САМАГ” (Швейцария). Разведенные образцы культуральной жидкости разделяли на пластинах Сорбфил в мобильной фазе: изопропанол–ацетон – 25%-ный водный аммиак – вода, 12.5 : 12.5 : 3 : 2 (v/v). После

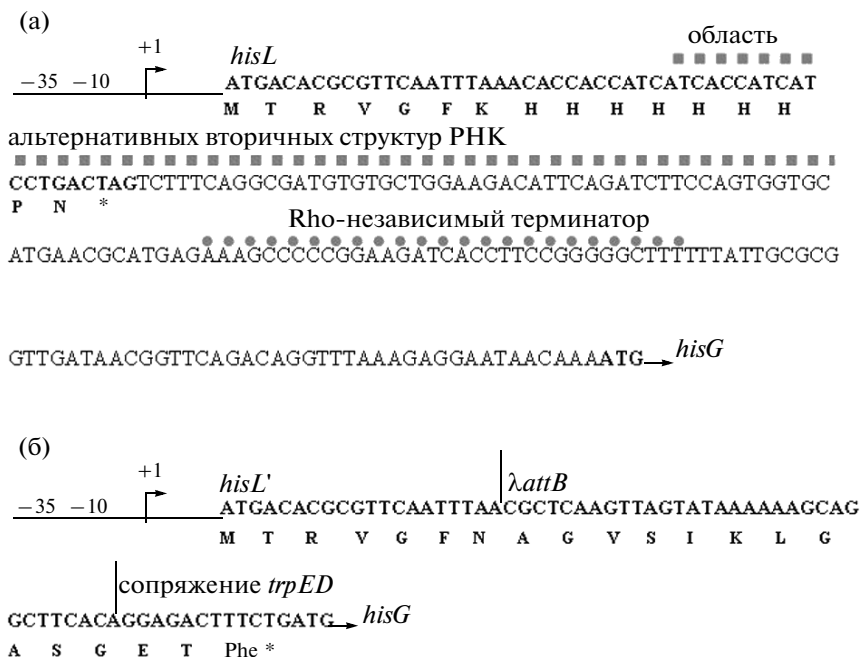


Рис. 2. Последовательности ДНК лидерного пептида *hisL* и аттенюатора, включающего область вторичных структур РНК и Rho-независимый терминатор транскрипции, *his* оперона *E. coli* (а) и их модификация, проведенная в данной работе (б).

окрашивания в растворе нингидрина (1%) в ацетоне концентрацию гистидина определяли количественным денситометрированием пластины.

Активность АТФ-фосфорибозилтрансферазы. Определяли в клеточных экстрактах по методике [18].

Получение протеомных профилей и их анализ. Получение водорастворимой фракции клеточных белков, их 2-мерное разделение по изоэлектрической точке и молекулярному весу, используя систему Ettan IPGphor “Amersham Pharmacia” (США), а также масс-спектрометрический анализ белковых образцов в Протеомном исследовательском центре Института биомедицинской химии РАН (Москва) проводились, как описано ранее [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для конструирования продуцента гистидина использовали штамм MG1655⁺ с улучшенными ростовыми характеристиками по сравнению с MG1655, который содержал прецизионно реконструированные аллели генов *rph* и *ihvG* [12]. Донором мутантного гена *hisG^r*, кодирующего устойчивую к ретроингибированию гистидином АТФ-фосфорибозилтрансферазу [19], служил штамм *E. coli* VKPM В-7270. Нуклеотидная последовательность гена *hisG^r*, а также расположенных перед ним участков промотора и аттенюатора была

определена в данной работе. Относительно известной последовательности MG1655 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/U00096>) последовательность из VKPM В-7270 содержала единичную нуклеотидную замену в кодирующей части *hisG*, которая приводила к замене E271K в С-концевой части белкового продукта, имеющего общую длину 299 аминокислотных остатков. Обнаруженная замена была удалена от остатков N232 и T252, которые участвовали в связывании с гистидином [6]. С другой стороны, замена E271K локализовалась между остатками V268 и L273, принимающими участие в формировании неактивного гексамерного комплекса HisG. Предположительно, замена E271K повышала устойчивость HisG к ретроингибированию из-за снижения вероятности формирования неактивного гексамера, стабилизированного гистидином.

Мутантный ген *hisG^r* был перенесен в MG1655⁺ и секвенирован. Штамм MG1655⁺ *hisG^r*, в отличие от исходного MG1655⁺ с геном *hisG* дикого типа, накапливал гистидин в среде культивирования (табл. 1).

Дальнейшее повышение уровня продукции гистидина могло быть достигнуто в результате удаления аттенюатора мутантного *hisLG^rDCBHAFI* оперона. Чтобы обеспечить оптимальную трансляцию гена *hisG^r*, использовался вариант, ранее предложенной стратегии конструирования оперонов с трансляционно-сопряженными генами [20]. Как

Таблица 1. Продукция гистидина для штаммов, полученных в работе (средние значения от трех экспериментов)

Генотип штамма MG1655 ⁺	Клетки, г/л	Гис, г/л	Спец. продукция Гис, мг/г сухих клеток	Гис/глюкоза, %
<i>hisG</i>	18.3 ± 2.0	<0.05	–	–
<i>hisG^r</i>	11.3 ± 0.8	0.2 ± 0.1	20 ± 10	0.5
<i>hisG^r hisL'-Δ</i>	6.3 ± 1.5	2.7 ± 0.2	430 ± 50	6.8
<i>ΔhisL'-Δ</i>	18.5 ± 1.5	<0.1	–	–
<i>hisG^r hisL'-Δ ΔpurR</i>	10.8 ± 2.0	4.9 ± 0.5	450 ± 50	12.3

Таблица 2. Относительные уровни белков *his* оперона, идентифицированные на 2D-электрофореграммах (см. рис. 3)

Штамм	Оптическая интенсивность пятна относительно всех пятен того же 2D-ПААГ						
	HisG	HisD	HisC	HisH	HisA	HisF	HisI
MG1655 ⁺ <i>hisG^r</i>	0.15	0.05	0.03	0.03	0.02	0.04	0.03
MG1655 ⁺ <i>hisG^r ΔhisL'-Δ</i>	2.1	2.23	0.9	0.4	0.52	0.42	0.4

показано на рис. 2б, была создана искусственная рамка считывания *hisL'-λattB'-trpE*, начинающаяся с ATG *hisL* и соединяющаяся с открытой рамкой *hisG^r* через межцистронное сопряжение *trpED* [21]. Искусственная рамка включала проксимальную часть *hisL* до гистидиновых кодонов, последовательность *λattB*, оставшуюся после вырезания маркера Cm^r и спланированную таким образом, чтобы не создавать терминирующих кодонов в этой рамке, а также дистальную часть *trpE* (5 кодонов). Терминирующий кодон TGA *trpE* был терминирующим кодоном рамки *hisL'-λattB'-trpE*. Трансляционное сопряжение достигалось в результате перекрытия этого терминирующего кодона и ATG *hisG^r*.

Предложенная стратегия была реализована как с MG1655⁺*hisG^r*, так и с MG1655⁺. Полученные штаммы MG1655⁺*hisL'-Δ* и MG1655⁺*hisG^r hisL'-Δ* отличались по способности к росту на минимальной среде. Второй штамм стал ауксотрофом по аденозину.

Уровни синтеза белков в клетках штаммов MG1655⁺*hisG^r*, и MG1655⁺*hisG^r hisL'-Δ* были проанализированы с помощью 2D-электрофореза в ПААГ. Образцы готовили из клеток, экспоненциально растущих на среде M9 с аденозином (рис. 3). Наблюдаемый протеомный профиль для каждого из анализированных штаммов стабильно воспроизводился в двух независимых экспериментах. Среди ~1300 белковых пятен на 2D-геле для каждого из препаратов значительные изменения касались только белков, которые, по данным масс-

спектрометрии трипсиновых гидролизатов [22], являлись продуктами *his* оперона. Уровень синтеза этих белков был увеличен более чем в 10 раз для штамма с *hisL'-Δ* (табл. 2). Наблюдаемое увеличение белковых продуктов *his* оперона соответствовало данным других авторов, которые тестировали 15-кратное увеличение активности HisD после селекционно-отобранной делеции Rho-независимого терминатора в аттенюаторе *his* оперона *S. typhimurium* [4].

В экстрактах штаммов MG1655⁺, MG1655⁺*hisL'-Δ* и MG1655⁺*hisG^r hisL'-Δ* была определена удельная активность HisG. Ее значение ~100–140 ед/(мг кл. белка) для штаммов, содержащих *hisL'-Δ* более чем в 10 раз превышало значение удельной активности АТФ-фосфорибозилтрансферазы клеточного экстракта штамма MG1655⁺. В экстрактах MG1655⁺ *hisL'-Δ* активность HisG была чувствительна к ингибированию: добавление гистидина (0.25 мМ) снижало активность на 85%. В этих же условиях фермент HisG^r из MG1655⁺*hisG^r hisL'-Δ* сохранял более 80% активности.

Штаммы MG1655⁺ *hisL'-Δ* и MG1655⁺*hisG^r hisL'-Δ* проверяли на способность к накоплению гистидина. Как видно из табл. 1, штамм MG1655⁺ *hisL'-Δ* не продуцировал гистидин. В то же время, MG1655⁺*hisG^r hisL'-Δ* существенно превосходил по продукции гистидина своего предшественника, MG1655⁺*hisG^r*, даже при сниженной способности к росту в этих условиях.

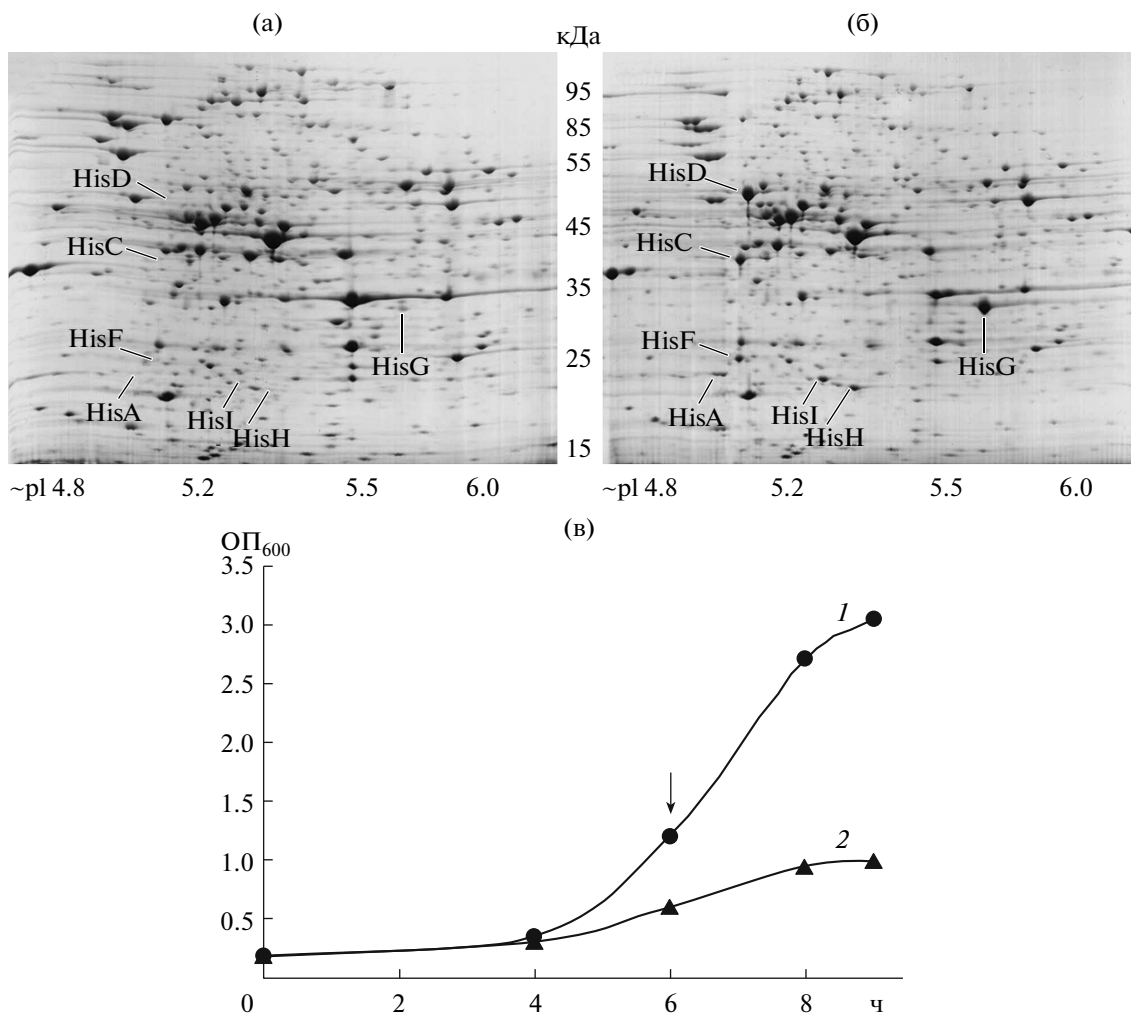


Рис. 3. Протеомные карты клеток MG1655⁺hisG⁺ (а) и MG1655⁺hisG⁺ΔhisL (б), отобранных в точке, указанной на кривых роста этих штаммов (в).

На (а) и (б) стрелками показаны пятна белков *his* оперона.

(в) MG1655⁺hisG⁺ (1) и MG1655⁺hisG⁺ΔhisL (2)

Добавление аденозина (0.1 г/л) в ферментационную среду, которая исходно была лимитирована по пуринам, содержащимся только в дрожжевом экстракте, увеличивало накопление биомассы штамма MG1655⁺hisG⁺hisL'-Δ на 30%, но при этом примерно на 30% снижалось количество гистидина, накапливаемого в среде культивирования. Добавляемый аденозин мог оказывать негативное влияние на биосинтез гистидина после превращения в гипоксантин, который является индуктором транскрипционного регулятора PurR [23]. Являясь одним из глобальных регуляторов клеточного метаболизма *E. coli*, PurR сложным образом вовлечен в регуляцию биосинтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, с которым биосинтез гистидина связан как через общий предшественник ФРПФ, так и через метаболический интермедиат – аминоконидазол карбоксиламид ри-

бонуклеотид (АИКАР) (рис. 1). В частности, сам синтез ФРПФ, катализируемый продуктом гена *purS*, репрессирован PurR [24]. Для проверки предположения о негативном влиянии PurR на биосинтез гистидина в хромосому штамма MG1655⁺hisG⁺hisL'-Δ ввели делецию гена *purR*. Как видно из табл. 1, штамм MG1655⁺hisG⁺ΔhisL'-ΔΔ*purR* увеличил накопление биомассы и гистидина по сравнению с предшественником MG1655⁺hisG⁺hisL'-Δ. При этом, специфическая продукция (на единицу биомассы) не изменилась, что, вероятно, отражает способность клеток, содержащих мутации *hisG⁺* и *hisL'-Δ*, синтезировать гистидин.

Полученный таким образом штамм с известной структурой генома может быть использован в дальнейших экспериментах по метаболической инженерии с целью повышения выхода гистидина.

Авторы выражают благодарность за помощь в получении протеомных профилей Ермишеву В.Ю. (ЗАО “АГРИ”). Авторы крайне признательны Машко С.В. (ЗАО “АГРИ”) за ценные замечания, а также Шакулову Р.С. (ФГУП ГосНИИ Генетика) за консультацию по ходу работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ikeda M. // Adv. Biochem. Engin. // Biotechnol. 2003. V. 76. P. 1–36.
- Kopple J.D., Swendseid M.E. // J. Clin. Invest. 1975. V. 55. № 5. P. 881–891.
- Klyachko E.V., Shakulov R.S., Kozlov Yu.I. Патент США. 2008. № 7399618 B2.
- Brenner M., Ames B.N. Metabolic Pathways, V. 5. / Ed. H.J. Vogel. N.Y.: Acad. Press, 1971. P. 349–387.
- Winkler M.E., Ramos-Montañez S. Chapter 3.6.1.9, Biosynthesis of Histidine. In *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. <http://www.ecosal.org>. Washington, DC: ASM Press, 2009.
- Lohkamp B., McDermott G., Campbell S.A., Coggins J.R., Lapthorn A.J. // J. Mol. Biol. 2004. V. 336. № 1. P. 131–144.
- Kubota K., Kamijo H., Mihara O., Okumura S., Mihara O., Okada H. Патент США. 1975. № 3875001.
- Kisumi M., Nakanishi N., Takagi T., Chibata I. // Appl. Environ. Microbiol. 1977. V. 34. № 5. P. 465–472.
- Mizukami T., Hamu A., Ikeda M., Oka T., Katsumata R. // Biosci. Biotech. Biochem. 1994. V. 58. № 4. P. 635–638.
- Hoppe H., Johnston M., Biek D., Roth J.R. // Genetics. 1979. V. 92. № 1. P. 17–26.
- Бирюкова И.В., Крылов А.А., Киселёва Е.М., Минаева Н.И., Машко С.В. // Генетика. 2010. Т. 46. № 3. С. 349–55.
- Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. // Mol. Systems Biol. 2006. V. 2. doi: 10.1038/msb4100050.
- Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 3 ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.
- Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972.
- Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
- Doroshenko V.G., Tsyrenzhapova I.S., Krylov A.A., Kiseleva E.M., Ermishev V.Y., Kazakova S.M., Biryukova I.V., Mashko S.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 88. № 6. P. 1287–1295.
- Krasikov V.D., Malakhova I.I., Degterev E.V., Tyaglov B.V. // J. Planar Chromatogr. 2004. V. 17. № 1. P. 113–122.
- Voll M.J., Appela E., Martin R.G. // J. Biol. Chem. 1967. V. 242. № 8. P. 1760–1767.
- Аствацатуряни Г.В., Лисенков А.Ф., Смирнов Ю.В., Шакулов Р.С. // Генетика. 1988. Т. 24. № 10. С. 1928–1934.
- Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М., Зиленков Д.В., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2009. Т. 43. № 3. С. 1–11.
- Oppenheim D., Yanofsky C. // Genetics. 1980. V. 95. № 4. P. 785–795.
- Говорун В.М., Мошковский С.А., Тихонова О.В., Гоуфман Е.И., Серебрякова М.В., Момыналиев К.Т., Лохов П.Г., Хряпова Е.В., Кудрявцева Л.В., Смирнова О.В., Торпыгин И.Ю., Максимов Б.И., Арчаков А.И. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 1. С. 42–49.
- Cho B.K., Federowicz S.A., Embree M., Park Y.S., Kim D., Palsson B.Ø. // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39. № 15. P. 6456–6464.
- He B., Choi K.Y., Zalkin H. // J. Bacteriol. 1993. V. 175. № 11. P. 3598–3606.

The Directed Modification of *Escherichia coli* MG1655 to Obtain Histidine-Producing Mutants

V. G. Doroshenko, A. O. Lobanov, and E. A. Fedorina

Ajinomoto Genetika Research Institute (CJSC AGRI), Moscow, 117545 Russia

e-mail: Vera_Doroshenko@agri.ru

Received February 14, 2012

Abstract—Strain MG1655⁺*hisG^f hisL^{-Δ}, purR*, which produces histidine with a weight yield of approximately 12% from glucose, was constructed through directed chromosomal modifications of the laboratory *Escherichia coli* strain MG1655⁺, which has a known genome sequence. A feedback-resistant ATP-phosphoribosyl transferase encoded by the mutant *hisG^f* (E271K) was the main determinant of histidine production. A further increase in histidine production was achieved by the expression enhance of a mutant *his* operon containing *hisG^f* through the deleting attenuator region (*hisL^{-Δ}*). An increase in the expression of the wild-type *his* operon did not result in histidine accumulation. Deletion of the transcriptional regulator gene *purR* increased the biomass produced and maintained the level of histidine production per cell under the fermentation conditions used.

УДК 577.15

НОВЫЕ НАДФН-СПЕЦИФИЧНЫЕ L-АСПАРТАТ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ МЕЗОФИЛЬНЫХ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ *Rhodopseudomonas palustris* И *Bradyrhizobium japonicum*

© 2013 г. Т. М. Куваева, Ж. И. Каташкина, А. Д. Киверо, С. В. Смирнов

Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика, Москва, 117545, e-mail: Tatiana_Kuvaeva@agri.ru

Поступила в редакцию 12.04.2012 г.

Гены предполагаемых L-аспартат дегидрогеназ (КФ 1.4.1.21, АДГ) из мезофильных азотфиксирующих бактерий *Rhodopseudomonas palustris* и *Bradyrhizobium japonicum* были клонированы и экспрессированы в *Escherichia coli*. Соответствующие ферменты, в виде гибридных белков с N-концевой гексагистидиной меткой, были очищены до гомогенного состояния. Оба фермента *in vitro* катализировали восстановительное аминирование оксалоацетата до L-аспартата на порядок быстрее, чем обратную реакцию при соответствующих оптимальных pH 8.0–9.0 и 9.8; при этом ферменты катализировали только аминирование при физиологических условиях (pH 7.0–8.0). Их специфичность к НАДФН была на 1–2 порядка больше, чем к НАДН. Значения кажущихся констант K_M по оксалоацетату, аммонию и НАДФН при pH 9.0 для АДГ из *R. palustris* составили 9.2, 11.3 и 0.21 мМ соответственно, а для АДГ из *B. japonicum* – 21, 4.3 и 0.032 мМ. Аминирующая активность новых АДГ может быть важна для фиксации неорганического азота *in vivo* и использована для создания бактериального штамма-продуцента L-аспартата методами метаболической инженерии.

DOI: 10.7868/S0555109913010108

В настоящее время L-аспарагиновая кислота (L-Асп) находит широкое применение в пищевой и химической промышленности, а также медицине. Основная часть L-Асп, производимого в мире за 1 г. (около 7000 тонн), используется для синтеза аспартама – низкокалорийного сахарозаменителя, входящего в состав более чем 6 тыс. пищевых продуктов [1]. Соли калия и магния L-Асп применяются для лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний [2]. Кроме того, они входят в состав лекарственных препаратов, используемых для лечения печеночной энцефалопатии [3]. Для химической промышленности L-Асп является перспективной “технологической платформой” для синтеза биodeградируемых полимеров, аспарагинового ангидрида и аминированных аналогов таких мировых химических “бестселлеров”, как 1,4-бутандиол, тетрагидрофуран и гамма-бутиролактон, используемых в производстве растворителей, ПАВ, ингибиторов коррозии и супер-абсорбирующих полимеров [4].

Сокращения: АДГ – L-аспартат дегидрогеназа; L-Асп – L-аспарагиновая кислота; L-Глу – L-глутаминовая кислота; ОА – оксалоацетат; ААТ – аспартат аминотрансфераза; ГлС – глутамат синтаза; Гс – глутамин синтаза; ГДГ – глутамат дегидрогеназа; АДГ_{ma} – АДГ из *Thermotoga maritima*; АДГ_{afu} – АДГ из *Archaeoglobus fulgidus*; АДГ_{reu} – АДГ из *Ralstonia eutropha*; АДГ_{рае} – АДГ из *Pseudomonas aeruginosa*; АДГ_{гра} – АДГ из *Rhodopseudomonas palustris*; АДГ_{hja} – АДГ из *Bradyrhizobium japonicum*; Гис – гистидин; Арг – аргинин; Иле – изолейцин; Про – пролин; ОРС – открытая рамка считывания; Ар – ампициллин; ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид; α-кГ – α-кетоглутарат; ФЕП – фосфоенолпируват.

Промышленное производство L-Асп основано на ферментативном аминировании фумаровой кислоты с использованием иммобилизованного фермента аспартазы или иммобилизованных бактериальных клеток с высокой аспартазной активностью. Кроме того, L-Асп получают из малеиновой кислоты в мембранной реакторной системе с использованием бактериальных клеток с высокими активностями малеат изомеразы и аспартазы [5]. В обоих случаях, в качестве исходного сырья, используются продукты переработки нефти (фумарат, малеат), что существенно ограничивает перспективы развития данной технологии ввиду исчерпаемости мировых углеводородных ресурсов и, как следствие, неизбежного роста цен на нефтепродукты. Кроме того, на пищевом рынке наблюдается активное продвижение “натуральных продуктов” (natural foods), содержащих исключительно “биогенные” компоненты.

В этой связи микробиологический синтез L-Асп из возобновляемых и дешевых углеводов (по аналогии с известными примерами биотехнологического производства L-глутаминовой кислоты (L-Глу), L-лизина, и т.д. [6, 7]) мог бы стать перспективной альтернативой современному производству L-Асп из субстратов, получаемых из нефти.

Аэробный синтез L-Асп можно разделить на две принципиальные части: синтез оксалоацетата (ОА) из глюкозы и ассимиляцию азота посредством аминирования ОА (рис. 1). В клетках *E. coli*

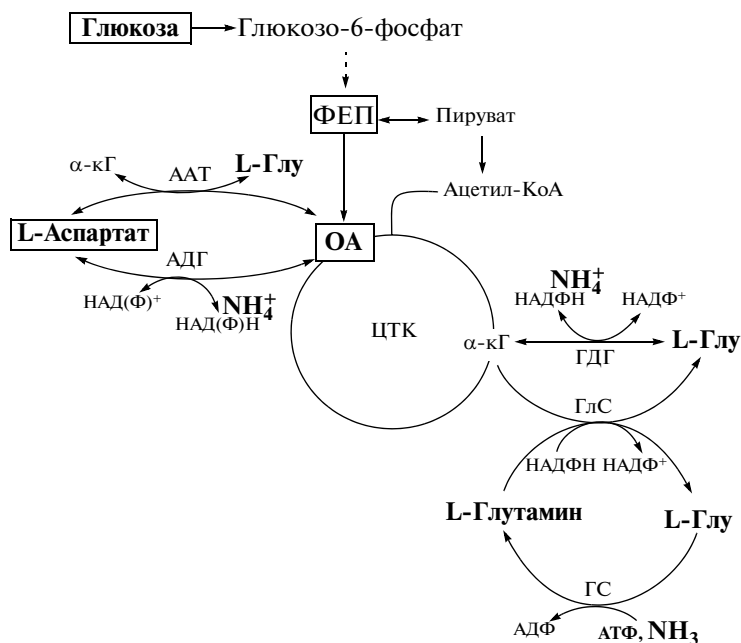


Рис. 1. Схема биосинтеза L-Асп в клетках *E. coli* дополненная путем аминирования ОА с помощью АДГ. ОА рассматривается как продукт карбоксилирования фосфоенолпирувата (ФЕП), синтезированного в гликолизе. Встраивание азота в молекулу L-Асп рассматривается тремя путями с помощью ААТ/ГС/ГлС, ААТ/ГДГ или АДГ.

аминирование ОА осуществляет аспарат аминотрансфераза (ААТ) путем переноса аминогруппы с L-Глу; тогда как неорганический азот может фиксироваться в молекуле L-Глу благодаря активности глутамат синтазы (ГлС) и глутамин синтазы (Гс) или глутамат дегидрогеназы (ГДГ) [8]. Принято считать [9, 10], что задача биосинтеза L-Асп значительно упрощается, если для аминирования ОА использовать не ферменты метаболизма L-Глу, а аспарат дегидрогеназу (АДГ) (рис. 1).

На данный момент охарактеризованы только 4 прокариотические АДГ, для которых *in vitro* показан катализ как окислительного дезаминирования L-Асп, так и восстановительного аминирования ОА с использованием НАД(Ф)⁺/НАД(Ф)Н в качестве кофактора [10–13]. Однако *in vivo* основной функцией термофильных АДГ из *Thermotoga maritima* (АДГ_{тма}) и *Archaeoglobus fulgidus* (АДГ_{афу}) является, по-видимому, катализ окислительного дезаминирования L-Асп до промежуточного продукта реакции – иминоаспартата, который далее используется в пути биосинтеза НАД⁺ de novo [12, 13]. АДГ из мезофильной почвенной бактерии *Ralstonia eutropha* (АДГ_{реу}), по-видимому, *in vivo* участвует в катаболизме L-Асп для обеспечения клеток азотом и углеродом [11]. Биологическая роль недавно обнаруженной АДГ в клетках мезофильной бактерии, *Pseudomonas aeruginosa*, (АДГ_{рае}) не установлена, тем не менее в экспериментах Ли и соавт. [10] удалось использовать способность этого фермента аминировать

ОА в разработанных авторами системах биоконверсии фумарата или сукцината до L-Асп. Однако возможность использования гена АДГ_{рае} для конструирования промышленного продуцента L-Асп ограничена тем, что *P. aeruginosa* является условным патогеном для человека и относится к группе второго уровня биологической безопасности.

Цель работы – поиск и характеристика “биосинтетических” (аммонийфиксирующих) АДГ в бактериях первого уровня биологической безопасности для дальнейшего конструирования штаммов-продуцентов L-Асп методами метаболической инженерии.

МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы, плазмиды, среды и реактивы. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные и (или) сконструированные в данной работе, представлены в табл. 1.; химические реактивы фирмы “Sigma” (США), за исключением L-аминокислот полученных от компании “Ajinomoto” (Япония).

ДНК-манипуляции. Манипуляции с ДНК проводили по стандартным методикам [14] с использованием коммерчески доступных ферментов (“Fermentas”, Литва; “Promega”, США).

Конструирование плазмид. Гибридные гены, кодирующие изучаемые АДГ из *R. palustris* и *V. japonicum* и слитые с лидерной последовательностью, кодирующей N-концевую Гис₆-метку,

Таблица 1. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные или сконструированные в данной работе

Штамм или плаزمид*	Генотип, характеристика	Источник, ссылка
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B - m _B -) <i>lon gal λ</i> (DE3)	“Novagen” (США); [15]
<i>E. coli</i> TG1	Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>supE thi hsdΔ5 F' traΔ36 proA⁺ B⁺ lacI^q lacZΔM15</i>	ВКПМ**
pET-15b	Экспрессионный вектор для системы с T7 РНК-полимеразой; Ap ^R	“Novagen” (США)
pPCRScrip _t _ADH1-Rp	Источник RPB_0147 ОРС <i>R. palustris</i> с замененными редкими кодонами и Гис ₆ сигналом; Ap ^R	“Sloning BioTechnology GmbH” (Германия)
pSlo3.1A_2_ADH-Bj	Источник bl16567 ОРС <i>B. japonicum</i> с замененными редкими кодонами и Гис ₆ сигналом; Ap ^R	“Sloning BioTechnology GmbH” (Германия)
pET15-ADH-Rp	pET-15b с клонированной RPB_0147 ОРС <i>R. palustris</i> с замененными редкими кодонами и Гис ₆ сигналом; Ap ^R	Данная работа
pET15-ADH-Bj	pET-15b с клонированной bl16567 ОРС <i>B. japonicum</i> с замененными редкими кодонами и Гис ₆ сигналом; Ap ^R	Данная работа

* Штаммы *E. coli* культивировали аэробно при 37°C в среде LB [14]. Для селекции и поддержания плазмидосодержащих клеток их культивирование проводили в присутствии 200 мг/л ампициллина (Ap).

** ВКПМ – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (Москва).

были химически синтезированы “Sloning BioTechnology GmbH” (Германия). Поскольку структурные части исследуемых нативных генов содержали редко используемые в *E. coli* кодоны, при химическом синтезе искусственных генов было решено заменить эти кодоны синонимическими, часто встречающимися в геноме *E. coli* (AGG^{Arg} → CGU^{Arg}, AGA^{Arg} → CGU^{Arg}, AUA^{Ile} → AUC^{Ile}, CCC^{Pro} → CCG^{Pro}). Для этого в последовательность открытой рамки считывания (ОРС) RPB_0147 (NCBI GeneID:3908117) из генома *R. palustris* были введены следующие нуклеотидные замены: G15T, G162T, A235C, G237C, A277C, G279T, G435T, G702T, C741G, G807T. Аналогичной модификации подверглась ОРС bl16567 (NCBI GeneID:1050893) из генома *B. japonicum*: A7C, A9T, A10C, G12T, C153G, C501G, C765G. Фрагменты ДНК, содержащие синтетические гены, фланкированные сайтами рестрикции *Xba*I и *Vam*NI, были химически синтезированы, а затем клонированы в составе вектора pET15(b) по сайтам *Xba*I и *Vam*NI. Первичная структура ДНК синтетических гибридных генов в составе сконструированных плазмид pET15-ADH-Rp и pET15-ADH-Bj была подтверждена секвенированием с использованием праймеров Pr1 (5'-AGCAACCGCACCTGTGGCGC-3') и Pr2 (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'), синтезированных в ЗАО “Синтол” (Россия).

Очистка и определение активности АДГ. Клетки штаммов *E. coli* BL21(DE3)[pET15-ADH-Rp] и BL21(DE3)[pET15-ADH-Bj], содержащие ген РНК полимеразы фага T7 под контролем промотора P_{lacUV5} в хромосоме, а гены исследуемых АДГ под контролем промотора, узнаваемого РНК полимеразой T7, в составе рекомбинантных плазмид, выращивали в колбах (5 × 200 мл) в среде LB с добавлением ампициллина (Ap) до D₅₉₅ = 1. Синтез це-

левых белков индуцировали добавлением 1 мМ изо-пропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) и продолжали культивирование в течение 3 ч. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в буфере № 1 (20 мМ фосфат натрия, рН 7.0, 0.5 мМ NaCl, 20 мМ имидазол) и разрушали с помощью Френч-пресса (P = 2000 psi). Клеточные обломки и остатки неразрушенных клеток удаляли центрифугированием. Из полученного супернатанта выделяли целевые белки с помощью металл-хелатной хроматографии на колонке HisTrap HP согласно рекомендациям производителя (“GE Healthcare”, Великобритания). Элюированные имидазолом целевые белки переводили в буфер А (20 мМ фосфат натрия, рН 7.0, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА, 15% глицерина) с помощью гель-хроматографии на колонке PD10 (“GE Healthcare”, Великобритания) и хранили при -70°C.

Смесь для АДГ_{гра} или АДГ_{бja} в реакции аминирования содержала 0.1 М трис-НСl, рН 9.0, 0.15 мМ НАДФН, 100 или 50 мМ NH₄Cl и 20 или 30 мМ ОА соответственно. Смесь для АДГ_{гра} или АДГ_{бja} в реакции дезаминирования содержала 0.1 М трис-НСl, рН 9.8, 1 или 2 мМ НАДФ⁺ и 40 или 100 мМ L-Асп соответственно. Реакции инициировали добавлением субстрата (ОА или L-Асп). Контрольное измерение проводили в отсутствие NH₄Cl в реакции аминирования и без L-Асп в реакции дезаминирования. За единицу активности фермента принимали количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль НАДФН за 1 мин при 28°C. Для расчета активности использовали коэффициент поглощения НАД(Ф)Н при 340 нм, равный 6.22 мМ⁻¹ см⁻¹.

Оптимальные значения рН для очищенных АДГ определяли с использованием следующих буферов: 0.1 М MES-NaOH (рН от 6.0 до 7.0), 0.1 М трис-НСl

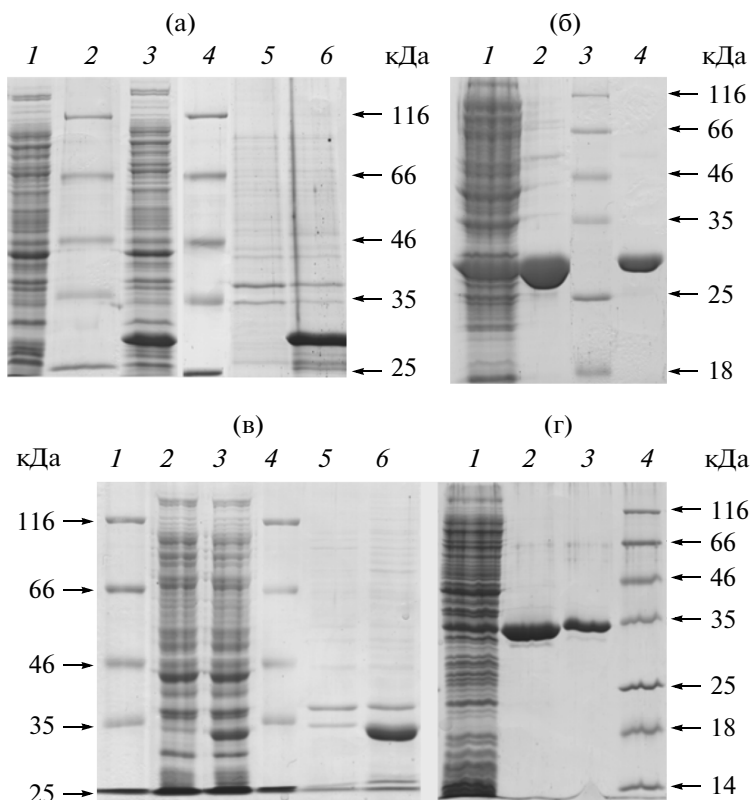


Рис. 2. Биосинтез и очистка рекомбинантных АДГ_{гра} и АДГ_{бja}; а – клеточные экстракты индуцированных ИПТГ штаммов BL21(DE3)[pET15-ADH-Rp] и BL21(DE3)[pET15b], контроля; 1, 3 – растворимая фракция контрольного и опытного штамма, 2, 4 – белковые маркеры молекулярных масс, 5, 6 – нерастворимая фракция контрольного и опытного штамма; б – очистка His₆-АДГ_{гра}; 1 – растворимая фракция клеточного экстракта BL21(DE3)[pET15-ADH-Rp], 2, 4 – очищенный His₆-АДГ_{гра} (12 и 3 мкг), 3 – маркеры; в – клеточные экстракты индуцированных ИПТГ штаммов BL21(DE3)[pET15-ADH-Bj] и BL21(DE3)[pET15b], контроля; 1, 4 – маркеры, 2, 3 – растворимая фракция контрольного и опытного штамма, 5, 6 – нерастворимая фракция контрольного и опытного штамма; г – очистка His₆-АДГ_{бja}; 1 – растворимая фракция клеточного экстракта BL21(DE3)[pET15-ADH-Bj], 2, 3 – очищенный His₆-АДГ_{бja} (5 и 2 мкг), 4 – маркеры.

(рН от 7.0 до 9.8) и 0.05 М глицин-NaOH (рН от 8.1 до 12.0) с добавлением 100 мМ NH₄Cl, 0.15 мМ НАДФН и 20 мМ ОА в реакции аминирования или с добавлением 2 мМ НАДФ⁺ и 10 мМ L-Асп в реакции дезаминирования. Исследование субстратной специфичности очищенных ферментов проводили в присутствии 20 мМ кетокислот (пируват, α-кетоглутарат (α-кГ), α-кетобутират, кетоизовалериат и кетометилвалериановая кислота) для реакции аминирования (100 мМ NH₄Cl, 0.15 мМ НАДФН, 0.1 М трис-HCl, рН 9.0) или 20 мМ аминокислот (L-Глу, L-аланин, α-аминобутират, L-валин, L-изолейцин и аспаргин) для реакции дезаминирования (2 мМ НАДФ⁺, 0.1 М трис-HCl, рН 9.8).

Значения кажущихся констант K_M находили с помощью регрессионного анализа соответствующих кривых насыщения для исследованных субстратов и кофакторов с использованием программы Sigma Plot 8.0. Значения $k_{кат}$ и $k_{кат}/K_M$ рассчитывали

с учетом молекулярных масс ферментов: в 30.63 кДа для His₆-АДГ_{гра} и 30.76 кДа для His₆-АДГ_{бja}.

Аналитические методы. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [16] с использованием БСА в качестве стандарта. Белковый денатурирующий электрофорез в 10–12% ПААГ выполняли по методу Лэммли [17]. Определение ОА, образовавшегося в ферментативной реакции, проводили методом капиллярного электрофореза [18]. Для определения L-Асп и ионов аммония (NH₄⁺), образовавшихся в ферментативных реакциях, использовали метод ВЭЖХ [19, 20]. Реакционная смесь для аминирования ОА содержала 0.1 М трис-HCl, рН 9.0, 2 мМ НАДФН, 100 мМ NH₄Cl, 20 мМ ОА и 1 мкл очищенного фермента АДГ; через 0 или 20 мин инкубации при 28°C реакцию останавливали путем охлаждения смеси до 0°C. Реакционная смесь для дезаминирования L-Асп содержала 0.05 М трис-HCl, рН 9.8, 5 мМ

Таблица 2. Очистка рекомбинантных АДГ_{гра} и АДГ_{бja} из *E. coli*

Фермент	Этап очистки	Общий белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность*, Е/мг	Выход, %	Степень очистки, раз
АДГ _{гра}	Клеточный экстракт	48	30.2	0.62	100	1
	Аффинная хроматография	1.8	5.7	3.1	19	5
АДГ _{бja}	Клеточный экстракт	95	14.1	0.15	100	1
	Аффинная хроматография	1.8	7.5	4.2	53	28

* Активность определяли при 28°C в окислительной реакции (0.1 М трис-НСl, рН 9.8, 2 мМ НАДФ⁺, 10 мМ L-Асп).

НАДФ⁺, 40 мМ L-Асп и 10 мкл очищенного фермента АДГ; через 0 или 90 мин инкубации при 28°C реакцию останавливали путем охлаждения смеси до 0°C.

[12] по базе данных NCBI был проведен с помощью компьютерной программы BLASTP (<http://ncbi.nlm.nih.gov>). Была обнаружена группа гомологичных ОРС предполагаемых АДГ в геномах азотфиксирующих бактерий, что, в частности, могло свидетельствовать о наличии дополнительного пути фиксации аммония в результате биосинтеза L-Асп в этих микроорганизмах. К тому же согласно современной модели углеродного и азотного обмена между симбиотическими бактериями и растениями, L-Асп наряду с аммонием и L-аланином, об-

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск анаболических АДГ в геномах мезофильных бактерий и экспрессия соответствующих генов в *E. coli*. Поиск гомологов охарактеризованной термофильной АДГ_{tma} (NCBI protein_id:NP_229443.1)

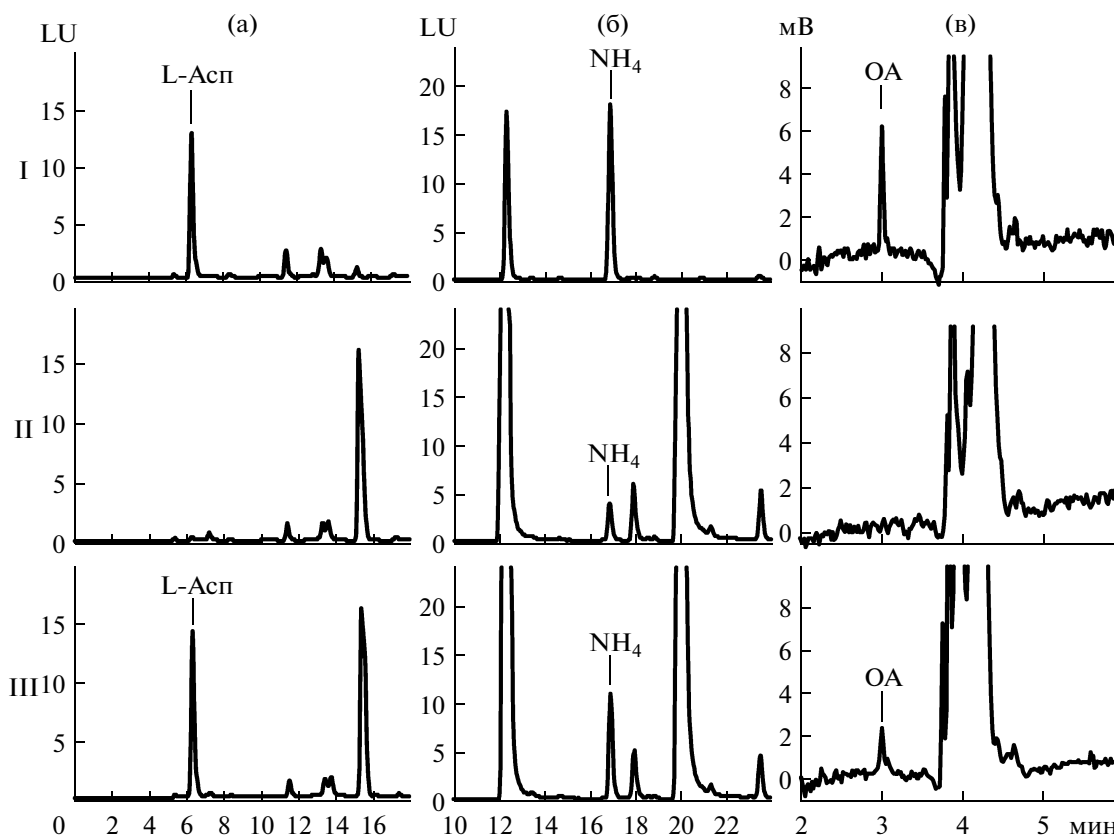


Рис. 3. Определение продуктов реакции методом ВЭЖХ и капиллярного электрофореза. Ферментативное образование L-Асп (а), NH₄⁺ (б) и ОА (в); I – стандарты L-Асп и NH₄⁺ в водном растворе, стандарт ОА в растворе реакционной смеси без фермента; II – стартовая реакционная смесь (аналогичная картина наблюдалась в контрольной реакционной смеси без субстрата или фермента после инкубирования); III – после инкубирования. LU – единицы люминесценции.

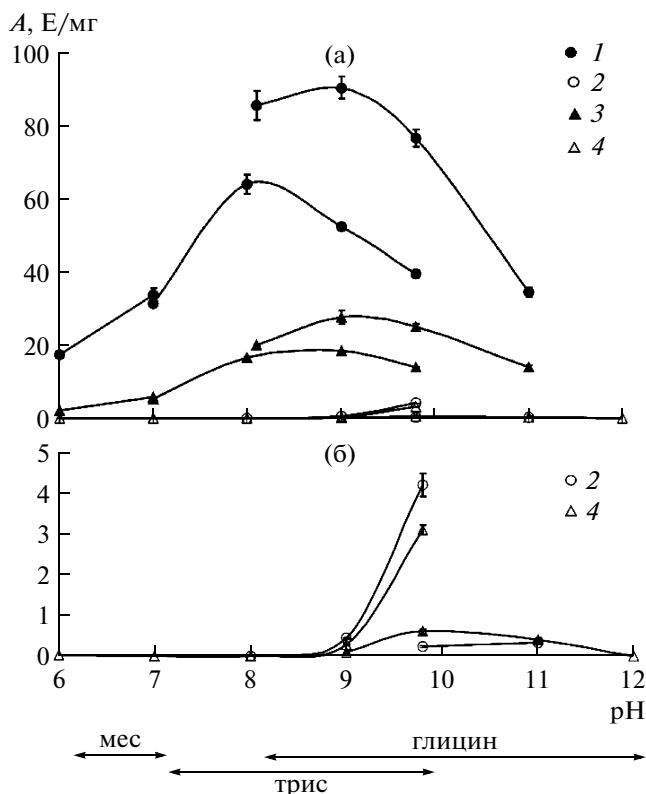


Рис. 4. Зависимость активности рекомбинантных АДГ_{гра} и АДГ_{бжа} от pH. Активность Гис₆-АДГ_{бжа} в реакциях аминирования ОА (1) и дезаминирования L-Асп (2); активность Гис₆-АДГ_{гра} в реакциях аминирования ОА (3) и дезаминирования L-Асп (4). Дезаминирование L-Асп также приведено в увеличенном в 10 раз по оси ординат масштабе (б).

разовавшиеся в бактериоиде, секретируются в цитозоль растительной клетки в качестве носителей азота [21]. И хотя в основном образование L-Асп в бактериоидах происходит путем трансаминирования ОА за счет активности ААТ [22, 23], в то же время в бактериоидных экстрактах *Rhizobium lupini* экспериментально зарегистрирована активность АДГ [24].

Поэтому для дальнейшего исследования мы выбрали продукт, кодируемый ОРС bll6567, из симбиотической азотфиксирующей бактерии *B. japonicum* USDA 110, и его близкий гомолог (74% идентичности) из свободноживущей *R. palustris* HaA2 (ОРС RPB_0147). Структурные части обеих ОРС с оптимизированным для трансляции в *E. coli* кодоновым составом, были химически синтезированы, клонированы в составе коммерчески доступного вектора pET-15b и экспрессированы в специализированном реципиентном штамме — *E. coli* BL21(DE3) с накоплением гибридных белков с N-концевым Гис₆-лидером. Как видно из рис. 2а и 2в, через 3 ч индукции

использованной экспрессионной системы бактериофага Т7 в клетках логарифмически растущей культуры наблюдалось накопление белковых продуктов с электрофоретической подвижностью, ожидаемой для Гис₆-АДГ_{гра} и Гис₆-АДГ_{бжа} (соответствующей белкам с массой ~31 кДа). Доля Гис₆-АДГ_{гра} и Гис₆-АДГ_{бжа} в растворимой фракции составила 10–15% от суммарного растворимого белка. Индукция сопровождалась появлением АДГ активности в грубых экстрактах рекомбинантных штаммов (данные не представлены).

Очистка и биохимическая характеристика новых дегидрогеназ. Гибридные с Гис₆-лидером АДГ_{гра} и АДГ_{бжа} были очищены с помощью аффинной металл-хелатной хроматографии. Чистота полученных препаратов белков была более 90% (рис. 2б и 2г) и они обладали АДГ активностью детектируемой по образованию НАДФН в реакции дезаминирования L-Асп при 28°C (табл. 2).

Поскольку аминокислотная последовательность обоих выделенных ферментов имеет низкую идентичность (28–37%) со всеми ранее охарактеризованными АДГ (АДГ_{тма}, АДГ_{афу}, АДГ_{рае} и АДГ_{геи}), образование L-Асп в реакции восстановительного аминирования ОА, катализируемое *in vitro* Гис₆-АДГ_{гра}, было подтверждено ВЭЖХ (рис. 3а). В свою очередь, образование ОА и ионов аммония в реакции окислительного дезаминирования L-Асп, катализируемой Гис₆-АДГ_{гра}, было подтверждено капиллярным электрофорезом (рис. 3в) и ВЭЖХ (рис. 3б) соответственно. Сходные результаты были получены с Гис₆-АДГ_{бжа} как в реакции аминирования ОА, так и дезаминирования L-Асп (данные не представлены).

Очищенные Гис₆-АДГ показали максимум активности при pH 9.8 для дезаминирования L-Асп и при pH 8.0–9.0 для аминирования ОА, причем активность аминирования ОА была значительно выше дезаминирования (рис. 4). Внутриклеточный pH в бактериоидах *B. japonicum*, клетках *R. palustris*, а также *E. coli* и других энтеробактерий по разным оценкам находится в диапазоне значений pH 7.0–8.0 [25–29]. При pH 7.0–8.0 активность дезаминирования L-Асп ферментами Гис₆-АДГ_{гра} и Гис₆-АДГ_{бжа} *in vitro* не детектировалась, тогда как активность аминирования ОА снизилась несущественно относительно своего максимума детектируемого уровня (рис. 4). Поэтому можно предполагать, что при физиологических pH оба фермента катализируют аминирование ОА в гомологичном окружении в клетках *R. palustris* и *B. japonicum*, а также, что соответствующие ферменты могут быть использованы для выполнения аналогичной функции в искусственно созда-

ваемых продуцентах L-Асп на основе рекомбинантных клеток *E. coli* или других энтеробактерий.

Субстратная специфичность и кинетические параметры рекомбинантных АДГ_{гра} и АДГ_{бja}. Анализ субстратной специфичности дегидрогеназ показал, что Гис₆-АДГ_{гра} и Гис₆-АДГ_{бja} имеют высокое сродство к ОА и L-Асп с использованием НАДФН/НАДФ⁺ в качестве кофакторов, но, например, не к α-кГ, пирувату, а также к ряду других проверенных субстратов (табл. 3).

Для обоих выделенных ферментов были исследованы кинетические параметры реакций аминирования ОА и дезаминирования L-Асп в области оптимальных рН (табл. 4). Кривые насыщения для обоих ферментов представляли собой классические гиперболы Михаэлиса–Ментен. Сравнение значений $k_{кат}/K_M$ по кофакторам показало, что оба фермента значительно более специфичны к НАДФН (на 1–2 порядка), чем к НАДН. Судя по каталитической эффективности $k_{кат}$ прямой и обратной реакций, новые Гис₆-АДГ_{гра} и Гис₆-АДГ_{бja} катализировали аминирование ОА с НАДФН значительно быстрее (в 7–8 раз), чем дезаминирование L-Асп. Высокое сродство к НАДФ(Н) и более быстрое аминирование ОА новыми ферментами Гис₆-АДГ_{гра} и Гис₆-АДГ_{бja} отличает их от ранее охарактеризованных АДГ (см. табл. 4).

Кажущееся значение K_M для Гис₆-АДГ_{бja} по амонию (4.3 мМ) значительно меньше аналогичных K_M для Гис₆-АДГ_{гра} и известных из литературы значений для АДГ_{рае}, Гис₆-АДГ_{геu} и АДГ_{afu} [10, 11, 13] (табл. 4). Для кажущихся значений K_M по ОА наблюдается обратная тенденция (табл. 4).

Необходимо отметить, что экспериментально определенные параметры в данной работе характеризуют не нативные ферменты, как в работах других авторов, а гибридные белки с Гис₆-пептидом на N-конце, что, возможно, несколько занижает их функциональные характеристики.

Тем не менее даже эти экспериментально определенные параметры косвенно свидетельствуют о возможности выполнения новыми ферментами функции восстановительного аминирования ОА в своем природном биологическом окружении. Действительно, оцениваемая в 12 мМ концентрация NH₄⁺ в бактериоидах *B. japonicum* [30] вполне физиологична для фермента, имеющего $K_M = 4.3$ мМ. Учитывая при этом, что отношение НАДФН/НАДФ⁺ = 2.7 в условиях, имитирующих нахождение бактериоидов *B. japonicum* в клубеньке [31], логично предположить участие АДГ_{бja} в ассимиляции аммония за счет катализа аминирования ОА до L-Асп для обеспечения нужд бактериоида и поддержания симбиоза с растением.

Таблица 3. Субстратная специфичность рекомбинантных АДГ

Субстрат	Фермент	
	АДГ _{гра}	АДГ _{бja}
Восстановительное аминирование*, %		
Оксалоацетат	100 ± 2	100 ± 2
α-кетоглутарат	2.0 ± 0.1	1.4 ± 0.1
Пируват	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.1
α-кетобутират	<0.2	<0.2
Кетоизовалериат	<0.2	<0.2
Кетометилвалериат	<0.2	<0.2
Окислительное дезаминирование**, %		
L-аспарат	100 ± 8	100 ± 11
L-глутамат	4.5 ± 0.4	6 ± 1
L-аланин	<2	<2

* Для реакций аминирования с НАДФН за 100% принята активность АДГ_{гра} и АДГ_{бja} с оксалоацетатом, равная 16.5 и 51 Е/мг соответственно.

** Для реакций дезаминирования с НАДФ⁺ за 100% принята активность АДГ_{гра} и АДГ_{бja} с L-Асп, равная 4.4 и 5.6 Е/мг соответственно.

Интересно, что в геноме *R. palustris* HaA2 (NCBI Ref. Seq.:NC_007778.1) не найден ген ГДГ, играющей ключевую роль в азотном метаболизме во многих микроорганизмах. Поэтому с учетом свойств идентифицированной АДГ_{гра}, возможно, именно этот фермент контролирует ассимиляцию аммония в клетках *R. palustris*.

Таким образом, в работе найдены и охарактеризованы новые АДГ из мезофильных азотфиксирующих бактерий *B. japonicum* и *R. palustris*. На основании полученных данных оба фермента могут быть отнесены к биосинтетическим, участвующим в ассимиляции аммония, и могут быть использованы для создания штаммов-продуцентов L-Асп, а также в качестве объектов рациональной или комбинаторной белковой инженерии с целью конструирования АДГ с оптимальными кинетическими свойствами.

Авторы выражают благодарность за ценные консультации проф. Р.С. Шакулову (ФГУП ГосНИИгенетика) и проф. С.В. Машко (НИИ Аджиномото-Генетика), а также А.Е. Новиковой (НИИ Аджиномото-Генетика) за помощь в проведении ряда аналитических экспериментов.

Таблица 4. Кинетические параметры рекомбинантных АДГ_{гра} и АДГ_{бја} в сравнении с параметрами известных АДГ_{геу} [11], АДГ_{рае} [10], АДГ_{афу} [13] и АДГ_{тма} [12]

Параметр K_M , мМ; $k_{кат}$, 1/с; $k_{кат}/K_M$, 1/(мМ × с)		АДГ _{гра}	АДГ _{бја}	АДГ _{геу}	АДГ _{рае}	АДГ _{афу}	АДГ _{тма}
Восстановительное аминирование оксалоацетата							
Условие		рН 9.0, 28°C	рН 9.0, 28°C	рН 8.2, 37°C	рН 8.2, 37°C	рН 7.5, 50°C	
ОА	K_M	9.2 ± 0.9	21 ± 6	2.32	2.12	1.2	—
	$k_{кат}$	14.2 ± 0.7	48 ± 6	—	68.4	—	—
	$k_{кат}/K_M$	1.5	2.3	—	32.3	—	—
NH ₄ Cl	K_M	11.3 ± 1.1	4.3 ± 0.7	14.9	10.1	167	—
	$k_{кат}$	10.3 ± 0.3	24.7 ± 0.9	—	62.0	—	—
	$k_{кат}/K_M$	0.91	5.7	—	6.14	—	—
НАДФН	K_M	0.21 ± 0.05	0.032 ± 0.005	—	0.052	—	—
	$k_{кат}$	19 ± 2	41 ± 2	—	80.2	—	—
	$k_{кат}/K_M$	90	1300	—	1542	—	—
НАДН	K_M	4.5 ± 0.4	0.25 ± 0.04	0.061	0.045	0.014	—
	$k_{кат}$	5.2 ± 0.3	26.2 ± 1.4	—	70.5	—	—
	$k_{кат}/K_M$	1.1	100	—	1567	—	—
Окислительное дезаминирование L-аспартата							
Условие		рН 9.8, 28°C	рН 9.8, 28°C	рН 10.2, 37°C	рН 9.8, 37°C	рН 11.3, 50°C	рН 9.8, 70°C
L-Асп	K_M	13.4 ± 0.5	27 ± 4	2.30	4.87	0.19	0.067
	$k_{кат}$	2.86 ± 0.04	7.3 ± 0.4	—	59.7	—	0.78
	$k_{кат}/K_M$	0.21	0.28	—	12.3	—	11.6
НАДФ ⁺	K_M	0.102 ± 0.011	0.12 ± 0.02	7.43	0.47	0.32	0.72
	$k_{кат}$	2.33 ± 0.07	6.2 ± 0.2	—	46.1	—	7.2
	$k_{кат}/K_M$	23	53	—	98.1	—	10.0
НАД ⁺	K_M	7.0 ± 0.3	10 ± 3	0.97	0.47	0.11	0.25
	$k_{кат}$	1.59 ± 0.03	3.3 ± 0.5	—	62.9	—	1.2
	$k_{кат}/K_M$	0.23	0.33	—	133.8	—	4.7

Знак “—” — нет данных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Magnuson B.A., Burdock G.A., Doull J., Kroes R.M., Marsh G.M., Pariza M.W., Spencer P.S., Waddell W.J., Walker R., Williams G.M. // Crit. Rev. Toxicol. 2007. V. 37. № 8. P. 629–727.
- Иежица И.Н., Снагов А.А. // Успехи физиол. наук. 2007. Т. 38. № 4. С. 39–57.
- Cash W.J., McConville P., McDermott E., McCormick P.A., Callender M.E., McDougall N.I. // Quarterly journal of medicine (Q.J.M.). 2010. V. 103. № 1. P. 9–16.
- Werpy T., Petersen G. // US Department of Energy, Oak Ridge. 2004. P. 1–76. <http://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf>.
- Yukawa H., Ookino S., Inui M. // Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology / Ed. M.C. Flickinger. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2010. P. 1–3.
- Hermann T. // J. Biotechnol. 2003. V. 104. № 1–3. P. 155–172.
- Bongaerts J., Krämer M., Müller U., Raeven L., Wubbolts M. // Metab. Eng. 2001. V. 3. № 4. P. 289–300.
- Reitzer L. // Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology / Eds. A. Böck, R. Curtiss III, J.B. Kaper, P.D. Karp, F.C. Neidhardt, T. Nyström, J.M. Slauch, C.L. Squires, D. Ussery. Washington: A.S.M. Press, 2004. P. 1–33.
- Li Y., Ogola H.J., Sawa Y. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 93. № 2. P. 503–516.

10. Li Y., Kawakami N., Ogola H.J.O., Ishikawa T., Shibata H., Sawa Y. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 90. № 6. P. 1953–1962.
11. Li Y., Ishida M., Ashida H., Ishikawa T., Shibata H., Sawa Y. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2011. V. 75. № 8. P. 1524–1532.
12. Yang Z., Savchenko A., Yakunin A., Zhang R., Edwards A., Arrowsmith C., Tong L. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 10. P. 8804–8808.
13. Yoneda K., Kawakami R., Tagashira Y., Sakuraba H., Goda S., Ohshima T. // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1764. № 6. P. 1087–1093.
14. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1989. 1448 p.
15. Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., Dubendorff J.W. // Methods Enzymol. 1990. V. 185. P. 60–89.
16. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
17. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
18. Willetts M., Clarkson P., Cooke M. // Chromatographia. 1996. V. 43. № 11/12. P. 671–674.
19. Cohen S.A., Michaud D.P. // Anal. Biochem. 1993. V. 211. № 2. P. 279–287.
20. Jones B.N., Gilligan J.P. // J. Chromatog. 1983. V. 266. P. 471–482.
21. Prell J., Pool P. // Trends Microbiol. 2006. V. 14. № 4. P. 161–168.
22. Rastogi V.K., Watson R.J. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. № 9. P. 2879–2887.
23. Lodwig E.M., Hosie A.H.F., Bourdes A., Findlay K., Allaway D., Karunakaran R., Downie J.A., Poole P.S. // Nature. 2003. V. 422. № 6933. P. 722–726.
24. Kretovich W.L., Kariakina T.I., Weinova M.K., Sidelnikova L.I., Kazakova O.W. // Plant Soil. 1981. V. 61. № 1–2. P. 145–156.
25. Bhandary B., Nicolas D.J.D. // J. Bacteriol. 1985. V. 164. № 3. P. 1383–1385.
26. Rolin D.B., Boswell R.T., Sloger C., Tu S.-I., Pfeffer P.E. // Plant Physiol. 1989. V. 89. № 4. P. 1238–1246.
27. Harwood C.S., Gibson J. // J. Bacteriol. 1986. V. 165. № 2. P. 504–509.
28. Wilks J.C., Slonczewski J.L. // J. Bacteriol. 2007. V. 189. № 15. P. 5601–5607.
29. Laane C., Krone W., Konings W.N., Haaker H., Veeger C. // FEBS Lett. 1979. V. 103. № 2. P. 328–332.
30. Streeter J.G. // Plant Physiol. 1989. V. 90. № 3. P. 779–782.
31. Tajima S., Kouzai K., Kimura I. // Nitrogen Fixation: Hundred Years After / Eds. H. Bothe, F.J. de Bruijn, W.E. Newton. New York: Gustav Fischer, 1988. P. 564.

Novel NADPH-Dependent L-Aspartate Dehydrogenases from the Mesophilic Nitrogen-Fixing Bacteria *Rhodopseudomonas palustris* and *Bradyrhizobium japonicum*

T. M. Kuvaeva, J. I. Katashkina, A. D. Kivero, and S. V. Smirnov

Ajinomoto-Genetika Research Institute, Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 117545 Russia

e-mail: Tatiana_Kuvaeva@agri.ru

Received April 12, 2012

Abstract—The genes encoding putative L-aspartate dehydrogenases (EC 1.4.1.21, ADH) from the mesophilic nitrogen-fixing bacteria *Rhodopseudomonas palustris* and *Bradyrhizobium japonicum* were cloned and expressed in *Escherichia coli*. The respective enzymes in the form of hybrid proteins with N-terminal hexahistidine tags were purified to apparent homogeneity. Both enzymes catalyzed in vitro the reductive amination of oxaloacetate to L-aspartate by an order faster than the reverse reaction at a respective pH optimum of 8.0–9.0 and 9.8; also, the enzymes only catalyzed amination under physiological conditions (pH 7.0–8.0). Their specificity to NADPH was higher by 1–2 orders of magnitude than that to NADH. The apparent K_M values of ADHs from *R. palustris* for oxaloacetate, ammonium, and NADPH at pH 9.0 were 9.2, 11.3, and 0.21 mM, respectively, and the corresponding K_M values of ADH from *B. japonicum* were 21, 4.3, and 0.032 mM, respectively. The amination activity of novel ADHs may be important for the fixation of inorganic nitrogen in vivo and used for the construction of a bacterial strain-producer of L-aspartate by metabolic engineering methods.

УДК 579.234:579.23'314:533.9

ВОЗДЕЙСТВИЕ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ НА КЛЕТОЧНУЮ СТЕНКУ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ *E. coli*

© 2013 г. Е. Н. Кобзев*, Г. В. Киреев*, Ю. А. Ракицкий*, И. И. Марговецкая*, В. А. Чугунов*, В. П. Холоденко*, М. В. Храмов*, Ю. С. Акишев**, Н. И. Трушкин**, М. Е. Грушин**

* Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Московская обл., 142279, e-mail: kobzev_e@mail.ru

** Троицкий институт инновационных и термоядерных исследований, г. Троицк, Московская обл., 142190, e-mail: akishev@triniti.ru

Поступила в редакцию 16.04.2012 г.

Исследовано воздействие холодной плазмы на микробные клетки *E. coli*. Показано, что при обработке холодной плазмой клеток *E. coli* происходило частичное либо полное нарушение целостности цитоплазматической мембраны (ЦПМ) клеток, что сопровождалось выходом внутриклеточных соединений во внеклеточную среду. Количественная оценка степени повреждения клеточной мембраны показала, что для гибели клеток достаточно потери не более 23.6% внутриклеточных соединений (рассчитано по доле выхода внутриклеточных нуклеотидов). Использование сред с различной ионной силой для создания осмотического шока показало, что обработка клеток *E. coli* холодной плазмой приводила к значительному снижению прочности их клеточной стенки.

DOI: 10.7868/S0555109913020074

Первые результаты исследований низкотемпературной (“холодной”) плазмы в области биомедицины позволяют предполагать, что плазменные технологии станут новым альтернативным способом борьбы с условно-патогенными и патогенными микроорганизмами (в том числе обладающими множественной лекарственной устойчивостью), которая представляет сейчас серьезную проблему для здравоохранения. Особенность низкотемпературной плазмы заключается в том, что в ходе плазменной обработки образуется широкий спектр активных агентов (заряженные частицы, свободные радикалы, активные формы кислорода и азота, ультрафиолет и т.д.), которые эффективно инактивируют различные виды микроорганизмов [1–2].

Однако несмотря на некоторый прогресс, достигнутый в испытаниях лабораторного масштаба, использование холодной плазмы для дезинфекции и стерилизации пока еще не получило широкого практического применения. Это связано, прежде всего, с недостаточной разработанностью научных и технических основ нового метода плазменной стерилизации. В частности, отсутствие ясного понимания механизмов инактивации микроорганизмов холодной плазмой затрудняет формулировку требований со стороны микробиологов к эффективным источникам плазмы.

В настоящее время выдвинуто несколько возможных моделей гибели клеток микроорганизмов под воздействием холодной плазмы. Моисан [3] предположил, что наиболее важную роль в инактивации микроорганизмов в условиях плаз-

мы низкого давления (вакуум) играет ультрафиолетовый свет (УФ), при этом инактивация, по его мнению, сопровождается эрозией и фотодесорбцией атомов микробных клеток. Однако, по мнению большинства исследователей, подобная модель не применима для холодной плазмы при атмосферном давлении, где УФ активно рассеивается молекулами воздуха [4].

Монти [5] была выдвинута гипотеза о том, что гибель микроорганизмов обусловлена тремя основными процессами: 1) перекисное окисление липидов мембраны гидроксильными радикалами, 2) инактивация белков вследствие окисления аминокислот; 3) окисление ДНК в результате взаимодействия с радикалами кислорода. Экспериментальное подтверждение или опровержение данного предположения до сих пор не получено. В то же время, в соответствии с данными работ [5–6], обработка клеток *E. coli* плазмой в течение 10–30 с приводила к нарушению целостности их мембраны и сопровождалась выходом внутриклеточного содержимого. При более длительных экспозициях наблюдалось полное разрушение клеток, что регистрировалось с помощью электронной микроскопии. Однако полной ясности в данном вопросе нет.

Цель работы — изучение повреждения цитоплазматической мембраны (ЦПМ) и клеточной стенки *E. coli* низкотемпературной плазмой.

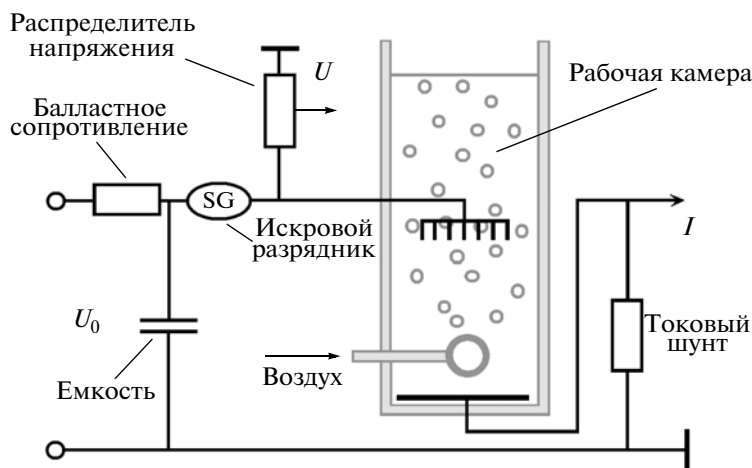


Рис. 1. Схема разрядного устройства для создания холодной плазмы в газовых пузырьках хорошо проводящей жидкости.

МЕТОДИКА

Культивирование микроорганизмов. Объектом исследований служил штамм *Escherichia coli* ATCC 25922 #2393, полученный из коллекции ГНЦ ПМБ. В качестве основной питательной среды использовали гидролизат рыбно-костной муки (“ГРМ-бульон” и “агаризованная среда ГРМ-1”, производство ГНЦ ПМБ, Оболенск).

Для экспериментов культуру выращивали на чашках с ГРМ-агаром при 37°C в течение 18 ч, после чего культуру смывали физиологическим раствором (ФР). Полученной суспензией инокулировали ГРМ-бульон и культивировали на качалке при 200 об/мин в течение 4 ч при 37°C . Перед обработкой холодной плазмой суспензию клеток разбавляли ФР до конечного титра 10^7 – 10^8 КОЕ/мл. Полученную рабочую суспензию микроорганизмов помещали в камеру генератора плазмы. В ходе обработки через определенные промежутки времени из рабочей камеры отбирали пробы суспензии и определяли в них количество живых микроорганизмов стандартным методом высева из десятикратных разведений на чашки Петри с ГРМ-агаром.

Характеристика газоразрядной системы, создающей холодную плазму в жидкости. В экспериментах была использована система [7], в которой импульсная плазма создавалась в газовых пузырьках, подаваемых в жидкость. Общая схема газоразрядной системы приведена на рис. 1. Жидкость объемом 300 мл заливалась в стеклянную трубу с внутренним диаметром 50 мм и высотой 500 мм. Объемный расход воздуха, используемого для создания газовых пузырьков, варьировался в пределах 20–120 мл/с. Секционированная электродная система состояла из 13 тонких штырей диаметром 1 мм, равномерно (через 3.5 мм) разнесенных друг от друга. Каждый штырь был нагру-

жен на индивидуальное балластное сопротивление, равное 1 МОм. Несекционированный электрод располагался на расстоянии 10–15 мм от кончиков штырей. Для поддержания разряда использовалось напряжение от высоковольтного источника амплитудой до 30 кВ, направление электрического тока было параллельно трубке, подающей воздух. Характерная мощность, вводимая газовым разрядом в пузырьки, составляла 30–90 Вт.

Оценка повреждения цитоплазматической мембраны. Методика основана на измерении выхода внутриклеточных соединений (преимущественно нуклеотидов) из клетки после нарушения барьерной функции цитоплазматической мембраны при воздействии на бактериальные клетки активных частиц холодной плазмы [5]. Для оценки повреждения цитоплазматической мембраны суспензию клеток *E. coli* обрабатывали плазмой в течение определенного времени (1–10 мин). Затем в обработанных и контрольных пробах определяли численность микроорганизмов методом высева на агаризованную среду ГРМ из десятикратных разведений. В оставшихся после высева пробах осаждали клетки на центрифуге Eppendorf 5810R (Германия) при 5000 g в течение 20 мин. После этого в супернатантах проб проводили измерение оптической плотности (ОП) на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 (Япония) при 260 нм.

Степень повреждения ЦПМ клеток, обработанных плазмой, рассчитывали в соответствии с формулой:

$$\text{Степень повреждения} = \frac{(\text{ОП}_{\text{эксп}} - \text{ОП}_{\text{конт}})}{\text{ОП}_{\text{макс}}} \times 100\%, \text{ где}$$

$\text{ОП}_{\text{эксп}}$ – оптическая плотность супернатанта после обработки клеток холодной плазмой.

$ОП_{\text{конт}}$ — оптическая плотность супернатанта в контрольном образце без обработки холодной плазмой.

$ОП_{\text{макс}}$ — для определения максимальной оптической плотности (максимальное количество внутриклеточных соединений, поглощающих при 260 нм), клетки подвергали такому воздействию повреждающего фактора, при котором барьерная функция клеточной мембраны полностью нарушалась, в результате чего весь пул внутриклеточных соединений выходил из клетки в окружающую среду. Для этого клеточную суспензию подвергали тепловому шоку при 70°C в течение 20 мин на водяной бане. После этого в пробе осаждали клетки на центрифуге (5000 g в течение 20 мин при 4°C) и измеряли ОП в супернатанте при 260 нм, как описано выше.

Оценка снижения прочности клеточной стенки.

Разработанный нами метод оценки прочности клеточной стенки после воздействия холодной плазмы основан на том, что снижение осмотического давления среды приводит к увеличению тургора клеток. Поскольку тургор обуславливается тремя факторами: 1) внутренним осмотическим давлением клетки, которое вызывает напряжение клеточной стенки, 2) внешним осмотическим давлением, 3) упругостью клеточной стенки, то снижение внешнего осмотического давления приводит к избыточному давлению на клеточную стенку. В свою очередь, осмотическое давление раствора (π) равно:

$$\pi = iCRT,$$

где i — изотонический коэффициент раствора; C — молярная концентрация раствора; R — универсальная газовая постоянная ($8.31441 \pm \pm 0.00026$ Дж моль⁻¹ К⁻¹); T — термодинамическая температура раствора.

Если пренебречь незначительным изменением изотонического коэффициента в ходе разбавления, то изменение осмотического давления ($\Delta\pi$) при постоянной температуре раствора равно:

$$\Delta\pi = C_{\text{кон}}/C_{\text{исх}},$$

где $C_{\text{кон}}$ и $C_{\text{исх}}$ — конечная и исходная молярные концентрации раствора соответственно.

Таким образом, путем разбавления суспензии микроорганизмов дистиллированной водой можно снижать осмотическое давление среды и увеличивать давление на клеточную стенку. Если клеточная стенка при этом повреждена, то снижение внешнего осмотического давления среды может привести к ее разрыву и гибели клетки. Поэтому в ходе оценки снижения прочности клеточной стенки, образцы клеточной суспензии помещали в среду с гипотоническим осмотическим давлением. Для этого клеточную суспензию обрабатывали плазмой в течение определенного вре-

мени (1–10 мин). Затем суспензию из каждой экспозиции делили на три пробы. В первую пробу вносили ФР в соотношении 1 мл суспензии + 9 мл ФР (изотоническая проба). Во вторую пробу вносили дистиллированную воду в соотношении 1 мл суспензии + 9 мл дистиллированной воды (гипотоническая проба 1/10). В третью пробу вносили дистиллированную воду в соотношении 0.1 мл суспензии + 9.9 мл дистиллированной воды (гипотоническая проба 1/100). Через 1 ч инкубирования при 37°C в каждой пробе определяли численность микроорганизмов методом высева на агаризованные среды из десятикратных разведений. Также в исследуемых пробах измеряли количество свободных нуклеотидов в супернатантах методом, описанным выше. В ходе анализа полученных данных учитывали разбавление, которое возникало при снижении осмотического давления среды в варианте гипотоническая проба 1/100.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Энергия, выделяемая одной активной частицей холодной плазмы при взаимодействии с молекулами, составляет в среднем 5 эВ [1]. При этом энергии разрыва химических связей в органических молекулах имеют близкие значения: от 2.7 эВ (энергия разрыва связи C—C) до 6.8 эВ (для связи C=O в кетонах) [8]. Скорее всего активные частицы плазмы действуют на молекулярном уровне, разрушая либо трансформируя биомолекулы. Взаимодействие активных частиц с биомолекулами неспецифично и воздействию могут подвергнуться любые биополимеры — белки, липиды, полисахариды, нуклеиновые кислоты. При этом, на наш взгляд, возможны следующие реакции: 1) разрыв связей в биомолекулах (в том числе, образование одно- и двунитевых разрывов в молекулах ДНК), 2) присоединение новых функциональных групп к биомолекулам (например, гидроксигирование, нитрирование), 3) образование межмолекулярных и внутримолекулярных сшивок. Любой из этих процессов носит вероятностный характер и может привести к изменению конформации и физико-химических свойств молекул, после чего молекулы уже не могут в полной мере выполнять свои функции.

На наш взгляд, клеточная стенка и ЦПМ первыми подвергаются воздействию активных частиц плазмы. И лишь после того как активные частицы прошли сквозь поврежденные клеточную стенку и мембрану, они могут инициировать повреждение ДНК и ключевых ферментов клетки.

Оценка степени повреждения ЦПМ клеток холодной плазмой. УФ с длиной волны 260 нм преимущественно поглощают нуклеиновые кислоты и нуклеотиды, однако некоторый вклад в оптическую плотность также вносит присутствие в среде

аминокислот, белков и некоторых ароматических соединений [9]. Нас не интересовала природа соединений, поглощающих свет с длиной волны 260 нм, а изучалась динамика изменения оптической плотности при данной длине волны. В связи с этим увеличение оптической плотности супернатанта (при 260 нм) в ходе эксперимента интерпретировалось, как появление в среде различных внутриклеточных соединений (преимущественно нуклеотидов) вследствие частичного либо полного нарушения целостности ЦПМ.

В ходе исследований было отмечено, что обработка суспензии *E. coli* плазмой приводила к значительному увеличению количества внутриклеточных веществ в супернатанте по сравнению с контролем, не подвергавшихся обработке плазмой (рис. 2). Уже после 6 мин обработки плазмой в образцах не выявлялось наличие КОЕ, в то же время ОП супернатанта увеличивалась линейно на протяжении всего эксперимента, и достигала максимума к 10 мин обработки (0.323 ед. ОП). Наблюдаемое различие между динамикой инактивации микроорганизмов и динамикой увеличения ОП позволяет предположить, что даже частичное нарушение целостности ЦПМ приводило к гибели микроорганизмов. В связи с этим мы предприняли попытку оценить степень повреждения ЦПМ в ходе эксперимента.

Как мы уже отмечали, ОП обработанных плазмой образцов увеличивалась линейно на протяжении всего эксперимента. Предположительно, при больших экспозициях ОП будет замедляться и она должна стабилизироваться на определенном уровне, соответствующем максимальной концентрации внутриклеточных веществ в супернатанте. Однако в ходе наших экспериментов плато для ОП достигнуто не было, что свидетельствует о том, что процесс выхода внутриклеточных веществ из клеток продолжался, в том числе, и после гибели клеток. Экстраполяция полученных результатов позволила предположить, что данное плато может быть достигнуто к 25–30 мин обработки. Если учитывать, что уже после 6 мин обработки плазмой живые клетки не обнаруживались методом высева, то, по нашему мнению, при столь длительных экспозициях обработки клеток плазмой (25–30 мин) мы могли бы получить искаженные результаты за счет плазменной деструкции биополимеров. Поэтому для определения максимальной концентрации внутриклеточных веществ, определяемых при 260 нм, не обработанные плазмой клетки подвергали тепловому шоку при 70°C в течение 20 мин на водяной бане. Полученные данные по общему пулу внутриклеточных веществ (определяемых при 260 нм) в клетках исследуемой культуры *E. coli* позволили нам рассчитать степень повреждения ЦПМ в зависимости от времени обработки плазмой. В ходе эксперимента степень повреждения ЦПМ клеток *E. coli*, об-

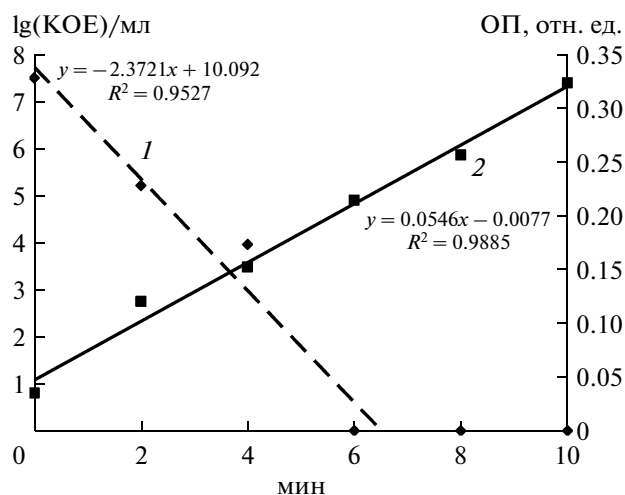


Рис. 2. Динамика выживаемости клеток *E. coli* (1) и оптическая плотность (2) супернатанта после обработки холодной плазмой.

работанных холодной плазмой, повышалась практически линейно с 0% в контроле (без обработки) до 11.2% после 2 мин обработки, 15.4% после 4 мин, 23.6% — 6 мин, 29.1% — 8 мин, достигая максимума в 37.9% к 10 мин.

В нашем случае, степень повреждения ЦПМ отражала долю внутриклеточных веществ (преимущественно нуклеотидов), оказавшихся во внеклеточной среде вследствие частичного либо полного нарушения барьерной функции ЦПМ. Поскольку уже после 6 мин обработки плазмой живые клетки в пробах отсутствовали, можно предположить, что для гибели клеток достаточно потери не более 23.6% внутриклеточных веществ. Скорее всего, эта величина должна быть значительно меньше 23.6%, поскольку в ходе наших экспериментов учитывались одновременно и частичное повреждение ЦПМ (когда только часть содержимого клетки выходило в среду), и полное повреждение ЦПМ (когда выходило все содержимое клетки). Используемый нами подход не позволял разделить вклад частичного и полного повреждения ЦПМ в процесс инактивации микроорганизмов.

Оценка воздействия плазмы на прочность клеточной стенки/мембраны. Анализ данных, полученных нами ранее, показал, что эффективность инактивации микроорганизмов активными частицами холодной плазмой во многом зависит от таксономического положения микроорганизмов [7]. Так, в ходе обработки плазмой исследуемых культур, нанесенных на поверхность агаризованных сред, было обнаружено, что грамотрицательные бактерии *Serratia marcescens* и *E. coli* оказались более чувствительными к обработке, чем вегетативные формы грамположительных культур *B. subtilis* и *Mycobacterium flavescens*. Поскольку одним из

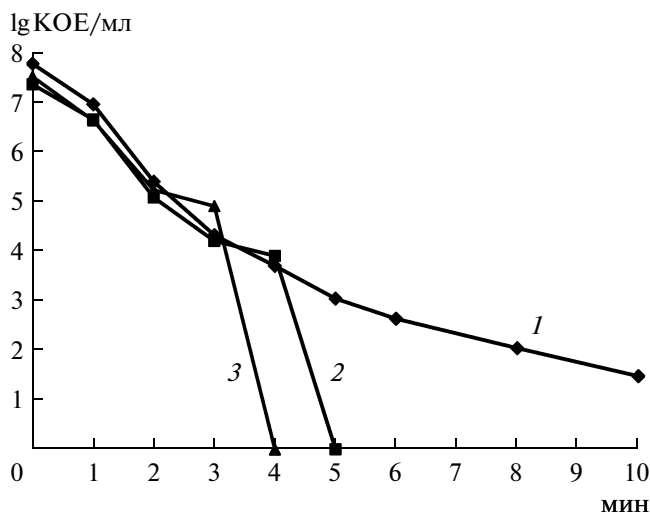


Рис. 3. Численность клеток *E. coli*, помещенных после обработки холодной плазмой в среды с разным осмотическим давлением:

1 – изотоническая среда, 2 – гипотоническая среда 1/10; 3 – гипотоническая среда 1/100.

наиболее ярко выраженных отличий грамположительных и грамотрицательных бактерий является строение клеточной стенки, то можно предположить, что инактивация микроорганизмов плазмой, прежде всего, связана с воздействием на клеточную стенку микроорганизмов, которая принимает первый удар активных частиц плазмы. Очевидно, что многослойная клеточная стенка грамположительных бактерий обладает, по сравнению с более тонкой клеточной стенкой грамотрицательных бактерий, более выраженным защитным действием и тормозит проникновение активных частиц в цитоплазму. С другой стороны, и сама клеточная стенка, скорее всего, повреждается частицами плазмы, что, в свою очередь, может приводить либо к нарушению ее целостности и гибели клетки, либо к нарушению процесса роста и деления клетки. И в том и в другом случае многослойная клеточная стенка грамположительных микроорганизмов обуславливает их заметно большую устойчивость к воздействию активных частиц плазмы, по сравнению с грамотрицательными микроорганизмами.

На наш взгляд, в любом случае при воздействии активных частиц плазмы на клеточную стенку должна снижаться ее прочность. Для проверки данного предположения был проведен ряд экспериментов, в ходе которых образцы клеточной суспензии *E. coli* после обработки плазмой при различных экспозициях помещали в среды с пониженным (гипотоническим) осмотическим давлением на 1 ч.

Анализ результатов посева на агаризованную среду ГРМ обработанных таким образом клеток

показал плавное снижение численности клеток микроорганизмов в изотонических условиях (рис. 3, 1). После 10 мин обработки плазмой численность микроорганизмов снизилась с 6.0×10^7 до 3.0×10^1 КОЕ/мл.

В то же время, в случае, когда после обработки плазмой клетки помещали в гипотоническую среду со сниженной в 10 раз концентрацией солей, наблюдалась несколько другая картина (рис. 3, 2). При экспозиции до 4 мин численность микроорганизмов в вариантах “изотоническая среда” и “гипотоническая среда 1/10” снижалась практически одинаково. Однако после 4 мин обработки плазмой выживаемость в гипотонической среде (1/10) резко снижалась, и к 5 мин в этой среде живые клетки не обнаруживались. Сходная тенденция была отмечена и для гипотонической среды “1/100” (рис. 3, 3). В связи с этим мы предположили, что поврежденные воздействием активных частиц плазмы клетки не смогли выжить в условиях увеличения внутриклеточного давления на клеточную стенку, которое, в свою очередь, повысилось из-за снижения осмотического давления внешней среды.

Подтверждением справедливости нашего предположения о том, что гибель микроорганизмов в гипотонической среде после обработки плазмой связана именно со снижением прочности клеточной стенки, являются следующие факты. Во-первых, кривые гибели микроорганизмов в первые 2 мин обработки плазмой для всех использованных сред были практически идентичны, то есть изменение осмотического давления практически не оказывало влияния на выживаемость микроорганизмов, обработанных плазмой в течение 2 мин (рис. 3). В то же время снижение осмотического давления в 10 раз (рис. 3, 2) приводило к увеличению процента гибели клеток после 4 мин обработки плазмой, а снижение осмотического давления в 100 раз (рис. 3, 3) приводило к увеличению гибели клеток уже после 3 мин обработки. Таким образом, выживаемость микроорганизмов в результате обработки плазмой зависела от того, в какую среду их помещали после обработки. Чем ниже было осмотическое давление среды, тем ниже была выживаемость *E. coli*.

Во-вторых, само по себе снижение осмотического давления среды не приводило к полной гибели исследуемой культуры, не обработанной плазмой, даже в случае инкубирования микроорганизмов в гипотонической среде в течение 1 сут и более (рис. 4). Так, за 1 сут инкубирования культуры *E. coli* в среде со сниженным в 100 раз осмотическим давлением (суспензия *E. coli* была разбавлена бидистиллированной водой в 100 раз) наблюдалось падение численности микроорганизмов в исследуемых образцах всего на 1.5 порядка (с 3.0×10^5 до $6.1-10.0 \times 10^3$ КОЕ/мл). При этом интенсивное пе-

ремешивание в ходе инкубирования на качалке при 200 об/мин оказывало лишь незначительное влияние на динамику численности бактерий. В дальнейшем, численность микроорганизмов в ходе инкубации только повышалась, достигнув к 6 сут значения $4.0\text{--}4.5 \times 10^4$ КОЕ/мл. Таким образом, снижение осмотического давления среды само по себе не приводило к быстрой и полной гибели исследуемой культуры. В то же время снижение прочности клеточной стенки после обработки плазмой могло интенсифицировать процесс гибели клеток, помещенных после обработки в гипотоническую среду.

В ходе изучения динамики прочности клеточной стенки *E. coli* мы также оценивали влияние осмотического давления среды, в которой были суспендированы клетки после обработки плазмой, на степень повреждения клеточной стенки микроорганизмов. Исследования показали, что ОП супернатантов при 260 нм в гипотонической среде была значительно выше оптической плотности супернатантов в изотонической среде (таблица).

Полученные данные свидетельствуют о значительном увеличении выхода внутриклеточных веществ из клеток в гипотонических условиях. Однако в отличие от данных, полученных для изотонических условий (рис. 2), какой-либо закономерности в распределении величин ОП в гипотонической среде выявлено не было. Кроме того, было отмечено довольно высокое значение ОП супернатанта в гипотонических условиях в контрольном варианте, который не подвергался обработке плазмой. На основании перечисленных фактов мы сделали вывод, что высокая оптическая плотность супернатантов в гипотонической среде связана не столько с нарушением целостности клеточной стенки плазмой, сколько с диффузией внутриклеточных веществ во внешнюю среду с пониженным осмотическим давлением. Это никоим образом не противоречит выдвинутой нами гипотезе, что обработка клеток *E. coli* холодной плазмой приводит к снижению прочности их клеточной стенки.

Таким образом, в ходе наших исследований было показано, что при обработке холодной плазмой клеток *E. coli* происходило частичное либо полное нарушение целостности ЦПМ. Количественная оценка степени повреждения клеточной

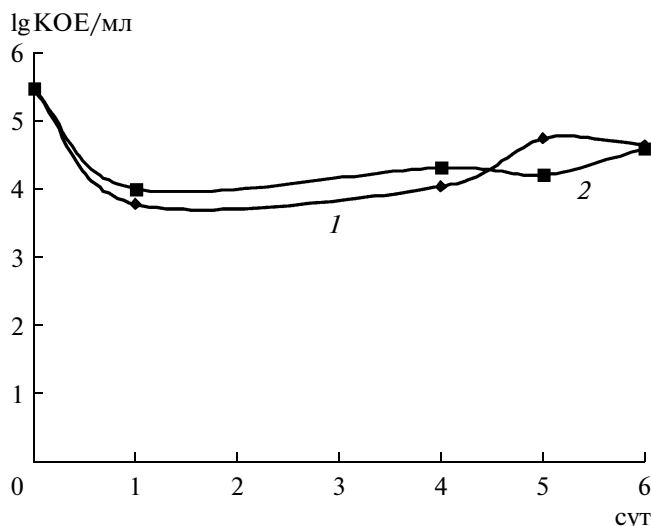


Рис. 4. Выживаемость клеток *E. coli* в гипотонической среде:

1 – на качалке, 2 – без перемешивания.

мембраны показала, что для гибели клеток достаточно потери не более 23.6% внутриклеточных веществ. Использование сред с различной ионной силой в ходе исследований позволило сделать вывод, что обработка микроорганизмов холодной плазмой также приводила к значительному снижению прочности их клеточной стенки.

Исследование механизма инактивации микроорганизмов холодной плазмой находится на начальном этапе. Ясное понимание этого явления позволит повысить эффективность плазменной стерилизации и тем самым ускорит широкое внедрение нового метода стерилизации. В свою очередь, широкое внедрение плазменных технологий может помочь в решении актуальных проблем в сфере биобезопасности и в других областях, где требуется быстрая и эффективная биодеконтаминация объектов.

Авторы выражают глубокую признательность С.А. Ермолаевой, руководителю лаборатории экологии возбудителей инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, за внимательное прочтение статьи и ряд важных критических замечаний.

Оптическая плотность супернатантов суспензий *E. coli*, обработанных плазмой и помещенных в среды с различным осмотическим давлением

Оптическая плотность супернатантов при 260 нм, отн. ед.	Время воздействия плазмы, мин					
	0	1	2	3	4	5
Изотоническая среда	0.55	0.60	0.61	0.66	0.72	0.70
Гипотоническая среда (1/10)	1.24	1.45	1.38	1.25	1.56	1.32

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора “Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Холоденко В.П., Акишев Ю.С., Кобзев Е.Н., Чугунов В.А., Жиркова Н.А., Ирхина И.А., Грушин М.Е., Каральник В.Б., Трушкин Н.И. // Химическая и биологическая безопасность. 2006. № 5 (29). С. 3–13.
2. Акишев Ю.С., Грушин М.Е., Каральник В.Б., Мониц А.Е., Панькин М.В., Трушкин Н.И., Холоденко В.П., Чугунов В.А., Жиркова Н.А., Ирхина И.А., Кобзев Е.Н. // Физика плазмы. 2006. Т. 32. № 12. С. 1142–1152.
3. Moisan M., Barbeau J., Moreau S., Pelletier J., Tabrizian M., Yahia L.H. // Int. J. Pharmaceut. 2001. V. 226. № 1–2. P. 1–21.
4. Laroussi M. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2002. V. 30. № 4. P. 1409–1415.
5. Montie T.C., Kelly-Wintenberg K., Roth J.R. // IEEE Trans. Plasma Sci. 2000. V. 28. № 1. P. 41–50.
6. Laroussi M., Sayler G., Galscock B., McCurdy B., Pearce M., Bright N., Malott C. // IEEE Trans. Plasma Sci. 1999. V. 27. P. 34–35.
7. Akishev Yu., Grushin M., Karalnik V., Petryakov A., Trushkin N., Kholodenko V., Chugunov V., Irkhina I., Kobzev E., Zhirkova N., Kireev G. // Pure and Appl. Chem. 2008. V. 80. № 9. P. 1953–1969.
8. Зонис С.А. Справочник химика. Т. 1 / Ред. С.А. Зонис, Г.А. Симонов. М.: Химия, 1966, С. 902.
9. Glasel J. // Biotechniques. 1995. V. 18. № 1. P. 62–63.

Effect of Cold Plasma on the *E. coli* Cell Wall and Plasma Membrane

E. N. Kobzev^a, G. V. Kireev^a, Yu. A. Rakitskii^a, I. I. Martovetskaya^a, V. A. Chugunov^a, V. P. Kholodenko^a, M. V. Khramov^a, Yu. S. Akishev^b, N. I. Trushkin^b, and M. E. Grushin^b

^a State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow oblast, 142279 Russia
e-mail: kobzev_e@mail.ru

^b Troitsk Institute for Innovation and Thermonuclear Research, Troitsk, Moscow oblast, 142190 Russia
e-mail: akishev@triniti.ru

Received April 16, 2012

Abstract—The effect of cold plasma on *E. coli* cells was studied. It was shown that the treatment of *E. coli* cells with cold plasma caused partial or total disruption of the plasma membrane integrity, which was accompanied by a release of intracellular substances into the extracellular environment. A quantitative assessment of the extent of the damage to the cell membrane showed that a loss of no more than 23.6% of intracellular substances (calculated by the proportion of the intracellular nucleotide release) is sufficient to lead to cell death. The use of media with different ionic strength levels to create osmotic shock showed that the treatment of *E. coli* cells with cold plasma significantly decreased the cell wall strength.

УДК 579.

БИОСИНТЕЗ ПОЛИГИДРОКСИБУТИРОВАЛЕРАТА С РАЗНОЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ ПРИ РОСТЕ *Methylobacterium extorquens* G-10 НА СМЕСИ МЕТАНОЛА И ПЕНТАНОЛА

© 2013 г. В. А. Ежов, Н. В. Доронина, Ю. А. Троценко

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пушкино, Московская область 142290;

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 23.08.2012 г.

Изучено влияние концентрации и времени добавления косубстрата (пентанола) на молекулярную массу (Мм) сополимера полигидроксибутиривалерата (ПГБВ), синтезируемого *Methylobacterium extorquens* G-10 при выращивании на среде с метанолом. Показано, что увеличение концентрации пентанола до 20% в смеси с метанолом стимулировало биосинтез ПГБВ с Мм ~1500 кДа и содержанием валерата до 50%, особенно при добавлении пентанола в логарифмической фазе роста культуры. Высокие концентрации пентанола токсичны для продуцента и снижали общий выход ПГБВ. Увеличение Мм до 1500 кДа снижает температуру плавления биополимера (с 172 до 162°C) и степень кристалличности (с 63 до 8%), но повышает его эластичность. Обнаруженная вариабельность свойств ПГБВ значительно расширяет сферы потенциального применения синтезируемых биопластиков.

DOI: 10.7868/S0555109913020049

Открытие и изучение полигидроксиалканоев (ПГА) — полиэфиров микробного происхождения, явилось значительным событием для биотехнологии новых материалов. ПГА — термопластичные, биоразлагаемые и биосовместимые полимеры, потенциальные области применения которых включают биомедицину, пищевую и косметическую промышленность, производство упаковочных материалов и сельское хозяйство [1, 2].

К настоящему времени описано более 300 продуцентов ПГА и около 150 различных полигидроксиалкановых кислот [3, 4]. Однако наибольшую коммерческую ценность представляют полигидроксибутират (ПГБ) и сополимер 3-гидроксибутирата (3-ГБ) с 3-гидроксивалератом (ПГБВ). Введение 3-гидроксивалерата (3-ГВ) в ПГБ существенно улучшает физико-химические свойства сополимера. ПГБВ обладает пониженной температурой плавления (увеличивается технологическое “окно перерабатываемости” между температурами плавления и началом термического разложения), большей эластичностью и прочностью [1–6]. Для биосинтеза ПГБВ необходимо добавлять в основную ростовую среду косубстраты. Наиболее эффективными косубстратами являются пентанол или пентановая кислота [7–10]. В качестве основных ростовых субстратов для биосинтеза полимеров чаще всего используют углеводы [11–17]. В России дешевым источником углерода является метанол, производство которого составляет около 3 млн т. ежегодно. Аэробные метиловобактерии с сериновым путем метаболизма

C1-соединений синтезируют из метанола 40–80% ПГБ от сухой биомассы [8, 10, 12, 15]. При добавлении к метанолу в качестве косубстрата пентанола или пентановой кислоты метиловобактерии синтезируют ПГБВ, однако характеристики процесса изучены недостаточно [7–10].

Цель работы — изучение условий биосинтеза ПГБВ при выращивании *Methylobacterium extorquens* G-10 на смеси метанола и пентанола, а также характеристика основных физико-химических свойств сополимера.

МЕТОДИКА

Объекты и условия культивирования. *Methylobacterium extorquens* G-10 выращивали на минеральной среде, следующего состава (г/л): KH_2PO_4 — 1.0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 1.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1; 10 мл раствора микроэлементов. Раствор микроэлементов содержал (г/л): $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0.2; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0.5; NaMoO_4 — 0.02; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0.1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1.0. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 750 мл со 100 мл среды и 0.5 мл метанола при 29°C на роторной качалке (180 об/мин) в течение 2 сут. Культуру в середине логарифмической фазы роста ($\text{ОП}_{600} = 1.0$) использовали в качестве посевного материала (инокулята) для ферментера. Периодическое культивирование в ферментере АНКУМ-2М (“Биоприбор”, Россия) проводили в режиме автоматического поддержа-

ния температуры 30°C и pH 6.85. В ферментер вносили 4.0 л минеральной среды и 200 мл посевного материала. pH поддерживали 25%-ным NH_4OH или 10%-ным раствором NaOH . При достижении культурой $\text{ОП}_{600} = 30$ добавляли 50 мл концентрата среды, содержащего (г/л): $\text{H}_3\text{PO}_4 - 270$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 80.0$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 2.3$; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0.6$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - 0.3$; $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} - 0.5$; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} - 0.6$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0.4$. Метанол добавляли дробно (порциями от 5 до 20 мл) по мере потребления растущей культурой, о чем судили по резкому увеличению уровня растворенного кислорода (pO_2) в момент полного потребления метанола. pO_2 поддерживали на уровне 20–30% от насыщения посредством увеличения числа оборотов мешалки до 1000 об/мин и расхода воздуха до 6 л/мин.

Пентанол добавляли в смеси с метанолом при достижении культурой разных фаз роста и до конца культивирования. Использовали 2, 10, 15 и 20% (по объему) концентрации пентанола в метаноле. Постепенное (дробное) внесение пентанола в среду позволяло снизить его токсическое влияние на растущую культуру.

Содержание биомассы определяли, измеряя оптическую плотность (ОП_{600}) в 0.5 см кювете на спектрофотометре Specol 221 (“Carl Zeiss”, Германия) и пересчитывали на сухую биомассу по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой отбирали по 50 мл суспензии клеток с известной ОП, центрифугировали (10000 g, 20 мин), полученный осадок сушили при 105°C до постоянной массы и взвешивали.

Содержание NH_4^+ в культуральной среде анализировали иономером MA-130 (“Mettler Toledo GmbH”, Швейцария) с аммонийным датчиком.

Для выделения ПГБ и ПГБВ из биомассы культуральную жидкость центрифугировали (10000 g, 30 мин), осадок сушили лиофильно. Навеску высушенной биомассы перемешивали с 6 об. метанола в течение 1 ч и центрифугировали при 5000 g 20 мин. Полученный осадок при перемешивании экстрагировали 6 об. хлороформа в течение 3 ч. Суспензию фильтровали через обеззоленную фильтровальную бумагу. Хлороформенный экстракт осветляли активированным углем марки А, который отделяли затем на воронке Бюхнера под вакуумом. Осветленный экстракт упаривали на роторном испарителе в 5–6 раз (до состояния жидкого киселя). Концентрат при энергичном перемешивании выливали в 6-кратный об. метанола. Выпавший осадок ПГБ или ПГБВ отделяли на воронке Бюхнера и сушили при 105°C.

Содержание ПГБ в биомассе и соотношение 3-ГБ и 3-ГВ в ПГБВ определяли обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой C18 [16]. Для этого образцы ПГБ гидролизovali концентрированной серной кислотой, а образцы

ПГБВ гидролизovali щелочью до кротоновой и метилкротоновой кислот, гидролизаты наносили на колонку. Через колонку пропускали элюент (смесь метанол–вода 1 : 1) со скоростью 0.4 мл/мин и элюаты анализировали при 228 нм на УФ-детекторе UVIS 200 (“Linear”, США). По калибровочной кривой определяли количество ПГБ и количество 3-ГБ и 3-ГВ в сополимере.

Мм полимеров определяли вискозиметрическим методом, измеряя вязкость растворов ПГБ и ПГБВ в хлороформе при 30°C [13]. Мм рассчитывали по уравнению Марка-Хаувинка-Куна, используя коэффициент $[\eta] = 7.7 \times 10^{-5} \text{ M}^{0.82}$ [17]. Температуру плавления (t , °C) ПГБ и ПГБВ, теплоту плавления (Дж/г), степень кристалличности и удлинения (%) при разрыве определяли методами дифференциального термического анализа на приборе STA 449 (“Jupiter NETZSCH”, Германия) и рентгеноструктурного анализа (рентгеноспектрометр D8 ADVANCE “Bruker”, Германия) соответственно [18]. Все опыты проводили в трех повторностях. В таблицах приведены средние значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

M. extorquens G-10 – аэробная метиловобактерия с сериновым типом C1-метаболизма, синтезирующая при выращивании на минеральной среде с метанолом ПГБ или ПГБВ при использовании смеси метанола с пентанолом. Данные по биосинтезу ПГБВ при дробном внесении 15%-ной смеси пентанола в метаноле на различных стадиях роста культуры представлены в табл. 1. Переход на поддержание pH посредством подачи в ферментер 10%-ного раствора NaOH для создания лимита по азоту осуществляли при достижении культурой $\text{ОП}_{600} = 70$. Чем раньше добавляли пентанол к культуре, растущей на метаноле, тем быстрее начиналось угнетение роста продуцента. При этом резко снижалось количество синтезируемого ПГБВ, но увеличивалась доля валерата и Мм сополимера. Добавление пентанола в конце логарифмической фазы в меньшей степени угнетало рост продуцента, при этом увеличивался биосинтез полимера, но уменьшалась его Мм. Из этого следовало, что добавлять пентанол целесообразно до перехода к поддержанию pH с помощью NaOH , особенно, если ставится задача получения биополимера с высокой Мм.

Во второй серии опытов исследовали влияние концентрации пентанола на рост культуры и биосинтез ПГБВ. Смесь пентанола с метанолом различной концентрации начинали подавать в ферментер при достижении $\text{ОП}_{600} = 70$, т.е. в середине логарифмической фазы роста культуры. Как видно из табл. 2, с увеличением концентрации пентанола значительно возрастало содержание валера-

Таблица 1. Влияние косубстрата (15%-ный пентанол в метаноле) на рост *M. extorquens* G-10 и биосинтез ПГБВ

Условия роста			Конечное содержание полимера в биомассе, %	Содержание валерата в ПГБВ, %	Мм ПГБВ, кДа
ОП ₆₀₀ в момент внесения пентанола	конечные значения				
		ОП ₆₀₀	АСБ, г/л		
30	50	15	30	45	1200
50	95	27	38	36	930
70	110	38	41	13	425
90	130	52	45	0	250

Таблица 2. Влияние концентрации пентанола на рост *M. extorquens* G-10 и биосинтез ПГБВ с различной Мм

Концентрация пентанола в метаноле, % (об./об.)	Биомасса, г/л	Содержание, %		Мм полимера, кДа
		полимера в биомассе	валерата в полимере	
0	48	53	0	196
2	40	45	13.6	305
10	31	40	36.0	800
15	28	38	41.0	1150
20	25	30	50.0	1500

та, а также Мм сополимера. При содержании 20% (об.) пентанола в смеси с метанолом доля валерата в сополимере достигала 50%. Увеличение концентрации пентанола в смеси значительно снижало скорость роста культуры и выход ПГБВ, что может быть связано с его токсичностью. Токсичность для клеток бактерий пентанола и пентановой кислоты была показана и другими авторами [5, 9, 14].

Некоторые физико-химические свойства полученных биополимеров приведены в табл. 3, из которой следует, что с увеличением Мм ПГБВ резко снижалась кристалличность (с 63 до 8%) сополимера, который становился более аморфным и эластичным. Снижалась также температура плавления ПГБВ с 172 до 162°C, что важно при переработке пластика, так как увеличивается разрыв между температурами плавления и температурой разложения полимера. Большая степень эластичности сополимера подтверждается значительным удлинением пластика при разрыве (с 4

до 230%), что особенно предпочтительно при использовании ПГБВ в биомедицине.

Таким образом, *M. extorquens* G-10 при росте на метаноле в присутствии пентанола способен синтезировать ПГБВ с большим диапазоном Мм в зависимости от концентрации и плотности биомассы в момент внесения косубстрата. Вариабельность Мм получаемых сополимеров расширяет перспективы их применения для различных сфер биомедицины и нанобиотехнологии. Ранее влияние источника углерода и его концентрации на Мм ПГБ исследовали у другого штамма *M. extorquens* [19]. Обнаружено, что при выращивании метиловых бактерий на избытке метанола (1.5 об./об.) Мм ПГБ снижалась до 2×10^5 Да. Напротив, при низких концентрациях метанола (0.5 об./об.) Мм возрастала до 6.0×10^5 Да. В то же время при использовании метиловых бактериями сукцината был получен ПГБ с Мм 1.7×10^6 Да. Следовательно, Мм синтезируемого метиловыми бактериями ПГБ зависела от источника углерода и его концентрации. Представляет

Таблица 3. Зависимость физико-химических свойств биополимера от его Мм и содержания валерата

Содержание валерата в полимере, %	Мм полимера, кДа	Температура плавления, °С	Теплота плавления, Дж/г	Степень кристалличности, %	Удлинение при разрыве, %
0	196	172	92.6	63.0	4.0
13.6	305	171	79.6	55.0	5.0
36.0	800	165	28.0	19.0	40.0
50.0	1500	162	11.1	8.0	230.0

интерес дальнейшее изучение причин и механизмов, обуславливающих синтез биополимеров с различными Мм.

Работа выполнялась в рамках ГК 14.740.11.0111.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anderson A.J., Dawes E.A. // *Microbiol. Rev.* 1990. V. 54. № 4. P. 450–472.
2. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение. Красноярск: Красноярский писатель, 2011. 392 с.
3. Steinbuechel A., Valentin Y.E. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1995. V. 128. № 3. P. 219–228.
4. Steinbuechel A., Wiese S.A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992. V. 37. № 1. P. 691–697.
5. Byron D. // *FEMS Microbiol. Rev.* 1995. V. 103. P. 247–250.
6. De Koning G. // *Can. J. Microbiol.* 1995. V. 41. P. 303–309.
7. Dawes E.A. // *Biosci. Reports.* 1988. V. 8. № 6. P. 537–547.
8. Ueda S., Matsumoto S., Takagi A., Yamane T. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1992. V. 98. P. 57–60.
9. Gross R.A. // *Biomedical Polymers: Designed-to-degrade Systems* / Ed. S. Shalaby. N.-Y.: Hanser Publishers, 1994. P. 173–188.
10. Короткова Н.А., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // *Микробиология.* 1999. Т. 68. № 3. С. 347–355.
11. Page W.J., Manchak J. // *Can. J. Microbiol.* 1995. V. 41. № 1. P. 106–114.
12. Taidi B., Anderson A.J., Dawes E.A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994. V. 40. P. 786–790.
13. Мышкина В.А., Иванов Е.А., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Филатова Е.В., Ружицкий А.О., Бонарцева Г.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. № 3. С. 315–323.
14. Lee I.T., Kim M.K., Kim G.J., Chang H.O., Park Y.H. // *Biotechnol. Lett.* 1995. V. 17. P. 571–574.
15. Bourque D., Pomerleau Y., Groleau D. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995. V. 44. P. 367–376.
16. Короткова Н.А., Ашин В.В., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 1997. Т. 33. № 3. С. 339–343.
17. Akita S., Einada Y., Miyaki Y., Fugita H. // *Macromol.* 1976. V. 9. № 2. P. 774–780.
18. Ребров А.В., Дубинский В.А., Некрасов Ю.П., Бонарцева Г.А., Штамм В.А., Антипов Е.М. // *Высокомолекулярные соединения.* 2002. Т. 44. № 2. С. 347–351.
19. Anderson A.J., Williams D.R., Taidi B., Dawes E.A., Ewing D.F. // *FEMS Microbiol. Rev.* 1992. V. 103. P. 93–102.

Biosynthesis of Polyhydroxybutyrate/Valerate with Different Molecular Weights during the Growth of *Methylobacterium extorquens* G-10 on a Methanol–Pentanol Mixture

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

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

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Received August 23, 2012

Abstract—The influence of the concentration and time of addition of cosubstrate (pentanol) on the molecular weight (MW) of the polyhydroxybutyrate/valerate (PHBV) copolymer synthesized by *Methylobacterium extorquens* G-10 during cultivation in a methanol-containing medium has been studied. It was shown that an increase in the pentanol concentration to 20% in a mixture with methanol stimulated the biosynthesis of PHBV with a MW of ~1500 kDa and increased the content of valerate up to 50%, especially when pentanol was added to the log phase culture. High pentanol concentrations are toxic for the producer and reduce the total yield of PHBV. An MW increase to 1500 kDa lowers the melting temperature (from 172 to 162°C) and the crystallinity degree (from 63 to 8%) of the biopolymer but increases its elasticity. The revealed variability of PHBV properties extends considerably the potential application areas of synthetic bioplastics.

УДК 582.232+637.17

ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ЧАЛА

© 2013 г. В. И. Голубев

Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии
и физиологии микроорганизмов РАН, Пушино, 142290

e-mail: wig@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 16.11.2011 г.

Обнаружен штамм кляйверомицетов, секретирующий фунгицидный токсин белковой природы. Наибольшая активность наблюдается при значении pH среды 5.0 и повышенном осмотическом давлении. Данный агент отнесен к микоцинам, действует против видов рода *Kluveromyces* и некоторых представителей таксономически родственных им таксонов.

DOI: 10.7868/S0555109913010066

Дрожжи нередко могут выступать в качестве антагонистов различных микроорганизмов. Такая их активность бывает обусловлена разными причинами: подкислением среды, накоплением в ней этанола, образованием хелатирующих соединений, гликолипидов, микоцинов (киллер-токсины) [1]. Последние представляют собой белковые вещества, действующие против таксономически родственных микоциногенным штаммам организмов. Помимо теоретических микоциногении посвящено немало и прикладных исследований, предлагающих использовать данное явление в целях конструирования устойчивых стартовых культур для бродильной промышленности, биотипирования запатентованных и патогенных штаммов, биоконтроля фитопатогенных и вызывающих порчу пищевых продуктов и кормов грибов.

К настоящему времени микоциногенные штаммы обнаружены у представителей почти всех родов дрожжевых грибов, включая *Kluveromyces van der Walt* [2–5]. За исключением *K. lactis* (Dombrowski) van der Walt [6], у которого изучены и генетические детерминанты синтеза микоцина, строение и механизм его действия, такие штаммы других видов кляйверомицетов исследованы обычно лишь в каком-либо одном аспекте.

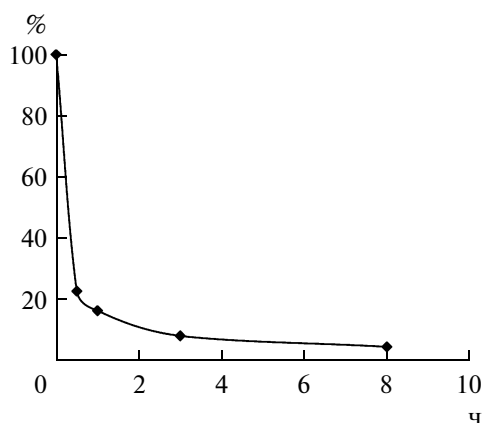
Микоциногенная активность обнаружена нами у штамма кляйверомицета, выделенного из чала, туркменского кисломолочного напитка, образующегося из верблюжьего молока в результате молочнокислого и спиртового брожения. В процессе роста микроорганизмы обогащают среду продуктами своего метаболизма [7]. Этому напитку приписывают целебные свойства и в некоторых районах Туркмении проводят курсы лечения чалом. Он используется при лечении туберкулеза и заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Цель работы – выяснение условий проявления антифунгальной активности, характеристика микоцина, секретируемого штаммом ВКМ Y-451, и установлению спектра его действия.

МЕТОДИКА

Штаммы. В работе использованы культуры Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ, <http://www.vkm.ru>). Подавляющая часть обследованных видов представлена их типовыми штаммами, а родов – типовыми видами. Исследованный в настоящей работе штамм ВКМ Y-451 поступил в коллекцию в 1948 г. от М.Ф. Цыганкова (АН Туркменской ССР). В.И. Кудрявцев отнес данный штамм к виду *Saccharomyces lactis* Adametz, рассматривая наименование *S. lactis* Dombrowski в качестве синонима [8]. Позднее он был переименован как *Kluveromyces lactis* (Dombrowski) van der Walt, а недавно на основании рестрикционного анализа некодирующих участков рДНК реидентифицирован как *K. marxianus* (Hansen) van der Walt [9]. В отличие от неотипового штамма и стандартного описания этого вида [10] ВКМ Y-451 не растет при +37°C, сбраживает трегалозу, инулин не сбраживает.

Тестирование чувствительности. Чувствительность трехсуточных культур, выращенных на суло-агаре (СА) при комнатной температуре, тестировали методом “культура против культуры”. Водную суспензию обследуемого на чувствительность штамма (0.05 мл, 10⁵ кл./мл) тщательно растирали шпателем по поверхности агаризованной среды подобранного состава (см. ниже). Затем штрихом наносили на нее обильный инокулюм штамма ВКМ Y-451. Чашки инкубировали при комнатной температуре до появления роста газона. При наличии вокруг штриха зоны подавления роста в несколько мм тестируемые штаммы реги-



Гибель клеток *Saccharomyces bayanus* ВКМ Y-523 (% от исходной концентрации 1.2×10^3 кл./мл) при инкубации в токсинсодержащей культуральной жидкости штамма ВКМ Y-451.

стрировали как чувствительные, при отсутствии зоны — как нечувствительный. При образовании узкой зоны, около 1 мм, штаммы относили к слабо чувствительным.

Получение и характеристика токсина. Для работы токсина штамм ВКМ Y-451 выращивали в жидкой среде в покое 3 сут. Клетки отделяли центрифугированием (5000 g, 10 мин) и супернатант фильтровали через стеклянные фильтры GF/A (“Sigma”, США). Полученную токсинсодержащую культуральную жидкость использовали для установления действия токсина на жизнеспособность чувствительных клеток, которую при инкубации в ней определяли высевами на СА. Она использована также для проверки устойчивости токсина к повышенной температуре и протеолизу методом лунок в агаре. Для ориентировочной оценки молекулярной массы токсина штамм ВКМ Y-451 выращивали на покрытой диализной мембраной (“Spectrum”, США) среде для тестирования чувствительности. После 7 сут инкубации мембрану вместе с выросшей на ней культурой удаляли и поверхность среды засеивали газонем чувствительного к токсину штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКМ Y-443.

Элиминация антифунгальной активности. Водную суспензию (0.1 мл, 10^4 кл./мл) штамма ВКМ Y-451 высевали газонем на СА и инкубировали при максимальной для его роста температуре. Другие чашки 3 мин облучали УФ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Антифунгальная активность штамма ВКМ Y-451 проявляется при кислых значениях pH среды и не обнаруживается уже при pH 6.0. Наибольшие по ширине зоны подавления роста чувствительных культур наблюдали при pH 5.0 (цитрат-

фосфатный буфер). Ширина этих зон вокруг штриха штамма ВКМ Y-451 возрастала при введении в среду глицерина или NaCl. Наибольшей она была при содержании глицерина 100–150 мл/л или концентрации соли 4%. Дальнейшее повышение содержания в среде глицерина и NaCl приводило к замедлению или даже отсутствию роста газона. В итоге тестирование чувствительности основной массы культур к антифунгальному агенту штамма ВКМ Y-451 осуществлено на среде следующего состава (г/л): глюкоза — 5.0, пептон — 2.5, дрожжевой экстракт — 2.0, NaCl — 40.0, Na_2HPO_4 — 7.31, моногидрат лимонной кислоты — 5.10, агар — 20.0, pH — 5.0. Штаммы, чувствительные к повышенному содержанию соли, тестировали при меньших концентрациях NaCl.

При наличии в среде метиленового синего (0.03 г/л) по границе зоны подавления роста на газоне возникала синяя кайма, что свидетельствовало об отмирании клеток чувствительного штамма. Фунгицидное действие подтвердили данные об их гибели в процессе инкубации в культуральной жидкости штамма ВКМ Y-451 (рисунок).

Для получения токсина данный штамм выращивали в среде указанного выше состава, исключив NaCl и агар, но с добавлением глицерина (100 мл/л) и содержании глюкозы 20.0 г/л.

Агент, секретируемый штаммом ВКМ Y-451, полностью инактивируется после выдерживания при 100°C (5 мин), а также после обработки пепсином (“Serva”, Германия). Он не диффундирует через диализную мембрану, не пропускающую соединения с молекулярной массой 6–8 кДа и более.

Судя по результатам проверки более 160 случайно отобранных колоний, инкубация этого штамма при максимальной для его роста температуре (34°C, СА) и облучение УФ (выживаемость при этом составляла менее 1%) не приводили к утрате антифунгальной активности.

Токсин штамма ВКМ Y-451 не действует на какие-либо из обследованных 92 видов 41 рода базидиомицетных дрожжевых грибов. К нему также нечувствительны 87 видов 48 родов аскомицетных дрожжей (табл. 1). Он активен против клейверомицетов, все виды которых, включая их анаморфы (*Candida sphaerica*, *C. kefyr*), к нему чувствительны (табл. 2). Исключения составляли единичные штаммы *K. lactis* и *K. marxianus*.

Несколько видов рода *Saccharomyces* Meyen ex Reess, таксономически близкие клейверомицетам, также чувствительны к данному токсину (табл. 3). Подавляющее большинство культур типового вида рода, *S. cerevisiae* Meyen ex Hansen, включая неотиповой штамм вида и типовый штамм его анаморфы, *S. robusta*, к нему устойчивы. Однако типовые штаммы видов *S. chevalieri* Guilliermond (syn. *S. lindneri* Guilliermond) и

Таблица 1. Дрожжи, нечувствительные к микоцину *Kluyveromyces marxianus* ВКМ Y-451 (цифры в скобках указывают количество обследованных видов, штаммов)

<i>Aciculoconidium</i> (1, 1)	<i>Kondoa</i> (1, 1)	<i>Schizoblastosporion</i> (1, 13)***
<i>Agaricostilbum</i> (1, 1)	<i>Kregervanrija</i> (1, 1)	<i>Schizosaccharomyces</i> (1, 1)
<i>Ambrosiozyma</i> (1, 1)	<i>Kurtzmanomyces</i> (1, 1)	<i>Schwanniomyces</i> (6, 8)
<i>Barnettozyma</i> (3, 15)	<i>Kwoniella</i> (1, 1)	<i>Sebacina</i> (1, 1)
<i>Bensingtonia</i> (1, 1)	<i>Leucosporidiella</i> (1, 1)	<i>Sirobasidium</i> (1, 1)
<i>Bullera</i> (1, 1)	<i>Leucosporidium</i> (1, 1)	<i>Sporidiobolus</i> (4, 4)
<i>Bulleromyces</i> (1, 1)	<i>Lipomyces</i> (3, 7)	<i>Sporobolomyces</i> (14, 21)
<i>Candida</i> (5, 6)*	<i>Lodderomyces</i> (1, 1)	<i>Sporopachydermia</i> (1, 1)
<i>Citeromyces</i> (1, 1)	<i>Magnusiomyces</i> (1, 1)	<i>Starmera</i> (2, 3)****
<i>Clavispora</i> (1, 1)	<i>Mastigobasidium</i> (1, 1)	<i>Sterigmatomyces</i> (1, 1)
<i>Cryptococcus</i> (1, 1)	<i>Metschnikowia</i> (8, 13)	<i>Sugiyamaella</i> (1, 1)
<i>Cuniculitrema</i> (1, 1)	<i>Meyerozyma</i> (1, 1)	<i>Sympodiomylopsis</i> (1, 1)
<i>Curvibasidium</i> (1, 1)	<i>Millerozyza</i> (1, 1)	<i>Tausonia</i> (2, 2)
<i>Cystofilobasidium</i> (1, 1)	<i>Mrakia</i> (1, 1)	<i>Tetrapisispora</i> (2, 2)
<i>Debaryomyces</i> (1, 1)	<i>Mrakiella</i> (1, 1)	<i>Tilletiopsis</i> (1, 1)
<i>Dioszegia</i> (1, 1)	<i>Myxozyma</i> (1, 1)	<i>Torulaspora</i> (4, 4)
<i>Dipodasopsis</i> (1, 1)	<i>Nadsonia</i> (2, 13)	<i>Tremella</i> (1, 1)
<i>Eremothecium</i> (1, 1)	<i>Nakazawaea</i> (1, 4)	<i>Trichomonoascus</i> (1, 1)
<i>Fellomyces</i> (1, 1)	<i>Nakaseomyces</i> (1, 1)	<i>Trichosporon</i> (1, 1)
<i>Erythrobasidium</i> (1, 1)	<i>Naumovozyza</i> (1, 1)	<i>Trigonopsis</i> (1, 1)
<i>Fibulobasidium</i> (1, 1)	<i>Peterozyza</i> (1, 1)	<i>Trimorphomyces</i> (1, 1)
<i>Filobasidiella</i> (1, 1)	<i>Pichia</i> (1, 1)	<i>Udeniomyces</i> (1, 1)
<i>Filobasidium</i> (1, 1)	<i>Priceomyces</i> (4, 10)**	<i>Wickerhamia</i> (1, 1)
<i>Hanseniaspora</i> (1, 1)	<i>Pseudozyma</i> (1, 1)	<i>Wickerhamiella</i> (1, 1)
<i>Holtermannia</i> (1, 1)	<i>Rhodosporeidium</i> (8, 23)	<i>Xanthophyllomyces</i> (1, 1)
<i>Hyphopichia</i> (2, 2)	<i>Rhodotorula</i> (28, 37)	<i>Yamadazyma</i> (1, 1)
<i>Itersonilia</i> (1, 1)	<i>Saccharomycopsis</i> (1, 1)	<i>Yarrowia</i> (1, 1)
<i>Kockovaella</i> (1, 1)	<i>Sakaguchia</i> (1, 1)	<i>Zygoascus</i> (2, 2)
<i>Kodamaea</i> (1, 1)	<i>Saturnispora</i> (1, 1)	<i>Zygosaccharomyces</i> (5, 29)
<i>Komagataella</i> (1, 1)	<i>Scheffersomyces</i> (1, 1)	<i>Zygorulaspora</i> (4, 4)

Слабо чувствительны: **C. glabrata* (1), ***P. castellae* (1), ***неотиповой штамм *S. starkeyi-henricii*, *****S. amethonina* (2), см. также табл. 2.

S. onubensis Santa Maria, названия которых сейчас рассматриваются в качестве синонимов *S. cerevisiae*, оказались чувствительными.

Термолабильность, чувствительность к действию пепсина и значительная молекулярная масса антифунгального токсина, секретируемого штаммом ВКМ Y-451, свидетельствуют о его белковой природе. Он проявляет фунгицидную активность (рисунок) при кислых значениях pH среды лишь против таксономически родственных продуцентов организмов (табл. 1–4). В совокупности эти характеристики позволяют отнести данный агент к микоцинам [1]. Синтез его у исследованного штамма детерминирован, вероятно, хромосомными генами, поскольку инкубация при повышенной температуре и облучение УФ, спо-

собствующие элиминации цитоплазматических генетических элементов, не приводили к утрате антифунгальной активности.

К микоцину штамма ВКМ Y-451 нечувствительны представители всех классов (*Agaricostilbomycetes*, *Microbotryomycetes*, *Tremellomycetes*, *Ustilaginomycetes*) базидомицетных дрожжей, а также аскомицетные дрожжи класса *Schizosaccharomycetes* (табл. 1). В классе *Saccharomycetes* нечувствительны к нему, за немногими исключениями (табл. 4), и члены всех семейств порядка *Saccharomycetales*, кроме представителей семейства *Saccharomycetaceae*.

В семействе же *Saccharomycetaceae* спектр действия микоцина штамма ВКМ Y-451 ограничен, главным образом, видами рода *Kluyveromyces*

Таблица 2. Внутривидовой спектр микоцина *Kluyveromyces marxianus* ВКМ Y- 451

Вид, штамм	Реакция к микоцину
<i>Kluyveromyces aestuarii</i> (Fell) van der Walt ВКМ Y-1528Т	с
<i>K. dobzhanskii</i> (Shehata et al.) van der Walt ВКМ Y-1293Т (<i>Saccharomyces dobzhanskii</i> , Т)	+
ВКМ Y-2744 (<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>dobzhanskii</i>) ВКМ Y-2745 (<i>K. marxianus</i> var. <i>dobzhanskii</i>)	+
<i>K. lactis</i> (Dombrowski) van der Walt var. <i>lactis</i> ВКМ Y-854 (<i>Zygosaccharomyces casei</i> , Т)	с
ВКМ Y-868HT (<i>Z. lactis</i>)	+
ВКМ Y-896 (<i>Z. versicolor</i> , Т)	–
ВКМ Y-1527 (<i>S. sociasi</i> , Т)	–
<i>Candida sphaerica</i> (Hammer et Cordes) Meyer et Yarrow ВКМ Y-762Т (<i>Torulopsis sphaerica</i>)	+
<i>K. lactis</i> (Dombrowski) van der Walt var. <i>drosophilorum</i> (Shehata et al.) Sidenberg et Lachance ВКМ Y-831 (<i>Zygofabospora krassilnikovii</i> , Т)	с
ВКМ Y-1296 (<i>S. phaseolosporus</i> , Т)	–
ВКМ Y-1302Т (<i>S. drosophilorum</i>)	с
ВКМ Y-1535 (<i>K. vanudenii</i> , Т)	с
ВКМ Y-1890 (<i>Z. krassilnikovii</i>)	+
<i>K. marxianus</i> (Hansen) van der Walt ВКМ Y-453, 454, 458, 461, 465, 467, 468, 470, 476 (<i>S. lactis</i>)	+
ВКМ Y-466, 469 (<i>S. lactis</i>)	с
ВКМ Y-471 (<i>S. lactis</i>)	–
ВКМ Y-486 (<i>S. muciparus</i> , Т)	+
ВКМ Y-848 (<i>Z. ashbyi</i> , Т)	+
ВКМ Y-876HT (<i>Z. marxianus</i>)	+
ВКМ Y-1187 (<i>S. macedoniensis</i> , А)	+
ВКМ Y-1242 (<i>S. fragilis</i> var. <i>bulgaricus</i> , Т)	+
ВКМ Y-1517 (<i>K. cicerisporus</i> , Т)	с
ВКМ Y-1545 (<i>K. wikenii</i> , Т)	+
<i>C. kefir</i> (Beijerinck) van Uden et Buckley ВКМ Y- 48 (<i>C. macedoniensis</i> , Т)	с
ВКМ Y-257Т (<i>Mycotorula kefir</i>)	с
ВКМ Y-258 (<i>M. lactis</i>)	+
ВКМ Y-434 (<i>S. fragrans</i> , Т)	+
ВКМ Y-922 (<i>M. lactosa</i> , Т)	+
<i>K. wickerhamii</i> (Phaff et al.) van der Walt ВКМ Y-1297Т (<i>S. wickerhamii</i>)	+

Примечания к табл. 2–4: (+) – чувствителен, с – слабо чувствителен, (–) – нечувствителен. В скобках указано наименование, под которым штамм поступил в ВКМ. Т – типовой, А – аутентичный штамм.

(табл. 2) и таксономически им родственными организмами (табл. 3). О близости их свидетельствует то, что все признанные сейчас виды клейверомицетов первоначально были описаны как саха-

ромицеты, а виды родов *Kazachstania* Zubkova, *Lachancea* Kurtzman, *Tetrapisispora* Ueda-Nishimura et Mikata и *Vanderwaltozyma* Kurtzman лишь недавно выведены из состава рода *Kluyveromyces*

Таблица 3. Спектр действия микоцина *Kluyveromyces marxianus* ВКМ У-451 среди *Saccharomyces* spp. (в скобках – количество обследованных штаммов)

Вид	Реакция к микоцину	Вид	Реакция к микоцину
<i>S. cariocanus</i> (2)	–	<i>S. kudriazevii</i> (2)	–
<i>S. bayanus</i> var. <i>bayanus</i> (4)*	+	<i>S. mikatae</i> (2)	с
<i>S. bayanus</i> var. <i>uyarum</i> (3)	+	<i>S. paradoxus</i> (8)	–
<i>S. cerevisiae</i> (49)**	–	<i>S. pastorianus</i> (3)	с

* Нечувствителен неотиповой штамм, **См. в тексте

Таблица 4. Спектр действия микоцина *Kluyveromyces marxianus* ВКМ У-451 среди аскомицетных дрожжей

Вид, количество штаммов	Реакция к микоцину	Вид, количество штаммов	Реакция к микоцину
<i>Babjeviella</i> (1, 1)	с	<i>L. suaveolens</i> (1)	–
<i>Blastobotrys adenivorans</i> (3)	с	<i>L. subsufficiens</i> (1)	–
<i>B. terrestris</i> (1)	–	<i>L. veronae</i> (1)	с
<i>Brettanomyces anomalus</i> (3)	+	<i>Ogatea minuta</i> (1)	с
<i>B. bruxellensis</i> (10)	с	<i>O. glucozyma</i> (1)	–
<i>B. custersianus</i> (1)	с	<i>O. henricii</i> (1)	с
<i>B. nanus</i> (1)	–	<i>O. methanolica</i> (1)	–
<i>Geotrichum fermentans</i> (1)	+	<i>O. methylivora</i> (1)	–
<i>Kazachstania africana</i> (1)	+	<i>O. naganishi</i> (1)	–
<i>K. barnettii</i> (2)	–	<i>O. nonfermentans</i> (1)	с
<i>K. bovina</i> (1)	–	<i>O. philodendra</i> (1)	–
<i>K. exigua</i> (<i>C. holmii</i>) (3)	с	<i>O. pini</i> (4)	+
<i>K. kunashiriensis</i> (1)	с	<i>O. polymorpha</i> (6)	–
<i>K. lodderae</i> (2)	–	<i>O. trehalophila</i> (1)	–
<i>K. rosini</i> (1)	–	<i>O. wickerhamii</i> (2)	с
<i>K. sloofiae</i> (1)	–	<i>Pachysolen tannophilus</i> (1)	+
<i>K. spencerorum</i> (2)	с	<i>Saccharomycodes ludwigii</i> (5)	с
<i>K. transvaalensis</i> (1)	с	<i>Vanderwaltozyma polyspora</i> (1)	с
<i>K. unispora</i> (3)	–	<i>Wickerhamomyces alni</i> (2)	+
<i>K. viticola</i> (1)	+	<i>W. anomalus</i> (54)	–
<i>K. yakushimaensis</i> (1)	–	<i>W. bisporus</i> (1)	+
<i>Kuraishia capsulata</i> (1)	с	<i>W. bovis</i> (1)	с
<i>Lachancea thermotolerans</i> (4)	–	<i>W. canadensis</i> (1)	–
<i>Lac. waltii</i> (1)	с	<i>W. chambardii</i> (1)	с
<i>Lindnera americana</i> (1)	с	<i>W. cifferi</i> (1)	–
<i>L. bimundalis</i> (1)	с	<i>W. lynferdii</i> (1)	–
<i>L. fabianii</i> (6)	–	<i>W. mucosus</i> (1)	–
<i>L. jadinii</i> (2)	–	<i>W. pijperi</i> (1)	–
<i>L. mrakii</i> (1)	–	<i>W. rabaulensis</i>	с
<i>L. petersonii</i> (1)	–	<i>W. silvicola</i> (1)	–
<i>L. rhodanensis</i> (1)	–	<i>W. strasburgensis</i> (3)	с
<i>L. sargentensis</i> (1)	–	<i>W. subpelliculosus</i> (5)	–
<i>L. saturnus</i> (19)	–	<i>W. sydowiorum</i> (1)	–

[10]. При этом многие из этих бывших кляйверомицетов, а также более отдаленно родственные виды устойчивы, а если чувствительны к микоцину, то обычно слабо (табл. 3, 4).

Как правило, штаммы одного вида однородны по реакции к микоцину, а встречающиеся в этом

отношении отклонения, по-видимому, не случайны. В частности, из 52 обследованных штаммов *S. cerevisiae*, в том числе неотиповой, 49 устойчивы к микоцину ВКМ У-451 (табл. 3). В противоположность им три штамма, ВКМ У-406, -407 и -2123, ранее рассматриваемые как представители от-

дельных видов, *S. chevalieri* и *S. onubensis*, оказались чувствительны, что перекликается с данными о маннанах клеточных стенок *S. chevalieri*, отличающиеся от маннанов других сахаромицетов серологически и по ПМР-спектрам [11–13]. Микоцины, как известно, сорбируются на поверхности чувствительных клеток рецепторами, имеющими в своем составе различные полисахариды клеточной стенки. Модификация их структуры приводит к изменению способности клеток сорбировать микоцин и, следовательно, реакции культур к микоцину [1]. Можно предположить, что микоцин штамма ВКМ Y-451 связывается маннансодержащими рецепторами и, вероятно, изменения в структуре маннанов этих сахаромицетов, а также единичных штаммов клюйверомицетов (табл. 2), обуславливают их нечувствительность.

Нередко различия между культурами одного таксона по микоциночувствительности могут свидетельствовать о его таксономической гетерогенности.

Биотехнологический потенциал клюйверомицетов, в частности *Kluyveromyces marxianus*, в качестве продуцентов различных ферментов, ароматических веществ, ББК, биологически активных соединений в последние годы оценивается весьма высоко [14, 15]. Микоцин этого вида дрожжей, обнаруживаемых обычно в молочных продуктах и на их производствах, может, вероятно, найти применение в молочной промышленности. Микоцин *K. wickerhamii*, например, недавно предложено использовать для защиты вин в процессе брожения, созревания и хранения от порчи бреттаномицетами [5].

Автор благодарен В.В. Ивановой за помощь в тестировании микоциночувствительности штаммов дрожжей.

Работа выполнена при финансовой поддержке МОН РФ (контакты № 16.518.11.7035, 14.518.11.7069)

и в рамках программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Golubev W.I. // Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts / Ed. C.A. Rosa, G. Péter. Berlin: Springer, 2006. P. 197–219.
2. Lehman P.F., Lemon M.B., Ferencak W.J. // Mycologia. 1987. V. 79. № 5. P. 790–794.
3. Vaughan-Martini A., Rosini G. // Mycologia. 1989. V. 81. № 2. P. 317–321.
4. Abranches J., Morais P.B., Rosa C.A., Mendonça-Hagler L., Hagler A.N. // Can. J. Microbiol. 1997. V. 43. № 4. P. 328–336.
5. Comitini F., Ciani M. // FEMS Microbiol. Lett. 2011. V. 316. № 1. P. 77–82.
6. Stark M.J.R., Boyd A., Mileham A.J., Romanos M.A. // Yeast. 1990. V. 6. № 1. P. 1–29.
7. Григорьянц Н.Н. // Вопросы питания. 1954. Т. 13. № 4. С. 41–42.
8. Кудрявцев В.И. Систематика дрожжей. М.: Изд-во АН СССР, 1954. 427 с.
9. Наумова Е.С., Наумов Г.И., Никитина Т.Н., Садыкова А.Ж., Кондратьева В.И. // Микробиология. 2012. Т. 81. № 2. С. 236–243.
10. The Yeasts, a Taxonomic Study. 5th ed. / Eds. C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout. Amsterdam: Elsevier. 2011. 2080 pp.
11. Gorin P.A.J., Spencer J.F.T. // Adv. Appl. Microbiol. 1970. V. 13. P. 25–89.
12. Campbell I. // J. Gen. Microbiol. 1972. V. 73. № 2. P. 279–301.
13. Šandula J., Kocková-Kratochvilová A., Šikl D. // J. Gen. Microbiol. 1974. V. 83. № 2. P. 339–347.
14. Fonseca G.G., Heinzle E., Wittmann C., Gombert A.K. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 79. P. 339–354.
15. Lane M.M., Burke N., Wolfe K.H., O’Byrne C.P., Morrissey J.P. // Ant. van Leeuwenh. 2011. V. 100. № 4. P. 507–519.

Fungicidal Activity of Yeast Isolated from Chal

W. I. Golubev

Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

e-mail: wig@ibpm.pushchino.ru

Received November 16, 2011

Abstract—A *Kluyveromyces* strain secreting a fungicidal proteinaceous toxin has been isolated. Its maximal activity is observed at pH 5.0 and an increased osmotic pressure. This agent has been identified as a mycocin; it is active towards species belonging to the genus *Kluyveromyces* and some representatives of taxonomically related groups.

UDC 577.154.3

INHIBITORY EFFECT OF COMPONENTS FROM *Streptomyces* SPECIES ON α -GLUCOSIDASE and α -AMYLASE OF DIFFERENT ORIGIN

© 2013 P. Meng, C. Xie, P. Geng, X. Qi, F. Zheng, F. Bai

Nankai University, Tianjin 300071, China

e-mail: baifang1122@nankai.edu.cn

Received April 26, 2012

The search for the effective and safe α -glucosidase and α -amylase inhibitors from Actinomycetaceae being antidiabetic agents is actual problem. Twenty one *Streptomyces* spp. of soil samples collected from different places of China were screened for the ability to produce this kind of inhibitory activities. Fermentation broth of isolated strains had absorbance between 350–190 nm. The *Streptomyces* strains PW003, ZG636, and ZG731 were characterized by special absorption at 280, 275, and 400 nm, respectively. Ten of the collected actinomycete strains had the ability to inhibit α -glucosidase or/and α -amylase and the fermentation broth of the same strain had inhibitory activity varied greatly depending on the enzyme source. In the process to screen the leading compounds used as antidiabetic agents, human α -glucosidase and α -amylase were revealed as the best used in trail compared with the same enzymes from other sources. Active α -glucosidase inhibitor was isolated from *Streptomyces* strain PW638 fermentation broth and identified as acarviosin I03 by MS and NMR spectrometry. Its IC₅₀ value was 1.25 and 12.23 μ g/mL against human intestinal *N*-terminal maltase-glucoamylase and human pancreatic α -amylase, respectively.

DOI: 10.7868/S0555109913020104

α -Glucosidase inhibitors were used to treat type II diabetes and obesity by suppressing the absorption of glucose and reducing postprandial hyperglycemia [1]. Current interest in these compounds has been extended to a diverse range of diseases including lysosomal storage disorders, cancer and AIDS [2]. It has been well acknowledged that microbial extracts and phytochemicals are potential alternatives to synthetic inhibitors against α -glucosidase. The use of kinetic data combined with variations in potential inhibitor structural information can elucidate the enzyme activity [3]. Such knowledge is fundamental to the discovery of lead compounds, because of their promising therapeutic potential.

The genus *Streptomyces* was described by Waksman and Henrici [4] for aerobic and spore forming Actinomycetes and emended by Kim et al. [5]. These microorganisms remain an important source of drug research for the future. *Streptomyces* were able to degrade relatively complex and recalcitrant plant and animal residues. Currently, about 10,000 antibiotics had been discovered from microorganisms. It had been estimated that approximately two thirds of these naturally occurring antibiotics were isolated from Actinomycetes [6]. All *Streptomyces* strains were acid fast negative and Gram stain positive. They differed greatly in their morphology, physiology, and biochemical activities, producing the majority of known antibiotics.

The main digestible carbohydrates in the human diet are starch and sucrose [7]. Human intestinal *N*-terminal maltase-glucoamylase (MGAMnt, EC 3.2.1.20) is a membrane anchored glycoprotein of the intestinal epithelial cells and can be solubilized by papain digestion [8]. The enzyme is more heat-stable than the other disaccharidases [9] and is the key enzyme which catalyses the final step in the digestive process of carbohydrates. Hence, α -glucosidase inhibitors can reduce postprandial plasma glucose levels and suppress postprandial hyperglycaemia, because of retarding the liberation of *D*-glucose of oligosaccharides and disaccharides from dietary complex carbohydrates and delay glucose absorption [10]. Glucosidase inhibitors delay the breakdown of carbohydrates in the small intestine and thus diminish the postprandial increase of blood glucose in diabetic subjects [11, 12].

In the course of screening for new bioactive compounds, studies are currently oriented towards the isolation of new *Streptomyces* species from uncommon habitats. It has been reported that *Streptomyces* species such as *S. hygroscopicus* [13], *S. griseus* [14], *S. fradiae* [15], and *S. lavendulae* [16] produce many bioactive compounds, while there are also many *Streptomyces* species that have not yet been shown to produce them. To select new *Streptomyces* species, several methods have been developed to identify this genus of bacteria. These include selective plating technique [17], construction of genetic marker systems [18], a combination of chemical markers, the presence of L,L-diami-

nopimelic acid and the absence of characteristic sugars in the cell wall [19]. In addition, 16S rRNA sequence data have proved invaluable in *Streptomyces* systematic, in which they have been used to identify several newly isolated *Streptomyces* species [20, 21].

In order to develop physiological functional compounds for use as antidiabetic agents, much effort has been expended in the search for effective α -glucosidase inhibitors from natural materials. In a series of our studies on extracting inhibitor from *Streptomyces* species, we previously reported that acarviosatins from *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 were a new class of α -glucosidase inhibitors [22].

The aim of the study was to isolate of 21 *Streptomyces* spp. of soil samples collected from different places of China and to test them for ability to inhibit the activity of MGAMnt and human pancreatic α -amylase (HPA, EC 3.2.1.1). Active α -glucosidase inhibitor, acarviostatin I03, was prepared from the *Streptomyces* strain PW638 broth. In the process to screen the lead compounds for use as antidiabetic agents, mammalian α -glucosidase and α -amylase were revealed as the best to be used in trail.

MATERIALS AND METHODS

Biological material. *Streptomyces* were collected from the following places of China: (i) 3 strains were isolated from a wet black mud sample collected at Anshan, Liaoning province; (ii) 7 strains were collected directly from soil samples at campus of the University of Nankai (CN); (iii) 3 strains were collected in the cave of Tai mountain; (iv) 4 strains were isolated from a paddy field, Gutian, Fujian province; (v) 4 strains were isolated from a soil sample, Shenzhou, Fujian province.

Sample collection, isolation and storage of *Streptomyces* spp. For each collected sample, 3.0 g of soil were suspended in 100 mL of 0.85% NaCl and allowed to stand for 15 min. Three different dilutions (1 : 10, 1 : 100 and 1 : 1000) were prepared using sterile saline solutions in a total volume of 10 mL. An aliquot of 0.1 mL of each dilution was plated on Gause's No. 1 synthetic medium [23]. Plates were incubated at 28°C, and monitored after 48, 72, and 96 h. Representative colonies were selected and streaked on new plates of Gause's No. 1 synthetic medium. The isolated *Streptomyces* species were preserved on Gause's No. 1 synthetic medium plates at 4°C until use. This procedure led to pure colonies of *Streptomyces*. The isolated *Streptomyces* strains were maintained as suspensions of spores and mycelial fragments in 10% glycerol (v/v) at 4°C in the Nankai University Collection of Pharmaceutical Sciences (China).

Genus identification and morphological characteristics. Visual observation of both morphological and microscopic characteristics using light microscopy and Gram staining were performed. All morphological

properties were observed on Gause's No. 1 synthetic medium and used for classification and differentiation.

Preparation of the fermentation complex. The culture of *Streptomyces* strain was filtered by hollow cellulose membrane (MOTIMO, China) with 100000 MWCO (Molecular Weight Cutoff) and the mycelium was discarded. The impurities were removed by ultrafiltration using hollow cellulose membrane with 360 and 10000 MWCO (MOTIMO, China). The effluent liquid passed through a D301R macroporous resin column (300 × 40 mm) (The Chemical Plant of Nankai University, China) to partly remove pigments, followed by a column of 001*7 cation-exchange resin (200 × 20 mm), washed with water, eluted with 0.1 M ammonia (The Chemical Plant of Nankai University, China). Then about a ninefold volume of EtOH was added to the concentrated eluate, and the supernatant was discarded after centrifugation at 3000 g, 10 min. The pellet was lyophilized to give the fermentation complex.

Purification and structure analysis of the *Streptomyces* strain PW638 fermentation complex. The *Streptomyces* strain PW638 fermentation complex was dissolved in water and filtered through a 0.45 μ m membrane (Sangon Biotech, China), then separated by semi-preparative reversed phase HPLC using a stainless steel column filled with Kromasil C₁₈ (250 × 10 mm, i.d., 10 μ m) at 25°C. The mobile phase was MeCN: water (10 : 90) at a flow rate of 5 mL/min with UV detection at 205 nm. The active fraction containing inhibitors was collected at 10.1 min. This fraction was further purified on the Waters (USA) Spherisorb S5 SCX semi-preparative column at 25°C with water: ammonia: acetic acid (1000 : 8 : 8) as the mobile phase. One active fraction containing inhibitors was collected with peak at 9.7 min.

Mass spectrometric detection was performed on a ThermoFinnigan LCQ Advantage mass spectrometer (USA) equipped with an ESI source and a mass range up to m/z 2000. Positive ion mode was employed, and the spray voltage was set at 4.5 kV. The capillary voltage was fixed at 5.0 V, and its temperature was maintained at 220°C. The solvent was nebulized using N₂ as both the sheath gas and the auxiliary gas at a flow rate of 0.8 and 0.08 L/min, respectively. NMR spectrometry was also used in the identification. The MS and NMR data then compared with the known α -glucosidase inhibitors.

The α -glucosidase inhibitory activity assay. Fifty μ L of dissolved fermentation complex and 50 μ L of 0.1 M phosphate buffer, pH 6.9, containing α -glucosidase solution (1.0 U/mL) were incubated in 96 well plates at 37°C for 10 min. After pre-incubation, 100 μ L of 5.0 mM maltose in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.9) was added to each well at 5 s interval. The reaction mixtures were incubated at 37°C for 15 min. 50 μ L aliquots were taken and added to 100 μ L of glu-

Table 1. Sources of *Streptomyces* strains investigated in the current research

Strain	Color of fermentation	pH	The fermentation product dry weight, mg/mL	Mycelial dry weight, mg/mL	Location	Gram-stain properties
PW409	Grey	9.3	6.16	2.40	Tai moutain, Shandong	+
ZG434	Light yellow	5.9	7.74	2.56	Shenzhou, Fujian	+
ZG728	Yellow	9.2	5.64	2.30	Shenzhou, Fujian	+
PW638	Light yellow	5.7	4.56	1.96	Nankai university, Tianjin	+
ZG243	Yellow	5.7	6.94	2.57	Shenzhou, Fujian	+
ZG031	Light yellow	8.1	5.44	2.34	Shenzhou, Fujian	+
PW609	Light pink	9.3	5.02	2.19	Nankai university, Tianjin	+
ZG624	Grey	9.0	3.92	1.60	Tai moutain, Shandong	+
ZG727	Light yellow	7.6	5.08	2.11	Tai moutain, Shandong	+
PZB126	Yellow	4.6	5.72	2.39	Nanjing, Jiangsu	+
PW852	Black	8.7	6.32	2.53	Nanjing, Jiangsu	+
PW698	Yellow	5.4	5.38	2.27	Nankai university, Tianjin	+
ZG731	Dark yellow	8.6	5.50	2.35	Anshan, Liaoning	+
ZG642	Yellow	7.9	5.94	2.43	Anshan, Liaoning	+
ZG084	Light yellow	7.1	4.20	1.72	Anshan, Liaoning	+
ZG159	Yellow	8.5	5.44	2.29	Gutian, Fujian	+
ZG737	Light yellow	8.9	4.74	2.07	Gutian, Fujian	+
ZG574	Dark green	9.0	6.10	2.38	Gutian, Fujian	+
ZG419	Yellow	6.9	5.04	2.18	Gutian, Fujian	+
ZG636	Light yellow	6.1	6.40	2.63	Nanjing, Jiangsu	+
PW003	Yellow	6.5	8.10	3.06	Nankai university, Tianjin	+

cose oxidase assay reagent (Sigma, USA) in a 96 well plate. Reactions were developed for 20 min and OD₄₉₀ was measured by microarray reader and compared to the control which had 50 µL of buffer solution instead of the dissolved fermentation complex. The α-glucosidase inhibitory activity was expressed as inhibition (%) and calculated as $(OD_{\text{control}} - OD_{\text{test}})/OD_{\text{control}} \times 100\%$. Each test was performed 3 times and the mean value was used to indicate the inhibitory activity of the fermentation broth.

The α-amylase inhibitory activity assay. 500 µL of dissolved fermentation complex and 500 µL of 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 6.9, with 0.006 M NaCl containing α-amylase (0.5 U/mL) were incubated for 10 min at 37°C. After pre-incubation, 500 µL of 1% starch solution in the same buffer was added to each tube at 5 s interval. The reaction mixtures were incubated at 37°C for 10 min. The reaction was stopped in a boiling water bath for 5 min and probes were cooled to room temperature. 50 µL aliquots were taken and added to 100 µL 4% iodine solution in a 96 well plate. Reaction was developed for 20 min and OD₅₄₀ was measured by microarray reader and compared to the control which had 50 µL of buffer solution instead of the dissolved fermentation complex. The α-amylase inhibi-

tory activity was expressed as inhibition (%) and calculated as $(OD_{\text{control}} - OD_{\text{test}})/OD_{\text{control}} \times 100\%$. Each test was performed 3 times and the mean value was used to indicate the inhibitory activity of the fermentation broth.

RESULTS

Taxonomy of the isolated *Streptomyces* strains. Samples collected from different regions of China, were spread on Gause'No.1 synthetic medium. All isolated strains were Gram positive, non acid fast, non-motile, aerobic actinomycetes (Table 1). The aerial mycelium was absent and well-branched yellowish or brown substrate mycelium grew on medium, showing the expected straight or flexuous forms, hooks, open loops and coils, which were used, among other features, to establish differences between them. The mature single spores on the tips of substrate mycelium were observed (0.6–0.9 µm) (Fig. 1a). It was revealed that the morphology of the spore chains varied depending on the species. The diameter of the substrate mycelium was between 0.4 and 0.7 µm (Fig. 1b). It was also observed that some strains produced diffusible pigments in the surround in medium and some of them produced melanoid pigment.

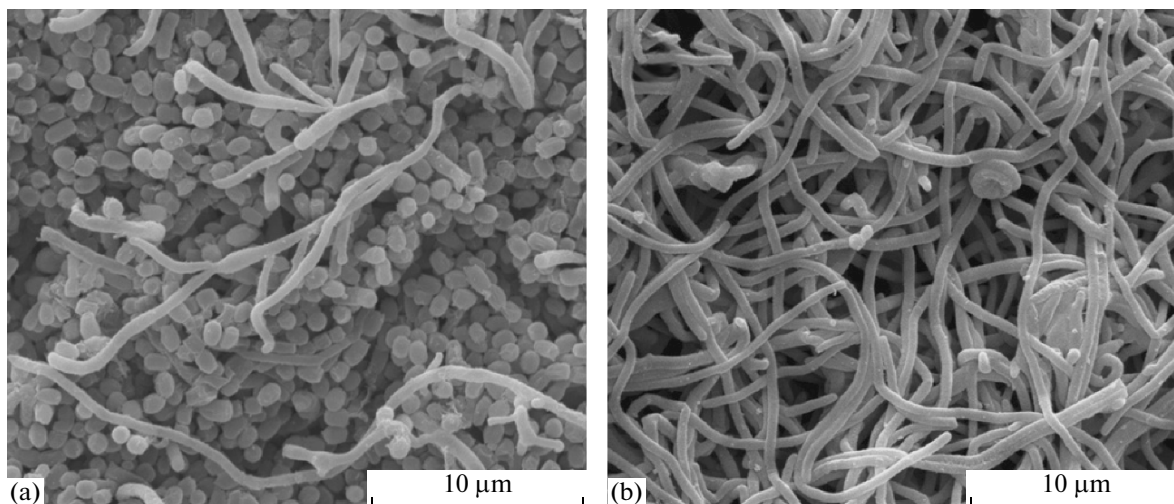


Fig. 1. Scanning electron micrograph of the *Streptomyces* strain PW609 spores (a) and the strain PW409 mycelia (b).

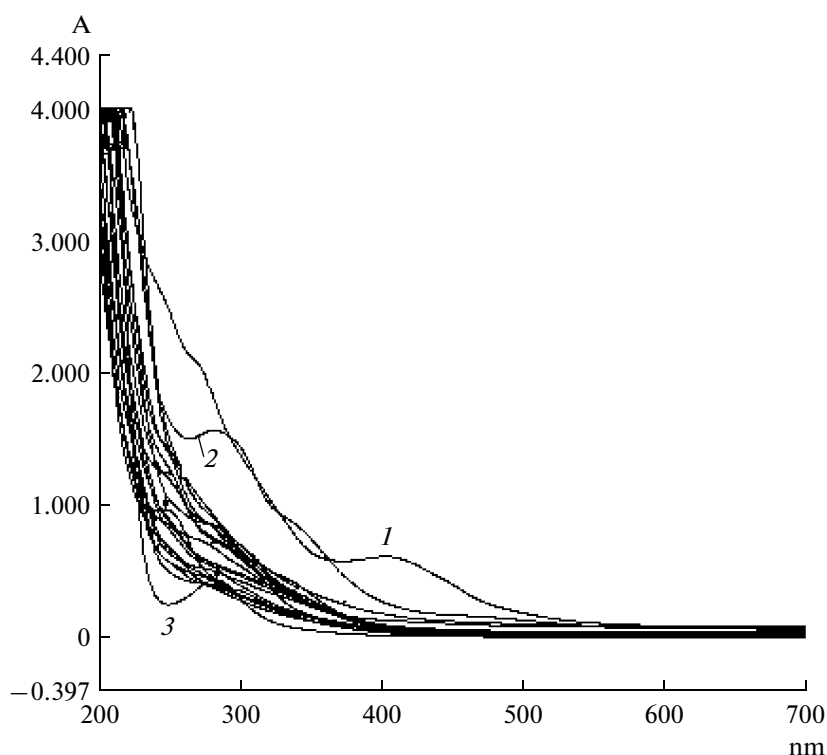


Fig. 2. Wavelength scan of the fermentation complex (1 mg/mL) of different *Streptomyces* strains between 190–700 nm. 1 – ZG731 strain; 2 – PW003 strain; 3 – ZG636 strain.

Fermentation of the *Streptomyces* strains. After incubation at 28°C for 7 days by growing in shake flasks of Gause'No.1 synthetic medium broth, cultural characteristics of the *Streptomyces* strains were determined and the most color of fermentation broth was yellow, three of them gave black, pink and green pigments. The solid contents of fermentation products from all the kinds of strains were around 5.0 mg/mL (Table 1). By observing the changes of the mycelial dry weight, it

was around 2.0 mg/mL. It was found that the fermentation product dry weight had positive relative with mycelial dry weight. The pH of culture influences the fermentation process. During the course of fermentation, for the of most of isolated strains the fermentation broth pH decreased to 4.9, maybe due to the production of organic acids.

Wavelength scan of the *Streptomyces* fermentation complex. After concentration, fermentation broth

Table 2. Inhibitory activities of the fermentation complex from different *Streptomyces* strains on HPA and rat intestinal α -amylase

Strain	Inhibitory activity (HPA)			Inhibitory activity (rat intestinal α -amylase)		
	10 mg/mL	1.0 mg/mL	0.1 mg/mL	10 mg/mL	1.0 mg/mL	0.1 mg/mL
PW409	2.7	2.2	2.4	7.3	4.6	4.2
ZG434	89.1	74.4	30.5	60.9	41.0	26.7
ZG728	2.3	2.3	2.1	6.5	4.2	4.1
PW638	1.7	1.6	1.8	1.7	1.6	1.8
ZG243	82.9	6.0	2.2	44.4	8.7	4.2
ZG031	65.5	24.0	3.0	64.2	23.8	6.7
PW609	96.3	94.0	79.5	75.0	63.6	46.4
ZG624	2.4	2.2	2.1	7.2	4.9	4.4
ZG727	2.3	2.1	2.0	5.0	4.6	4.5
PZB126	75.1	73.9	46.3	53.5	47.8	31.1
PW852	2.9	2.2	2.0	6.8	6.1	4.6
PW698	2.6	2.3	2.2	6.0	5.4	4.7
ZG731	2.9	2.2	2.0	8.1	4.6	4.5
ZG642	5.5	2.3	2.2	11.5	5.5	5.1
ZG084	44.3	2.3	2.2	17.4	5.4	4.7
ZG159	4.5	2.3	2.2	7.5	5.6	5.2
ZG737	3.0	2.2	1.9	5.5	4.9	4.4
ZG574	1.7	1.6	1.6	1.8	1.7	1.6
ZG419	7.8	2.2	2.0	13.3	4.9	4.6
ZG636	3.3	2.3	2.2	6.8	4.8	4.1
PW003	2.3	2.2	2.0	4.7	4.5	4.4

passed through ultrafilters and the macroporous resin to obtain coarse powder after precipitation of eluate by ethanol. Double distilled water was used to dissolve the powder. The UV-Vis spectra of the fermentation complex from different *Streptomyces* strains (1 mg/mL) were recorded in the wavelength range of 190 to 700 nm. Acquired absorption spectrum data are showed in Fig. 2, all the samples had absorbance between 190–350 nm. The *Streptomyces* strains PW003, ZG636, and ZG731 had peaks around 280, 275 and 400 nm, respectively.

The α -amylase inhibitory activity assay. The isolated *Streptomyces* strains were tested for their ability to inhibit α -amylase, HPA and rat intestinal α -amylase (EC 3.2.1.1). The fermentation complex was used for that. As can be observed in Table 2, 6 *Streptomyces* strains (ZG434, ZG243, ZG031, PW636, PZB126, ZG084) showed the inhibitory effect on α -amylase: at 10 mg/mL it was 89.1, 82.9, 65.5, 96.3, 75.1, 44.3% on HPA, respectively, and 60.9, 44.4, 64.2, 75.0, 53.5 and 17.4% on rat intestinal α -amylase, respectively. The inhibitory action on the HPA and rat intestinal α -amylases did not exhibited significant differences but the inhibitory activity of 6 *Streptomyces* strains on rat intestinal α -amylase was relatively weaker than on HPA at the same concentration. Increasing the concentrations of

the fermentation complex resulted corresponding increase in α -amylase inhibitory activity. The inhibitory activities of the *Streptomyces* strain ZG434 on rat intestinal α -amylase were found to be 60.89% (10 mg/mL), 40.99% (1 mg/mL) and 26.73% (0.1 mg/mL), respectively (Table 2).

The α -glucosidase inhibitory activity assay. MGAMnt and rat intestinal α -glucosidase (EC 3.2.1.20) were used to investigate the inhibitory activity of the *Streptomyces* fermentation complex. We found that the α -glucosidase inhibitory activities varied widely among the tested strains (Table 3). Six *Streptomyces* strains (PW409, PW609, PW638, PZB126, PW852, PW698) had inhibitory effect on the α -glucosidase: at 10 mg/mL it was 34.0, 63.2, 64.5, 62.6, 17.4 and 49.1% on MGAMnt, respectively, and 82.0, 60.5, 72.0, 56.3, 81.3 and 31.2% on rat intestinal α -glucosidase, respectively. The inhibitory effects of the *Streptomyces* strains PW409 and PW852 was similar for both enzymes. An increased concentration of the strain fermentation complex resulted to higher α -glucosidase inhibitory activity. The inhibitory activity of the *Streptomyces* strain PW638 fermentation complex on rat intestinal α -glucosidase was found to be 77.2%

Table 3. Inhibitory activities of the fermentation complex from different *Streptomyces* strains on MGAMnt and rat intestinal α -glucosidase

Strain	Inhibitory activity (MGAMnt)			Inhibitory activity (rat intestinal α -glucosidase)		
	10 mg/mL	1.0 mg/mL	0.1 mg/mL	10 mg/mL	1.0 mg/mL	0.1 mg/mL
PW409	34.6	21.4	10.1	82.0	79.1	35.9
ZG434	14.6	6.6	9.7	2.3	2.6	4.5
ZG728	11.1	4.8	4.4	18.2	15.8	4.1
PW638	64.5	59.5	51.4	77.2	60.5	26.8
ZG243	32.0	25.0	6.3	6.8	11.2	6.5
ZG031	37.6	19.4	11.6	6.3	2.6	0.9
PW609	63.2	59.2	53.3	60.5	44.4	11.9
ZG624	11.1	10.0	7.7	15.3	11.6	6.5
ZG727	11.1	8.9	6.4	18.5	11.6	5.4
PZB126	62.6	57.1	44.3	56.3	32.6	5.2
PW852	17.4	13.0	12.2	81.3	67.8	9.8
PW698	49.1	35.5	30.2	31.1	9.6	3.4
ZG731	18.6	18.2	13.2	14.5	9.8	6.4
ZG642	3.6	0	0	5.5	3.9	1.4
ZG084	7.2	6.3	4.6	12.4	10.1	5.3
ZG159	10.2	6.5	6.2	13.5	8.8	10.0
ZG737	2.4	1.6	6.3	11.6	5.9	5.5
ZG574	6.6	6.8	4.0	8.3	4.6	3.4
ZG419	4.7	16.8	6.4	6.1	7.2	6.8
ZG636	6.7	4.0	8.3	9.2	15.3	14.7
PW003	1.7	16.3	17.4	13.1	8.7	11.1

(10 mg/mL), 41.0% (1 mg/mL) and 26.7% (0.1 mg/mL), respectively (Table 3).

Purification and structure analysis of fermentation complex from *Streptomyces* strain PW638. The *Streptomyces* strain PW638 fermentation complex (0.5 g) was dissolved in water, separated by semi-preparative Kromasil C₁₈, the active fractions were collected at 10.1 min (Fig. 3a). The fractions were further purified on the Spherisorb S5 SCX semi-preparative column, one active fraction (9 mg) was collected with peak at 9.7 min (Fig. 3b). It had inhibitory activity against the α -glucosidase. The purity of this compound was determined by HPLC analysis.

The pale white powder was treated by completely acidic hydrolysis followed by monosaccharide analysis with the 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone precolumn derivatization HPLC method [25], the result proved that it contained glucose unit. The molecular formula was deduced as C₃₇H₆₄NO₂₈ by combined high resolution positive ESI-MS (Anal. Found [M + H]⁺ 969.3537, Calcd 970.3537). The molecular mass of the compound was determined by a ThermoFinnigan LCQ Advantage mass spectrometer. The mass spectrum showed one major peak at m/z 969.4 (Fig. 4). Its sodium adducts were revealed at m/z 991.4. The sig-

nals at m/z 807.3, 645.3 and 483.4 were due to the loss of one to three glucose units from the molecule 829.3, 667.2 and 505.4 (M + Na), respectively. The precursor ion at m/z 969.4 fragmented to generate the abundant peak at m/z 304.3 corresponding to cleavage of the glycosidic bonds, suggesting that no glucose was linked to the non-reducing end. In the further analyses, NMR was performed to identify the structure of the active compound (data not shown). Compared with the MS, ¹H NMR and ¹³C NMR spectrum of the known α -glucosidase inhibitors, the data showed that the purified α -glucosidase inhibitor from the *Streptomyces* strain PW638 fermentation broth was acarviostatin I03 speculatively (Fig. 4). The IC₅₀ value of acarviostatin I03 was 1.25 μ g/mL and 12.23 μ g/mL against MGAMnt and HPA, respectively. Acarbose and acarviostatin I03 showed similar inhibitory activity against α -glucosidases and α -amylase. They may have the same molecular mechanism to inhibit the two enzymes.

DISCUSSION

Streptomyces are known to be a rich source of bio-active compounds, notably antibiotics and enzymes.

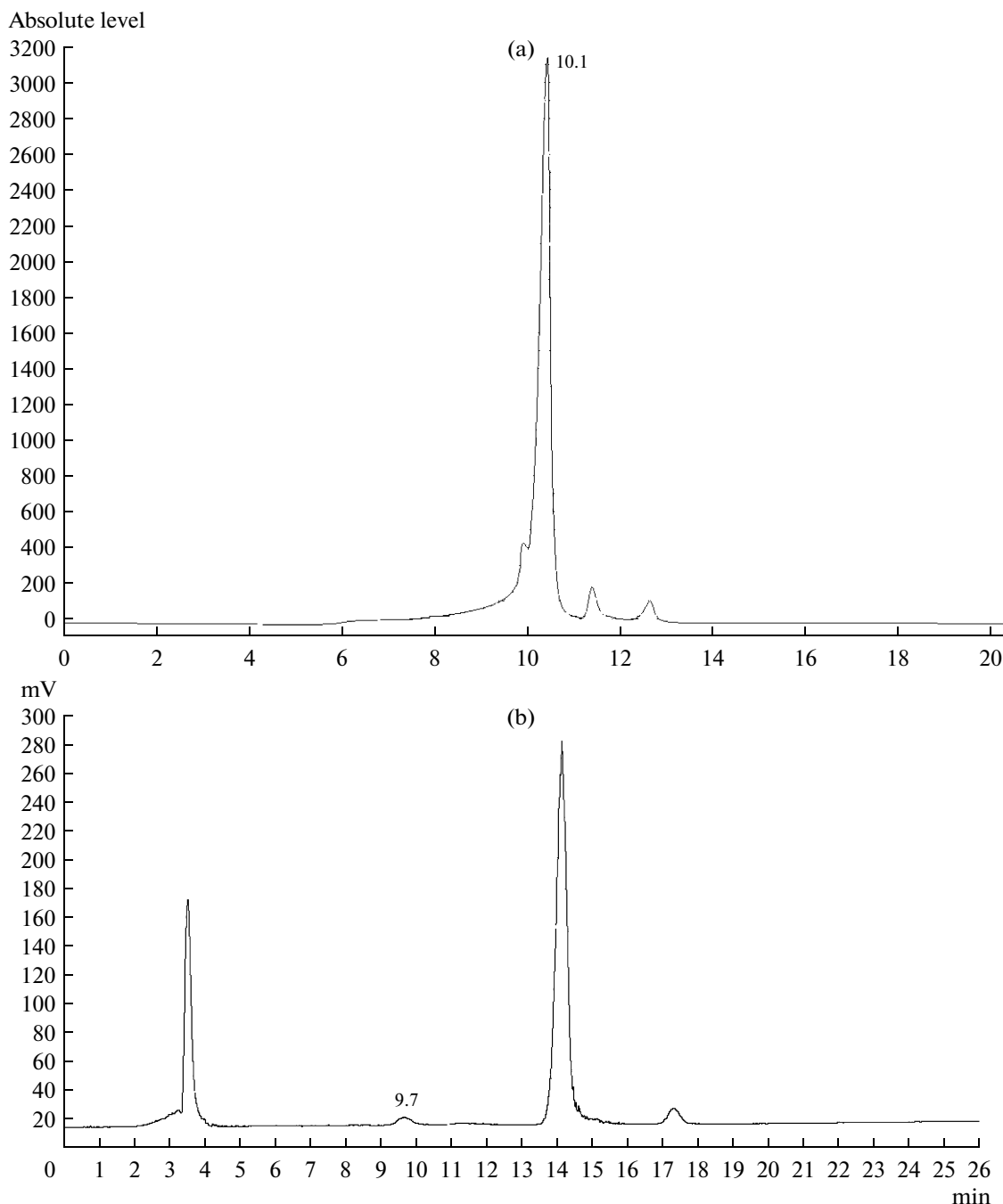


Fig. 3. HPLC of the *Streptomyces* PW638 fermentation complex on semi-preparative Kromasil column (a) and HPLC of active fraction obtained from (a) on Spherisorb S5 SCX (b).

They differ greatly in their morphology, physiology, and biochemical activities, producing the majority of known antibiotics. The phenotypic and phylogenetic data presented in this study provide clear evidence that 21 isolated microorganisms belong to different *Streptomyces* strains. Polyhydroxy glucosidase inhibitors are a widely diverse class of compounds frequently isolated from *Streptomyces*, they have significant therapeutic use or potential to manage diabetes [24]. Inhibitors

of mammalian intestinal α -glucosidase have become exciting candidates to slow down the digestion of carbohydrates and in turn mitigate postprandial hyperglycemia. Therefore, investigation of such agents from *Streptomyces* species has become more important and researchers are competing to find new, effective and safe therapeutic agents for the treatment of diabetes. Dibutyl phthalate, an α -glucosidase inhibitor from *S. melanosporofaciens* [26] and 4 acarviosin containing

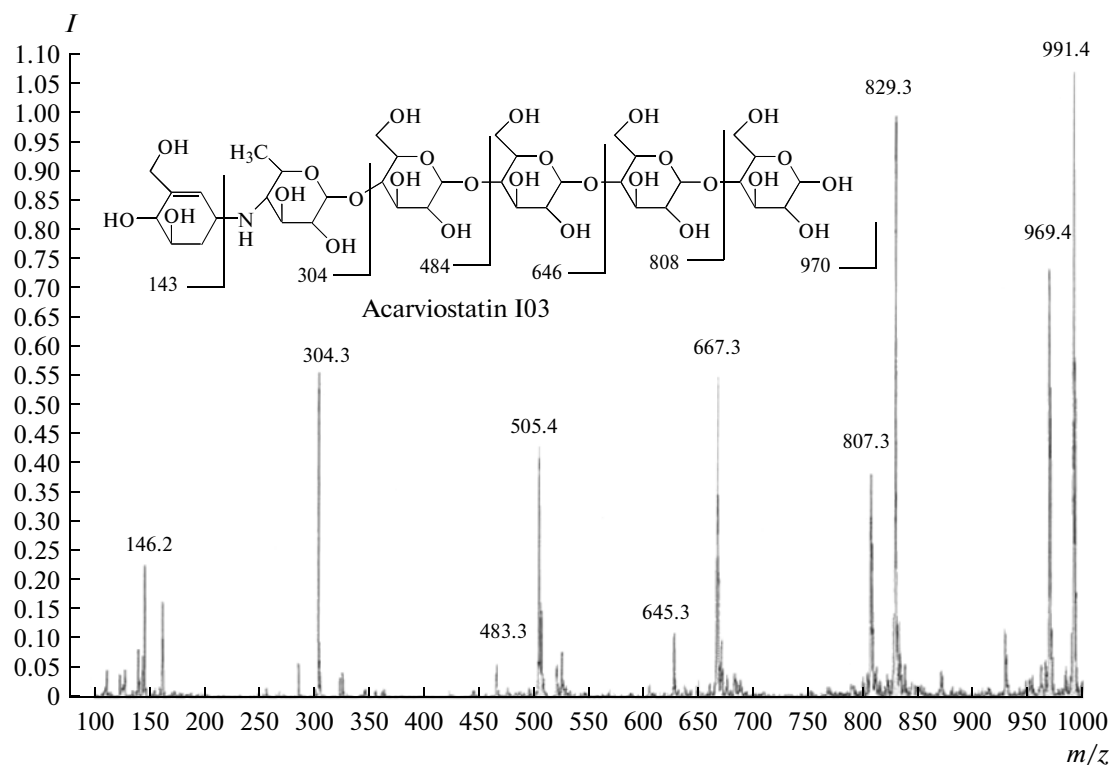


Fig. 4. Positive ESI-MS spectrum profile and chemistry structure of acarviostatins I03 obtained from HPLC active fraction (Fig. 3b).

oligosaccharides identified from *S. coelicoflavus* ZG0656 are potent inhibitors of α -amylase [27]. Among the valuable members of antidiabetic agents, most of them belong to C_7N -aminocyclitol family. Aminocyclitols are a group of microbially derived bioactive natural products with important clinical and agricultural applications [28, 29].

α -Glucosidase is widely distributed in microorganisms, plants, and animal tissues, and the substrate specificity of α -glucosidases is known to differ greatly depending on their source. The bacterial, yeast and insect enzyme, named α -glucosidase I, shows higher activity toward such heterogeneous substrates as sucrose and *p*-nitrophenyl- α -glucoside, and none or less toward such homogeneous substrates as maltooligosaccharides, implying that α -glucosidase I recognizes the glucosyl structure in the substrate. It has been reported that compounds with α -glucosidase inhibitory activity were preliminarily screened on yeast α -glucosidase (Sigma G7256) [30] and (Sigma G6136) [31]. The mold, plant, and mammalian enzyme, named α -glucosidase II, hydrolyzes the homogeneous substrates more rapidly than the heterogeneous ones, indicating that this class of α -glucosidases recognizes the maltose structure. The inhibitory activities of 2, 4, 6-tribromophenol and 2, 4-dibromophenol purified from red alga *Grateloupia elliptica* against rat intestinal sucrase and maltase were reported [32, 33]. Some α -glucosidase II enzymes also attack such α -glucans as soluble starch and glycogen.

α -Glucosidases I and II have greatly different substrates. The inhibitors which have effect on α -glucosidase I maybe fail to inhibit α -glucosidase II. Inhibitors of mammalian intestinal α -glucosidase are exciting candidates to slow down the digestion of carbohydrates and play the role in the human body. An increased concentration of the *Streptomyces* strain fermentation complex resulted in an increase in α -glucosidase inhibitory activity, and we suggest that there is a conformational change derived from binding of inhibitor to the enzyme. Among fermentation complex of the analyzed *Streptomyces* strains, a favorable correlation between MGAMnt and rat intestinal α -glucosidase inhibitory effects was not found. This was especially true for the *Streptomyces* strains PW409 and PW852, which had high enzyme inhibitory activity on rat intestinal α -glucosidase, but showed almost no effect on MGAMnt. The fermentation complex of the *Streptomyces* strains PW609 and PZB126 inhibited α -glucosidase and α -amylase at the same time. This may indicate that their fermentation complex contains the same component inhibiting both enzymes or it has 2 components, one inhibiting α -glucosidase and the other inhibiting α -amylase. The *Streptomyces* strains ZG434, ZG243, and ZG031 were able to inhibit only α -amylase, while strains PW698, PW409, PW638, and PW609 inhibited only α -glucosidase. Thus, in the process to screen out a physiological functional food or lead compounds for use as antidia-

betic agents, human α -glucosidase and α -amylase are the best to be used.

The present study introduces novel sources for the prevention of diabetes diseases. We found that 10 of the isolated *Streptomyces* strains had the ability to inhibit α -glucosidase or/and α -amylase and purified α -glucosidase inhibitor, acarviosatin I03, from the *Streptomyces* strain PW638.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (21002052), the Tianjin Municipal Science and Technology Commission, China (10JCYBJC14300) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (65011161).

REFERENCES

- Coniff, R. and Kron, A., *Clin. Ther.*, 1997, vol. 19, no. 1, pp. 16–26.
- Eduardo, B.M., Adriane, S.G., and Ivone, C., *Tetrahedron*, 2006, vol. 62, no. 44, pp. 10277–10302.
- Taifo, M., *Nat. Prod. Rep.*, 2003, vol. 20, no. 1, pp. 137–166.
- Waksman, S.A. and Henrici AT., *J. Bacteriol.*, 1943, vol. 46, no. 4, pp. 337–341.
- Kim, SB., Lonsdale, J., and Seong, C.N., *Antonie van Leeuwenhoek*, 2003, vol. 83, no. 4, pp. 107–116.
- Okami, Y. and Hotta, K., *Actinomycetes in Biotechnology*, Goodfellow M., Williams S.T., Mordarski M., Eds., London: Academic Press, 1988, pp. 33–67.
- Myers, A.M., Morel, M.K., James, M.G., and Ball, S.G., *Plant Physiol.*, 2000, vol. 122, pp. 989–997.
- Flanagan, P.R. and Forstner, G.G., *Biochem. J.*, 1978, vol. 173, no. 2, pp. 553–563.
- Auricchio, S., Semenza, G., and Rubino, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, vol. 96, pp. 498–507.
- Huang, Y.N., Zhao, Y.L., Gao, X.L., Zhao, Z.F., Jing, Z., Zeng, W.C., and Yang, R., *J. Ethnopharmacol.*, 2010, vol. 58, pp. 135–144.
- Hillebrand, I., Boehme, K., Frank, G., Fink, H., and Berchtold, P., *Res. Exp. Med. (Berlin)*, 1979, vol. 175, no. 1, pp. 81–86.
- Matsumoto, K., Yano, M., Miyake, S., Ueki, Y., Yamaguchi, Y., Akazawa, S., and Tominaga, Y., *Diabetes Care*, 1998, vol. 21, no. 2, pp. 256–260.
- Gurusiddaiah, S. and Graham, S.O., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1980, vol. 17, no. 6, pp. 980–987.
- Werner, G., Hagenmaier, H., Drautz, H., Baumgartner, A., and Zahner, H., *J. Antibiot. (Tokyo)*, 1984, vol. 37, pp. 110–117.
- Henkel, T., Ciesiolka, T., Rohr, J., and Zeeck, A., *J. Antibiot. (Tokyo)*, 1989, vol. 42, pp. 299–311.
- Kunihiro, S. and Kaneda, M., *J. Antibiot. (Tokyo)*, 2003, vol. 56, pp. 3330–3333.
- Kuster, E. and Williams, S., *Nature*, 1964, vol. 202, pp. 928–932.
- Wipat, A., Wellington, E., and Saunders, V., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, vol. 57, no. 11, pp. 23–30.
- Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1970, vol. 20, pp. 35–43.
- Taddei, A., Rodriguez, M., Marquezvilchez, E., and Castelli, C., *Microbiol. Res.*, 2006, vol. 161, no. 3, pp. 222–231.
- Bieble, H. and Sproer, C., *Syst. Appl. Microbiol.*, 2002, vol. 25, no. 4, pp. 491–497.
- Geng, P., Qiu, F., Zhu, Y.Y., and Bai, G., *Carbohydr. Res.*, 2008, vol. 343, no. 5, pp. 882–892.
- Shirling, E.B. and Gottlieb, D., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1966, vol. 16, no. 3, pp. 313–340.
- Myles, D.C., *Curr. Opin. Biotech.*, 2003, vol. 14, no. 6, pp. 627–633.
- Honda, S., Akao, E., Suzuki, S., Okuda, M., and Kakehi, K., *J. Anal. Biochem.*, 1989, vol. 180, no. 2, pp. 351–357.
- Lee, D.S., *J. Biosci. Bioeng.*, 2000, vol. 89, no. 2, pp. 271–273.
- Geng, P. and Bai, G., *Carbohydr. Res.*, 2008, vol. 343, no. 3, pp. 470–476.
- Mahmud, T., *Nat. Prod. Rep.*, 2003, vol. 20, no. 1, pp. 137–166.
- Davies, J.E., *J. Antibiot. (Tokyo)*, 2007, vol. 38, no. 8, pp. 529–532.
- Yoichi, N., Takashi, M., Shigeki, M., Rob, W.M., Soestb, V., and Nobuhiro, F., *Tetrahedron*, 2000, vol. 56, no. 46, 8977–8987.
- Choudhary, D., Jansson, I., Sarfarazi, M., and Schenkman, J.B., *Pharmacogenet. Genomics*, 2008, vol. 18, no. 8, pp. 665–676.
- Kim, K.Y., Nama, K.A., Kurihara, H.B., and Kim, S.M., *Phytochem.*, 2008, vol. 69, no. 16, pp. 2820–2825.
- Lee, S.S., Lin, H.C., and Chen, C.K., *Phytochem.*, 2008, vol. 69, no. 12, pp. 2347–2353.

UDC 576.852.1

BIOCHEMICAL PARAMETERS OF *Saccharopolyspora erythraea* DURING FEEDING AMMONIUM SULPHATE IN ERYTHROMYCIN BIOSYNTHESIS PHASE

© 2013 X. Zou^{*,**}, W.-J. Li^{***}, W. Zeng^{***}, H.-F. Hang^{*}, J. Chu^{*}, Y.-P. Zhuang^{*}, S.-L. Zhang^{**}

^{*} East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

^{**} Southwest University, Chongqing 400715, China

^{***} Yidu HEC Biochem. Co. Ltd, Hubei 443300, China

e-mail: juchu@ecust.edu.cn

Received February 8, 2012

The physiology of feeding ammonium sulphate in erythromycin biosynthesis phase of *Saccharopolyspora erythraea* on the regulation of erythromycin A (Er-A) biosynthesis was investigated in 50 L fermenter. At an optimal feeding ammonium sulphate rate of 0.03 g/L per h, the maximal Er-A production was 8281 U/mL at 174 h of growth, which was increased by 26.3% in comparison with the control (6557 U/mL at 173 h). Changes in cell metabolic response of actinomycete were observed, i.e. there was a drastic increase in the level of carbon dioxide evolution rate and oxygen consumption. Assays of the key enzyme activities and organic acids of *S. erythraea* and amino acids in culture broth revealed that cell metabolism was enhanced by ammonium assimilation, which might depend on the glutamate transamination pathway. The enhancement of cell metabolism induced an increase of the pool of TCA cycle and the metabolic flux of erythromycin biosynthesis. In general, ammonium assimilation in the erythromycin biosynthesis phase of *S. erythraea* exerted a significant impact on the carbon metabolism and formation of precursors of the process for dramatic regulation of secondary metabolites biosynthesis.

DOI: 10.7868/S0555109913020189

Erythromycin is a polyketide antibiotic produced by *Saccharopolyspora erythraea* in submerged fermentation. Erythromycin A (Er-A) is the main active component of erythromycin products. Simultaneously, there exist two structurally similar by-products of erythromycin B (Er-B) and erythromycin C (Er-C) in the culture broth. In fermentation phase, improving Er-A production is an effective way to meet the market demands and reduce the production cost.

Ammonium salts are an available inorganic nitrogen source, which usually regarded to suppress the biosynthesis of antibiotics [1]. Addition of ammonium ions (5–30 mM) to *Penicillium urticae* shake-flask culture led to a strong repression of the enzyme activities of secondary metabolism [2]. However, in cephalosporin-C fermentation, ammonium sulphate as inorganic nitrogen source was suitable for higher yield of antibiotic [3]. In previous work, we first reported that feeding ammonium sulphate in erythromycin biosynthesis phase of *S. erythraea* could affect Er-A biosynthesis [4]. Nevertheless, a thorough understanding of the physiology mechanism of ammonium assimilation for enhancing Er-A production was still lacking.

As we know, there are close links between primary and secondary metabolism, both in terms of precursors formation and nutrient regulation. Er-A has 3

structural parts with the 14-member macrolide ring and 2 deoxysugars, in which the lactonic ring requires propionyl-CoA and 6 methylmalonyl-CoA molecules as precursors for its biosynthesis [5]. These compounds could have multiple metabolic origin including catabolism of odd-numbered fatty acids, reduction of acrylate, rearrangement of succinyl-coenzyme A and catabolism of Met, Thr or Val [6, 7]. Deeper knowledge of intermediary metabolism, especially of TCA cycle enzymes and precursors supply, may provide a better understanding of the link between primary and secondary metabolism for Er-A biosynthesis.

The aim of the study was to investigate some key enzymes and metabolites profiles in carbon metabolism, and amino acids utilization in culture broth of *S. erythraea* under the optimal feeding ammonium sulphate rate in erythromycin biosynthesis phase using 50 L fermenter. The results showed that cell metabolism was enhanced by ammonium assimilation, which induced an increase of the pool of TCA cycle and the metabolic flux of erythromycin biosynthesis. The information obtained in this work should be helpful for deeper understanding of ammonium assimilation in erythromycin biosynthesis phase for the regulation of Er-A biosynthesis in *S. erythraea*.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and culture conditions. *Saccharopolyspora erythraea* № 8, an erythromycin producer strain from Yidu HEC Biochem. Co. Ltd. (Hubei, China) was used, which was publicly available [9]. Agar slants were inoculated with spores and incubated at 32°C for 7 days, and then used for seed culture inoculation. For seed cultures, the medium composition was (g/L): starch – 30, soybean flour – 15, NaCl – 5, (NH₄)₂SO₄ – 2. The seed culture was grown in a 500 mL shake flask containing 50 mL of liquid medium and incubated at 32°C on a rotary shaker (220 rpm) for 7 days. The fermentation cultivation was inoculated with 10% (v/v) of the above seed culture medium and incubated at 33°C.

Feeding ammonium sulphate in erythromycin biosynthesis phase. The 50 L fermenter was manufactured by Shanghai Guoqiang Bioengineering Equipment Co., Ltd. (China) [8], which had a 30 L (working volume) agitated bioreactor with 3 turbine impellers and equipped with devices to monitor and control more than 14 on-line measurable parameters. The stirred reactor was aerated through a ring sparger. Dissolved oxygen (DO) level was set above 20% of air saturation and controlled by adjusting agitation speed and aeration rate during fermentation. DO concentration was detected using polarographic DO electrode (Mettler Toledo, Switzerland). The CO₂ off-gas from the fermenter was measured with the gas analyzer (Chongqing Hateman measuring instruments Co., Ltd, China). The cultivation temperature was kept at 33°C, and pH was controlled at 6.9–7.0 with feeding glucose concentration of 300 g/L during the whole of fermentation process. Three independent samples were taken every 8 h for the analyses of cell biomass, erythromycin production, NH₄⁺ and total sugar concentration.

Feeding ammonium sulphate was commenced from 80 h to the end of fermentation in 50 L fermenter. The rate of the process was 0.03 g/L per h. Cultivation without feeding ammonium sulphate was used as the control.

Determination of cell biomass (packed mycelium volume, PMV). For the determination of cell biomass (PMV), 10 ml of culture broth was taken as sample, after removal of supernatant by centrifugation (4,000 × g, 10 min), PMV was calculated as the volume of precipitate/10 mL of culture broth.

Analysis of extra- and intracellular organic acids. For the determination of extra- and intracellular organic acids of metabolism, the HPLC system (Agilent 1200, USA) was equipped with AquaSep C8 column and a UV detector (210 nm). 0.6 mL/min mobile phase using 0.01 mol/L H₃PO₄ solution was applied to the column. The column was operated at 30°C [9].

Analysis of amino acids. For the determination of free amino acids in culture broth, the amino acids were derived by automatic pre-column O-phthalaldehyde (OPA) derivation methods. The HPLC was equipped with Agilent 1200 system, column ZORBAX Eclipse-AAA (4.6 mm × 150 mm, 5 μm, Agilent, USA). Mobile phase contained mixture of 0.04 M NaH₂PO₄, pH 7.0, as A phase and acetonitrile, methanol and distilled water (45 : 45 : 5, v/v) as B phase. Flow rate was 2 mL/min using UV detector at 238 nm.

Analysis of enzyme activities *in vitro*. *Preparation of cell extracts.* Enzyme activity was defined as μmol of substrate consumed per min and mg of protein (U/mg). In each case, reactor bulk liquid samples were withdrawn and centrifuged at 12,000 × g and 4°C for 15 min. The supernatant was removed and cells were resuspended with 50 mM potassium phosphate extraction buffer (pH 7.4), the ratio of buffer : cells was 10 : 1. Cells were lysed with addition of lysozyme (1 g/mL of buffer) at room temperature for 2 h. The extract was centrifuged at 12,000 × g and 4°C for 15 min to remove cell debris and the supernatant was used for subsequent activity measurements. Protein content was determined by Bradford assay method.

Pyruvate kinase. The activity of pyruvate kinase (PKS) was measured spectrophotometrically [10]. All compounds of the reaction mixture were pipetted into a colorimetric ware, and reactions initiated by adding the cell extract to give a final volume of 1 mL. The reaction mixture contained 80 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 2 mM ADP, 10 mM phosphoenolpyruvate, 2 mM NADH, and 5 U lactate dehydrogenase (Shanghai Yuanju Biotechnology Co., Ltd., China).

Citrate synthetase. The activity of citrate synthetase (CS) was detected by monitoring the disappearance of NADH during reaction [11]. The assay conditions were the following: 2 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), 0.5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 0.2 mM acetyl-CoA, and 0.15 mM oxaloacetic acid.

Glutamine synthetase. The activity of glutamine synthetase (GS) was determined by measuring the increase of glutamylhydroxamate at 540 nm [12]. The reaction mixture contained 30 mM glutamate, 0.4 mM ADP, 20 mM sodium dihydrogen arsenate, 60 mM hydroxylamine, 3 mM MnCl₂ in 40 mM imidazole buffer (pH 7.0) and cell extract in a total volume of 1 mL.

Methylmalonyl coenzyme A mutase. Methylmalonyl coenzyme A mutase (MCM) was assayed as reported by Bermudez et al. [6] with minor modifications. The activity was detected by measuring the decreased succinyl-CoA by HPLC. The reaction mixture contained 1 mM dithioerythritol, 60 μM coenzyme B₁₂, 50 μM succinyl-CoA in 100 mM Tris-buffer (pH 8.0) and cell extract in a total volume of 1 mL. The reaction was initiated by addition of succinyl-CoA and incubated in

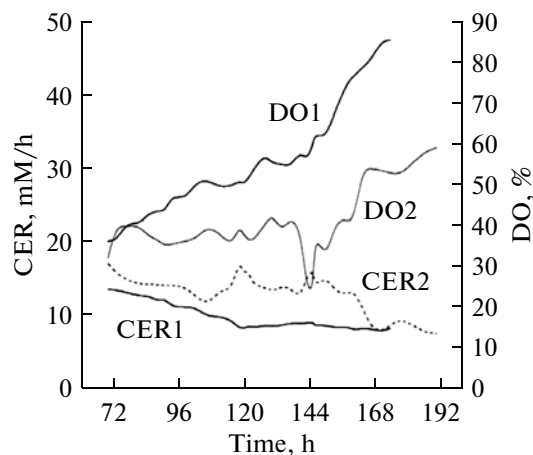


Fig. 1. The changes of the CER and DO level during growth of *S. erythraea* with feeding ammonium sulphate. CER₁ and DO₁ – control; CER₂ and DO₂ – feeding ammonium sulphate.

the dark for 30 min at 30°C. It was stopped by the addition of 20 µl perchloric acid. Precipitated protein was removed by centrifugation at 15,000 × g for 20 min, and the supernatant was assayed by HPLC chromatography. Activity was expressed as picomols of succinyl-CoA decreased per min per mg protein. The HPLC was equipped with Agilent 1200 system, column Hypersil BDS C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 µm, Elite, China). Mobile phase contained mixture of phosphate buffer (pH 7.0) and methanol (95 : 5, v/v). Flow rate was 1.2 mL/min using UV detector at 259 nm.

Protease activity. Protease activity was determined as described by Shimogaki et al. [13], using casein as

the substrate. Enzyme solution (1 mL) was added to 1 mL of casein (20 g/L), and the mixture was incubated at 40°C for 10 min. The reaction was stopped by adding 2 mL of trichloroacetic acid and kept at room temperature for 10 min followed by filtration through Whatman filter paper № 1 (USA). The supernatant (1 mL) was mixed with 5 mL of sodium carbonate and 1 mL of Folin reagent, and kept at 40°C for 20 min. The absorbance of the filtrate was measured at 680 nm. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme required to produce one µg of Tyr per min under the conditions described above.

Assay of erythromycin production and its components. The concentration of total erythromycin production was measured by the modified colorimetric method [14]. After removing the biomass and insoluble ingredients, the fermentation broth was extracted with butyl acetate. Extracted erythromycin was mixed with the 0.1 M hydrochloric acid. The aqueous phase fraction was separated with great care, and further mixed with sulfuric acid for 3 min. Its absorbance was measured at 498 nm. To confirm the production of erythromycin, the fermentation broth samples at the end of fermentation were further bioassayed against *Bacillus pumilus* CMCC (B) 63202 using cylinder plate assay method [9].

The components of erythromycin (A, B and C) were determined by HPLC method [4] with Hypersil BDS-C18 column (4 mm × 250 mm, 5 µm, Elite, China). Mobile phase contained mixture of acetonitrile and 0.025 M potassium hydrogen phosphate (60 : 40, v/v). Flow rate was 0.9 mL/min using UV detector at 215 nm.

RESULTS

Physiology of feeding ammonium sulphate in erythromycin biosynthesis phase. Based on our previous data of control the cell growth in erythromycin biosynthesis phase of *S. erythraea*, an appropriate ammonium sulphate feeding rate of 0.03 g/L per h [4] was applied in this work. The changes of erythromycin components in the culture medium with feeding ammonium sulphate were shown in Table 1. The Er-A production and the rate of Er-A to Er-C were obviously enhanced compared with the control. The highest Er-A production of 8281 U/mL at 174 h obtained was 26.3% higher than in the control (6557 U/mL at 173 h). The ratio of Er-A to Er-C was 11.39 : 1, which was increased remarkably with respect to the control (4.42 : 1).

The changes of cell metabolic response with feeding ammonium sulphate were shown in Fig. 1. In comparison with the control, the level of carbon dioxide evolution rate (CER) was remarkably enhanced after feeding ammonium sulphate in erythromycin biosynthesis phase. Correspondingly, DO concentration was

Table 1. The changes of erythromycin components in the culture medium of *S. erythraea* during feeding ammonium sulfate

Time, h	Erythromycin, U/mL			Er-A:Er-C
	A	B	C	
78	3593	201	307	11.70:1
102	5096	204	429	11.87:1
126	6185	213	580	10.66:1
150	7422	250	690	10.75:1
174	8281	235	727	11.39:1
184	8240	199	777	10.60:1
Control (173 h)	6557	199	1483	4.42:1

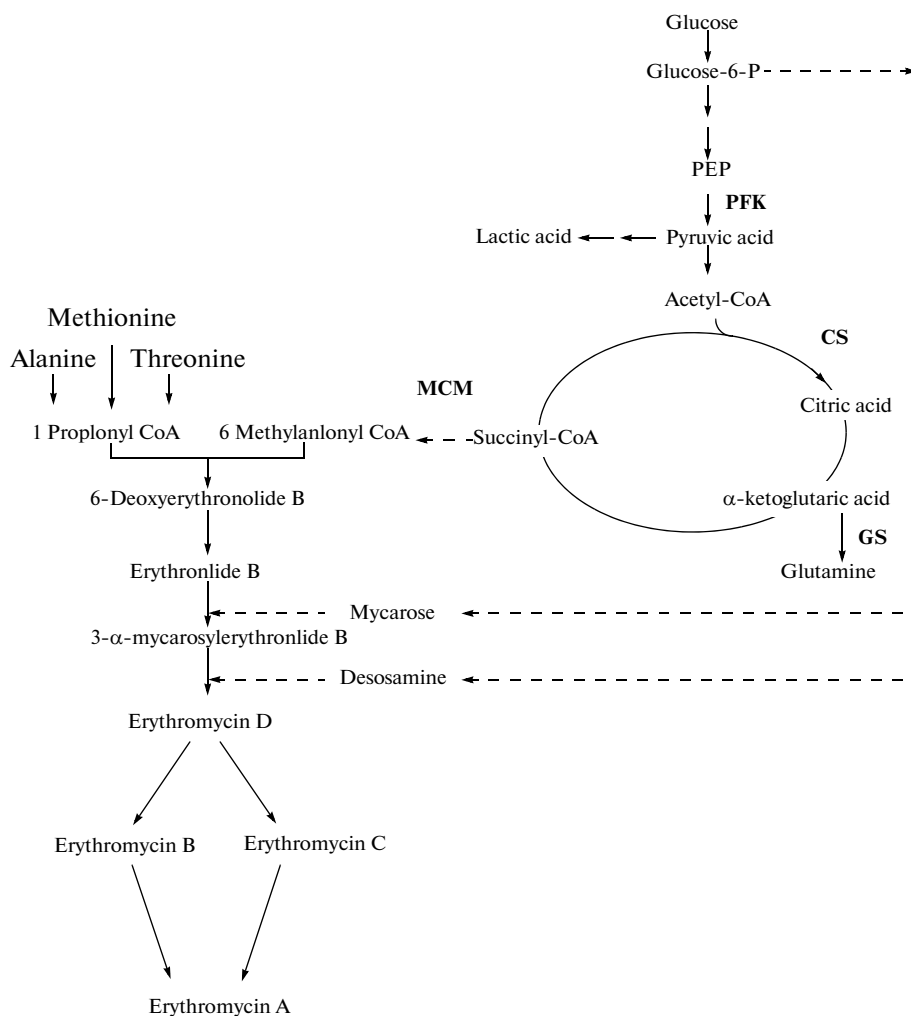


Fig. 2. The schematic representation of key metabolic pathway in erythromycin A biosynthesis [5]. The *S. erythraea* enzyme activities detected in the study shown in bold.

decreased compared with the control. These results indicated that feeding ammonium sulphate enhanced the activity of microbial metabolism.

Variation of the intra- and extracellular metabolites level and key enzymes activity. The lactonic ring of erythromycin requires propionyl-CoA and 6 methylmalonyl-CoA molecules as precursors for its biosynthesis (Fig. 2). The changes of key enzyme activities of *S. erythraea* during feeding ammonium sulphate were further investigated as shown in Fig. 3. It was revealed that the activity of PKS was similar to the control, while the activities of CS and GS were higher compared with the control. Methylmalonyl-CoA was used as precursor for erythromycin biosynthesis and its synthesis from succinyl-CoA depended mainly on the activity of MCM [5]. Fig. 3d indicated that the activity of this enzyme was higher during feeding ammonium sulphate of *S. erythraea* than that of the control. Moreover, the changes of organic acids in the process

were analyzed as shown in Fig. 4. It is obvious that the accumulation of intracellular pyruvic, citric, and lactic acids was higher compared with the control. Propionic acid was the precursor for propionyl-CoA biosynthesis, and the accumulation of this compound in the *S. erythraea* cells was more than that of the control.

Variation in utilization of amino acids and protease activity. Protease activity reflected the ability of protein broken down into amino acids. Some amino acids including Ala, Thr or Met were provided for propionyl-CoA biosynthesis as erythromycin precursors [6, 7]. As shown in Fig. 5 after feeding of actinomycete with ammonium sulphate, the protease activity was higher than in the control, which indicated that more protein was hydrolysed into amino acids. The contents of amino acids in culture broth was presented in Table 2, the total contents of amino acids were definitely lower than those of the control. The contents of Ala, Thr and Met in culture broth revealed that the level these

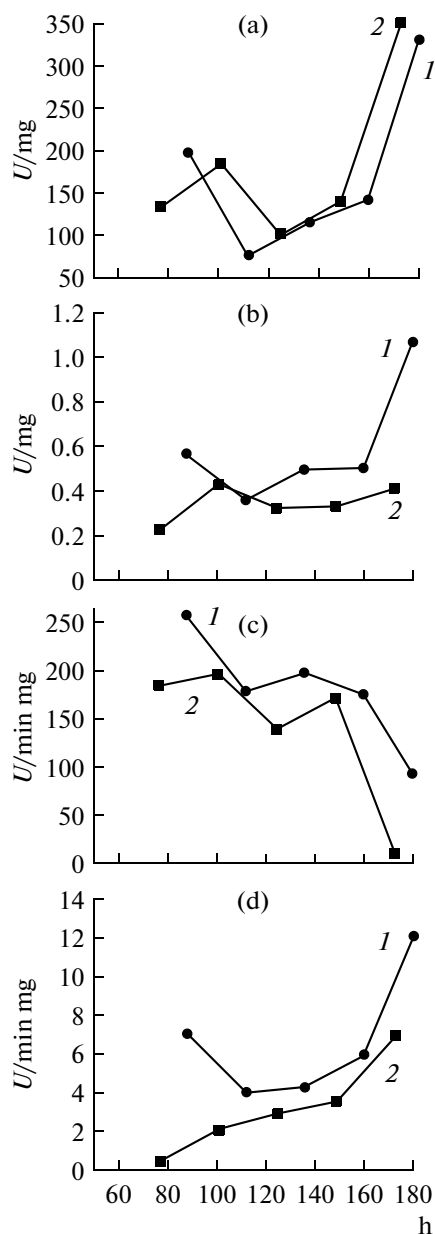


Fig. 3. The key enzymes activities (a – PFK; b – CS; c – GS; d – MCM) during growth of *S. erythraea* with feeding ammonium sulphate. 1 – feeding ammonium sulphate; 2 – the control.

3 amino acids were obviously lower compared with the control. The results implied that there were more amino acids consumed as precursors supply for erythromycin biosynthesis under high activity of protease.

DISCUSSION

Although some researchers reported that antibiotics biosynthesis may be inhibited or repressed by ammonia [15], the most striking characteristics of the

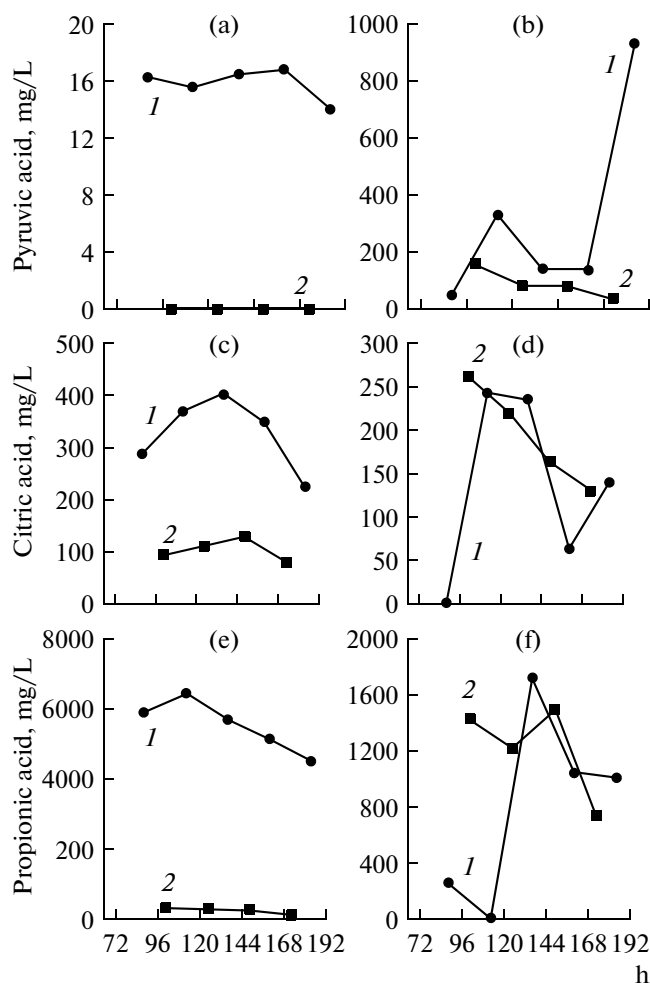


Fig. 4. Time course of the intra- (a, c, e) and extracellular (b, d, f) organic acids levels of *S. erythraea* during feeding ammonium sulphate. 1 – feeding ammonium sulphate; 2 – the control.

regulation of this process were its diversity and complexity. In this study, the physiology of feeding ammonium sulphate in erythromycin biosynthesis phase of *S. erythraea* on the regulation of Er-A biosynthesis was investigated. At an appropriate feeding rate, the maximal Er-A production was 8281 U/mL at 174 h, which was increased by 26.3% with respect to the control (6557 U/mL at 173 h). Cell metabolism revealed by the aid of some physiology parameters on bioreactor scale was enhanced by ammonium assimilation (Fig. 1).

The changes of the key enzyme activities and organic acids participating in metabolism of *S. erythraea* confirmed that ammonium assimilation might depend on the glutamate transamination pathway for enhancing the activity of microbial metabolism (Figs. 3 and 4). Ammonium assimilation promoted the cell growth, which induced the increase of the pool of TCA cycle and the metabolic flux of erythromycin biosynthesis.

In previous work, we also found that adding ammonium ions in culture medium was favorable to primary metabolism of actinomycete in meilingmycin biosynthesis [16].

Biosynthesis of antibiotics was markedly affected by compounds containing amino acids [1]. As shown in Table 2, the consumption of amino acids (Ala, Thr and Met) was obviously elevated under high activity of protease (Fig. 5), which indicated that more precursors were supplied for erythromycin biosynthesis. In our previous work, overexpression of S-adenosylmethionine synthetase which catalyzed the biosynthesis of S-adenosylmethionine (SAM) from ATP and Met was induced to erythromycin A increased by 132% and erythromycin B decreased by 30% [17]. Compared with the level of Ala and Thr in culture broth, the content of Met was lower (Table 2). We suppose that more Met used for the biosynthesis of SAM, which enhanced the biotransformation from Er-C to Er-A in actinomycete by increasing the substrate concentration of the methylation reaction, and further increased the Er-A production and the ratio of Er-A to Er-C.

In this work, it seemed that adding ammonium ions in erythromycin biosynthesis phase had no effect on

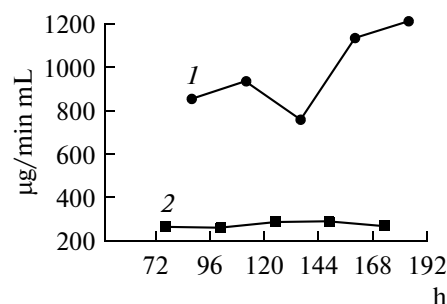


Fig. 5. Protease activity of *S. erythraea* during feeding ammonium sulphate. 1 – feeding ammonium sulphate; 2 – the control.

the activities of secondary enzymes. Instead, in patulin biosynthesis, adding ammonium ions during appearance of secondary enzymes caused a rapid decrease in specific activity [2]. In conclusion, the present study should be helpful for better understanding ammonium assimilation on the regulation of erythromycin biosynthesis. Moreover, it can also help us to establish novel strategy for regulation the central

Table 2. Variation of the amino acids contents (mg/L) in the culture broth during feeding of *S. erythraea* with ammonium sulphate and the control at the later stage of fermentation

Amino acids	Control, mg/L			Feeding ammonium sulphate, mg/L			
	101 h	125 h	149 h	88 h	112 h	136 h	160 h
Asp	24.87	30.08	28.48	0.00	6.00	5.57	13.71
Glu	55.21	90.12	117.72	20.79	36.69	82.34	339.16
Ser	11.74	10.52	15.41	4.88	7.43	8.59	17.19
His	12.23	11.62	12.84	0.00	7.97	11.39	17.65
Arg	16.49	21.53	20.16	5.79	8.69	8.69	33.09
Gly	5.24	7.62	9.05	3.23	3.39	4.00	10.62
Thr	15.10	13.96	18.23	10.09	10.37	11.49	21.85
Ala	14.07	20.36	22.21	8.59	10.87	16.31	39.28
Met	30.16	23.62	34.88	4.16	7.81	10.41	25.77
Phe	11.39	14.45	18.39	0.00	16.11	29.74	40.89
Ile	27.06	22.65	145.30	0.00	3.49	5.23	14.82
Leu	79.07	77.46	179.04	38.74	42.12	61.87	69.93
Lys	10.03	13.14	28.35	6.61	6.61	8.35	33.40
Total	413.64	482.13	799.08	190.88	279.53	399.98	837.35

metabolism in antibiotics biosynthesis phase to improve the secondary metabolites biosynthesis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by a grant from the National High Technology research and Development Program of China (863 Program), No. 2006AA020304, the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2007CB714303, and National Key Technology R&D Program, No. 2007 BAI26B02 and No. 2008BAI63B01 (China).

REFERENCES

1. Demain, A.L. and Vaishnav, P., *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2006, vol. 26, no. 2, pp. 67–82.
2. Rollins, M.J. and Gaucher, G.M., *Appl. Microbiol. Biot.*, 1994, vol. 41, no. 4, pp. 447–455.
3. Nigam, V.K., Verma, R., Kumar, A., Kundu, S., and Ghosh, P., *Electron. J. Biotech.*, 2007, vol. 10, no. 2, pp. 230–239.
4. Zou, X., Hang, H.F., Chu, J., Zhuang, Y.P., and Zhang, S.L., *Biores. Technol.*, 2009, vol. 100, no. 13, pp. 3358–3365.
5. Mironov, V.A., Sergienko, O.V., Nastasyak, I.N., and Danilenko, V.N., *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2004, vol. 40, no. 6, pp. 531–541.
6. Bermudez, O., Padilla, P., Huitron, C., and Flores, M.E., *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998, vol. 164, no. 1, pp. 77–82.
7. Tang, L., Zhang, Y.X., and Hutchinson, C.R., *J. Bacteriol.*, 1994, vol. 176, no. 19, pp. 6107–6119.
8. Zhang, S.L., Chu, J., and Zhuang, Y.P., *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2004, vol. 87, no. 3, pp. 97–150.
9. Zou, X., Hang, H.F., Chu, J., Zhuang, Y.P., and Zhang, S.L., *Biores. Technol.*, 2009, vol. 100, no. 3, pp. 1406–1412.
10. Malcovati, M. and Valentini, G., *Methods Enzymol.*, 1982, vol. 90, pp. 170–179.
11. Fortnagel, P. and Freese, E., *J. Bacteriol.*, 1968, vol. 95, no. 4, pp. 1431–1438.
12. Ferguson, A.R. and Sims, A.P., *J. Gen. Microbiol.*, 1974, vol. 80, no. 1, pp. 159–171.
13. Shimogaki, H., Takeuchi, K., Nishino, T., Ohdera, M., Kudo, T., Ohba, K., Iwama, M., and Irie, M., *Agric. Biol. Chem.*, 1991, vol. 55, no. 9, pp. 2251–2258.
14. Zou, X., Hang, H.F., Chen, C.F., Chu, J., Zhuang, Y.P., and Zhang, S.L., *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 2008, vol. 35, no. 12, pp. 1637–1642.
15. Bapat, P.M., Sinha, A., and Wangikar, P.P., *Appl. Microbiol. Biot.*, 2011, vol. 91, no. 4, pp. 1019–1028.
16. Wang, P., Zhuang, Y.P., Chu, J., and Zhang, S.L., *Acta Microbiol. Sin.*, 2005, vol. 45, no. 3, pp. 405–409.
17. Wang, Y., Wang, Y.G., Chu, J., Zhuang, Y.P., Zhang, L.X., Wang, P., Zhuang, Y.P., Chu, J., and Zhang, S.L., *Acta Microbiol. Sin.*, 2005, vol. 45, no. 3, pp. 405–409.

УДК 582.548.27:547.458.6

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ГЛЮКАНЫ СЕМЯН КАРДАМОНА НАСТОЯЩЕГО *Elettaria cardamomum*

© 2013 г. Д. Н. Оленников*, А. В. Рохин**

*Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 670047; e-mail: oldaniil@rambler.ru

**Иркутский государственный университет, Иркутск, 664033

Поступила в редакцию 15.10.2011 г.

Проведено исследование водорастворимых полисахаридов семян кардамона настоящего (*Elettaria cardamomum* White at Maton, сем. Zingiberaceae). Установлено, что в составе полисахаридов *E. cardamomum* присутствуют компоненты нейтрального и кислого характера. Из нейтральной фракции выделено три полисахарида с молекулярными массами 380, 166 и 27 кДа. По данным структурного анализа, установлено, что полимеры представляют собой α -глюканы разной степени разветвленности (7.1–46.1%), в основных цепях которых остатки α -(1→4)-D-глюкопиранозы замещены по положению C-6 единичными остатками α -D-глюкопиранозы. Полисахариды с подобным строением обладают широким спектром биологической активности. Присутствие разветвленных α -глюканов в семенах *E. cardamomum* установлено впервые.

DOI: 10.7868/S0555109913010133

Кардамон настоящий (*Elettaria cardamomum* White at Maton) – растительный вид семейства имбирных (Zingiberaceae), семена которого применяются в пищевой, парфюмерной и фармацевтической промышленности, а также в традиционной и народной медицине в качестве лекарственного средства [1]. Фармакологические исследования экстрактов и индивидуальных компонентов *E. cardamomum* выявили наличие антибактериальной [2], инсектицидной [3], антиоксидантной [4], желчегонной [5], гастропротекторной, противоязвенной [6], противовоспалительной, анальгетической, спазмолитической [7] и противоопухолевой активности [8].

Химические исследования семян кардамона показали присутствие в них эфирного масла [1], углеводов и тритерпеновых соединений [9]. Данные о других классах соединений ограничены общей информацией о липидах, белках, полисахаридах и др. Имеются сведения о том, что для семян *E. cardamomum* характерно накопление глюканов типа крахмала [1], однако данные о структуре этих биополимеров отсутствуют.

Широкое использование *E. cardamomum* как пищевого компонента (специи) предполагает наличие научной информации о составе и структурных особенностях веществ, составляющих комплекс экстрактивных веществ данного растительного вида, каковыми, в том числе, безусловно, являются водорастворимые полисахариды.

Цель работы – выделение и структурная характеристика водорастворимых глюканов семян *E. cardamomum*.

МЕТОДИКА

Семена *E. cardamomum*. Плоды кардамона были предоставлены фирмой “Padma AG” (Швейцария). Семена отделяли от перикарпиев и высушивали при 105°C в течение 5 ч, после чего измельчали на мельнице до размера частиц <0.5 мм.

Выделение фракции водорастворимых полисахаридов из *E. cardamomum*. Измельченные семена *E. cardamomum* (320 г) экстрагировали в аппарате Сокслета последовательно хлороформом, этилацетатом и метанолом. Обезжиренное сырье высушивали до постоянной массы, после чего экстрагировали водой на кипящей водяной бане (1 : 30; 3-кратная экстракция по 60 мин). Водные извлечения объединяли, концентрировали до 500 мл в вакууме, сконцентрированный остаток обрабатывали по методу Севага [10] и диализовали против дистиллированной воды в диализных трубах с пределом диализа 2 кДа (“Sigma-Aldrich Inc.”, Германия) в течение 48 ч. Диализат лиофильно высушивали. Получено 33.44 г фракции водорастворимых полисахаридов семян кардамона (ВПСК).

Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Фракцию ВПСК (30 г) растворяли в 500 мл воды, нерастворившуюся часть удаляли центрифугированием и полученный раствор наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (ОН⁻-форма, 4 × 120 см), которую последовательно промывали водой, 0.1–1 М растворами NaCl и 0.1 М раствором NaOH. Элюаты нейтрализовали HCl, диализовали против дистиллированной воды в течение 48 ч и лиофильно высушивали. Получено 6 подфракций: ВПСК-1 (элюент – вода) – 23.54 г, ВПСК-2 (элюент – 0.1 М

NaCl) – 0.05 г, ВПСК-3 (элюент – 0.3 М NaCl) – 4.22 г, ВПСК-4 (элюент – 0.5 М NaCl) – 0.49 г, ВПСК-5 (элюент – 1 М NaCl) – 0.09 г, ВПСК-6 (элюент – 0.1 М NaOH) – 0.56 г.

Углеводы определяли антрон-серноокислотным методом в пересчете на глюкозу [11], уруновые кислоты – 3,5-диметилфенол-серноокислотным методом в пересчете на галактуроновую кислоту [12], белок – по методу Бредфорд с применением кумасси G250 (“Силекс”, Россия) [13]. Оптическое вращение измеряли для 1%-ных растворов в 1%-ной КОН на поляриметре СМ-3 (“Загорский оптико-механический завод”, Россия) в кювете 1 дм при 20°C. Спектроскопические исследования проводили на спектрофотометре СФ-2000 (“Ломо”, Россия) в кварцевых кюветках 10 мм.

ИК-спектроскопия. ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрометре ФТ-801 (“Симекс”, Россия) в интервале 4000–600 см⁻¹ в таблетке с бромидом калия (1 : 100).

Гель-хроматография. Использовали Sephacryl® 300 HR (“Sigma-Aldrich Inc.”, Германия), колонка 1.6 × 60 см, элюент – фосфатный буфер, рН 5.5, скорость потока – 800 мкл/мин, объем элюатов – 1 мл, температура колонки – 20°C. Колонку градуировали с использованием стандартов декстранов с молекулярными массами 6, 100, 200, 500 кДа (“Fluka”, Швейцария). Внешний объем колонки определяли по синему декстрану (2000 кДа, “Pharmacia”, Швеция). Концентрация раствора полисахарида – 10 мг/мл, стандартов декстранов – 1 мг/мл, объем вводимой пробы – 1 мл. Объем выхода определяли спектрофотометрическим фенол-серноокислотным методом при 480 нм [14].

Гидролиз. Растворяли 10 мг полисахарида в 5 мл 2 М ТФУ и нагревали при 120°C в течение 2 ч. ТФУ удаляли в вакууме в присутствии метанола, остаток растворяли в смеси ацетонитрил–вода (3 : 1) и анализировали методом ВЭЖХ.

ВЭЖХ. Проводили на жидкостном хроматографе Милихром А-02 (“Эконова”, Россия) на колонке Searon 5-NH₂ (80 × 2 мм, 5 мкм, “Tessek Ltd.”, Чехия). Подвижная фаза: ацетонитрил–вода (3 : 1), скорость подвижной фазы 0.1 мл/мин, температура колонки 22°C. Детектирование проводили при 190 нм.

Выделение глюканов ВПСК-1-1, ВПСК-1-2 и ВПСК-1-3. Выделение проводили с применением препаративной гель-хроматографии в условиях, описанных ранее, на колонке Sephacryl® 300 HR (“Sigma-Aldrich Inc.”, Германия); объем фракций – 5 мл. Фракции, элюирующиеся в диапазоне молекулярных масс 400–350, 200–150 и 50–20 кДа объединяли, диализовали и диализаты лиофильно высушивали. Из 9 г ВПСК-1 получено 1.98 г ВПСК-1-1, 6.03 г ВПСК-1-2 и 0.44 г ВПСК-1-3.

Условия периодатного окисления, деградация по Смитту, ферментативный гидролиз с α-глюкозидазой и анализ продуктов ферментативного расщепления описаны нами ранее [15–17].

Окисление хромовым ангидридом. Реакцию проводили с хромовым ангидридом после предварительного ацетилирования по методу Хоффмана [18].

Метилирование. Метилирование полисахарида осуществляли йодистым метилом по методу [19] с последующим формолизом, гидролизом перметилата [20] и анализом методом ГХ/МС.

Газовая хроматография/масс-спектрометрия (ГХ/МС). ГХ/МС анализ проводили на хромато-масс-спектрометре 5973N/6890N MSD/DS (“Agilent”, США) с масс-селективным детектором (№ 5973) с диффузным насосом с применением капиллярной колонки РН-Innowax (30 м × 250 мкм × 0.50 мкм). Градиент температуры – 150–250°C, скорость нагрева 2°/мин. Газ-носитель – гелий, скорость потока 1 мл/мин.

Спектроскопия ЯМР. Спектры ¹³C-ЯМР регистрировали на ЯМР-спектрометре VXR 500S (“Varian”, США), рабочая частота 125.7 МГц. Спектры получены для 1%-ных растворов в ДМСО-d₆.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Водорастворимые полисахариды выделяли из семян *E. cardamomum* в результате горячей водной экстракции предварительно обезжиренного сырья с последующими депротеинизацией, диализом и лиофильной сушкой. В результате была получена фракция ВПСК с выходом 10.5% от массы семян.

Растворы ВПСК обладали положительным удельным вращением (+112°) и давали реакцию с йодом. Содержание углеводов, уруновых кислот и белка в ВПСК составляло 82.42, 7.94 и 4.15% соответственно. Исследование моносахаридного состава ВПСК показало, что доминирующим углеводом является глюкоза (83.1 моль%); также были обнаружены галактоза, арабиноза, галактуроновая кислота, рамноза, манноза и глюкуроновая кислота в соотношении 105 : 46 : 13 : 2 : 1 : 1 (табл. 1). Полученные данные указывали на преобладание во фракции ВПСК крахмалоподобных полисахаридов.

Для фракционирования ВПСК применяли хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, в результате чего было получено шесть фракций (ВПСК-1 – ВПСК-6). Максимальный выход был отмечен для фракции ВПСК-1 (78.5% от массы ВПСК), элюируемой водой и содержащей 98.4 моль% глюкозы, а также следы арабинозы и галактозы (табл. 1). Для фракций, элюируемых растворами NaCl и NaOH, было характерно меньшее содержание

Таблица 1. Характеристики водорастворимых полисахаридных фракций (1–6) *E. cardamomum*

Показатель	ВПСК	Фракция ВПСК					
		1	2	3	4	5	6
Выход, %	10.5 *	78.5 **	0.2 **	14.1 **	1.6 **	0.3 **	1.9 **
Углеводы, %	82.41	90.67	92.61	87.11	94.30	93.72	92.15
Уроновые кислоты, %	7.94	<0.5	1.15	3.75	7.29	12.32	29.11
Белок, %	4.15	<0.5	1.01	5.20	3.02	0.95	1.24
Реакция с йодом	+	+	+	–	–	–	–
$[\alpha]_D, ^\circ$	+112	+192	н.о.	+63	+106	н.о.	+122
Моносахаридный состав, моль %							
Арабиноза	4.6	сл.	11.0	22.7	37.5	30.6	23.5
Галактоза	10.5	сл.	14.7	45.8	42.3	43.8	33.7
Глюкоза	83.1	98.4	73.1	27.1	11.2	9.1	8.2
Манноза	0.1	–	–	0.4	0.2	0.6	0.8
Рамноза	0.2	–	–	сл.	1.1	2.7	3.5
Ксилоза	сл.	–	–	сл.	0.4	0.9	1.2
Галактуроновая кислота	1.3	–	1.1	3.6	6.9	12.1	26.5
Глюкуроновая кислота	0.1	–	сл.	0.2	0.3	0.1	2.5

* Выход от массы семян. ** Выход от массы ВПСК. “+” – реакция положительная. “–” – реакция отрицательная. н.о. – не определялось. сл. – следы (<0.1%).

глюкозы (8.2–73.1 моль%), присутствие кислых моносахаридов – галактуроновой и глюкуроновой кислот (1.1–26.5 и 0.2–2.5 моль% соответственно) и белка (1.01–5.20%). Наличие положительной реакции с йодом было отмечено для ВПСК-1 и ВПСК-2. Данные о моносахаридном составе ВПСК-2 – ВПСК-6 указывали на присутствие в их составе компонентов “пектинового комплекса” – арабиногалактанов и галактуронов. Таким образом, водорастворимые полисахариды семян *E. cardamomum* представляют смесь полимеров нейтрального и кислого характера.

Дальнейшему исследованию была подвергнута фракция ВПСК-1, в которой с применением гель-хроматографии установлено присутствие 3 полимеров с молекулярными массами 380 (ВПСК-1-1), 166 (ВПСК-1-2) и 27 кДа (ВПСК-1-3) (рис. 1). Выделение данных соединений проводили методом препаративной гель-хроматографии, что привело к получению гомогенных препаратов полисахаридов. Все выделенные компоненты обладали положительным удельным вращением, давали характерную реакцию с йодом, и глюкоза была единственным продуктом полного гидролиза. Доминирующим являлся полимер ВПСК-1-2, содержание которого в ВПСК составляло 69.7%.

В ИК-спектре ВПСК-1-2 присутствовали полосы при 935 и 852 см⁻¹, указывающие на наличие α-гликозидных связей, а также при 1151, 1079 и

1024 см⁻¹, характерные для пиранозных колец (рис. 2). Общий характер спектра близок к таковому крахмалоподобных α-глюканов [21].

При периодатном окислении ВПСК-1-2 расходовалось 1.30 моль IO₄⁻ на ангидрозвено, выделение муравьиной кислоты составило 0.32 моль/ангидрозвено (табл. 2). После деградации по Смитту продукта периодатного окисления в гидролизате были обнаружены глицерин и эритрит в соотношении 1 : 2.19; присутствие моносахаридов выяв-

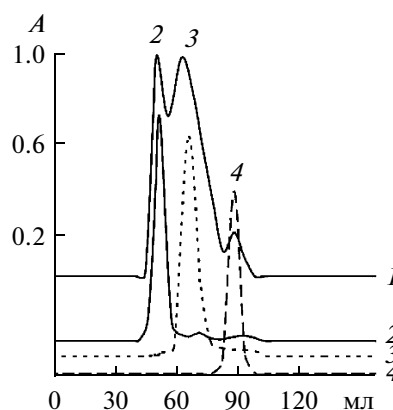


Рис. 1. Гель-хроматограммы фракции ВПСК-1 (1) и компонентов ВПСК-1-1 (2), ВПСК-1-2 (3), ВПСК-1-3 (4).

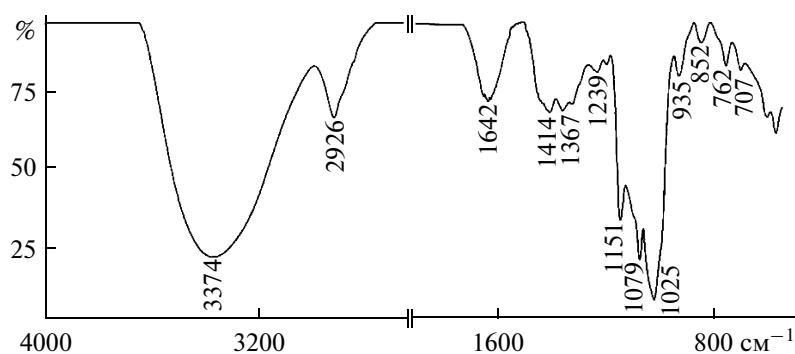


Рис. 2. ИК-спектр компонента ВПСК-1-2. Цифрами обозначены значения волновых чисел.

лено не было. Подобный характер расщепления свидетельствовал о присутствии в структуре ВПСК-1-2 связей (1→4)- и (1→6)-типов, а обнаружение глицерина указывало на наличие точек ветвления у основной цепи полисахарида.

Для определения конфигурации глюкозы в ВПСК-1-2, полисахарид подвергали ацетилированию с последующей обработкой CrO_3 . Продукт окисления гидролизовали и после анализа установили присутствие глюкозы, что подтверждало ее α -конфигурацию.

Согласно данным ГХ/МС анализа, после метилирования в составе продуктов гидролиза ВПСК-1-2 обнаружены 2,3,4,6-тетраметил-глюкопираноза,

2,3,6-триметилглюкопираноза и 2,3-диметилглюкопираноза в соотношении 1.01 : 1.19 : 1 (табл. 2). Полученные результаты указывали на то, что ВПСК-1-2 содержит в основной цепи остатки (1→4)-связанной глюкопиранозы, замещенной по положению С-6 единичными остатками глюкопиранозы. Обнаружение в продуктах гидролиза небольшого количества 2,3,4-триметилглюкопиранозы свидетельствовало о присутствии более длинных участков из 1,6-связанной глюкопиранозы в составе боковых цепей или о включении подобных фрагментов в неразветвленные участки основной цепи полимера.

Ферментативное расщепление ВПСК-1-2 α -глюкозидазой привело к получению ряда продуктов

Таблица 2. Свойства, результаты периодатного окисления и метилирования компонентов ВПСК-1-1, ВПСК-1-2 и ВПСК-1-3

Показатель	Компонент		
	ВПСК-1-1	ВПСК-1-2	ВПСК-1-3
Содержание в ВПСК-1, %	23.7	69.7	6.6
$[\alpha]_D, ^\circ$	+135	+182	+191
Молекулярная масса, кДа	380	166	27
Периодатное окисление			
Расход IO_4^- *	1.12	1.30	1.07
Выделение HCOOH *	0.12	0.32	0.07
Соотношение глицерин : эритрит	1 : 6.3	1 : 2.19	1 : 13.1
Метилирование **			
2,3,4,6-тетраметил-глюкопираноза [ГП-(1→)]	13.0	31.4	6.5
2,3,6-триметил-глюкопираноза [→4)-ГП-(1→]	73.5	37.1	86.7
2,3,4-триметил-глюкопираноза [→6)-ГП-(1→]	0.7	0.4	0.4
2,3-диметил-глюкопираноза [→4,6)-ГП-(1→]	12.8	31.1	6.4
Степень разветвления основной цепи (%)			
Периодатное окисление	15.9	45.7	7.6
Метилирование	15.1	46.1	7.1
^{13}C -ЯМР спектроскопия	15.4	46.0	7.5

* Моль/ангидрозвено. ** В скобках указан тип связи, соответствующий метилированному углеводу. ГП – глюкопираноза.

Таблица 3. Положение и интерпретация сигналов ¹³C-ЯМР спектра ВПСК-1-2

Моносахаридный остаток цепи полимера	¹³ C-химический сдвиг (δ), м.д.					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
4-О-α-D-глюкопиранозил	99.2	70.9	72.8	77.1	69.3	59.9
4,6-ди-О-α-D-глюкопиранозил	98.8	71.1	72.3	77.6	70.7	68.9
α-D-глюкопиранозил	99.5	72.2	73.9	70.2	72.5	60.0
α-D-глюкопираноза	92.7	72.1	73.4	70.4	72.1	61.3

деградации, идентифицированных как глюкоза, О-α-глюкопиранозил-(1→4)-глюкопираноза (мальтоза), О-α-глюкопиранозил-(1→4)-О-α-глюкопиранозил-(1→4)-глюкопираноза (мальтотриоза) и О-α-глюкопиранозил-(1→4)-О-α-глюкопиранозил-(1→4)-О-α-глюкопиранозил-(1→4)-глюкопираноза (мальтотетраоза).

В ¹³C-ЯМР-спектре ВПСК-1-2 были обнаружены полосы, отнесенные к остаткам единичной глюкопиранозы боковых цепей, а также незамещенной и замещенной глюкопиранозы основной цепи полимера (табл. 3) [22]. Подтверждена α-конфигурация остатков глюкозы по положению сигналов атомов C-1 в слабом поле (98.8–99.5 м.д.). Для замещенных и незамещенных остатков глюкопиранозы основной цепи отмечалось наличие сдвига сигналов атомов C-4 (+7.4 и +6.9 м.д. соответственно) по сравнению с таковым свободной α-глюкопиранозы, что возможно при участии данного атома в образовании связи (1→4)-типа [23]. Для атома C-6 замещенной глюкозы основной цепи также установлено смещение на +7.6 м.д., объясняемое наличием ветвлений по данному положению. Величина этого сдвига (68.9 м.д.) свидетельствовала о том, что данный атом гликозилирован α-заместителем [24]. Последнее обстоятельство подтверждалось смещением сигнала атома C-5 замещенных остатков глюкопиранозы основной цепи на +1.4 м.д. в сравнении с таковым незамещенных остатков, обусловленное α-эффектом заместителя по C-6.

Соотношение интегральных интенсивностей сигналов атомов C-6 замещенной и незамещенной глюкопиранозы основной цепи составляло 1 : 2.17, что соответствовало 46%-ной степени разветвленности и было близко к значениям, полученным ранее методом периодатного окисления (45.7%) и метилирования (46.1%).

Проведенные исследования показали, что доминирующий водорастворимый полисахарид семян *E. cardamomum* представляет собой высоко разветвленный глюкан, основная цепь которого построена из остатков α-(1→4)-связанной глюкопиранозы, замещенных у атомов C-6 единичными остатками α-глюкопиранозы.

Исследования структуры полимеров ВПСК-1-1 и ВПСК-1-3, содержание которых во фракции

ВПСК составило 23.7 и 6.6% соответственно, показали, что они являются близкими по строению к ВПСК-1-2 за исключением меньшей степени разветвленности основной цепи: 15.4% для ВПСК-1-1 и 7.5% для ВПСК-1-3. Следует также отметить, что для ВПСК-1-1 характерно большее содержание 1,6-связанных остатков глюкопиранозы.

Согласно данным литературы, α-глюканы растительного происхождения обладают различными видами фармакологического действия: гипогликемическое (*Panax ginseng*), иммуностимулирующее (*Scutellaria baicalensis*, *Sophora flavescens*, *Astragalus mongholicus*), противопухоловое (*Aloe arborescens*), противокашлевое (*Althaea officinalis*) и др. [16, 17, 25]. Вероятно, присутствие в семенах *E. cardamomum* данного класса полисахаридов, наравне с другими соединениями, объясняет наличие у препаратов из него широкого спектра биологической активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта СО РАН № VI.52.1.3 и Лаврентьевского конкурса молодежных проектов СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cardamom: The genus *Ellettaria* / Eds. P.N. Ravindran, K.J. Mdhusoodanan. London, New York: Francis & Taylor, 2002. P. 69–90.
2. Tanaka Y., Kikuzaki H., Nakatani N. // Jap. J. Food Chem. 2002. V. 9. № 2. P. 67–76.
3. Huang Y., Lam S.L., Ho S.H. // J. Storage Prod. Res. 2000. V. 36. № 2. P. 107–117.
4. Hinneburg I., Damien Dorman H.J., Hiltunen R. // Food Chem. 2006. V. 97. № 1. P. 122–129.
5. Yamahara J., Kimura H., Kobayashi M. // Chem. Pharm. Bull. 1985. V. 33. № 4. P. 1669–1675.
6. Jamal A., Javed K., Aslam M., Jafri M.A. // J. Ethnopharmacol. 2006. V. 103. № 2. P. 149–153.
7. Al-Zuhair H., El-Sayeh B., Ameen H.A., Al-Shoora H. // Pharmacol. Res. 1996. V. 34. № 1–2. P. 79–82.
8. Sengupta A., Ghosh S., Bhattacharjee S. // Asian Pacific J. Cancer Prev. 2005. V. 6. № 2. P. 118–122.
9. Gopalakrishnan M., Narayanan C.S., Grenz M. // J. Agric. Food Chem. 1990. V. 38. № 12. P. 2133–2136.
10. Sevag M.G., Lackman D.B., Smolens J. // J. Biol. Chem. 1938. V. 124. № 2. P. 425–436.

11. Olennikov D.N., Tankhaeva L.M., Samuelsen A.B. // Chem. Natur. Comp. 2006. V. 42. № 3. P. 265–268.
12. Usov A.T., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Bot. Marina. 1995. V. 35. № 1. P. 43–51.
13. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 2. P. 248–254.
14. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 3. P. 350–356.
15. Olennikov D.N., Rokhin A.V., Tankhaeva L.M. // Chem. Natur. Comp. 2009. V. 45. № 3. P. 300–303.
16. Olennikov D.N., Stolbikova A.V., Rokhin A.V., Khobrakova V.B., Tankhaeva L.M. // Chem. Natur. Comp. 2011. V. 47. № 1. P. 1–6.
17. Olennikov D.N., Stolbikova A.V., Rokhin A.V., Khobrakova V.B. // Chem. Natur. Comp. 2011. V. 47. № 2. P. 190–193.
18. Hoffmann J., Lindberg B., Svenson S. // Acta Chem. Scand. 1972. V. 26. № 4. P. 661–667.
19. Ciukanu I., Kerek F. // Carbohydr. Res. 1984. V. 131. № 2. P. 209–217.
20. Olennikov D.N., Tankhaeva L.M. // Chem. Natur. Comp. 2007. V. 43. № 5. P. 501–507.
21. Li Sh.-g., Wang D.-g., Tian W., Wang X.-x., Zhao J.-x., Liu Zh., Chen R. // Carbohydr. Polym. 2008. V. 73. № 2. P. 344–350.
22. Шапков А.С., Чушков О.С. // Биоорганическая химия. 1976. Т. 2. № 4. С. 437–497.
23. Lipkind G.M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Vinogradov E.V., Kochetkov N.K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59–75.
24. Egorov A.V., Mestechkina N.M., Shcherbukhin V.D. // Appl. Biochem. Microbiol. 2003. V. 39. № 4. P. 398–402.
25. Arifkhodzhaev A.O. // Chem. Natur. Comp. 1997. V. 33. № 1. P. 1–10.

Water-Soluble Glucans from True Cardamom (*Elettaria cardamomum* White at Maton) Seeds

D. N. Olennikov^a and A. V. Rokhin^b

^a*Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, 670047 Russia*
e-mail: oldaniil@rambler.ru

^b*Irkutsk State University, Irkutsk, 664033 Russia*

Received October 15, 2011

Abstract—Water-soluble polysaccharides from seeds of true cardamom (*Elettaria cardamomum* White at Maton, family Zingiberaceae) have been studied. The study has shown the presence of neutral and acidic components in these polysaccharides. Three polysaccharides (380, 166, and 27 kDa) have been isolated from the neutral fraction. According to the structural analysis data, they represent α -glucans with different degrees of branching (7.1–46.1%); α -(1→4)-D-glucopyranose residues of their backbone chains are substituted at the C6 position with single α -D-glucopyranose residues. Polysaccharides with such structures have a wide range of biological activity. The presence of branched α -glucans in *E. cardamomum* seeds has been demonstrated.

УДК 543.95:543.55:543.38

АЭРОБНЫЕ МЕТИЛОБАКТЕРИИ КАК ОСНОВА БИОСЕНСОРА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ДИХЛОРМЕТАНА

© 2013 г. Ю. В. Плеханова, Ю. Е. Фирсова, Н. В. Доронина, Ю. А. Троценко, А. Н. Решетилов

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

e-mail: anamol@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 15.05.2012 г.

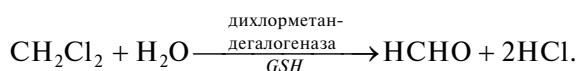
Клетки бактерий-деструкторов дихлорметана (ДХМ) иммобилизовали сорбцией на различных типах мембран, которые фиксировали на измерительной поверхности рН-чувствительного полевого транзистора. Наличие ДХМ в среде (0.6–8.8 мМ) вызывало изменение выходного сигнала транзистора, обусловленное появлением ионов H^+ в среде в результате утилизации ДХМ метиловыми бактериями. Из 4 штаммов метиловых бактерий – *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4, *Methylobacterium extorquens* ДМ17, *Methylopila helvetica* ДМ6 и *Ancylobacter dichloromethanicus* ДМ16 – наиболее высокая и стабильная активность в отношении деградации ДХМ выявлена у штамма *M. dichloromethanicum* ДМ4. Из 11 типов мембран для иммобилизации клеток в качестве оптимальных носителей выбраны нитроцеллюлозные мембраны типа Millipore и хроматографическая стеклобумага GF/A, позволяющие получать стабильные сигналы биосенсора в течение 2 нед. без замены биорецептора.

DOI: 10.7868/S0555109913020141

Широкое использование дихлорметана (ДХМ), некоторые области применения которого показаны на рис. 1, требует постоянного контроля за его содержанием в городских и промышленных стоках. ДХМ относится к классу галогенированных производных метана и является распространенным загрязнителем окружающей среды [1–3]. Известно, что ДХМ обладает высокой токсичностью для млекопитающих, вызывает образование опухолей печени и легких у мышей и крыс [4], оказывает канцерогенное действие на эритроциты, печень и почки человека [5, 6].

ДХМ считается одним из основных загрязнителей воды и атмосферы, так как в атмосфере период его полураспада составляет 70 сут, а в водных средах около 700 лет [7, 8], поэтому, разработка высокочувствительных, экспрессных и простых по конструкции аналитических устройств, таких, как биосенсоры, для определения ДХМ в промышленных и городских стоках является актуальной задачей.

ДХМ эффективно утилизируется некоторыми видами метилотрофных бактерий. Первый этап утилизации ДХМ как источника углерода и энергии микроорганизмами заключается в гидролитическом дегалогенировании с образованием формальдегида и неорганического хлорида. Реакция катализируется дихлорметандегалогеназой [9]:



Этот процесс у аэробных метиловых бактерий, использующих ДХМ в качестве источника углерода

и энергии, сопровождается образованием в цитоплазме высоких концентраций HCl. При этом ионы H^+ и Cl^- экскретируются в среду [10].

Процесс биодеструкции ДХМ обычно оценивают с помощью газовой хроматографии [11], с использованием радиоизотопов [12], а также спектрофотометрически по концентрации ионов хлора в культуральной жидкости [13]. Известен также биосенсор для определения ДХМ [14], основанный на комбинации преобразователей, состоящий из проточного калориметра и электрода, чувствительного к ионам хлора. Анализ основан на использовании клеток *Hyphomicrobium* DM2, иммобилизованных в альгинат.

Поскольку при биодеградации ДХМ в среду выделяются не только ионы хлора, но и протоны, этот процесс можно отслеживать с помощью рН-чувствительных полевых транзисторов (ПТ) [15, 16]. Миниатюрные ПТ часто применяют в качестве электрохимических преобразователей сигналов биосенсоров для детекции различных токсичных соединений, например пестицидов (атразин [17], 2,4-Д [18]), токсинов (β -бунгаротоксин из яда змеи *Bungarus multicinctus* [19]). Известно применение полевых транзисторов, содержащих алкогольоксидазу и клетки метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* для определения формальдегида [20]. Применение полевых транзисторов для определения дихлорметана неизвестно.

Цель работы – создание биосенсора на основе полевого транзистора с иммобилизованными на нем клетками метилотрофных деструкторов ДХМ



Рис. 1. Области применения дихлорметана.

для детекции ДХМ в лабораторных условиях и изучение параметров биосенсорного анализа.

МЕТОДИКА

Реагенты. В качестве иммобилизационных материалов в экспериментах использовали хроматографическую стекlobумагу GF/A (“Whatman”, Великобритания); нитроцеллюлозные мембраны Millipore с различным размером пор (“Sigma”, США, размер пор 0.22, 0.30, 0.45 и 0.65 мкм); регенерированную целлюлозу на полипропилене (размер пор ~500 Å), полисульфонамид на лавсане (размер пор ~1000 Å), полиэфирсульфон на лавсане (размер пор ~0.22 мкм), ацетат целлюлозы на тканевом лавсане (размер пор ~1000 Å), которые получены на ЗАО ТНЦ “Владипор” (Россия); нетканые материалы – термоскрепленный полипропилен ТС-1 и ТС-2 (ОАО “НИИ нетканых материалов”, г. Серпухов, Моск. обл., Россия). В качестве компонентов измерительной среды использовали хлорид натрия, натрий фосфорнокислый двузамещенный, натрий фосфорнокислый однозамещенный (“Диакон”, Россия), дихлорметан (“Синтакон”, Россия).

Рецепторный элемент биосенсора. Для приготовления рецепторного элемента биосенсора использовали суспензии клеток аэробных деструкторов ДХМ: *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4 ВКМ В-2191 (=DSM 6343), *Methylopila helvetica* ДМ6, *Ancylobacter dichloromethanicus* ДМ16 ВКМ В-2484 (=DSM 21507) и *Methylobacterium extorquens* ДМ17. Штаммы выделены из мест с длительным селективным давлением поллютанта: из загрязненного грунта и ила очистных сооружений химических предприятий Швейцарии, Германии и России.

Бактерии выращивали на среде “К”, содержащей (г/л): KH_2PO_4 – 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2.0, NaCl –

0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.025, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.002, pH 7.2. Культивирование на ДХМ проводили в колбах Эрленмейера объемом 300 мл, содержащих 50 мл среды, закрытых заворачивающимися крышками с резиновой мембраной (“Precision Sampling Corp.”, Baton Rouge, США) при 29°C на качалке (180 об/мин). ДХМ вносили в среду через мембрану шприцем порциями до конечной концентрации 10 мМ. По мере сдвига pH до 5.0 добавляли 3.0 М NaOH до pH 7.0. Для культивирования *A. dichloromethanicus* ДМ16 в стерильную среду “К” добавляли биотин и пантотенат (20 мкг/л).

Выращенные таким образом клетки с индуцированной дихлорметандегалогеназой центрифугировали при 10000 g в течение 3 мин, промывали дважды калий-фосфатным буфером и затем разбавляли исходный объем клеток в два раза таким же буфером; 5 мкл суспензии клеток наносили на мембрану, имеющую размер 3×3 мм² и подсушивали на воздухе в течение 10–15 мин. Затем мембрану закрепляли с помощью фиксатора на поверхности измерительного электрода, которым являлся ПТ.

Преобразователь сигнала биосенсора. В работе использовали ПТ, изготовленные на НПО “Позитрон” (г. Санкт-Петербург, Россия. pH-чувствительной мембраной служил слой пятиокиси тантала на затворной области ПТ. Химическая чувствительность ПТ составляла 45–56 мВ/pH. После усиления сигнал поступал на компьютер для регистрации и обработки данных. Измеряемым параметром являлась амплитуда сигнала ПТ. Измерения выполняли в стеклянной кювете объемом 2.0 мл при постоянном перемешивании и температуре 20–22°C в натрий-фосфатном буфере (pH 7.2, 1 мМ).

Оценка диффузионной проницаемости мембран. Фрагменты мембран помещали на затворную pH-

чувствительную область транзистора, регистрировали базовый уровень сигнала затем добавляли 10 мкл 0.1 М HCl (конечная концентрация в кювете 0.5 мМ). Регистрировали время от внесения вещества до начала развития сигнала и скорость изменения сигнала, коррелирующие со скоростью диффузии протонов в данном материале.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Скрининг штаммов метилобактерий по интенсивности биодеградации ДХМ. На рис. 2 представлены калибровочные зависимости, позволяющие определять ДХМ с помощью метилобактерий *M. dichloromethanicum* ДМ4, *M. extorquens* ДМ17, *M. helvetica* ДМ6, *A. dichloromethanicus* ДМ16, использующих ДХМ в качестве источника углерода и энергии сериновым (ДМ4, ДМ17, ДМ6) или рибулозобисфосфатным (ДМ16) путями C₁-метаболизма. Калибровочные зависимости для четырех штаммов микроорганизмов описываются уравнениями, представленными в табл. 1. Основные характеристики биосенсоров, вычисленные на основании этих зависимостей, показаны там же. Область линейности, соответствующее уравнение регрессии и коэффициент вариации вычислены с помощью программы Microsoft Office Excel 2003.

Для создания биосенсора лучшие характеристики выявлены у штамма *M. dichloromethanicum* ДМ4. Штамм характеризовался высокой активностью в отношении деградации ДХМ и устойчивостью к различным факторам окружающей

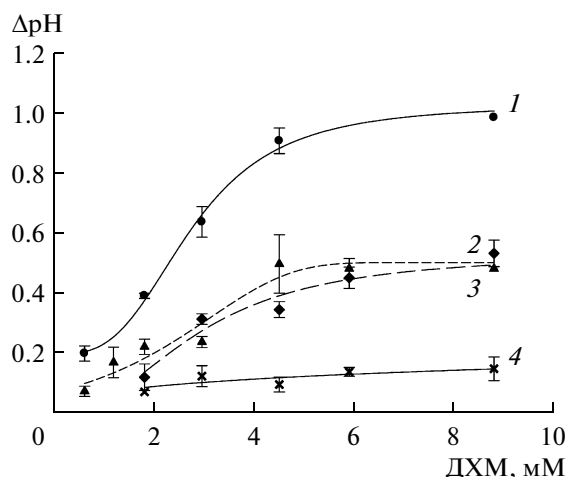


Рис. 2. Калибровочные зависимости для определения ДХМ с помощью различных штаммов микроорганизмов: 1 – *Methylobacterium dichloromethanicum* ДМ4; 2 – *Methylopila helvetica* ДМ6; 3 – *Methylobacterium extorquens* ДМ17; 4 – *Ancylobacter dichloromethanicus* ДМ16. Ось Y – сигнал биосенсора.

среды: ультрафиолетовому излучению, пероксиду водорода, колебаниям pH и температуры, высушиванию [21]. Кроме того, клетки этого штамма хорошо иммобилизовались на носителях и не утрачивали способности к деградации поллютанта при длительном культивировании в неселективных условиях, что связано с хромосомной локализацией соответствующих генов [22].

Таблица 1. Основные характеристики биосенсоров на основе разных бактериальных штаммов – деструкторов ДХМ

Характеристика	<i>Methylobacterium dichloromethanicum</i> ДМ4	<i>Methylopila helvetica</i> ДМ6	<i>Methylobacterium extorquens</i> ДМ17	<i>Ancylobacter dichloromethanicus</i> ДМ16
Уравнение, описывающее калибровочную зависимость	$V = V_0 + \frac{V_{max}S^h}{K_M^h + S^h}$, где $V_0 = 0.16$; $V_{max} = 0.88$; $h = 2.73$; $K_M = 2.67$; $R^2 = 0.99$	$V = V_0 + \frac{V_{max}S^h}{K_M^h + S^h}$, где $V_0 = 0.09$; $V_{max} = 0.42$; $h = 3.50$; $K_M = 2.15$; $R^2 = 0.92$	$V = \frac{V_{max}S^h}{K_M^h + S^h}$, где $V_{max} = 0.53$; $h = 2.75$; $K_M = 2.72$; $R^2 = 0.98$	$V = \frac{V_{max}S^h}{K_M^h + S^h}$, где $V_{max} = 0.14$; $h = 3.53$; $K_M = 1.82$; $R^2 = 0.58$
Линейный диапазон детекции, мМ	1.0–4.5 мМ	0.6–1.8	1.8–6.0	1.8–3.0
Уравнение регрессии для линейного участка	$y = 0.2067x$	$y = 0.1277x$	$y = 0.0757x$	$y = 0.0408x$
Коэффициент корреляции	0.99	0.96	0.99	0.99
Коэффициент чувствительности, pH/мМ	0.26	0.19	0.16	0.07
Минимальный предел обнаружения, мМ	0.6	0.6	1.8	2.0
Диапазон детекции, мМ	0.6–8.8	0.6–6.0	1.8–8.8	2.0–8.8
Коэффициент вариации, %	7	8–20	8	11–28

Таблица 2. Данные по диффузионной проницаемости мембран и активности клеток *M. dichloromethanicum* ДМ4 на разных типах мембран

Тип мембраны	ΔT , с	V_0 , рН/с	A_1 , рН	A_4 , рН
ПТ без мембраны	20	4.4	–	–
GF/A	55	0.4	0.07 ± 0.0064	0.32 ± 0.0197
Полисульфонамид на лавсане	45	0.6	0.06 ± 0.0111	0.05 ± 0.005
Ацетат целлюлозы на тканевом лавсане	56	1.0	0.04 ± 0.0108	0.06 ± 0.0197
Полиэфирсульфон на лавсане	65	0.6	0.10 ± 0.0115	0.09 ± 0.0099
Регенерированная целлюлоза на полипропилене	124	0.6	0.10 ± 0.0115	0.18 ± 0.074
Термоскрепленный полипропилен ТС 1	201	0.5	0.11 ± 0.0107	0.12 ± 0.049
Термоскрепленный полипропилен ТС 2	113	0.7	0.06 ± 0.0112	0.17 ± 0.015
Millipore type GS (0.22 мкм)	60	1.6	0.03 ± 0.0061	0.20 ± 0.0099
Millipore type PH (0.30 мкм)	37	1.4	0.06 ± 0.0107	0.18 ± 0.035
Millipore type HVLP (0.45 мкм)	92	1.5	0.04 ± 0.0081	0.21 ± 0.074
Millipore type DA (0.65 мкм)	60	1.4	0.07 ± 0.0115	0.49 ± 0.0099

Оценка операционной стабильности биосенсора на основе штамма *M. dichloromethanicum* ДМ4 проводилась на основании статистической обработки выборки из 17 измерений концентрации ДХМ, равной 1.8 мМ. Коэффициент вариации (отношение среднеквадратичного отклонения, составляющего 0.027 рН, к среднему арифметическому значению сигнала, равному 0.37 рН) составил 7.3%.

Оценка диффузионной проницаемости различных типов мембран с помощью ПТ. Физико-химические параметры мембран: размер пор, структура, ионообменные и, в частности, протонсвязывающие свойства влияют на скорость диффузии субстратов к иммобилизованным клеткам. В свою очередь, скорость диффузии определяет время сенсорного измерения. Таким образом, крайне важной является сравнительная характеристика диффузионной проницаемости различных мембран. Для измерения этой величины регистрировали сигналы транзистора, возникающие при скачкообразном изменении рН раствора при внесении в кювету раствора соляной кислоты.

Установленные в результате этих экспериментов величины ΔT (время, прошедшее от введения вещества до начала развития сигнала ПТ) и максимальная начальная скорость изменения тока (V_0) для мембран приведены в табл. 2. Время ответной реакции самого транзистора, не содержащего покрытий на измерительной поверхности, не превышало 20 с и связано со временем, необходимым на перемешивание магнитной мешалкой введенного вещества в кювете.

По возрастанию параметра ΔT мембраны располагаются в следующий ряд: Millipore (размер пор 0.30 мкм) – полисульфонамид на лавсане – GF/A – ацетат целлюлозы на тканевом лавсане – Millipore

(размер пор 0.22 мкм)/Millipore (размер пор 0.65 мкм) – полиэфирсульфон на лавсане – Millipore (размер пор 0.45 мкм) – ТС 2 – регенерированная целлюлоза на полипропилене – ТС 1. По уменьшению начальной скорости сигнала мембраны располагаются в следующий ряд: Millipore (размер пор 0.22 мкм) – Millipore (размер пор 0.45 мкм) – Millipore (размер пор 0.30 мкм)/Millipore (размер пор 0.65 мкм) – ацетат целлюлозы на тканевом лавсане – ТС 2 – полиэфирсульфон на лавсане/полисульфонамид на лавсане/регенерированная целлюлоза на полипропилене – ТС 1 – GF/A.

Эти результаты свидетельствуют о том, что при регистрации сигналов с помощью рН-чувствительного ПТ более предпочтительно использование нитроцеллюлозных мембран типа Millipore; они обеспечивали быструю диффузию протонов к затворной области транзистора и высокую начальную скорость ответа. Указанные факторы важны для уменьшения времени анализа, а также для снижения ошибок при измерении начальной скорости ферментативной реакции, регистрируемая величина которой может быть ограничена медленной диффузией субстратов к иммобилизованным клеткам через мембрану.

Активность клеток на различных носителях. Помимо диффузионной проницаемости мембран, необходимы оценки активности клеток микроорганизмов, иммобилизованных сорбцией на этих типах мембран, при биодеградации ДХМ, а также времени, в течение которого активность будет сохраняться.

В первые сутки измерений сигналы, полученные от клеток, иммобилизованных на различных типах носителей, были примерно одинаковы – величина сигналов варьировала в пределах 0.03–0.07 рН (при концентрации

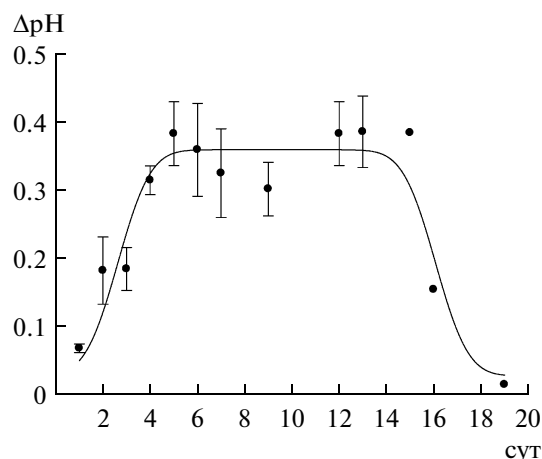


Рис. 3. Стабильность биосенсора. Концентрация клеток *M. dichloromethanicum* ДМ4 на мембране GF/A – 5 мг сырой биомассы, концентрация добавленного ДХМ – 1.8 мМ. Ось Y – сигнал биосенсора.

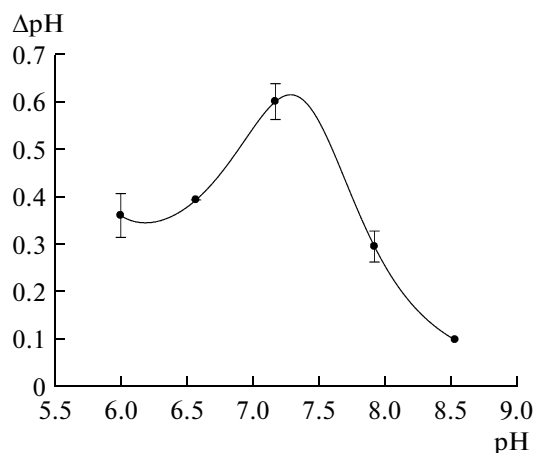


Рис. 4. Зависимость сигнала биосенсора (ΔpH) на основе клеток *M. dichloromethanicum* ДМ4 от pH буферного раствора. Концентрация клеток на мембране GF/A – 4.7 мг сырой биомассы, концентрация добавленного ДХМ – 2.95 мМ. Ось Y – сигнал биосенсора.

ДХМ – 1.8 мМ). Исключение составляли три мембраны: регенерированная целлюлоза на полипропилене (0.10 рН), полиэфирсульфон на лавсане (0.10 рН) и ТС 1 (0.11 рН) – в скобках указана величина сигнала в единицах рН. На 4 сут функционирования биорецепторов активность клеток почти на всех типах мембран возрастала, исключение составляла только мембрана – “полисульфонамид на лавсане”. Далее происходила либо стабилизация сигналов на этом же уровне (полиэфирсульфон на лавсане; Millipore с размером пор 0.30, 0.45 и 0.65 мкм; GF/A), либо наблюдалось падение активности (для регенерированной целлюлозы на полипропилене; нетканых материалов – термоскрепленных полипропиленов ТС-1 и ТС-2; Millipore с размером пор 0.22 мкм; полисульфонамида на лавсане; ацетата целлюлозы на тканевом лавсане). Величины сигналов на первые (A_1) и четвертые сутки (A_4) функционирования биорецепторов показаны в табл. 2. Между измерениями биорецепторы хранились в натрий-фосфатном буфере (рН 7.2, 1.0 мМ) при температуре +4°C. Максимальная активность иммобилизованных клеток достигалась на мембранах типа Millipore (размер пор 0.65 мкм) и GF/A.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при регистрации сигналов с помощью рН-чувствительного ПТ с иммобилизованными физической сорбцией клетками *M. dichloromethanicum* ДМ4 более предпочтительно применение нитроцеллюлозных мембран типа Millipore с размером пор 0.65 мкм и хроматографической стеклотычки GF/A.

Использование данных типов мембран позволило получать стабильные сигналы биосенсора в течение 2 нед функционирования биорецептора.

На рис. 3 показана долговременная стабильность биорецептора на основе мембраны GF/A.

Влияние рН-буфера на сигнал биосенсора. Исследованы сигналы биосенсора в буферных растворах со значением рН от 6.0 до 8.5. Изучение зависимости сигналов биосенсора от начальных значений рН среды показало (рис. 4), что максимальная амплитуда ответа приходилась на значения рН 7.0–7.4, что соответствует оптимуму рН для роста этого штамма [23].

В заключение отметим, что впервые показана принципиальная возможность использования клеток микроорганизмов, способных к биодegradации ДХМ, для создания биосенсора для детекции этого растворителя на основе рН-чувствительного транзистора. Клетки метилобактерий с индуцированной активностью дихлорметандегалогеназы селективно реагируют на галометан. Выбран наиболее подходящий бактериальный штамм и оптимальный носитель для иммобилизации клеток методом сорбции. Показана возможность детекции ДХМ в лабораторных условиях в диапазоне концентраций 0.6–8.8 мМ. Такой биосенсор может найти применение на предприятиях, производящих и использующих ДХМ в своих процессах (лакокрасочные производства, фармацевтическая промышленность и т.д.), для анализа сточных вод.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 14.740.11.0111, ГК № 16.740.11.0020).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Троценко Ю.А., Торгонская М.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 3. С. 261–276.

2. Harper D.B. // Nat. Prod. Rep. 2000. V. 17. P. 337–348.
3. Worton D.R., Sturgers W.T., Schwander J., Mulvaney R., Barnola J.-M., Chappellaz J. // Atmos. Chem. Physics. 2006. V. 6. P. 2847–2863.
4. Mizutani K., Shinomiya K., Shinomiya T. // Forensic Sci. Int. 1988. V. 38. № 1–2. P. 113–128.
5. Green T. // Hum. Exp. Toxicol. 1997. V. 16. № 1. P. 3–13.
6. Thier R., Wiebel F.A., Hinkel A., Burger A., Brüning T., Morgenroth K., Senge T., Wilhelm M., Schulz T.G. // Arch. Toxicol. 1998. V. 72. № 10. P. 622–629.
7. Dhillon S., Von Burg R.J. // Appl. Toxicol. 1995. V. 15. P. 329–335.
8. Law K.S., Sturges W.T. Global Ozone Research and Monitoring Project – Report № 50 / Ed. C.A. Ennis. Geneva: World Meteorol. Org., 2007. 572 p.
9. Leisinger Th., Kohler-Staub D. // Methods in Enzymology. 1990. V. 188. P. 355–361.
10. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловобактерии. Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
11. Sakai T., Morita Y., Wakui C. // J. Chromatography B. 2002. V. 778. № 1–2. P. 245–250.
12. Krausova V.I., Robb F.T., González J.M. // J. Microbiol. Methods. 2003. V. 54. № 3. P. 419–422.
13. Jörg G., Bertau M. // Anal. Biochem. 2004. V. 328. P. 22–28.
14. Henrysson T., Mattiasson B. // Biodegradation. 1993. V. 4. P. 101–105.
15. Schonning M.J., Poghossian A. // Electroanalysis. 2006. V. 18. № 19–20. P. 1893–1900.
16. Решетиллов А.Н., Коржук Н.Л., Плеханова Ю.В. Биосенсорные анализаторы и их использование в медицине, биотехнологии и экологическом мониторинге. Тула: Изд-во ТулГУ, 2009. 140 с.
17. Plekhanova Yu.V., Reshetilov A.N., Yazygina E.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Biosens. Bioelectron. 2003. V. 19. P. 109–114.
18. Khomutov S.M., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Reshetilov A.N. // Analytical Letters. 1994. V. 27. № 15. P. 2983–2995.
19. Selvanayagam Z.E., Neuzil P., Gopalakrishnakone P., Sridhar U., Singh M., Ho L.C. // Biosens. Bioelectron. 2002. V. 17. № 9. P. 821–826.
20. Korpan Y.I., Gonchar M.V., Sibirny A.A., Martelet C., El'skaya A.V., Gibson T.D., Soldatkin A.P. // Biosens. Bioelectron. 2000. V. 15. № 1–2. P. 77–83.
21. Фирсова Ю.Е., Торгонская М.Л., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 5. С. 547–552.
22. Muller E., Bringel F., Vuilleumier S. // Res. Microbiol. 2011. V. 162. № 9. P. 869–876.
23. Doronina N.V., Trotsenko Y.A., Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Leisinger T. // System. Appl. Microbiol. 2000. V. 23. P. 210–218.

Aerobic Methylobacteria as the Basis for a Biosensor for Dichloromethane Detection

Yu. V. Plekhanova, Yu. E. Firsova, N. V. Doronina, Yu. A. Trotsenko, and A. N. Reshetilov

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

e-mail: anamol@ibpm.pushchino.ru

Received May 15, 2012

Abstract—Cells of dichloromethane (DChM) bacteria-destroyers were immobilized by sorption on different types of membranes, which were fixed on the measuring surface of a pH-sensitive field transistor. The presence of DChM in the medium (0.6–8.8 mM) led to a change in the transistor's output signal, which was determined by the appearance of H⁺ ions in the medium due to DChM utilization by methylobacteria. Among four strains of methylobacteria—*Methylobacterium dichloromethanicum* DM4, *Methylobacterium extorquens* DM17, *Methylopila helvetica* DM6, and *Ancylobacter dichloromethanicus* DM16—the highest and most stable activity toward DChM degradation was observed in the strain *M. dichloromethanicum* DM4. Among 11 types of membranes for cell immobilization, Millipore nitrocellulose membranes and chromatographic fiber paper GF/A, which allow one to obtain stable biosensor signals for 2 weeks without a bioreceptor change, were chosen as optimal carriers.

УДК 612.122

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ И ЙОДИДНОГО ЭЛЕКТРОДА

© 2013 г. Е. Каракус*, Ш. Пекиардимчи**, Е. Килич**

*Технический университет Илдыза, 34240, Эсенлер, Стамбул, Турция,

** Университет Анкары, 06210, Анкара, Турция

e-mail: karakus@yildiz.edu.tr

Поступила в редакцию 1.02.2012 г.

Разработан потенциометрический биосенсор для определения глюкозы путем иммобилизации глюкозооксидазы на йодид-селективном электроде. Пероксид водорода, образующийся при окислении глюкозы глюкозооксидазой, окислялся в присутствии молибдата натрия и дихлорметана на йодид-селективном электроде. Концентрация глюкозы рассчитывалась по уменьшению концентрации йодида, определяемого йодид-селективным биосенсором. Чувствительность глюкозного биосенсора к ионам йодида и глюкозы была в пределах концентраций 1.0×10^{-1} – 1.0×10^{-6} М и 1.0×10^{-2} – 1.0×10^{-4} М соответственно. Разработанные глюкозные биосенсоры использовались для определения глюкозы в образцах сыворотки крови человека и показали результаты, совпадающие с клиническими определениями.

DOI: 10.7868/S0555109913020062

Сахарный диабет является глобальной проблемой, поскольку от него страдает значительный процент населения. Его основной диагностический признак – хронически повышенный уровень глюкозы. Постоянный контроль глюкозы в крови может замедлить возникающие впоследствии осложнения, такие, как микроангиопатии, паталогические изменения почек или нервной системы, которые сопутствуют диабету [1]. Точное, быстрое и доступное по стоимости измерение концентрации глюкозы имеет большое значение для промышленного и медицинского применения [2–4].

Многочисленные процессы и методики разработаны для создания новых глюкозных биосенсоров, основанных на электрохимических [5], колориметрических [6], кондуктометрических [7], оптических методах [8], а также методах флуоресцентной спектроскопии [9]. Среди них наибольший интерес вызывают электрохимические глюкозные биосенсоры, лидирующие в этой области в течение последних 40 лет благодаря их непревзойденной чувствительности и селективности. Кроме того, электрохимические методы имеют низкий предел обнаружения, быстрый отклик, стабильны в течение длительного времени и недороги. Такие глюкозные сенсоры подразделяются на 4 основные группы, в зависимости от используемых принципов измерения: потенциометрические, амперометрические, кондуктометрические и импедансные.

Ферменты являются важными компонентами таких датчиков, так как они используются для распознавания целевых молекул с высокой точностью в сложной системе. Интерес к использованию ферментных электродов постоянно растет. По этой причине исследователи пытаются использовать ферменты с улучшенными свойствами, повышенной операционной стабильностью, стабильные при хранении за счет использования различных методов иммобилизации. В последнее время такой фермент, как глюкозооксидаза, стал широко использоваться при определении концентраций глюкозы [10–14]. Такие электроды обычно состоят из сенсорного электрода, который регистрирует изменения концентрации реагентов или продуктов реакции, катализируемых выбранным ферментом, иммобилизованным на поверхности сенсора [15]. Таким образом, были разработаны многочисленные датчики для быстрого мониторинга уровня глюкозы в физиологических жидкостях, для использования *in vivo* или *in vitro* [15–24].

Ферментативное окисление различных биологических субстратов может сопровождаться образованием пероксида водорода, в частности, окисление глюкозы, катализируемое глюкозооксидазой, также сопровождается образованием этого соединения. Действие классических глюкозных биосенсоров основано на мониторинге потребления кислорода или образования пероксида водорода. К сожалению, амперометрическое определение пероксида водорода проводится при вы-

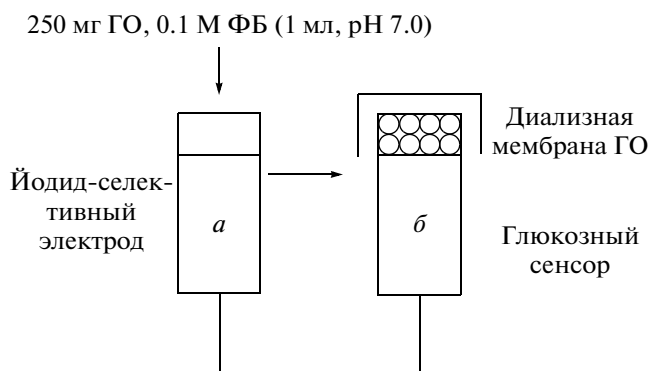
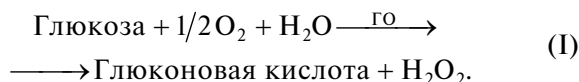


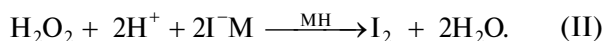
Рис. 1. Схема изготовления глюкозного биосенсора. а — йодид-селективный датчик, б — глюкозный биосенсор, основанный на ГО и йодид-селективном электроде.

соком анодном потенциале [20]. В потенциометрических глюкозных биосенсорах, описанных в литературе, используются различные методы компоновки электродов [25, 26]. Совместная иммобилизация глюкозооксидазы и пероксидазы на электроде позволяет проводить потенциометрическое определение глюкозы на основе биоэлектродокаталитической детекции пероксида водорода, который образуется в результате каталитического окисления глюкозы.

Цель работы — разработка нового потенциометрического сенсора для определения глюкозы на основе глюкозооксидазы (ГО) и молибдата натрия, иммобилизованных на йодид-ион-селективном электроде. На первой стадии глюкозооксидаза катализирует окисление глюкозы:



На второй стадии образовавшийся пероксид водорода и йодид-ионы реагируют с молибдатом натрия (МН), в результате реакции образуются йод и вода:



Уменьшение концентрации йодида пропорционально концентрации глюкозы. Были исследованы условия для оптимальной работы ГО биосенсора на основе йодидного электрода: время жизни, время отклика, оптимум pH, оптимальная температура, оптимальный рабочий диапазон концентрации и влияние посторонних факторов. Кроме того, было проведено исследование возможности использования разработанного глюкозного биосенсора для определения уровня глюкозы в образцах сыворотки крови человека.

МЕТОДИКА

Реагенты и аппаратура. В работе использовали глюкозооксидазу (ГО, ЕС 1.1.3.4) типа VII из *Aspergillus niger*, молибдат натрия, глюкозу, йодид натрия, мочевую кислоту, аскорбиновую кислоту, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaF, NaBr, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ фирмы “Sigma” (США). Все остальные химические вещества, используемые в работе, были аналитической чистоты. Стандартные и буферные растворы готовили на дистиллированной воде. Образцы сыворотки крови были предоставлены биохимической лабораторией больницы Ибн-Сина Университета Анкары (Турция).

Потенциометрические измерения и измерения pH проводились pH-метром ORION 720A (“Aelec”, США). Йодид-электрод (ORION 940011) был использован для определения уменьшения количества ионов йодида в результате окисления. Значения потенциалов даны по отношению к Ag/AgCl электроду (ORION 90-02). Измерения проводились в 25 мл стеклянной ячейке. В ходе всех экспериментов использовали магнитную мешалку. Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду.

Приготовление глюкозных биосенсоров. 250 мг ГО (50 тыс. ед.) растворяли в 1 мл 0.1 М фосфатного буфера (ФБ), pH 7.0. 100 мкл этого раствора наносили на йодистый электрод и оставляли на ночь. Поверхность электрода покрывали диализной мембраной. Приготовленный глюкозооксидазный биосенсор помещали в 0.01 М NaI на 2 ч (рис. 1).

Чувствительность ГО-биосенсора, приготовленного указанным способом, определяли, измеряя потенциал калибровочных растворов NaI в пределах 10^{-1} – 10^{-6} М, pH 7.0. Чтобы оценить чувствительность глюкозного биосенсора в отношении глюкозы, измерения проводили в калибровочных растворах глюкозы в 0.1 М ФБ, pH 7.0, содержащих 10 мл дихлорметана, 5.0 мл 5%-ного молибдата натрия и 2.5 мл 0.01 М йодида натрия.

Измерение ответа биосенсора. Измерение потенциала для глюкозного биосенсора проводили в стационарных условиях в 0.1 М фосфатном буфере, pH 7.0, и Ag/AgCl-электродом в качестве электрода сравнения. Биосенсор погружали на глубину 1.5 см, раствор перемешивали магнитной мешалкой. Значение pH определяли с помощью комбинированного стеклянного pH-электрода Orion. Все экспериментальные работы проводились при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Калибровочные кривые получали путем построения графика на основании измеренных потенциалов серии стандартных растворов глюкозы относительно логарифма концентрации глюкозы.

Определения глюкозы в сыворотке крови. Образцы сыворотки крови человека были отобраны у больных сахарным диабетом. Уровень глюкозы



Рис. 2. Отклик глюкозного электрода (E, mV) на йодид в 0.01 М фосфатном буфере при рН 7.0.

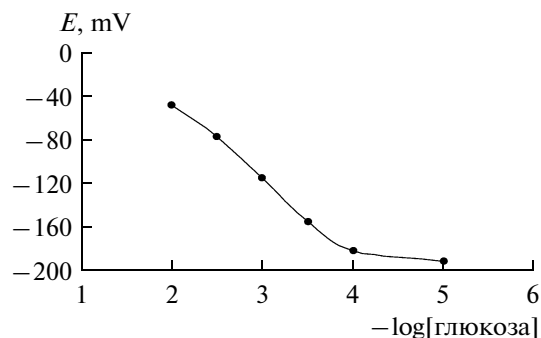


Рис. 3. Калибровочный график глюкозного электрода в 0.01 М фосфатном буфере при рН 7.0.

в диапазоне концентраций от 75–115 мг/л был определен в образцах стандартным методом [27]. Глюкозный биосенсор помещали в 25 мл 0.1 М фосфатного буфера, рН 7.0, содержащего 0.5 мл сыворотки, после этого к раствору добавляли растворы глюкозы. После каждого добавления измеряли значение потенциала против растворов глюкозы, взятых в различных концентрациях, и рассчитывали уменьшение количества йодида натрия. Концентрация глюкозы в сыворотке крови человека рассчитывалась в соответствии с калибровочным графиком. Полученные результаты были сопоставлены с данными анализов, проведенных в больнице Ибн Сина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Функционирование разработанного глюкозного биосенсора основано на реакции окисления глюкозы, катализируемой ГО, и превращения йодида в йод, катализируемого молибдатом натрия. Раствор глюкозы для калибровки содержал 10 мл дихлорметана, 2.5 мл 0.1 М йодида натрия, рН 7.0, и 5.0 мл 5%-ного молибдата натрия. Реакционную смесь доводили до 25 мл 0.1 М фосфатным буфером с тем же значением рН.

После окисления глюкозы в стандартных калибровочных растворах (10^{-1} – 10^{-6} М) с помощью полученного глюкозного электрода, содержащего ГО, образуется перекись водорода по реакции (1), которая реагирует с йодидом на йодидном электроде (реакция 2) в присутствии дихлорметана. Образовавшийся йод при этом переходит в фазу дихлорметана, а молибдат аммония катализирует окисление йодида. В противном случае, образовавшийся йод реагирует с йодидом в реакционной смеси с образованием трийодида (3).



Уменьшение количества йодид-иона определяется с помощью йодидного электрода. Концентрация глюкозы, таким образом, определяется опосредованно по уменьшению концентрации йодида,

который детектируется йодид-селективным биосенсором.

Чувствительность глюкозного биосенсора по отношению к йодиду и глюкозе. Для того, чтобы определить отклик глюкозного биосенсора на йодид-ионы и глюкозу, потенциометрические измерения проводились с использованием стандартных растворов для каждого реагента.

Калибровочные кривые для глюкозного биосенсора, йодид-ионов и глюкозы показаны на рис. 2 и 3. Чувствительность биосенсора к йодид-ионам и глюкозе была высокой в диапазоне концентраций 10^{-1} – 10^{-6} М и 10^{-2} – 10^{-4} М соответственно, что позволяет использовать этот тип сенсора для определения глюкозы в биологических жидкостях. Линейный диапазон отклика глюкозного биосенсора был в пределах 10^{-2} – 10^{-4} М и отвечал уравнению Нернста в пределах этого диапазона концентраций глюкозы (рис. 3). Наклон зависимости отклика биосенсора, выраженный в мВ/[глюкоза], составлял 65.2 ± 0.2 .

Влияние концентрации буфера. Чтобы изучить влияние концентрации буфера на отклик биосенсора и изменение наклона его линейного участка были проведены измерения с 5 различными концентрациями ФБ, взятыми в диапазоне 0.05–0.15 М. На рис. 4а показана зависимость изменения потенциала от концентрации глюкозы. Оптимальной концентрацией буфера, обеспечивающей наибольший отклик, была принята концентрация 0.05 М.

Влияние рН. Влияние рН на отклик глюкозного биосенсора исследовали в 0.05 М фосфатном буфере, проводя измерение при 6 различных значениях рН в диапазоне 5.0–8.0. Было показано, что величина отклика глюкозного биосенсора увеличивалась при увеличении рН до 7.0 и снижалась при рН выше 7.0 (рис. 4б). При значениях рН 7.0 ГО денатурируется из-за депротонирования в активном центре. При значениях рН менее 7.0 фермент также может быть денатурирован и следовательно иметь сниженную активность [27, 28].

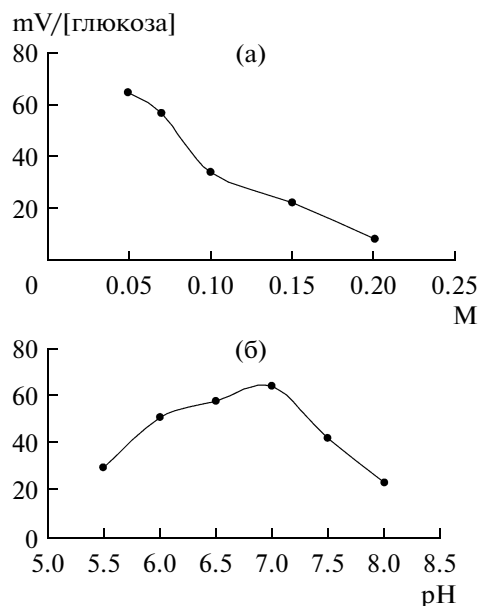


Рис. 4. Влияние концентрации фосфатного буфера (а) и рН (б) на чувствительность глюкозного биосенсора на основе йодид-селективного электрода.

Уменьшение отклика биосенсора с увеличением рН является общим свойством потенциометрических систем [27]. Таким образом, для всех измерений в дальнейшем использовали значение рН 7.0, как оптимальное.

Влияние температуры. Влияние температуры на отклик глюкозного биосенсора на основе йодидного датчика изучали при концентрации глюкозы 1.0 мМ и рН 7.0. Измерения проводили при 7 различных температурах от 10 до 50°C. Как видно из рис. 5, значение потенциала биосенсора увеличивалось с увеличением температуры до 25°C и снижалось при температуре выше 25°C, по-видимому, из-за снижения активности ГО. Активность фермента возрастала в определенных пределах при увеличении температуры, поэтому проведение экспериментов при оптимальной температуре является очень важным. При этом важно отметить, что высокая температура может привести к тепловой инактивации фермента и снижению концентрации O_2 [29].

Коэффициент селективности. Соединения, которые могут оказывать влияния на показания глюкозного биосенсора, можно разделить на две группы: одна группа соединений мешает обнаружению йодид-иона, другая мешает протеканию реакции с молибдатом натрия, поскольку он конкурирует с йодидом. К таким соединениям относятся аскорбиновая и мочевая кислоты, присутствующие в некоторых биологических образцах.

Приготовленный глюкозный биосенсор тестировали на чувствительность к Fe^{+3} , Cu^{+2} , F^- ,

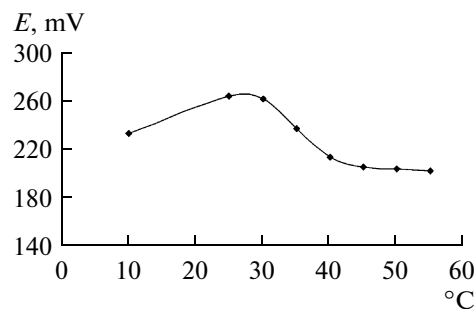


Рис. 5. Влияние температуры на отклик глюкозного биосенсора на 1 мМ концентрацию глюкозы.

Br^- , Cl^- , аскорбиновой и мочевой кислоте при рН 7.0. Соединения, часто обнаруживаемые в биологических жидкостях, реагируют с пероксидом водорода при том же потенциале, при котором проводятся потенциометрические измерения биосенсором в растворе 1.0 мМ глюкозы, как было показано Шринивасан и Рехнитц [30]. Были получены значения их потенциалов и рассчитаны коэффициенты селективности. Влияние Fe^{+3} , Cu^{+2} , F^- и Br^- на ответ глюкозного биосенсора было незначительным, 10^{-5} М аскорбиновая кислота не оказывала никакого эффекта. Мочевая кислота нерастворима в фосфатном буфере при рН 7.0, и ее влияние на биосенсор также не было обнаружено.

Влияние скорости перемешивания. Для изучения влияния скорости перемешивания на величину отклика глюкозного биосенсора измерения проводили в 0.05 М фосфатном буфере, рН 7.0, при 3 различных скоростях перемешивания – 100, 250 и 750 об/мин после достижения стабильного потенциала. Перемешивание в режиме 100 и 750 об/мин требовало больше времени для достижения стабильного потенциала по сравнению с 250 об/мин, который в дальнейшем и был использован. Снижение скорости перемешивания до 100 об/мин не оказывало никакого влияния на

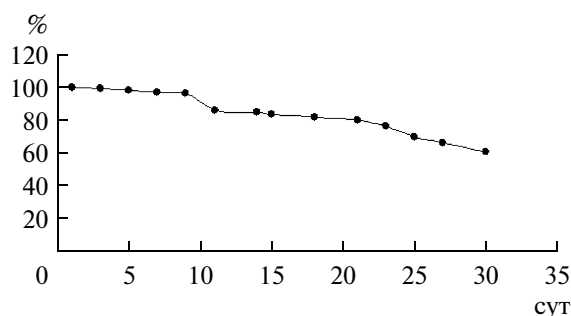


Рис. 6. Время эффективной работы глюкозного биосенсора на основе йодид-селективного электрода при хранении (4°C).

Измерение содержания глюкозы в образцах сыворотки крови человека с помощью разработанного глюкозного биосенсора и референтного глюкозного анализатора (госпиталь Ибн-Сина)

Образцы сыворотки	Концентрация глюкозы, мг/л*		Воспроизводимость, %
	госпиталь Ибн-Сина	йодид-селективный глюкозный сенсор	
1	86	84.7 ± 1.3	98.49
2	256	255.8 ± 2.1	99.9

* Значения являются средними из 4 экспериментов.

величину сигнала, но увеличивало время отклика биосенсора. Это можно объяснить более медленным протеканием ферментативной реакции при низкой скорости перемешивания. При высокой скорости перемешивания (750 об/мин) скорость ферментативных реакций также уменьшалась из-за возможного изменения конформации фермента, что также приводило к снижению аналитического сигнала. По указанным причинам скорость перемешивания 250 об/мин была определена как оптимальная.

Время отклика. Время отклика глюкозного биосенсора определяли как время, необходимое для достижения стабильного потенциала после того, как биосенсор и электрод сравнения были погружены в калибровочный раствор. Время отклика в наших измерениях составляло 1–2 мин.

Хранение глюкозного биосенсора. Срок хранения глюкозного биосенсора при температуре 4°C рассчитывали, определяя значения потенциала в калибровочных растворах и строя калибровочные кривые в течение одного месяца. Угол наклона калибровочной кривой, выраженной в мВ/[глюкоза] не изменялся в течение 10 дней, а затем постепенно снижался в течение 30 дней. Можно заключить, что разработанный глюкозный биосенсор достаточно стабилен в течение месяца (рис. 6).

Воспроизводимость показаний глюкозного биосенсора. Биосенсор был протестирован на точность повторения получаемых результатов путем воспроизведения калибровочной кривой пять раз в течение одного дня и угла наклона калибровочного графика, представленного в мВ/[глюкоза]. Относительное стандартное отклонение полученных углов наклона оказалось менее 0.5% для разработанных глюкозных биосенсоров.

Определение уровня глюкозы в образцах сыворотки крови человека с помощью глюкозного биосенсора. Уровень глюкозы в сыворотке крови человека измеряли с помощью разработанного глюкозного биосенсора, полученное значение сравнивали с результатами определения в больнице. Содержание глюкозы в двух различных образцах крови приведены в таблице.

Была показана высокая корреляция между данными, полученными при измерении концен-

трации глюкозы в пределах 75–115 мг/л в сыворотке крови человека с помощью разработанного глюкозного биосенсора и йодидного электрода и результатами, полученными в больнице Ибн-Сина. Такие соединения, как аскорбиновая и мочевая кислота в образцах сыворотки крови человека не оказывали влияния на измерение концентрации глюкозы.

Авторы выражают признательность за финансовую поддержку TUBITAK (проект № 106 T 359).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wencel D., Higgins C., Klukowska A., MacCraith B.D., McDonagh C.* // Mater. Sci. 2007. V. 25. № 3. P. 767–779.
2. *Mascini M., Guilbault G.G.* // Biosensors. 1986. P. 147–172.
3. *Park J.H., Kim C.S., Choi B.C., Ham K.Y.* // Biosens. Bioelectron. 2003. V. 19. № 4. P. 321–324.
4. *Tura A., Maran A., Pacini D.* // Diabetes Res. Clin. Pract. 2007. V. 77. № 1. P. 16–40.
5. *Wang Y., Xu H., Zhang J., Li G.* // Sensors. 2008. V. 8. № 4. P. 2043–2081.
6. *Morikawa M., Kimizuka N., Yoshihara M., Endo T.* // Chem. Eur. J. 2002. V. 8. № 24. P. 5580–5584.
7. *Miwa Y., Nishizawa M., Matsue T., Uchida I.* // Bull. Chem. Soc. Jp. 1994. V. 67. № 10. P. 2864–2866.
8. *Mansouri S., Schultz J.S.* // Nature Biotech. 1984. V. 2. № 10. P. 885–890.
9. *Pickup J.C., Hussain F., Evans N.D., Rolinski O.J., Birch D.J.S.* // Biosens. Bioelectron. 2005. V. 20. № 12. P. 2555–2565.
10. *Wingard L.B., Jr.* // Proc. Fed. Am. Sot. Exp. Biol. 1983. V. 42. № 2. P. 288–291.
11. *Wingard L.B., Jr., Schiller J.G., Wolfson S.K., Jr., Liu L.L., Drash A.L., Yao S.J.* // J. Biomed. Mater. Res. 1979. V. 13. P. 921–935.
12. *Guilbault G.G., Neto G.O.* Immobilized Cells and Enzymes. Ed. J. Woodward. Oxford: IRL Press, 1985. P. 55–74.
13. *Scheller F.W., Pfeiffer D., Schubert F., Renneberg R., Kirstein D.* // Biosensors: Fundamentals and Applications. Ed. A P. F. Turner et al. Oxford: Oxford University Press, 1987. P. 315–346.

14. *Velho G.D., Reach G., Thevenot D.R.* // *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Ed. A P. F. Turner et al. Oxford: Oxford University Press, 1987. P. 390–408.
15. *Abdulla H.M., Greenway G.M., Platt A.E., Fielden P.R.* // *Analyst*. 1989. V. 114. № 1. P. 785.
16. *Jeykumari D.R.S., Narayanan S.S.* // *Biosens. Bioelectron*. 2008. V. 23. № 9. P. 1404–1411.
17. *Al-Hitti İ. K., Moody G.J., Thomas J.D.R.* // *Analyst*. 1984. V. 109. № 9. P. 1205–8.
18. *Alva S., Gupta S.S., Phadke R.S., Govil G.* // *Biosens. Bioelectron*. 1991 V. 6. № 8. P. 663–668.
19. *Abd-Rabboh H.S.M., Meyerhoff M.E.* // *Talanta*. 2007. V. 72. № 3. P. 1129–1133.
20. *Ghindilis A.L., Kurochkin I.N.* // *Biosens. Bioelectron*. 1994. V. 9. № 4–5. P. 353–357.
21. *Tinkilic N., Cubuk O., Isildak I.* // *Anal. Chim. Acta*. 2002. V. 452. № 1. P. 29–34.
22. *Wang J.* // *Electroanalysis*. 2001. V. 13. № 12. P. 983–989.
23. *Wang H.J., Zhou C.M., Peng F., YuInt H.* // *J. Electrochem. Sci*. 2007. V. 2. № 4. P. 508–516.
24. *Wang X.D., Zhou T.Y., Chen X., Wong K.Y., Wang X.R.* // *Sens. Actuators B*. 2008. V. 129. № 2. P. 866–873.
25. *Couves L.D., Porter S.J.* // *Synthetic Metals*. 1989. V. 28. № 1–2. P. 761–768.
26. *Folly R.O.M., Valdman B., Valero F., Solà C.* // *Biotechnol. Tech*. 1996. V. 10. № 11. P. 867–870.
27. *Karakuş E., Pekyardımcı Ş., Kılıç E.* // *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol*. 2005. V. 33. № 3. P. 329–41.
28. *Karakuş E., Pekyardımcı Ş., Kılıç E.* // *Process Biochem*. 2006. V. 41. № 6. P. 1371–1377.
29. *Kalaycı Ş., Somer G., Ekmekci G.* // *Talanta*. 2005. V. 65. № 1. P. 87–91.
30. *Srinivasan K., Rechnit G.A.* // *Anal. Chem*. 1969. V. 41. № 10. P. 12039.

Potentiometric Glucose Determination in Human Serum Samples with Glucose Oxidase Biosensor Based on Iodide Electrode

E. Karakuş^a, Ş. Pekyardımcı^b, and E. Kılıç^b

^a *Yildiz Technical University, 34240, Esenler, Istanbul, Turkey*

^b *Ankara University, 06210, Ankara, Turkey*

e-mail: karakus@yildiz.edu.tr

Received February 1, 2012

Abstract—Glucose potentiometric biosensor was prepared by immobilizing glucose oxidase on iodide-selective electrode. The hydrogen peroxide formed after the oxidation of glucose catalysed by glucose oxidase (GOD) was oxidized by sodium molybdate (SMo) at iodide electrode in the presence of dichloromethane. The glucose concentration was calculated from the decrease of iodide concentration determined by iodide-selective sensor. The sensitivity of glucose biosensor towards iodide ions and glucose was in the concentration ranges of 1.0×10^{-1} — 1.0×10^{-6} M and 1.0×10^{-2} — 1.0×10^{-4} M, respectively. The characterization of proposed glucose biosensor and glucose assay in human serum were also investigated.

УДК 546.57:544.77.032.1:615.28

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ СТАБИЛЬНЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА ЗАДАННОГО РАЗМЕРА

© 2013 г. Ю. П. Муха*, А. М. Еременко*, Н. П. Смирнова*, А. И. Михиенкова**, Г. И. Корчак**, В. Ф. Горчев***, А. Ю. Чунихин***

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины, 03164 Киев-164

**Институт гигиены и медицинской экологии им. А.М. Марзеева НАМН Украины, Киев-94, 02660

***Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев-601, 01601

e-mail: annaerem@ukr.net

Поступила в редакцию 10.09.2012 г.

Разработаны условия получения стабильных наночастиц серебра размером менее 10 нм при использовании бинарного стабилизатора поливинилпирролидон/додецилсульфат натрия в оптимальных соотношениях. Получены оптические спектры, исследована морфология и зависимость среднего размера наночастиц от количества использованного восстановителя. Коллоидные растворы наносеребра проявляют высокую бактерицидную активность по отношению к штаммам *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, а также фунгицидную по отношению к *Candida albicans*. Механизм действия наноразмерного серебра на микробную клетку исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа с применением флуоресцентной метки. Первый этап антимикробного воздействия на микроорганизмы – разрушение мембраны и проникновение наночастиц серебра внутрь клетки. Показано сохранение стабильности наночастиц и их антимикробного действия на протяжении двух лет.

DOI: 10.7868/S0555109913020128

В связи с существенным повышением устойчивости микроорганизмов к действию медикаментов, прежде всего антибиотиков, в медицинской практике чрезвычайно актуален поиск других антибактериальных средств, в том числе получение препаратов на основе серебра. В небольших концентрациях (на уровне ПДК – 50 мкг/л) серебро безопасно для организма человека, но проявляет разрушительное действие по отношению к большинству бактерий и вирусов, поэтому уже много лет активно используется для обеззараживания воды и борьбы с инфекциями. К настоящему времени уникальные свойства серебра всесторонне изучены [1–5]. Применение серебра в виде наночастиц (НЧ) позволяет в сотни раз снизить его концентрацию по сравнению с ионной формой с сохранением всех антимикробных свойств [6–10]. Важной задачей является как разработка нетоксичных антимикробных препаратов на основе НЧ серебра, сохраняющих свои бактерицидные свойства и стабильность в течение длительного периода, так и выяснение механизмов антимикробного действия. Одной из основных проблем при получении НЧ Ag является их нестабильность вследствие легкого окисления.

Цель работы – получение стабильных НЧ Ag и характеристика их антимикробного действия с

длительным сохранением бактерицидной активности.

МЕТОДИКА

Реактивы и материалы. Для получения НЧ Ag использовали следующие вещества: нитрат серебра (AgNO_3 , “Merck”, Германия), додецилсульфат натрия (ДДС, “Sigma”, “Aldrich”, Германия), поливинилпирролидон (ПВП, марки ВФС 42-1491-85 с молекулярной массой 10000), тетрагидроборат натрия (NaBH_4 , “Fluka”, Германия).

Получение НЧ серебра. НЧ серебра в коллоидном растворе получали путем химического восстановления из нитрата серебра в присутствии тетрагидробората натрия с применением ПАВ ДДС в мольном соотношении к металлу 15 : 1, или полимера ПВП в соотношении 1 : 1. Известно, что использование отдельно ПАВ или полимера для стабилизации НЧ Ag имеет свои недостатки – небольшой срок хранения, коагуляция и окисление НЧ, а также потеря активности. Нами использован бинарный стабилизатор на основе ДДС и ПВП [11, 12]. Для снижения токсичности коллоидных растворов серебра синтез проводили с уменьшенным количеством ДДС до 0.5 мг/л (уровень предельно допустимой концентрации, ПДК) и увеличенным для ПВП до 30 г/л (3%).

Методы исследования образцов. Спектры поглощения коллоидных растворов НЧ Ag регистрировали в УФ- и видимой области с помощью спектрофотометра Lambda 35 (“Perkin-Elmer”, США) в кварцевых кюветках диаметром 10 мм.

Электронно-микроскопические изображения получали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-100С (“JEOL”, Япония) с ускоряющим напряжением 100 кВ. Для расчета распределения частиц по размерам использовали программу ImageJ (National Institutes of Health, NIH, США). Функцию распределения частиц по размерам изучали с помощью лазерного корреляционного спектрометра (ЛКС) “ZetaSizer-3” (“Malvern Instruments”, Великобритания), оборудованного коррелятором Multi8 (computing correlator type 7032 ce, “Malvern Instruments”, Великобритания). Принцип действия ЛКС основан на методе динамического рассеивания света. Данный метод позволяет определять коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости на основе анализа характеристического времени флуктуации интенсивности рассеянного света. Из коэффициента диффузии по формуле Стокса-Эйнштейна рассчитывали гидродинамический диаметр наночастиц. Исследуемую суспензию в количестве 1 мл помещали в цилиндрическую оптическую стеклянную кювету диаметром 10 мм, которую вводили в термостатированную лунку лазерного корреляционного спектрометра. Регистрацию и статистическую обработку рассеянного от суспензии под углом 90° лазерного излучения проводили трижды в течение 300 с (использовался гелий-неоновый лазер ЛГН-111 мощностью 25 мВт и длиной волны 633 нм). Полученную автокорреляционную функцию обрабатывали с помощью стандартных компьютерных программ PCS-Size mode v 1.61.

Определение антимикробной активности НЧ серебра. Бактерицидную активность коллоидных растворов НЧ Ag, стабилизированных ДДС, ПВП и комплексом ДДС/ПВП, исследовали суспензионным методом согласно европейским нормативам [13, 14]. Концентрация серебра в растворе составляла 0.0016%. Количество стабилизаторов варьировали: ДДС — от 0.065 до 0.000045% (ПДК — 0.5 мг/л), ПВП — от 0.18 до 3.0%. В контрольном эксперименте исследовали растворы нитрата серебра и стабилизаторов в присутствии восстановителя.

Для определения бактерицидной активности были использованы штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* K12 NCTC 10538 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, а также *Candida albicans* ATCC 10231 — для определения фунгицидной активности. Результаты оценивали по логарифму уменьшения количества жизнеспособных организмов после воздействия исследуе-

мого образца по сравнению с их начальным количеством $\lg R = \lg N_0 - \lg N_a$, где R — коэффициент редукиции. Высокую антимикробную активность образца определяли как уменьшение числа бактерий на 5.0 $\lg R$ и грибов на 4.0 $\lg R$, что соответствует величине необходимой редукиции в соответствии с европейскими стандартами ($\lg R > 90.0\%$) [13, 14].

Суть статистической обработки полученных данных заключалась в том, что опыты по определению бактерицидной/фунгицидной активности имели точность определения $\pm 1.0 \lg$ с 90.0%-ной вероятностью, если результат повторялся как минимум 3 раза. Среднее значение результатов повторов должно демонстрировать уменьшение количества микроорганизмов, которое требуется для данного вида исследования.

Изучение процесса взаимодействия НЧ с микробной клеткой. Взаимодействие НЧ с клетками *C. albicans* исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 META (“Carl Zeiss”, Германия) в мультитрековом режиме работы. Для обоих каналов использовали объектив LD Plan-Neofluar 63×/0.75 Corr. В первом канале изображения клеток с НЧ получали в отраженном от поверхности образца свете. При этом использовался лазер с длиной волны 543 нм. Далее в канале располагались светоделитель MBS NT 80/20 и светофильтр LP 505. Второй канал регистрировал флуоресценцию образца, при этом для возбуждения флуоресценции использовалось лазерное излучение с длиной волны 405 нм, при этом в канале размещали светоделитель MBS HFT 405/488 и светофильтр LP505. Такая оптическая конфигурация микроскопа позволяла получать изображение клеток в отраженном свете, их флуоресцентное изображение и накладывать эти изображения одно на другое. Метка наночастиц — флуоресцеин вводился в экспериментальную смесь вместе с коллоидным раствором НЧ Ag при 1000-кратном молярном избытке металла.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве агентов, обычно используемых для стабилизации и предупреждения агрегации НЧ в коллоидных растворах, могут выступать ПАВ. В работе в качестве базового стабилизатора НЧ Ag в растворе использовали анионное ПАВ ДДС с критической концентрацией мицеллообразования 8 ммоль/л. ДДС формирует сферические мицеллы с центральным гидрофобным ядром, радиус которого составляет 16.6 Å, и слоем, в котором размещены головные группы и противоионы (4.6 Å). Результаты исследования фонового рассеяния света от оболочки стабилизатора НЧ по методу ЛКС свидетельствуют о том, что стабилизаторы ДДС и ПВП в используемых в эксперименте concentra-

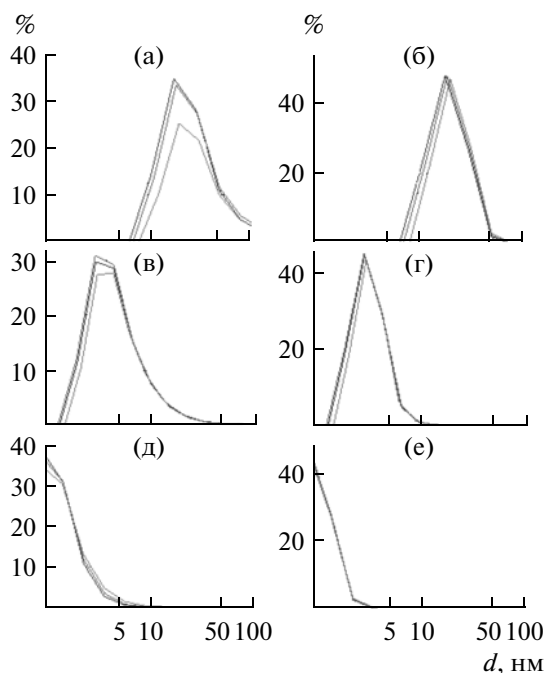


Рис. 1. Зависимость размера НЧ Ag от количества использованного восстановителя, распределение по объему (а, в, д) и по количеству НЧ (б, г, е), при молярном отношении NaBH_4 : Ag = 1 : 1 (а, б), 5 : 1 (в, г), 25 : 1 (д, е). Количество кривых соответствует количеству повторов измерения.

циях не рассеивают свет, и, следовательно, не влияют на определение размера сформированных металлических наночастиц.

Нитрат серебра – наиболее доступное, дешевое и из-за хорошей растворимости в воде наиболее удобное вещество для получения наночастиц. Решающую роль в получении НЧ определенного размера играет количество восстановителя. С увеличением концентрации NaBH_4 средний размер наночастиц уменьшался (рис. 1). В ряду молярных отношений NaBH_4 : Ag увеличение количества восстановителя по сравнению с количеством серебра в 1, 5, 10, 25 раз приводило к уменьшению среднего размера НЧ до 20, 3, 2, 1 нм соответственно. Причиной этого может быть конкуренция зародышеобразования и роста зародышей при доминировании скорости первого процесса над вторым. Таким образом, изменяя количество NaBH_4 по отношению к металлу, можно регулировать образование НЧ Ag определенного размера, что, как известно, играет основную роль для проявления антимикробного эффекта, учитывая их высокую химическую и биологическую активность и способность “безбарьерно” проникать через мембрану внутрь клетки [15]. В частности, можно получать частицы, размер которых меньше 10 нм, поэтому в дальнейшем эксперименте использовали восстановитель в соотношении NaBH_4 : Ag 10 : 1.

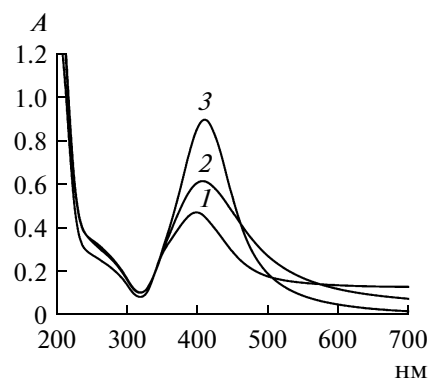


Рис. 2. Спектры поглощения коллоидных растворов НЧ Ag, стабилизированных ДДС, после 9 мес хранения при соотношении ДДС : Ag 1 : 1 (1), 10 : 1 (2), 15 : 1 (3).

По спектрам поглощения коллоидных растворов установлено количество стабилизатора, необходимое для наиболее длительного сохранения устойчивости НЧ (рис. 2). Наиболее интенсивный и симметричный спектр поверхностного плазмонного резонанса (ППР) при длительном хранении растворов соответствует 15-кратному молярному избытку ДДС по отношению к серебру (кривая 3 на рис. 2).

В растворе нитрата серебра в присутствии тетрагидробората натрия последовательность процессов образования и стабилизации НЧ зависит от типа стабилизатора. Так, в присутствии анионного ПАВ ДДС ионы серебра ассоциируются вокруг функциональных групп ДДС по электростатическому механизму, а затем происходит процесс восстановления ионов серебра тетрагидроборатом натрия и сольubilизация мицеллами ДДС [16]. В случае ПВП ионы серебра связываются с каркасом макромолекулы за счет образования комплекса с атомами азота и кислорода кольца пирролидона, а после восстановления происходит их нуклеация и рост [17, 18]. При использовании бинарного стабилизатора взаимодействие ДДС и ПВП состоит из двух процессов: образование комплекса вследствие гидрофобного взаимодействия между углеродной цепью ДДС и метиленовыми группами ПВП и электростатического взаимодействия между главными группами ПАВ и частичными зарядами азота и кислорода пирролидольного кольца [19–21]. Ионы серебра в растворе с двумя стабилизаторами взаимодействуют с полярными группами ДДС и частично заряженными фрагментами пирролидольного кольца ПВП. После восстановления тетрагидроборатом натрия образованные НЧ проникают в центр гидрофобной части мицеллы, а также размещаются вдоль цепи полимера. Именно двойная оболочка из мицеллы ДДС и полимера, которая ее покрывает, усиливает стабильность НЧ (рис. 3, б).

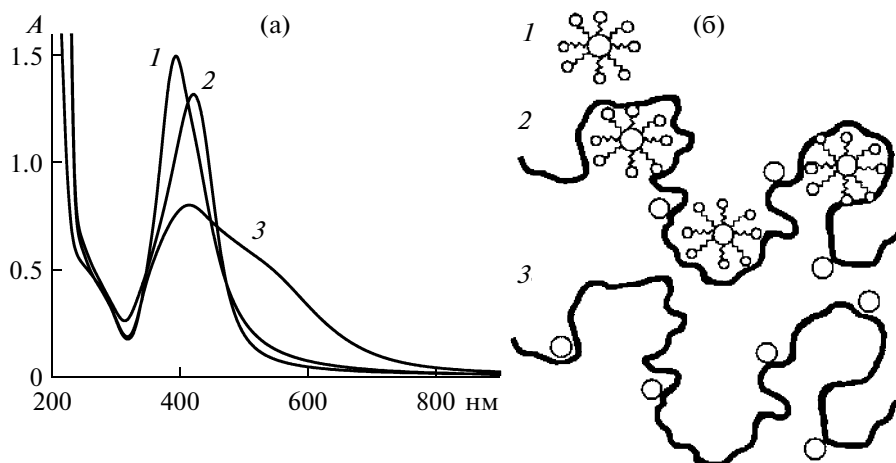


Рис. 3. Спектры поглощения коллоидных растворов НЧ Ag, стабилизированных ДДС (1), ДДС/ПВП (2) и ПВП (3) после двух недель хранения (а) и соответствующие схемы взаимодействия НЧ Ag со стабилизаторами (б).

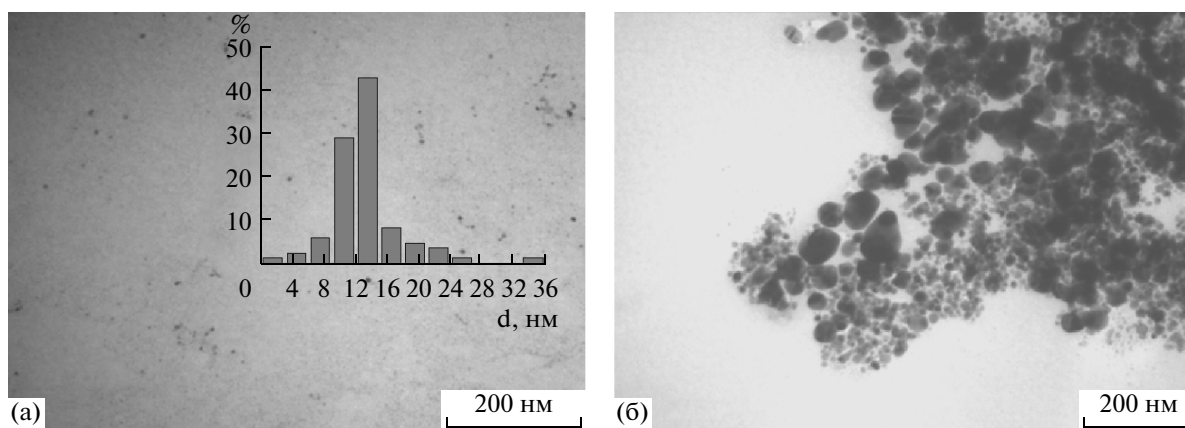


Рис. 4. ПЭМ НЧ Ag, стабилизированных ДДС/ПВП (а) и ПВП (б). Масштаб 200 нм. На врезке распределение по размерам НЧ Ag, стабилизированных ДДС/ПВП.

Положение полосы ППР наноразмерного серебра в спектрах поглощения синтезированных систем зависит от типа использованного стабилизатора. С применением ДДС в мольном соотношении 15 : 1 максимум полосы находился при 395 нм, для смеси стабилизаторов ДДС и ПВП — при 420 нм. Во время хранения коллоидных растворов на воздухе в течение двух недель максимумы полос ППР незначительно смещались в длинноволновую область, что связано с агрегацией и незначительным укрупнением наночастиц (рис. 3). Более активный процесс старения раствора НЧ серебра происходил при стабилизации ПВП, что проявлялось в быстром уменьшении интенсивности полосы ППР в спектре и приобретении коллоидным раствором коричневой окраски. Изменения в спектрах поглощения сопровождались морфологическими изменениями НЧ. На рис. 4 показано укрупнение размеров частиц до 100 нм и

их агрегация в случае стабилизации ПВП после двух недель хранения.

При одновременном использовании обоих соединений для стабилизации НЧ Ag полоса ППР НЧ была стабильна во времени и практически не менялась. Даже после 8 мес. хранения спектры коллоидных растворов Ag/ДДС/ПВП оставались практически идентичными, а также и при разведениях в 2–4 раза (рис. 5а). Это подтверждало предположение авторов работ [22, 23] об адсорбции ПВП на частицах серебра и предотвращении их агрегации. Некоторое расширение спектра свидетельствует о наличии агрегатов несимметричной формы.

Размер НЧ в коллоидном растворе, стабилизированных ДДС/ПВП, определенный из изображений, полученных в просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) с помощью ImageJ, составлял около 10–15 нм (рис. 3а, 3б). Причина отличия от данных, полученных методом ЛКС, заключается в

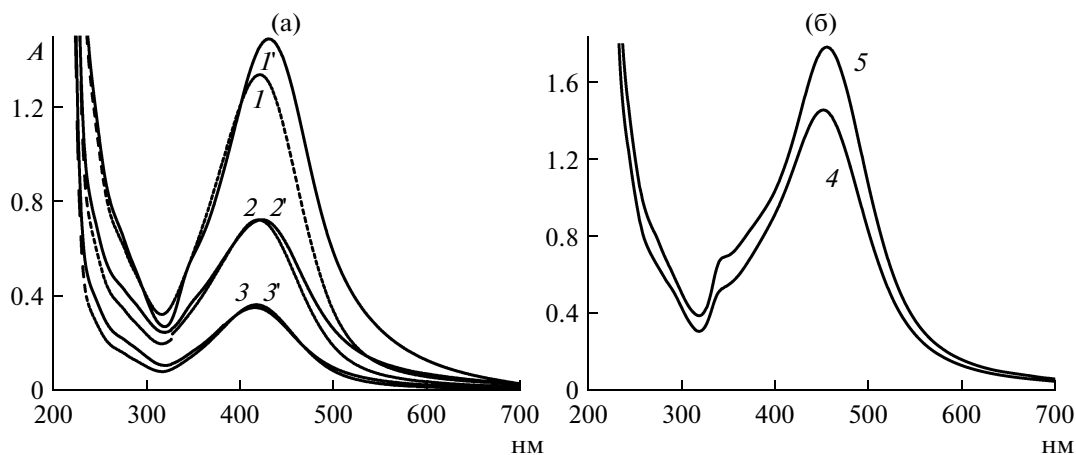


Рис. 5. Изменение спектров поглощения коллоидного раствора наноразмерного серебра, стабилизированного ДДС/ПВП, в течение 8 мес. (I и I') и при разведении в 2 (2 и 2') и 4 (3 и 3') раза (а) и спектры поглощения (б) исходного раствора НЧ Ag (4) и после нагревания при 85°C (5).

различной чувствительности методов. На изображениях в ПЭМ мы не можем четко фиксировать частицы очень малых размеров, учитывая разрешение прибора.

Таким образом, бинарный стабилизатор, состоящий из ПВП и ДДС в оптимальных соотношениях, позволяет получить стабильные наночастицы серебра в коллоидных растворах, которые не окисляются, сохраняют наноразмерность и характерную полосу ППР более 1 г.

Антимикробная активность наночастиц Ag в растворах. Антимикробная активность коллоидного раствора наноразмерного серебра, стабилизиро-

ванного ПВП, практически отсутствует (табл. 1). В присутствии другого стабилизатора – ДДС, проявлялся выраженный эффект по отношению ко всем микроорганизмам. Несмотря на отсутствие бактерицидного действия ДДС в контрольном эксперименте, нельзя полностью исключить его влияние на активацию взаимодействия НЧ с клетками микроорганизма [24]. В малых концентрациях ПАВ проявляют обратимую адсорбцию на поверхности клетки, что приводит к функциональным нарушениям в клеточных мембранах. Это может усиливать бактерицидный эффект НЧ серебра. Бинарный стабилизатор ДДС/ПВП по-

Таблица 1. Антимикробное действие (lgR) коллоидных растворов НЧ Ag с различными стабилизаторами

НЧ Ag (0.0016%) + стабилизатор	Экспозиция, ч	Тест-штаммы микроорганизмов		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
ПВП	1	<0.39	<0.43	<0.57
	2	<0.39	<0.43	<0.57
	4	<0.39	<0.43	<0.57
	24	>5.06	<0.43	<0.57
ДДС	1	>5.30	2.73	>4.19
	2	>5.30	5.01	>4.19
	4	>5.30	>5.02	>4.19
	24	>5.30	>5.02	>4.19
ПВП + ДДС	1	>5.30	1.57	>4.19
	2	>5.30	2.07	>4.19
	4	>5.30	4.35	>4.19
	24	>5.30	>5.18	>4.19
Исходное количество микроорганизмов, lg		7.45	7.17	6.68

Таблица 2. Антимикробная активность коллоидных растворов НЧ Ag, стабилизированных ДДС/ПВП (lgR)

Концентрация серебра, %	Экспозиция, ч	Тест-штамм микроорганизма			
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
0.0016	1	>5.22	4.06	<1.57	>4.27
	2	>5.22	5.00	2.07	>4.27
	4	>5.22	5.40	4.35	>4.27
	24	>5.22	>5.46	>5.24	>4.27
0.0008	1	4.07	3.71	<1.57	>4.27
	2	5.11	4.35	<1.57	>4.27
	4	>5.22	5.35	2.72	>4.27
	24	>5.22	>5.46	>5.24	>4.27
0.0004	1	3.97	0.58	<1.57	>4.27
	2	5.07	4.03	<1.57	>4.27
	4	>5.22	4.46	<1.57	>4.27
	24	>5.22	>5.46	5.09	>4.27
Исходное количество микроорганизмов, lg		7.37	7.61	7.39	6.42

Таблица 3. Антимикробная активность коллоидного раствора НЧ Ag (0.0016%), стабилизированного ДДС/ПВП, через 1 и 2 г. хранения при комнатной температуре

Время хранения образца	Экспозиция, ч	Тест-штамм <i>E. coli</i> (lgR)	Исходное количество микроорганизмов, lg
1 г.	1	>5.29	7.44
	2	>5.29	
	4	>5.29	
	24	>5.29	
2 г.	1	2.9	7.12
	2	3.76	
	4	>4.97	
	24	>4.97	

вышает устойчивость НЧ Ag за счет образования связанных мицелл. Кроме того, комплексный стабилизатор благодаря ПВП имеет ряд преимуществ, например, биосовместимость и способность к адсорбции и, таким образом, удержанию НЧ. Дрожжеподобные грибы *C. albicans* в случае двойного стабилизатора были наиболее чувствительными, величина необходимой редукции (4.0 lgR) была достигнута за 1 ч контакта даже при разбавлении растворов в 2 и 4 раза (табл. 1, 2). Грамотрицательные бактерии (*E. coli*, *P. aeruginosa*) занимали промежуточное положение, необходимый уровень редукции (5.0 lgR) наблюдали через 1–2 ч контакта микроорганизмов с НЧ Ag. Более устойчивыми к действию НЧ Ag оказались *S. aureus* – для достижения (5.0 lgR) потребовалось 4 ч экспозиции.

Снижение антимикробной активности коллоидных растворов НЧ Ag при хранении проявлялось в увеличении времени для достижения необходимой редукции. Такой процесс частично можно объяснить агрегацией и увеличением наночастиц серебра. Однако при нагреве таких коллоидных растворов до 80°C интенсивность полос ППР в спектрах поглощения полностью восстанавливается (рис. 5б). Под действием температуры агрегаты распадались на исходные нанокластеры серебра. Даже после 2 лет хранения растворы имеют удовлетворительную антимикробную активность, что подтверждено результатами исследования (табл. 3) на примере *E. coli*.

Воздействие НЧ серебра на микробную клетку происходит в 2 стадии (адсорбция НЧ, активный

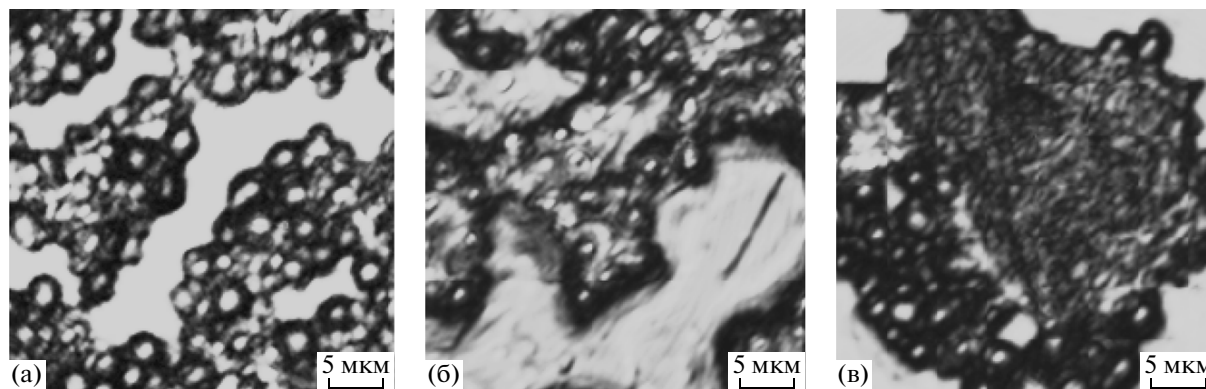


Рис. 6. Электронно-микроскопические снимки процесса разрушения клеток *C. albicans* при контакте с НЧ серебра в течение 0 (а), 4 (б) и 24 (в) ч.

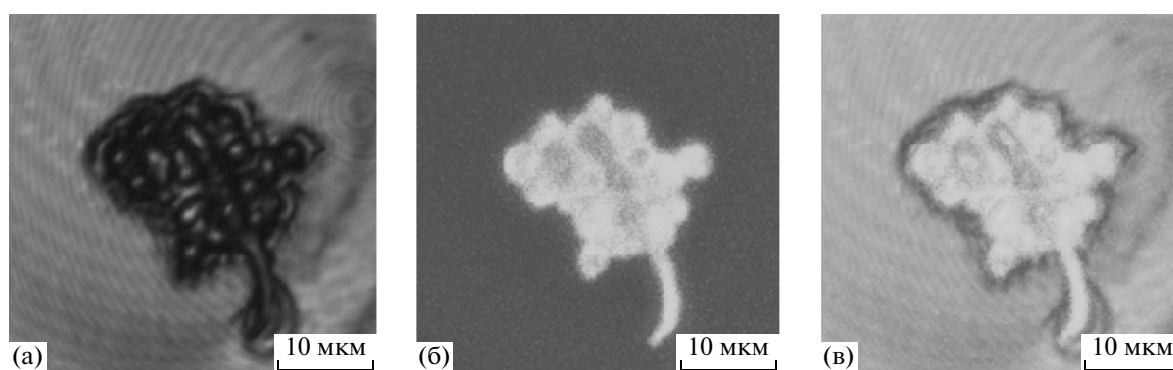


Рис. 7. Электронно-микроскопические снимки процесса проникновения НЧ Ag, меченных флуоресцеином, внутрь микробных клеток (*C. albicans*) в течение 4 ч в режиме отражения света (а), флуоресценции (б) и при наложении двух изображений (в).

транспорт НЧ в клетку), поэтому правомерно утверждать, что степень проникновения НЧ в значительной степени зависит от строения клеточной стенки микроорганизма, и, таким образом, предопределяет реализацию в той или иной мере следующих механизмов: 1) непосредственное разрушение мембраны клетки наночастицами металла; 2) поглощение клеткой свободных ионов серебра, образующихся на границе раздела НЧ/среда, после чего происходят нарушения выработки АТФ и репликации ДНК; 3) катализ НЧ и ионами серебра процесса образования активных форм кислорода [2].

Результаты исследований антимикробной активности растворов наносеребра свидетельствуют о наиболее высокой чувствительности *C. albicans* к НЧ Ag, что частично находит объяснение в работах [<http://zhurnal.apc.relarn.ru/articles/2005/139.pdf>1403, 25, 26]. Необратимое взаимодействие серебра с цистеиновыми остатками, содержащими –SH группу в изомеразе фосфоманнозы, прерывает синтез стенок клетки, что, в свою очередь, приводит к потере незаменимых питательных веществ и, как следствие

этого, гибели клетки. Разрушение клеточной стенки *C. albicans* в системе с НЧ серебра, стабилизированными ДДС, продемонстрировано на полученных изображениях микроскопа LSM 510 META в режиме отражения света после 0, 4, 24 ч экспозиции (рис. 6). Поскольку коэффициент отражения света от стеклянной подложки больше, чем от клеток, то изображение клеток выглядит более темным, чем фон. В процессе взаимодействия компонентов системы четкие границы клеточных мембран культуры размываются и образуется неструктурированная масса, что свидетельствует о деструкции мембран клеток под действием наночастиц серебра.

Для выяснения механизма проникновения НЧ, меченных флуоресцентной молекулой, внутрь микробной клетки получали изображения с помощью микроскопа LSM 510 META при наложении режимов флуоресценции и отражения, как показано на рис. 7. В качестве метки наночастиц выбрали флуоресцеин, который способен встраиваться между молекулами ПАВ в мицеллах стабилизатора.

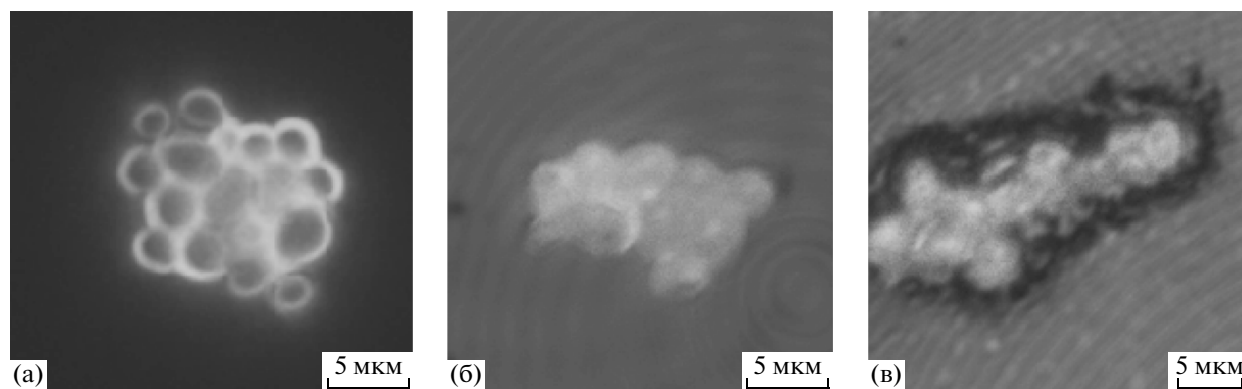


Рис. 8. Электронно-микроскопические снимки области излучения флуоресцеина в системе с *C. albicans* (а) и при взаимодействии *C. albicans* с НЧ серебра в течение 15 мин (б) и 4 ч (в).

На изображении, соответствующем контрольному эксперименту без НЧ, четко видно пространственное распределение флуоресцеина, который концентрируется в зоне мембран клеток. (рис. 8а). Введение в суспензию клеток НЧ серебра приводило к изменению распределения красителя. При малом промежутке времени взаимодействия наночастиц серебра с клетками приводило к более равномерному распределению флуоресцеина по объему, что свидетельствовало о проникновении связанных с ним наночастиц внутрь клеток *C. albicans* (рис. 8б). При увеличении времени воздействия на поверхности клеток появлялись излучающие зоны, что, возможно, связано с деструкцией мембран клеток и исчезновением трансмембранного потенциала. Со временем этот процесс становился все более выраженным. Таким образом, увеличение области флуоресценции свидетельствует о проникновении меченных флуоресцеином НЧ серебра внутрь клеток *C. albicans*.

В коллоидном растворе существуют НЧ различных размеров. При указании их размера имеется в виду средний диаметр образованных частиц. По данным ЛКС условия синтеза способствовали образованию частиц Ag менее 10 нм, которые были способны проникать в микробные клетки через поры в мембранах. Возбужденный краситель, связанный с мицеллами стабилизатора НЧ, излучает уже внутри клетки. Таким образом, первым этапом в уничтожении микроорганизмов является разрушение мембраны и проникновение НЧ Ag внутрь микробной клетки.

Во избежание возможного токсического влияния стабилизатора ДДС в коллоидных растворах НЧ Ag уменьшили концентрацию ПАВ до ПДК, то есть его предельного содержания в питьевой воде (0.5 мг/л согласно ДСанПиН 2.2.4 – 171-10 “Гигиенические требования к воде питьевой, предназначенной для потребления человеком”), но для сохранения стабильности повысили при этом концентрацию ПВП до 3.0%. Сравнительное изучение

антимикробных свойств коллоидного раствора НЧ Ag с концентрацией ДДС на уровне ПДК (0.000045%), с раствором 0.064% ДДС проводили на модели представителя грамотрицательной микрофлоры – *E. coli*. Уменьшение концентрации ДДС в опытном образце НЧ Ag до уровня ПДК не привело к снижению антимикробной активности, в обоих случаях коэффициент редукции $>5.0 \lg R$ был достигнут через 1 ч экспозиции. Полученные результаты свидетельствуют о том, что предложенный коллоидный раствор НЧ Ag не утратил своей антимикробной активности и, в то же время, по концентрации ДДС отвечал требованиям ПДК для этого компонента.

Высокая антимикробная активность синтезированных НЧ Ag обеспечивалась двумя основными показателями: размеры и четко определенное соотношение стабилизаторов, предупреждающих агрегацию частиц и тем самым обеспечивающих сохранение их стабильности на протяжении двух лет наблюдения. Показано, что первым этапом уничтожения микроорганизмов является деструкция клеточной мембраны и проникновение НЧ серебра внутрь микробной клетки. Данные по изучению антимикробной активности коллоидного раствора НЧ Ag с пониженной до уровня ПДК концентрации ДДС свидетельствуют о возможности его применения в качестве эффективного антимикробного средства.

Авторы выражают благодарность ГЦНТП Украины (дог. № 5.16.1.7) за финансовую поддержку исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В. // Успехи химии. 2008. Т. 77. № 3. С. 242–270.
2. Marambio-Jones C., Hoek E.M.V. // J. Nanopart. Res. 2010. V. 12. P. 1531–1551.

3. *Silver S.* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2003. V. 27. P. 341–353.
4. *Silver S., Phung L.T., Silver G.* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 33. P. 627–634.
5. *Clement J.L., Jarrett P.S.* // *Metal-Based Drugs.* 1994. V. 1. № 5–6. P. 467–482.
6. *Elchiguerra J.L., Burt J.L., Morones J.R., Camacho-Bragado A., Gao X., Lara H.H., Yacamán M.J.* // *J. Nanobiotechnol.* 2005. V. 3. № 6. doi:10.1186/1477-3155-3-6
7. *Baker C., Pradhan A., Pakstis L., Pochan D.J., Shah S.I.* // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2005. V. 5. № 2. P. 244–249.
8. *Shrivastava S., Bera T., Roy A., Singh G., Ramachandran P., Das D.* // *Nanotechnology.* 2007. V. 18. P. 1–9.
9. *Pal S., Tak Y., Song J.M.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. V. 73. P. 1712–1720.
10. *Weir E., Lawlor A., Whelan A., Regan F.* // *Analyst.* 2008. V. 133. P. 835–845.
11. *Муха Ю., Еременко А.М., Смирнова Н.П., Корчак Г.И., Михиенкова А., Чекман И.С.* // *Химия, физика и технология поверхности.* Киев. Наукова думка, 2009. № 15. С. 255–266.
12. *Михиенкова А., Муха Ю.* // *Довкілля і здоров'я.* 2011. № 1. С. 55–59.
13. EN 13624:2003 Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants for instruments used in the medical area – Test method and requirements (phase 2, step 1).
14. EN 13727:2003 Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants for instruments used in the medical area – Test method and requirements (phase 2, step 1).
15. *Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T., Yacamán M.J.* // *Nanotechnology.* 2005. V. 16. № 10. P. 2346–2353.
16. *Henglein A., Mulvaney P., Linnert T.* // *Faraday Discuss.* 1991. V. 92. P. 31–44.
17. *Patakfalvi R., Viranyi Z., Dekany I.* // *Colloid Polym. Sci.* 2004. V. 283. № 3. P. 299–305.
18. *Hoogsteen W., Fokkink L.G.J.* // *J. Colloid Interface Sci.* 1995. V. 175. P. 12–26.
19. *Olofsson G., Wang G.* // *Pure Appl. Chem.* 1994. V. 66. № 3. P. 527–532.
20. *Sukul D., Pal S.K., Mandal D., Sen S., Bhattacharyya K.* // *J. Phys. Chem. B.* 2000. V. 104. № 26. P. 6128–6132.
21. *Roscigno P., Asaro F., Pellizer G., Ortona O., Paduano L.* // *Langmuir.* 2003. V. 19. P. 9638–9644.
22. *Chen Ch., Wang L., Jiang G., Yu H.* // *Research Adv. Mater.* 2006. V. 11. P. 1–18.
23. *Yin B., Ma H., Wang S., Chen S.* // *J. Phys. Chem. B.* 2003. V. 107. P. 8898–8904.
24. *Kora A.J., Manjusha R., Arunachalam J.* // *Mater. Sci. Eng.* 2009. V. 29. P. 2104–2109.
25. *Wright J.B., Lam K., Hansen D., Burrell R.E.* // *Am. J. Infect. Control.* 1999. V. 27. № 4. P. 344–349.
26. *Wells T.N., Scully P., Paravicini G., Proudfoot A.E., Payton M.A.* // *Biochemistry.* 1995. V. 34. № 24. P. 7896–7903.

Antimicrobial Activity of Stable Silver Nanoparticles of a Certain Size

Yu. P. Mukha^a, A. M. Eremenko^a, N. P. Smirnova^a, A. I. Mikhienkova^b,
G. I. Korchak^b, V. F. Gorchev^c, and A. Yu. Chunikhin^c

^a *Chuiko Institute of Surface Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, 03164 Kyiv-164*

^b *Marzeev Institute for Hygiene and Medical Ecology NAMS Ukraine, Kyiv-94, 02660*

^c *Palladin Institute of Biochemistry NAS Ukraine, Kiev-601, 01601*

e-mail: annaerem@ukr.net

Received September 10, 2012

Abstract—Conditions for obtaining stable silver nanoparticles smaller than 10 nm were developed using a binary stabilizer polyvinylpyrrolidone/sodium dodecylsulphate in optimal ratio. Optical spectra, morphology and dependence of size of the nanoparticles on the amount of reducing agent were studied. Colloidal solutions of nanosilver showed a high bactericidal activity against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and fungicidal activity against *Candida albicans*. The mechanism of action of nanosized silver on microbial cell was examined by laser scanning confocal microscope using fluorescent label. First step of antimicrobial effect on microorganisms was membrane damage and penetration of silver nanoparticles into the cell. Prolonged stability of nanoparticles and their antimicrobial activity over the past two years were showed.

ПОЗДРАВЛЯЕМ ЕЛЕНУ ПЕТРОВНУ ФЕОФИЛОВУ С ЮБИЛЕЕМ



Феофилова Елена Петровна — специалист в области физиологии, биохимии и биотехнологии мицелиальных грибов, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий лабораторией экспериментальной микологии Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, член редколлегии журналов “Прикладная биохимия и микробиология” и “Микология и фитопатология”, почетный член Национальной академии микологии.

Е.П. Феофилова родилась 6 января 1933 г. в Туле. После окончания Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (1955 г.) работала в лаборатории академика С.Р. Мардашева, где прошла методическую школу в области биохимии и получила навыки работы с патогенными грибами. В 1959 г. под руководством академика В.Н. Шапошникова и профессора А.Я. Мантейфель защитила кандидатскую диссертацию, посвященную кефирным грибам. Дальнейшей темой научных исследований Е.П. Феофиловой стала физиология и биохимия микроорганизмов, а с 1961 г. вся последующая жизнь связана с Институтом микробиологии, где в начале своего научного пути она работала в отделе технической микробиологии под руководством академика В.Н. Шапошникова и проф. М.Н. Бехтерева. На основе большого экспериментального материала ею была создана оригинальная теория о биологической функции вторичных метаболитов микроорганизмов, нашедшая отражение в многочисленных обзорах и докторской диссертации (1979 г.). В 80-х гг. XX века интерес Е.П. Феофиловой был сосредоточен на исследованиях в области липидообразования и цитродифференцировки мицелиальных грибов. С 1988 г. Елена Петровна — руководитель сначала временного научного коллектива, а с 1996 г. — организатор новой лаборатории экспериментальной микологии. В 1991 г.

ей присвоено звание профессора. В настоящее время область интересов Е.П. Феофиловой охватывает широкий круг проблем, касающихся исследования биохимической адаптации грибов к стрессовым воздействиям путем изменения состава липидов, углеводов, антиоксидантов, а также изучения состояния гипометаболизма.

Е.П. Феофилова имеет огромный опыт внедрения результатов научных разработок в промышленное производство. По заданию правительства СССР она участвовала в пуске биотехнологических заводов по производству каротина в Свердловске, Верхнеднепровске и Краснодаре. В 90-е годы при ее участии вместе с заводом “Уралбиофарм” был разработан способ получения ликопина, а с заводом “Цитробел” — способ получения хитин-глюканового комплекса. Значительным достижением Е.П. Феофиловой и ее сотрудников является создание новых лекарственных препаратов — Микорана и Миколикопина. В настоящее время ведутся работы по созданию способа получения нового вида биологического топлива (биоудизеля) на основе липидов мицелиальных грибов.

В 1974 г. в издательстве “Наука” выходит первая книга Е.П. Феофиловой — “Пигменты микроорганизмов”, посвященная, в основном, каротиноидам грибов, имеющая большое научное и прикладное значение, в 1983 г. — “Клеточная стенка грибов”, а в 2002 г. — коллективная монография “Хитин и хитозан: получение, свойства и применение”, также получившие широкое научное признание.

Результаты научных исследований Е.П. Феофиловой отражены более чем в 270 научных публикациях, а прикладные разработки — в 12 авторских свидетельствах и 15 патентах РФ.

Елена Петровна работает в тесном контакте с кафедрой микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, читает лекции о новых достижениях в области микологии и биотехнологии. Под ее руководством или консультировании защищены 10 кандидатских и 2 докторские диссертации. Большое внимание Е.П. Феофилова уделяет деятельности Национальной академии микологии, почетным членом которой она избрана.

В 2004 г. за заслуги в научной деятельности и подготовке высококвалифицированных специалистов она удостоена звания “Заслуженный деятель науки Российской Федерации”, а в 2011 г. награждена медалью А.А. Ячевского, учрежденной Общероссийской общественной организацией “Национальная академия микологии”.

Бесконечная тяга к новым знаниям, эрудиция, большая работоспособность, энергия и преданность своему делу Е.П. Феофиловой снискали огромный авторитет в научном сообществе и уважение ее коллег и учеников.

Редколлегия журнала “Прикладная биохимия и микробиология”, коллеги и друзья поздравляют Елену Петровну с юбилеем и желают ей здоровья и дальнейших успехов в ее плодотворной и многосторонней деятельности.

Редколлегия