

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	СОВМЕСТНАЯ МИГРАЦИЯ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ И БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ В НОВЫЕ МЕСТООБИТАНИЯ: МЕХАНИЗМЫ КОЭВОЛЮЦИИ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ (ОБЗОР) Проворов Н.А., Жуков В.А., Курчак О.Н., Онищук О.П., Андронов Е.Е., Борисов А.Ю., Чижевская Е.П., Наумкина Т.С., Овцына А.О., Воробьев Н.И., Симаров Б.В., Тихонович И.А.	229	2
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ РИЗОБИАЛЬНОЙ (RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM) ИНОКУЛЯЦИИ И ИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ В КОРНЯХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА (PISUM SATIVUM L.) Глянко А.К., Ищенко А.А.	236	1
<input type="checkbox"/>	ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ БЕЛКОВ МЕМБРАНЫ МАГНЕТОСОМ Груздев Д.С., Дзюба М.В., Герасимов А.С., Кузнецов Б.Б.	242	0
<input type="checkbox"/>	PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NITROREDUCTASE FROM RED ALKALIPHILIC BACTERIUM AQUIFLEXUM SP. DL6 Misal S.A., Bajoria V.D., Lingojar D.P., Gawai K.R.	249	0
<input type="checkbox"/>	МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ Г-НУЗИНОЗИНА ВЫСОКОГО УРОВНЯ ДЕЙТЕРИРОВАННОСТИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ ХЕМОГЕТЕРОТРОФНОЙ БАКТЕРИЕЙ BACILLUS SUBTILIS Мосин О.В., Швец В.И., Складнев Д.А., Игнатов И.	255	0
<input type="checkbox"/>	ДЕСТРУКЦИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ ШТАММОМ RHODOCOCCLUS WRATISLAVIENSIS KT112-7, ВЫДЕЛЕННЫМ ИЗ ОТХОДОВ СОЛЕДОБЫВАЮЩЕГО ПРЕДПРИЯТИЯ Егорова Д.О., Корсакова Е.С., Демаков В.А., Плотникова Е.Г.	267	5
<input type="checkbox"/>	METAL SOLUBILIZATION FROM POWDERED PRINTED CIRCUIT BOARDS BY MICROBIAL CONSORTIUM FROM BAUXITE AND PYRITE ORES Adhapure N.N., Waghmare S.S., Hamde V.S., Deshmukh A.M.	279	0
<input type="checkbox"/>	ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ЛИГНОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ, У ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ Шевченко Е.А., Бессолицына Е.А., Дармов И.В.	285	1
<input type="checkbox"/>	ТРАНСФОРМАЦИЯ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ВЫСОКООКИСЛЕННОГО БУРОГО УГЛЯ БАЗИДИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ TRAMETES HIRSUTA И TRAMETES MAXIMA Кляйн О.И., Куликова Н.А., Константинов А.И., Фёдорова Т.В., Ландесман Е.О., Королёва О.В.	292	3
<input type="checkbox"/>	ИММОБИЛИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ПРОДУЦЕНТА ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЛИПАЗЫ ИЗ THERMOMYCES LANUGINOSUS В НАНОУГЛЕРОД-СИЛИКАТНЫЕ МАТРИЦЫ И СВОЙСТВА ПРИГОТОВЛЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ Коваленко Г.А., Беклемишев А.Б., Перминова Л.В., Чуенко Т.В., Мамаев А.Л., Иванов И.Д., Мосеенков С.И., Кузнецов В.Л.	301	1
<input type="checkbox"/>	ДЕТЕКЦИЯ ПИРЕТРОИДОВ С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРАЛЬНО-КОРРЕЛЯЦИОННОЙ ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ Буренин А.Г., Никитин М.П., Орлов А.В., Ксеневиц Т.И., Никитин П.И.	312	1
<input type="checkbox"/>	ТРОМБОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ГЛЮКОЗОСОДЕРЖАЩИХ ГИДРОГЕЛЕЙ Валуев И.Л., Валуев Л.И., Ванчугова Л.В., Обыденнова И.В., Валуева Т.А.	319	0
<input type="checkbox"/>	ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЛИШАЙНИКАХ Буркин А.А., Кононенко Г.П., Толпышева Т.Ю.	322	5

УДК 576.8.095.38:851.155

СОВМЕСТНАЯ МИГРАЦИЯ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ И БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ В НОВЫЕ МЕСТООБИТАНИЯ: МЕХАНИЗМЫ КОЭВОЛЮЦИИ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ (ОБЗОР)

© 2013 г. Н. А. Проворов*, В. А. Жуков*, О. Н. Курчак*, О. П. Онищук*, Е. Е. Андронов*, А. Ю. Борисов*, Е. П. Чижевская*, Т. С. Наумкина**, А. О. Овцына*, Н. И. Воробьев*, Б. В. Симаров*, И. А. Тихонович***

*Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, С.-Петербург, 196608

**Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых и крупяных культур Россельхозакадемии, Орел, 303112

***Санкт-Петербургский госуниверситет, С.-Петербург, 199034

e-mail: provorov@newmail.ru

Поступила в редакцию 17.05.2012 г.

В обзоре обобщены результаты изучения совместной миграции клубеньковых бактерий и бобовых растений в новые местообитания, которая часто сопровождается снижением эффективности их симбиоза в связи с утратой разнообразия по генам, контролирующим взаимодействие. Эта миграция может приводить к появлению новых симбионтов в результате переноса генов из исходных симбионтов в местные бактерии. Показано, что новые симбионты обычно лишены способности к фиксации N_2 , но обладают высокой конкурентоспособностью, блокируя инокуляцию бобовых культур производственными штаммами. Конструирование ко-адаптированных систем узнавания и сигнального взаимодействия партнеров является перспективным подходом для обеспечения конкурентного преимущества эффективных штаммов ризобий, интродуцируемых в агроценозы совместно с хозяевами, над неактивными местными штаммами.

DOI: 10.7868/S0555109913030148

Растительно-микробные симбиозы (РМС), которые формируются в результате мутуалистического (взаимовыгодного) взаимодействия растений и микроорганизмов – эффективная стратегия ко-адаптации партнеров к неблагоприятным условиям среды [1, 2]. Симбиозы с бактериями или грибами улучшают минеральное питание растений (на основе фиксации N_2 или мобилизации питательных ресурсов почвы), а также их устойчивость к патогенам и фитофагам (благодаря синтезу токсинов и антибиотиков, либо индукции иммунных реакций растений) и к ряду абиотических стрессов [3]. Поэтому интродукция растений в новые местообитания (которая происходит в процессе как естественной эволюции, так и доместикации растений) наиболее успешна в том случае, если она осуществляется в комплексе с полезной микрофлорой, обеспечивающей быструю адаптацию хозяев к стрессовым условиям [4].

Удобной моделью для изучения адаптивных процессов, происходящих при совместной миграции растений и бактерий в новые условия, является N_2 -фиксирующий бобово-ризобиальный (клубеньковый) симбиоз, изучение которого проводится с помощью широкого арсенала совре-

менных подходов, включая методы молекулярной экологии и математического моделирования [5, 6]. Развитие клубенькового симбиоза определяется комплементарными генными системами партнеров, которые возникли в результате их продолжительной (60–70 млн. лет) коэволюции [2]. Ключевую роль в развитии симбиоза играют бактериальные *nod*-гены, которые кодируют синтез липо-хито-олигосахаридных *Nod*-факторов – сигналов, активирующих системные и локальные ответы у растений. В результате сигнального взаимодействия партнеров происходит инфицирование и развитие клубеньков, кульминацией которого является эндоцитоз бактерий в растительные клетки, где образуются N_2 -фиксирующие бактериоиды (у эволюционно продвинутых бобовых “галегоидного” комплекса, включающего роды *Galega* L., *Medicago* L., *Pisum* L., *Trifolium* L., дифференцировка бактерий в бактериоиды является необратимой). Бактериоиды поддерживаются в органеллоподобных внутриклеточных компартментах, симбиосомах, которые осуществляют активный экспорт продуктов нитрогеназной реакции (главным образом, аммоний) и импорт С-соединений (дикарбоновые кислоты), используемых для ее обеспечения энергией.

Повышение эффективности РМС и их широкое использование в сельскохозяйственной практике основано на изучении эколого-генетических и молекулярных механизмов взаимодействия партнеров, определяющего их взаимную адаптацию к различным агроклиматическим условиям. Хотя в условиях почвы не способные к азотфиксации штаммы ризобий часто проявляют более высокую экологическую приспособленность, чем активные азотфиксаторы, основным направлением коэволюции партнеров клубенькового симбиоза является повышение эффективности симбиотрофного питания растений азотом, сопровождаемое возрастанием структурной организованности и функциональной целостности симбиоза. Знания о популяционных факторах и молекулярных механизмах этой эволюции могут быть использованы для конструирования улучшенных РМС и их широкого внедрения в экологически устойчивое агропроизводство, основанное на замене химикатов микробными препаратами [3].

Интродукция растительно-микробных систем из центров происхождения в регионы возделывания. Эволюция РМС в условиях агроценоза определяется совместной миграцией растений и микроорганизмов из центров происхождения (где наблюдается большое разнообразие партнеров и их высокая зависимость от симбиоза) в регионы возделывания (где разнообразие партнеров снижено, а эффективность их взаимодействия ограничена активным применением удобрений и пестицидов). В том случае, если новые условия обитания неблагоприятны для исходных симбионтов (ИС), мигрировавших совместно с хозяевами, эволюция РМС может идти по разным сценариям. Один из них заключается в адаптации ИС к новым условиям, которая приводит к выживанию ограниченного спектра микробных генотипов. Второй сценарий подразумевает возникновение новых симбионтов (НС) путем переноса симбиотических (*sym*) генов из ИС в местные бактерии, интенсивность которого может повышаться в ходе симбиотического взаимодействия. И наконец, третий эволюционный сценарий предусматривает расширение спектра симбионтов, способных вступать в симбиоз с растением, за счет утраты последним избирательности взаимодействия с почвенными микроорганизмами.

Первый сценарий был показан для ризобий клевера (*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*), интродукция которых вместе с клевером переменчивым (*Trifolium ambiguum* Vieb.) из кавказского центра происхождения в североамериканские регионы возделывания резко снизила полиморфизм бактериальных популяций [7]. Широкое таксономическое разнообразие симбионтов культурной сои, *Glycine max* (L.) Merr. и *G. soja* Siebold & Zucc. (*Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, *Sinorhizobium fredii*) наблюдается в Китайском центре проис-

хождения, тогда как в сельскохозяйственных зонах США это разнообразие ограничено лишь некоторыми генотипами *B. japonicum* [2].

Второй сценарий – возникновение НС путем переноса *sym*-генов из ИС в местные бактерии (таблица) – обеспечивается локализацией генов симбиоза на *Sym*-плазмидах (**pSym**) или в “геномных островах”, которые содержат гены образования клубеньков (**nod-гены**) и фиксации N₂ (**nif/fix-гены**, кодирующие синтез и функционирование нитрогеназы). Хотя частоты переноса этих генов невелики, его вклад в эволюцию симбиотических бактерий весьма значителен, поскольку при взаимодействии с растениями редко возникающие рекомбинанты подхватываются частотнозависимым отбором и быстро вовлекаются в микроэволюционные процессы [8].

Такая адаптивная стратегия была осуществлена при интродукции: а) фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) из южноамериканского центра происхождения в Европу совместно с ризобиями *R. tropici* и *R. etli*, которые послужили для местных бактерий донорами pSym [9, 10]; б) лядвенца (*Lotus corniculatus* L.) из Средиземноморья в Австралию совместно с ризобиями *Mesorhizobium loti*, которые послужили для местных бактерий донорами хромосомных “симбиотических” островов [11]. Рекомбинанты, возникающие при гибридизации интродуцированных и местных бактерий, закрепляются в популяциях благодаря экспрессии *nod*-генов, обеспечивающей размножение бактерий в клубеньках. Однако N₂-фиксирующая активность вновь возникших НС обычно является низкой или нулевой, что связано с нарушениями экспрессии *nif/fix*-генов на новом генетическом фоне [12].

Мы изучили эти эволюционные процессы, сравнив полиморфизм популяций *R. leguminosarum* bv. *viciae* из Украины (область интенсивного возделывания вики, *Vicia sativa* L. и *V. villosa* Roth.) и Средней Азии (центр разнообразия рода *Vicia* L.) [13]. Среднеазиатские популяции *R. leguminosarum* bv. *viciae* оказались высоко полиморфными по составу плазмид (что связано с таксономическим разнообразием хозяев, представленных более чем 15 видами *Vicia*) и обладали низкой активностью утилизации сахаров (отсутствующих в низкоплодородных сероземных почвах полупустынной зоны, покрытых редкой растительностью). Однако эти штаммы проявляли высокую активность симбиоза, которая отражает сильную зависимость бактерий от растений.

В противоположность этому, украинская популяция *R. leguminosarum* bv. *viciae* была низко полиморфной по составу плазмид, активно усваивала сахара (доступные в плодородных черноземных почвах, покрытых плотной растительностью). Однако симбиотическая эффективность украинских штаммов по сравнению со среднеазиатскими была

Эволюция новых видов ризобий путем горизонтального переноса *sym*-генов в местные бактерии, связанного с интродукцией бобовых растений-хозяев в новые местообитания (библиография дана в обзоре [2]).

Растение-хозяин	Направление (возраст) интродукции растений	Ризобии, интродуцированные вместе с хозяином, доноры <i>sym</i> -генов	Местные бактерии, предполагаемые реципиенты <i>sym</i> -генов	Новые симбионты, возникшие в областях интродукции	Передаваемые генетические элементы
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Европа → Новая Зеландия (7 лет)	<i>Mesorhizobium loti</i>	Асимбиотические штаммы <i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i> sp.	Хромосомные острова (до 611 т.п.н.)
<i>Biserrula pelecinus</i> L.	Средиземноморье → Австралия (12 лет)	<i>Mesorhizobium</i> sp.	То же	То же	То же
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Северная Америка → Европа (≈300 лет)	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	Местные ризобии и агробактерии	<i>M. loti</i> , <i>M. amorphae</i> , <i>R. leguminosarum</i> , <i>R. tropici</i>	Возможно, симбиотические острова
<i>Amorpha fruticosa</i> L.	Северная Америка → Китай (≈50 лет)	<i>Mesorhizobium amorphae</i>	Местные ризобии	<i>Mesorhizobium</i> sp., <i>R. leguminosarum</i> , <i>B. elkanii</i>	То же
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Северная и Центральная Америка → Европа (≈500 лет)	<i>Rhizobium tropici</i> , <i>R. etli</i>	Местные ризобии и агробактерии	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> , <i>R. gallicum</i> , <i>R. giardinii</i>	Возможно, <i>Sym</i> -плазмиды
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	Северная Америка → Южная Америка (≈80 лет)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Местные ризобии и агробактерии	<i>Rhizobium</i> sp., <i>B. elkanii</i>	Нет данных

снижена, что отражало меньшую зависимость от хозяев, которая проявлялась у бактерий в благоприятных эдафических условиях [13].

Высокая зависимость популяционной структуры бактерий, интродуцированных вместе с хозяевами в новую экологическую зону, от адаптации к местным эдафическим факторам была показана также для популяций *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, мигрировавших совместно с красным и белым клевером (*Trifolium pratense* L., *T. repens* L.) в бореальную экосистему о. Средний (Белое море), где эти бактерии взаимодействовали с генетически родственными штаммами *R. leguminosarum* bv. *viciae* – симбионтами местных видов вики (*Vicia* L.) и чины (*Lathyrus* L.) [14]. Эта адаптация выразилась в повышенном разнообразии хромосомных маркеров у *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (показанного путем ПЦР-анализа локуса IGS), тогда как разнообразие находящихся на *pSym* локусов *nod* и *nif* было низким, показывая, что интродуцированные ризобии клевера эволюционировали путем адаптации к почвенным нишам, контролируемой в основном хромосомными генами. В объединенной популяции *R. leguminosarum* (bv. *trifolii* + bv. *viciae*) выявлена высокая панмиктичность (случайное комбинирование плазмидных и хромосомных локусов), показавшая значительный вклад гори-

зонтального переноса *sym*-генов в формирование популяционной структуры. Этот фактор играет ключевую роль в эволюции симбиоза, обеспечивая формирование у ризобий новых генных систем, контролирующих взаимодействие с растениями [2].

Для того чтобы выяснить, почему бактерии, интродуцированные совместно с хозяевами в новые условия, эволюционируют главным образом благодаря адаптациям к эдафическим факторам, а не к растению-хозяину, мы использовали методологию математического моделирования эволюционных процессов, которые происходят в бактериальных популяциях на автономных и симбиотических стадиях жизненного цикла.

Моделирование коэволюционных процессов. Используя методы математической композиции, мы разработали схемы компьютерных экспериментов по изучению эволюции РМС в природных экосистемах и агроценозах [15]. Созданные модели позволили нам объединять процессы конкуренции ризобий за почвенные, ризосферные и клубеньковые ниши в серию циклов, представляющих длительный (неограниченный во времени) эволюционный процесс. Компьютерные эксперименты показали, что возникновение у микросимбионтов адаптаций к выживанию в почве и к

образованию клубеньков являются результатом быстро протекающих микроэволюционных процессов, которые зависят от индивидуального (Дарвиновского, частотно-зависимого) отбора, происходящего при конкуренции между различными штаммами бактерий на ранних стадиях симбиоза (преинфекция, проникновение в корневые волоски). Благодаря этим процессам из почв могут “извлекаться” очень редкие (возникающие с частотами менее 10^{-12}) рекомбинанты, для закрепления которых в ассоциированных с растениями микробных популяциях оказывается достаточным небольшого числа (10–15) микроэволюционных циклов [2].

В то же время эволюция высокой активности N_2 -фиксации является гораздо более длительным процессом, основанным на групповом отборе, который происходит при конкуренции между внутриклубеньковыми клонами за трофические ресурсы, предоставляемые хозяином на поздних стадиях симбиоза (функционирование глубоко дифференцированных бактериоидов в составе зрелых симбиосом). Этот отбор особенно важен для эволюции ризобий – симбионтов бобовых “галегоидного” комплекса, поскольку характерная для них необратимая дифференцировка бактериоидов является результатом межвидового альтруизма, “запрещенного” в рамках Дарвиновской парадигмы адаптивной эволюции [16].

Кроме того, эволюция ризобий на повышение активности N_2 -фиксации происходит *in planta*, где она определяется дифференциальным размножением N_2 -фиксаторов под контролем метаболических обратных связей с растением-хозяином, поставляющим С-соединения в активно фиксирующие N_2 клубеньки [17]. Если растения испытывают дефицит азота, характерный для природных экосистем, то эти обратные связи весьма эффективны, что и позволяет растениям развиваться на основе симбиотрофного питания азотом. Однако регуляторные связи партнеров могут нарушаться при активном внесении удобрений, продукты ассимиляции которых подавляют развитие симбиоза. Поэтому в естественных экосистемах эволюция НС продолжается вплоть до их преобразования в активные азотфиксаторы, тогда как в агроценозах это преобразование резко замедлено или даже полностью блокировано, в связи с чем в почвенных популяциях накапливаются вирулентные штаммы, не способные к активной фиксации N_2 .

Результаты математического моделирования эволюционной динамики симбиоза показали, что интродукция РМС в агроценозы должна базироваться на быстро возникающих ко-адаптациях партнеров и будет успешной лишь в том случае, если совместно мигрировавшие генотипы обладают высоко специфичными механизмами узна-

вания, обеспечивающими избирательную инокуляцию растений эффективными микросимбионтами [18]. Такие механизмы позволяют исключить неэффективные штаммы (НС или местные генотипы) из инфицирования растений, которые таким образом инокулируются только специально подобранными или сконструированными активными N_2 -фиксаторами. Моделирование популяционной динамики симбиоза может быть использовано и для оценки эколого-генетических последствий интродукции в агроценозы модифицированных штаммов ризобий, которые могут оказаться по отношению к аборигенному микробиоценозу источниками генов, влияющих на развитие растений [2, 18].

Интродукция ко-адаптированных микробно-растительных систем в агроценозы. На молекулярном уровне сопряженная эволюция растений и бактерий основана на их высокоспецифичном узнавании и сигнальном взаимодействии, которые обеспечивают формирование коадаптированных генетических комбинаций партнеров и, как следствие, устойчивость симбиоза к неблагоприятным факторам среды. Образующие бактериями Nod-факторы имеют высокое сходство с сигнальными молекулами грибов арбускулярной микоризы – Muc-факторами [19, 20]. Бобовые растения способны распознавать структуру Nod-факторов за счет белковых комплексов, в состав которых входит не менее двух высокоспецифичных рецепторных киназ [21]. Одиночные замены аминокислот в последовательностях данных белков могут приводить к смене специфичности распознавания Nod-факторов различными видами бобовых [22–24]. Генетическая трансформация растений люцерны *M. truncatula* Gaertn. экспрессионными конструкциями с генами, кодирующими рецепторные киназы *Nfr1* и *Nfr5* лядвенца японского (*Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen), приводит к тому, что люцерна начинает формировать клубеньки с “чужеродными” симбионтами лядвенца, *Mesorhizobium loti* [25]. Однако фиксации азота в таких клубеньках не происходит, что указывает на различие лядвенца и люцерны по генам, контролирующим последующие стадии симбиоза, например, глубокую дифференцировку бактериоидов [26]. В ходе эволюции система узнавания Nod-факторов растением, вероятно, возникла на основе рецепторов, распознающих Muc-факторы, либо хитинподобные элиситоры защитных реакций растения. У бобовых данная система обеспечивает проникновение в растение лишь строго определенных ризобий, не допуская, таким образом, превращения мутуалистических взаимодействий в паразитические.

Рассмотренный выше третий сценарий эволюции РМС, предполагающий расширение симбиотической специфичности растения при интродукции в новые местообитания, вероятно, реали-

зуется благодаря молекулярной эволюции генов, кодирующих рецепторы Nod-факторов. В пределах вида горох посевной (*Pisum sativum* L.) выделяется группа дикорастущих “афганских” линий (представители подвида *P. sativum* ssp. *abyssinicum*), несущих аллель гена *sym2^A*, которая блокирует инфицирование растений подавляющим большинством штаммов ризобий из европейских почв [27, 28]. Устойчивость, кодируемая аллелью *sym2^A*, может быть преодолена штаммами *R. leguminosarum* bv. *viciae*, которые несут ген *nodX*, редко встречающийся в европейских популяциях [29–31]. Этот эффект связан с тем, что ген *nodX* кодирует повторное ацетилирование Nod-фактора, который приобретает сродство к гипотетическому белковому рецептору, кодируемому геном *Sym2*.

В то же время вариант рецептора, кодируемый доминантной аллелью *Sym2^E*, характерной для культурных форм гороха (*P. sativum* ssp. *sativum*), обладает низкой специфичностью к бактериальным сигналам и “разрешает” нодуляцию растений широким спектром штаммов *R. leguminosarum* bv. *viciae*, как содержащих ген *nodX*, так и лишенных его. Вероятно, возникновение такой аллели явилось необходимой предпосылкой для продвижения предковых форм культурного гороха из Малой Азии в Европу, где широко распространены аборигенные штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* – симбионтов дикорастущих видов *Lathyrus* spp. и *Vicia* spp. Эти штаммы не несут гена *nodX*, однако подавляют инокуляцию гороха *nodX*-содержащими штаммами, интродуцированными совместно с горохом.

На основе описанного эволюционного сценария может быть разработана эффективная стратегия для интродукции комплементарных сочетаний генотипов партнеров в агроценозы. Такая интродукция очень важна для гороха (*P. sativum*), производственная инокуляция которого часто неэффективна из-за того, что штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae*, отселектированные на высокую азотфиксирующую активность, оказываются неспособными конкурировать за образование клубеньков с аборигенными штаммами *R. leguminosarum* bv. *viciae* – симбионтами чины и вики. По отношению к гороху эти штаммы неэффективны, однако при его инокуляции оказываются более конкурентоспособными, чем эффективные коммерческие штаммы-инокулянты.

Для обеспечения высокой конкурентоспособности производственных штаммов в сорта культурного гороха (*P. sativum* ssp. *sativum*) из дикорастущих “афганских” линий (*P. sativum* ssp. *abyssinicum*) путем возвратного скрещивания была введена аллель *sym2^A*, которая блокирует инфицирование растений подавляющим большинством аборигенных штаммов. Введение гена *nodX* в производственные штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* позволяет

им вступать в симбиоз со специально сконструированными линиями *P. sativum* ssp. *sativum* генотипа *sym2^A/sym2^A*, устойчивыми к инфицированию неэффективными (аборигенными или вновь возникшими) штаммами. Специфичность этой системы “ген-на-ген” может быть еще более повышена благодаря замене гена *nodX* на гетерологичный (выявленный у ризобий сои, но отсутствующий у ризобий гороха) ген *nodZ*, который позволяет рекомбинантным штаммам *R. leguminosarum* bv. *viciae* преодолевать *sym2^A*-кодируемую устойчивость гороха к инокуляции ризобиями благодаря фукозилированию Nod-фактора [31].

Однако участие подобных систем “ген-на-ген” и кодируемых ими высокоспецифичных факторов узнавания в контроле бобово-ризобиального симбиоза ограничено [27], поскольку, в отличие от фитопаразитарных взаимодействий, при мутуализме растение “заинтересовано” в сохранении способности к симбиозу с широким спектром микросимбионтов, находящихся в почве. В отсутствие таких систем проблема конкуренции между производственными и местными штаммами ризобий может быть решена путем конструирования рекомбинантных штаммов, у которых интенсивная фиксация N₂ сочетается со способностью активно конкурировать с неактивными азотфиксаторами за образование клубеньков и выживание в почве. У клубеньковых бактерий клевера (*R. leguminosarum* bv. *trifolii*) такое сочетание было достигнуто благодаря введению генов *tfx*, кодирующих синтез олигопептидного антибиотика трифолиотоксина, в симбиотически активные штаммы: полученные рекомбинанты приобрели высокую конкурентоспособность донора, сохранив характерный для реципиента уровень нитрогеназной активности [32]. Аналогичный эффект был достигнут и при передаче *tfx*-генов в ризобии фасоли (*R. etli*) и люцерны (*Sinorhizobium meliloti*): полученные рекомбинанты приобрели способность успешно конкурировать с родительским штаммом за образование клубеньков у *Phaseolus vulgaris* L. и *Medicago sativa* L. соответственно [33].

Для комбинирования высокой симбиотической активности и выживаемости в почве у ризобий вики (*R. leguminosarum* bv. *viciae*) мы [34] использовали плазмиду pSym1032 штамма R11032, кодирующую широкий комплекс адаптивно значимых признаков, включая активную фиксацию N₂, успешную конкуренцию за образование клубеньков у вики мохнатой (*Vicia villosa*) и устойчивость к кислой реакции среды. Конъюгативный перенос этой плазмиды в штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae*, обладающие низкой активностью N₂-фиксации (изоляты из местных популяций Украины) позволил получить широкий спектр рекомбинантов, среди которых 10% оказались активными N₂-фиксаторами, обладающими высо-

кой конкурентоспособностью и кислотоустойчивостью [34].

Для генетического конструирования ризобий люцерны (*S. meliloti*), обладающих повышенной конкурентоспособностью, мы [35] с использованием метода неспецифического Tn5-мутационеза получили серию мутаций, вызывающих нарушения данного признака. Гены *cmp*, маркированные этими мутациями, были локализованы на всех трех репликациях (хромосома и две мегаплазмиды) высокоэффективного и конкурентоспособного штамма СХМ1-105 *S. meliloti*. Некоторые из этих генов кодируют адаптивно значимые признаки бактерий, которые могут быть изучены на лабораторных средах (скорость роста, устойчивость к антибиотикам или фагам, синтез липо-, экзо- или капсулярных полисахаридов). Однако для целей генетического конструирования наиболее привлекательными оказались гены, лишенные проявления *ex planta*, так как перенос этих генов (путем трансдукции фагом φM12 или конъюгации с помощью различных векторных плазмид) в исходные мутанты вызывает повышение их конкурентоспособности до уровня “дикого типа”. При введении одного из этих генов, *cmp-107* (расположен на мегаплазмиде-1, кодирует мембранный белок с неизвестными функциями) в дефектный по данному гену мутант в составе низкокопийной плазмиды pLw107-8 удалось добиться повышения конкурентоспособности рекомбинантов по сравнению с высокоактивным родительским штаммом [36].

Приведенные примеры показывают возможность использования знаний об эволюционной генетике и молекулярной экологии РМС для развития сельскохозяйственных биотехнологий, основанных на широком использовании микробных препаратов в растениеводстве. Изучение происходящей в природе коэволюции растений и микроорганизмов дает исследователям продуктивные подходы для улучшения РМС, которое направлено на повышение эффективности взаимодействия партнеров [2].

Работа поддержана грантами РФФИ (11-04-01899а, 12-04-00409а), Президента РФ НШ-337.2012.4 и Госконтрактами с Минобрнауки РФ (16.552.11.7085, 12.740.11.0233).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Seckbach J.* Symbiosis: Mechanisms and Model System. Dordrecht, Boston, L.: Kluwer Acad. Publ., 2002. 820 p.
2. *Provorov N.A., Vorobyov N.I.* Evolutionary Genetics of Plant-Microbe Symbioses / Ed. I. Tikhonovich. N.Y.: NOVA Sci. Publ., 2010. 290 p.
3. *Tikhonovich I.A., Provorov N.A.* // Ann. Appl. Biol. 2011. V. 159. № 2. P. 155–168.
4. *Richardson D.M., Allsopp N., d'Antonio C.M., Milton S.J., Rejmanek M.* // Biol. Rev. 2000. V. 75. № 1. P. 65–93.
5. *Franche C., Lindstrom K., Elmerich C.* // Plant and Soil. 2009. V. 321. № 1. P. 35–59.
6. *Kiers E.T., West S.A., Denison R.F.* // J. Appl. Ecol. 2002. V. 39. № 5. P. 745–754.
7. *Seguin P., Graham P.H., Sheaffer C.C., Ehlke N.J., Russele M.P.* // Canad. J. Microbiol. 2001. V. 47. № 1. P. 81–85.
8. *Проворов Н.А., Воробьев Н.И.* // Генетика. 1998. Т. 34. № 12. С. 1712–1719.
9. *Laguerre G., Nour S.M., Macheret V., Sanjuan J., Drouin P., Amarger N.* // Microbiology. 2001. V. 147. № 6. P. 981–993.
10. *Brom S., Girard L., Garcia de los Santos A., Sanjuan-Pinilla J.M., Olivares J., Sanjuan J.* // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 12. P. 2555–2561.
11. *Sullivan J.T., Trzebiatowski J.R., Cruickshank R.W., Gouzy J., Brown S.D., Elliot R.M., Fleetwood D.J., McCalum N.G., Rossbach U., Stuart G.S., Weaver J.E., Webby R.J., de Bruijn F., Ronson C.* // J. Bacteriol. 2002. V. 184. № 14. P. 3086–3095.
12. *Sanjuan J., Herrera-Cervera J., Sanjuan-Pinilla J., Munoz S., Nogales J., Olivares J.* // Nitrogen Fixation: from Molecules to Crop Productivity / Ed. F. Pedrosa. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2000. P. 593–594.
13. *Курчак О.Н., Проворов Н.А., Ситаров Б.В.* // Генетика. 2011. Т. 47. № 4. С. 484–491.
14. *Проворов Н.А., Андронов Е.Е., Онищук О.П., Курчак О.Н., Чижевская Е.П.* // Микробиология. 2012. Т. 81. № 2. С. 244–253.
15. *Provorov N.A., Vorobyov N.I.* // Theor. Popul. Biol. 2010. V. 78. № 2. P. 259–269.
16. *Проворов Н.А., Воробьев Н.И., Тихонович И.А.* // Чарльз Дарвин и современная биология / Ред. Э.И. Колчинский. СПб.: Нестор-История, 2010. С. 470–485.
17. *Provorov N.A., Vorobyov N.I.* // Phytochem. Rev. 2009. V. 8. № 4. P. 519–534.
18. *Проворов Н.А., Воробьев Н.И.* // Усп. соврем. биол. 2010. Т. 130. № 4. С. 336–345.
19. *Dénarié J., Debelle F., Promé J.C.* // Annu. Rev. Biochem. 1996. V. 65. № 4. P. 503–535.
20. *Maillet F., Poinsot V., André O., Puech-Pages V., Haouy A., Gueunier M., Cromer L., Giraudet D., Formey D., Niebel A., Martínez E.A., Driguez H., Becard G., Dénarié J.* // Nature. 2011. V. 469. № 7328. P. 58–63.
21. *Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Felle H.H., Umehara Y., Gronlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J.* // Nature. 2003. V. 425. № 6958. P. 585–592.
22. *Smit P., Limpens E., Geurts R., Fedorova E., Dolgikh E., Gough C., Bisseling T.* // Plant Physiol. 2007. V. 145. № 2. P. 183–191.
23. *Zhukov V., Radutoiu S., Madsen L.H., Rychagova T., Ovchinnikova E., Borisov A., Tikhonovich I., Stougaard J.* // Mol. Plant-Microbe Interact. 2008. V. 21. № 8. P. 1600–1608.
24. *Madsen E.B., Antolin-Llovera M., Grossmann C., Ye J., Vieweg S., Broghammer A., Krusell L., Radutoiu S.,*

- Jensen O.N., Stougaard J., Parniske M. // *Plant J.* 2011. V. 65. № 3. P. 404–417.
25. Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Jurkiewicz A., Fukai E., Quistgaard E.M., Albrektsen A.S., James E.K., Thirup S., Stougaard J. // *EMBO J.* 2007. V. 26. № 12. P. 3923–3935.
26. Velde van de W., Zehirov G., Szatmari A., Debreczeny M., Ishihara H., Kevei Z., Farkas A., Mikulass K., Nagy A., Tiricz H., Satiat-Jeunemaître B., Alunni B., Bourge M., Kucho K., Abe M., Kereszt A., Maroti G., Uchiumi T., Kondorosi E., Mergaert P. // *Science.* 2010. V. 327. № 5969. P. 1122–1126.
27. Tikhonovich I.A., Kozhemyakov A.P., Ovtsyna A.O., Provorov N.A. // *New Approaches and Techniques in Breeding Sustainable Fodder Crops and Amenity Grasses* / Eds. N.A. Provorov, I.A. Tikhonovich, F. Veronesi. St.-Petersburg: N.I. Vavilov All-Russia Research Institute of Plant Industry Publ., 2000. P. 131–135.
28. Naumkina T. // *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications* / Eds. I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov, W.E. Newton. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. P. 174.
29. Четкова С.А., Тихонович И.А. // *Микробиология.* 1986. Т. 55. № 1. С. 143–147.
30. Ma S.W., Iyer V.N. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V. 56. № 11. P. 2206–2212.
31. Ovtsyna A.O., Rademaker G.J., Esser E., Weinman J., Lugtenberg B., Tikhonovich I.A. // *Molec. Plant-Microbe Interact.* 1999. V. 12. № 2. P. 252–258.
32. Triplett E.V. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1990. V. 56. № 1. P. 98–103.
33. Robledo E.A., Kmiecек K., Oplinger E.S., Nienhuis J., Triplett E.W. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. V. 64. № 11. P. 2630–2633.
34. Курчак О.Н., Проворов Н.А., Симаров Б.В. // *Генетика.* 2001. Т. 37. № 9. С. 1225–1232.
35. Onishchuk O.P., Sharypova L.A., Simarov B.V. // *Plant and Soil.* 1994. V. 197. № 2. P. 267–274.
36. Chizhevskaya E.P., Onishchuk O.P., Sharypova L.A., Simarov B.V. // *Biology of Plant-Microbe Interactions* / Eds. I.A. Tikhonovich, B. Lugtenberg, N. Provorov. St. Paul, St.-Petersburg: IS-MPMI, 2004. P. 549–553.

Comigration of Root Nodule Bacteria and Bean Plants to New Habitats: Coevolution Mechanisms and Practical Importance (Review)

N. A. Provorov^a, V. A. Zhukov^a, O. N. Kurchak^a, O. P. Onishchuk^a, E. E. Andronov^a, A. Yu. Borisov^a, E. P. Chizhevskaya^a, T. S. Naumkina^b, A. O. Ovtsyna^a, N. I. Vorob'yov^a, B. V. Simarov^a, and I. A. Tikhonovich^c

^a All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences, St. Petersburg, 196608 Russia
e-mail: provorov@newmail.ru

^b All-Russian Research Institute of Legumes and Groat Crops, Russian Academy of Agricultural Sciences, Orel, 303112 Russia
^c St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

Received May 17, 2012

Abstract—The review summarizes the results of studies on the comigration of tubercular bacteria and bean plants to new habitats, which is often accompanied by a decrease in the symbiosis efficiency due to a loss of the diversity of genes responsible for the interaction. This migration may lead to a rise in new symbionts as a result of gene transfers from initial symbionts to local bacteria. It was demonstrated that typically new symbionts lack an ability for N₂ fixation but are highly competitive, blocking the inoculation of bean cultures by industrial strains. The design of coadapted systems of recognition and signal interaction of partners is a perspective approach to ensure competitive advantages of efficient rhizobia strains introduced into agrocenoses, together with host plants, over inactive local strains.

УДК 581.138.1

ВЛИЯНИЕ РИЗОБИАЛЬНОЙ (*Rhizobium leguminosarum*) ИНОКУЛЯЦИИ И ИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА АКТИВНОСТЬ НАДФН-ОКСИДАЗЫ В КОРНЯХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.)

© 2013 г. А. К. Глянько, А. А. Ищенко

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033

e-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 11.05.2012 г.

Показаны изменения в функциональной активности НАДФН-оксидазы в микросомальной фракции корней этиолированных проростков гороха под влиянием ризобияльной инокуляции и ионов кальция (Ca^{2+}). Обнаружены колебания активности фермента на среде с экзогенным источником Ca^{2+} (CaCl_2 , 100 мкМ): повышение через 5 и 20 мин и снижение через 10 и 30 мин. Хелатор кальция (этиленгликоль тетрауксусная кислота, 100 мкМ) способствовал снижению активности фермента на фоне экзогенного кальция. Ризобияльная инокуляция в 3.9 раза увеличивала активность фермента через 5 мин по сравнению с контролем (без инокуляции). Активатор Ca^{2+} -каналов амиодарон (300 мкМ) и блокатор Ca^{2+} -каналов – хлорид лантана (400 мкМ), снижали активность НАДФН-оксидазы на фоне ризобияльной инокуляции до уровня контроля (без инокуляции). Делается вывод об участии Ca^{2+} и активных форм кислорода в регуляции активности мембранной НАДФН-оксидазы в корнях проростков гороха.

DOI: 10.7868/S0555109913030082

Мутуалистический симбиоз между клубеньковыми бактериями (*Rhizobium leguminosarum*) и бобовыми растениями (*Leguminosae*) – уникальное биологическое явление, изучение теоретических основ которого важно в практическом аспекте для получения высоких урожаев бобовых растений, повышения азотного плодородия почв, сохранения экологической стабильности почвенной среды. В отличие от патогенеза, бобово-ризобияльный симбиоз – полезное для обоих организмов сожительство. Проникая в клетки растения, клубеньковые бактерии способствуют формированию “эндоэкологической ниши” в виде корневых клубеньков, в которых ризобии фиксируют атмосферный азот (N_2) за счет энергетических ресурсов растения-хозяина, давая растению взамен усвояемый им минеральный азот (NH_3).

Формирование бобово-ризобияльного симбиоза требует успешного инфицирования корней бобовых растений ризобиями (микросимбионт) и образования симбиотических структур. Это сложные постепенно развивающиеся процессы, осуществляемые клубеньковыми бактериями под контролем растения-хозяина (макросимбионт) [1, 2].

Необходимым условием для инфицирования и образования клубеньков (нодуляция) бобовых растений является прикрепление ризобий к кончику корневого волоска. У адсорбированных на поверхности корня бактерий под влиянием специфических для ризобий растительных флавоно-

идов (дайдзеин, апигенин, лютеолин и др.) инициируется экспрессия *Nod*-генов, конечными продуктами которых являются бактериальные сигнальные молекулы – липохитоолигосахариды – *Nod*-факторы (NF). Эти сигналы воспринимаются эпидермальными клетками корня, на плазмалемме которых локализованы рецепторы NF – рецептор-подобные киназы (receptor-like kinases, RLK): LysM RLK и LRR (leucine rich repeat) RLK. Первая из них содержит внеклеточные лизиновые мотивы, вторая (LRR) – богата лейциновыми повторами [3]. Наличие двух (или более) рецепторов в эпидермальных клетках объясняется, вероятно, их разной ролью в инициации включения сигнальных путей, ведущих к инфицированию растения ризобиями и образованию корневых клубеньков [4, 5]. Молекулярное взаимодействие NF и RLK включает определенные ответы макросимбионта, такие, как ионные изменения, защелачивание цитоплазмы, колебания концентрации Ca^{2+} и экспрессия генов, которые приводят к бактериальной инвазии и формированию клубенька [6, 7]. В первые минуты после воздействия на клетки корня очищенного NF или ризобий наблюдается быстрый транспорт ионов кальция в цитоплазму через плазмалемму, что сопровождается деполяризацией мембраны и оттоком ионов хлора и калия из цитоплазмы во внеклеточное пространство корневых волосков. Колебания в концентрации цитозольного Ca^{2+} наблюдаются спустя 10–15 мин после индукции потока

кальция в цитоплазму [8]. Подобные изменения в концентрации Ca^{2+} вызывают (с участием активированной Ca^{2+} -кальмодулинзависимой киназы) фосфорилирование белков — транскрипционных факторов, дальнейшую трансдукцию NF-сигнала и экспрессию ядерных симбиотических генов [9]. Таким образом, этим самым Ca^{2+} -сигнальная система участвует в рецепции симбиотических сигналов на самых ранних стадиях взаимодействия симбионтов.

Кроме ионов Ca^{2+} сигнальную роль на ранних этапах симбиоза играют активные формы кислорода (АФК), такие, как супероксидный анион-радикал (O_2^-), пероксид водорода (H_2O_2) и др. Показано, что АФК активируют Ca^{2+} -каналы, которые являются сигнальным механизмом, ведущим к полярному росту корневого волоска [10]. Многочисленные исследования по вовлечению АФК в систему сигнализации растений также подтверждают участие Ca^{2+} в этих процессах [11–13].

Одним из важных источников генерации АФК в растениях является НАДФН-оксидазная ферментная система, локализованная на плазматической мембране клетки. Ингибирование активности НАДФН-оксидазы ведет не только к уменьшению генерации АФК, но и к торможению образования инфекционных нитей при симбиотических взаимоотношениях люцерны и *Sinorhizobium meliloti* [14, 15]. Необходимо отметить, что усиление Ca^{2+} -сигнала происходит в том числе и за счет его взаимодействия с различными белками, которые после этого способны осуществлять ионный транспорт, функциональные, регуляторные и другие функции, поддерживать определенный уровень кальция в структурах и органеллах клетки.

С ферментом НАДФН-оксидазой (КФ 1.6.3.1) связывают, по крайней мере, два звена в метаболизме: генерацию АФК и потоки Ca^{2+} [16]. Предполагается, что АФК и Ca^{2+} являются основными сигнальными элементами в механизме регуляции активности мембранной НАДФН-оксидазы у растений [17]. НАДФН-оксидаза растений локализована на плазмалемме клеток корня и активируется при действии на растение абиотических и биотических стрессоров [18]. Образовавшиеся в результате активации этого фермента АФК защищают растение от патогенов путем участия в реакции сверхчувствительности клеток, системной приобретенной и индуцированной устойчивости, в укреплении клеточной стенки как механического барьера на пути инфекции [19]. Роль АФК при мутуалистических взаимодействиях неоднозначна: с одной стороны, они способствуют развитию бобово-ризобиального симбиоза; с другой — выполняют защитную роль как сигнальные и цитотоксические соединения [20].

В отличие от патогенного воздействия на растения, роль НАДФН-оксидазы и связанного с ее функциональной активностью кальция в мутуалистических взаимодействиях до конца не ясна. В частности, нерешенным остается вопрос о механизмах регуляции НАДФН-оксидазы растений. Как уже отмечалось, важную роль в этом механизме может играть Ca^{2+} [16]. Этим растительная НАДФН-оксидаза отличается от животной, поскольку содержит на цитозольном N-терминальном участке Ca^{2+} -связывающие мотивы (EF-рука) [17]. Это обеспечивает непосредственное стимулирование активности фермента с помощью ионов кальция, выход которых из внеклеточного пространства в цитоплазму инициируется экзогенными и эндогенными факторами.

Цель работы — изучение влияния ионов Ca^{2+} на функциональную активность НАДФН-оксидазы в корнях этиолированных проростков гороха и влияние клубеньковых бактерий на этот процесс.

МЕТОДИКА

Объектом исследований служили проростки гороха посевного (*Pisum sativum* L.), сорт Ямальский, выращенные в пластмассовых кюветах на влажной фильтровальной бумаге при 22°C . Для поддержания заданной температуры с точностью до $\pm 0.5^\circ\text{C}$ использовали электрический термостат с водяной рубашкой ЗЦ-1125М (Россия). Перед замачиванием семена трижды промывали теплой проточной водой с мылом и обеззараживали 3%-ным раствором H_2O_2 в течение 15 мин. Затем семена заливали дистиллированной водой (60°C) и помещали в термостат для набухания при 22°C на 3–4 ч. После этого семена перекладывали в кювету на влажную фильтровальную бумагу и проращивали при 22°C в течение 48 ч. Полученные таким образом исходные растения использовали для дальнейшей работы, для чего выбирали проростки с одинаковыми размерами корней. В экспериментах использовали 48-часовые проростки гороха, которые в зависимости от варианта опыта инокулировали клубеньковыми бактериями *Rhizobium leguminosarum* bv *viceae*, эффективного производственного штамма 1060 в концентрации 2×10^8 кл./мл (1 мл/проросток). Штамм получен из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии РАСХН (Санкт-Петербург, Россия). Контрольным вариантом служили неинокулированные ризобиями проростки, выращенные на дистиллированной воде.

Проростки инкубировали на растворах изучаемых соединений в течение 5, 10, 20 и 30 мин. В исследованиях применяли экзогенный кальций (100 мкМ CaCl_2), а интенсивность потока в клетках эндогенного кальция изменяли путем дей-

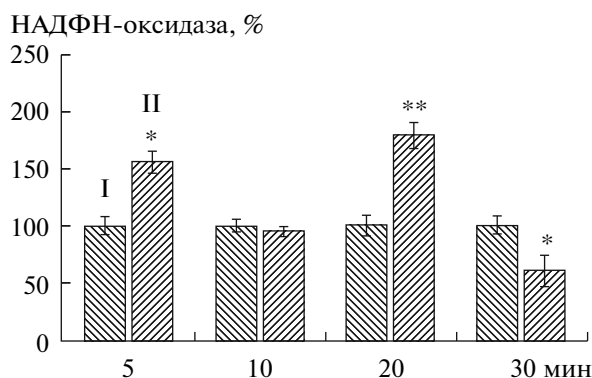


Рис. 1. Динамика активности НАДФН-оксидазы корневых проростков гороха на фоне экзогенного источника кальция. I – контроль, II – 100 мкМ CaCl₂.

На рис. 1, 2 и 3: * – достоверно при $P \geq 0.95$, ** – при $P \geq 0.99$.

ствия на проростки активатора кальциевых каналов амиодарона (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 300 мкМ и блокатора кальциевых каналов хлорида лантана в концентрации 400 мкМ. В качестве хелатора ионов кальция использовали 100 мкМ раствор этиленгликоль тетрауксусной кислоты (ЭГТА) (“Sigma-Aldrich”, США).

Активность НАДФН-оксидазы измеряли в микросомальной клеточной фракции корней, полученной методом дифференциального центрифугирования. Для этого корни отмывали дистиллированной водой, взвешивали и гомогенизировали в предварительно охлажденной ступке в буферном растворе (50 мМ HEPES-КОН, pH 7.8), содержащем 250 мМ сахарозу и 0.1 мМ ЭДТА [23]. Далее гомогенат фильтровали через капроновую ткань и центрифугировали при 600 г в течение 15 мин для осаждения тяжелых органелл и компонентов клетки. Надосадочную жидкость центрифугировали при 42000 g в течение 20 мин для осаждения митохондрий. Полученный супернатант вновь центрифугировали при 140000 g в течение 1 ч. Микросомальную клеточную фракцию выделяли с помощью дифференциального центрифугирования на препаративной центрифуге “Sorvall Discovery 90SE” (“Hitachi”, Япония-США). Супернатант, содержащий цитозольную фракцию, отделяли, осадок (микросомальная фракция, включающая в себя плазмалемму, тонопласт, мембраны аппарата Гольджи и эндоплазматический ретикулум) суспендировали в том же буфере, который использовали для гомогенизации корней.

В полученной таким образом микросомальной фракции определяли НАДФН-оксидазную активность. Для этого к реакционной среде, состоящей из 0.8 мл буферного раствора (50 мМ HEPES-КОН, pH 7.8), 0.1 мМ ЭДТА и 1.0 мкМ KCN до-

бавляли 0.2 мл пробы и инкубировали 1 мин при 30°C. Реакцию инициировали добавлением 100 мкМ НАДФН. Скорость окисления регистрировали на спектрофотометре Specord S-100 (“Analytik Jena”, Германия) по уменьшению в адсорбции при $\lambda = 340$ нм (A_{340}) в течение 5 мин и рассчитывали с коэффициентом экстинкции $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Активность фермента выражали в нмоль/мин · мг белка. Содержание белка в ферментном препарате определяли с красителем амидо-черным [21]. Средние значения и их стандартные ошибки вычислены из трех независимых экспериментов, каждый из которых состоял из трех повторений. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментами было установлено, что на фоне экзогенного источника кальция (CaCl₂, 100 мкМ) наблюдались колебания в активности НАДФН-оксидазы (рис. 1). Так, активность фермента значительно повышалась через 5 и 20 мин (на 56 и 80% соответственно), а через 10 и 30 мин, наоборот, снижалась: в первом случае до уровня контроля, во втором – на 40% ниже контрольного уровня. Эти данные, очевидно, свидетельствуют о наличии в растительных клетках механизма, регулирующего активность НАДФН-оксидазы путем изменения концентрации ионов кальция. При этом первая фаза связана с притоком Ca²⁺ в цитоплазму и вызывает активацию фермента, а вторая – обусловлена накоплением Ca²⁺ в цитоплазме и ведет к снижению активности фермента. Возможные механизмы влияния кальция на активность НАДФН-оксидазы описаны в статьях [19, 22]. Так, по мнению Уонг с соавт. [22], основным фактором, модулирующим активность НАДФН-оксидазного ферментного комплекса, является концентрация Ca²⁺ в цитоплазме растительной клетки, регулирующей взаимодействие между субъединицами фермента – цитозольной Рас-ГТФазы и мембранной субъединицей gp91phox, гомологичной субъединице НАДФН-оксидазы (NOX2) из животных клеток. Однако, по данным Саги и Флюр [19], растительная НАДФН-оксидаза может продуцировать O₂⁻ и в отсутствие цитозольного компонента Рас-ГТФазы.

Таким образом, увеличение образования АФК при активации НАДФН-оксидазы может вызывать вторую фазу накопления кальция в цитоплазме в результате стимулирования открытия Ca²⁺-каналов на плазматической мембране, а это является причиной ингибирования активности фермента.

Присутствие в среде экзогенного Ca²⁺ усиливало при экспозиции в течение 20 мин актив-

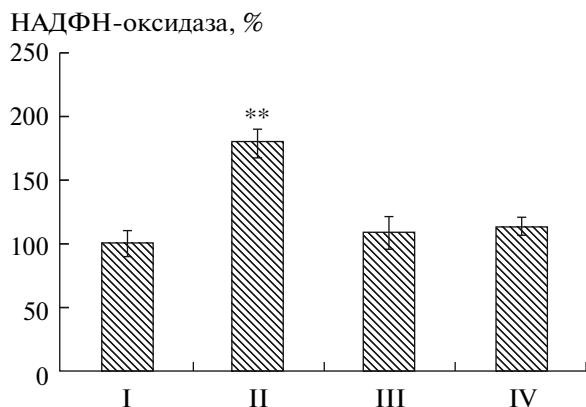


Рис. 2. Влияние хелатора кальция (ЭГТА) на активность НАДФН-оксидазы корней проростков гороха на фоне экзогенного источника кальция (CaCl_2) при времени экспозиции 20 мин. I – контроль (H_2O), II – 100 мкМ CaCl_2 , III – 100 мкМ ЭГТА, IV – 100 мкМ CaCl_2 + 100 мкМ ЭГТА.

ность фермента на 80% по сравнению с контролем (рис. 2). Добавление в среду с CaCl_2 хелатора кальция – ЭГТА, приводило к снижению активности изучаемого фермента до уровня контроля при экспозиции 20 мин. При этом сама ЭГТА при той же экспозиции не вызывала достоверных изменений в активности НАДФН-оксидазы по сравнению с контролем. Таким образом, связывание кальция хелатором ведет к снижению активности фермента, что свидетельствует о вовлечении кальция в регуляцию активности его в корнях проростков гороха. В этих вариантах действие Ca^{2+} проявляется как в увеличении, так и в снижении активности НАДФН-оксидазы, что может быть связано с регуляцией уровня АФК в клетке.

Цель последующих экспериментов – изучение влияния ризобиальной инокуляции на активность НАДФН-оксидазы. Из полученных данных (рис. 3) следует, что инокуляция проростков клубеньковыми бактериями приводила через 5 мин к увеличению активности фермента в 3.9 раза по сравнению с контролем (без инокуляции). Возможный механизм активации фермента может быть также связан с Ca^{2+} -гомеостазом. По данным Шоу и Лонг [8], спустя 1–5 мин после ризобиальной инфекции наблюдается быстрый приток ионов кальция в цитоплазму. Предполагается, что цитозольные потоки кальция активируют Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы, которые фосфорилируют N-терминальный участок НАДФН-оксидазы и тем самым активируют фермент [23]. Влияние ризобий на Ca^{2+} -каналы, очевидно, обусловлено взаимодействием бактериального NF и растительного рецептора (*LysM RLK*), что ведет к открыванию Ca^{2+} -каналов и усилению притока кальция в цитоплазму. Считают, что кальций и кальмодулинзависимая киназа являются ключе-

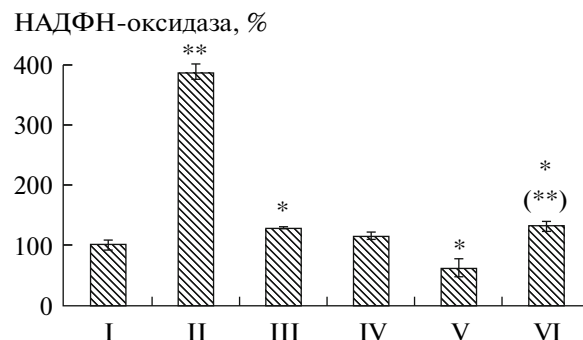


Рис. 3. Влияние ризобиальной инокуляции, амиодарона (АМД) и хлорида лантана (LaCl_3) на активность НАДФН-оксидазы корней проростков гороха, экспозиция 5 мин. I – контроль (H_2O), II – инокуляция, III – 300 мкМ АМД, IV – 300 мкМ АМД + инокуляция, V – 400 мкМ LaCl_3 , VI – 400 мкМ LaCl_3 + инокуляция.

В скобках указана достоверность по сравнению с вариантом “инокуляция”.

выми медиаторами симбиотического взаимодействия [24].

Чтобы проверить предположение об активации НАДФН-оксидазы ризобиальной инфекцией через ее влияние на поток Ca^{2+} из внеклеточного пространства в цитоплазму, были проведены опыты с амиодароном – активатором Ca^{2+} -каналов в дрожжевых клетках [25] и блокатором каналов – хлоридом лантана [26]. Представленные на рис. 3 данные свидетельствуют о том, что амиодарон в применяемой концентрации сам по себе стимулирует активность фермента на 30% по сравнению с контролем, а в сочетании с ризобиальной инокуляцией снимает стимулирующее влияние ризобий на активность фермента до уровня контроля, уменьшая его активность в 3.4 раза. Таким образом, стимуляция активности НАДФН-оксидазы под влиянием амиодарона в концентрации 300 мкМ свидетельствует об участии ионов кальция в функционировании фермента. Снижение активности НАДФН-оксидазы под влиянием амиодарона на фоне ризобиальной инокуляции, возможно, связано с избыточным поступлением Ca^{2+} в цитозоль, вызванного активирующим действием амиодарона на Ca^{2+} -каналы.

Неселективный блокатор кальциевых каналов хлорид лантана, как и амиодарон, снимает стимулирующее влияние клубеньковых бактерий на активность фермента, что проявилось в снижении активности фермента в 2.9 раза. Однако в отличие от амиодарона снижение активности фермента в этом варианте, вероятно, связано с недостатком ионов кальция в цитоплазме для активации фермента. В варианте опыта с влиянием только одного хлорида лантана наблюдалось снижение активности НАДФН-оксидазы на 36% по сравнению с контролем (без инокуляции). Это, по-видимому,

можно объяснить недостаточным количеством в цитоплазме ионов кальция вследствие блокирования Ca^{2+} -каналов хлоридом лантана. Эти данные согласуются с представлением о том, что кальций играет двойную роль в клетке [27]. Так, он в зависимости от концентрации может способствовать формированию бобово-ризобияльного симбиоза или подавлять этот процесс.

В заключение следует отметить, что участие Ca^{2+} в бобово-ризобияльном симбиозе тесно связано с его взаимодействием с АФК, а также с активными формами азота (АФА) [27]. Полученные нами данные подтверждают необходимость ионов кальция для функционирования НАДФН-оксидазы – генератора O_2^- и H_2O_2 . В литературе есть также данные о потребности Ca^{2+} для функционирования растительного фермента(ов), генерирующего(их) другую сигнальную молекулу – оксид азота (NO), которая может повышать или тормозить поток Ca^{2+} в цитоплазму путем изменения проницаемости кальциевых каналов с участием сигнальных белков, подвергшихся посттрансляционной модификации NO (S-нитрозилирование, металлонитрозилирование и нитрование белков) [28, 29]. Этот механизм регуляции потоков Ca^{2+} на плазмалемме и мембранах внутриклеточных органелл с участием NO (АФА) также может быть применен для объяснения функциональной активности НАДФН-оксидазы при бобово-ризобияльном симбиозе. Участие Ca^{2+} в этих процессах очевидно, но каков механизм влияния бобово-ризобияльного симбиоза на функции кальция и каким образом кальциевый сигнал реализуется при симбиотическом взаимодействии, предстоит выяснить.

Авторы выражают благодарность Путилиной Т.Е., Галиченко В.А., Грабельных О.И. за техническую помощь при проведении экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kouchi H., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Hakoyama T., Nakagawa T., Umehara Y., Sugunuma N., Kawaguchi M. // *Plant Cell Physiol.* 2010. V. 51. № 9. P. 1381–1397.
2. Downie J.A. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. V. 34. № 2. P. 150–170.
3. Ferguson B.J., Indrasumunar A., Hayashi S., Lin Y-H., Reid D.E., Gresshoff P.M. // *J. Integr. Plant Biol.* 2010. V. 52. № 1. P. 61–76.
4. Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Felle H.H., Umehara Y., Gronlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. // *Nature.* 2003. V. 425. № 6958. P. 585–592.
5. Arrighi J.-F., Barre A., Ben Amor B., Bersoult A., Soriano L.C., Mirabella R., de Carvalho-Niebel F., Journet E.-P., Gherardi M., Huguet T., Geurts R., Denarie J., Rouge P., Gough C. // *Plant Physiol.* 2006. V. 142. № 1. P. 265–279.
6. Cardenas L., Holdaway-Clarke T.L., Sanchez F., Quinto C., Feijo J.A., Kunkel J.G., Hepler P.K. // *Plant Physiol.* 2000. V. 123. № 2. P. 443–452.
7. Oldroyd C.E.D., Downie J.A. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004. V. 5. № 7. P. 566–576.
8. Shaw S.L., Long S.R. // *Plant Physiol.* 2003. V. 131. № 3. P. 976–984.
9. Hayashi T., Banda M., Shimoda Y., Kouchi H., Hayashi M., Imaizumi-Anraku H. // *Plant J.* 2010. V. 63. № 1. P. 141–154.
10. Mori I.C., Schroeder J.I. // *Plant Physiol.* 2004. V. 135. № 2. P. 702–708.
11. Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H., Torres M.A., Linstead P., Brownlee C., Jones J.D.G., Davies J.M., Dalan L. // *Nature.* 2003. V. 422. № 6930. P. 442–446.
12. Kwak J.M., Mori I.C., Pei Z.M., Leonhardt N., Torres M.A., Dangl J.L., Bloom R.E., Jonea J.D.G., Schroeder J.I. // *EMBO J.* 2003. V. 22. № 11. P. 2623–2633.
13. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. Киев: Основа, 2010. 350 с.
14. Peleg-Grossman S., Volpin H., Levine A. // *J. Exp. Bot.* 2007. V. 58. № 7. P. 1637–1649.
15. Cardenas L., Martinez A., Sanchez F., Quinto C. // *Plant J.* 2008. V. 56. № 5. P. 802–813.
16. Sagi M., Fluhr R. // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. № 2. P. 336–340.
17. Глянько А.К., Ищенко А.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. № 5. С. 509–518.
18. Глянько А.К., Васильева Г.Г., Ищенко А.А., Миронова Н.В., Алексеенко А.Л. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. № 4. С. 479–485.
19. Sagi M., Fluhr R. // *Plant Physiol.* 2001. V. 126. № 3. P. 1281–1290.
20. Marino D., Dunand C., Puppo A., Pauly N. // *Trends Plant Sci.* 2012. V. 17. № 1. P. 9–15.
21. Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. // *Физиология растений.* 1982. Т. 29. № 1. С. 198–200.
22. Wong H.L., Pinontoan R., Hayashi K., Tabata R., Yano T., Hasegawa K., Kojima S., Yoshioka H., Iba K., Kawasaki T., Shimamoto K. // *Plant Cell.* 2007. V. 19. № 12. С. 4022–4034.
23. Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., Shimamoto K., Doke N., Yoshioka H. // *Plant Cell.* 2007. V. 19. № 3. P. 1065–1080.
24. Yano K., Yoshida S., Muller J., Singh S., Banba M., Vickers K., Markmann K., White C., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Murooka Y., Perry J., Wang T.L., Kawaguchi M., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Parnis M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 51. С. 20540–20545.
25. Courchesne W.E., Ozturk S. // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 47. № 1. P. 223–234.
26. Huetter J.E., Stack E., Wilding T.J. // *Neuropharmacology.* 1998. V. 37. № 10–11. P. 1239–1247.
27. Cerella C., Diederich L., Ghibelli L. // *Int. J. Cell Biol.* 2010. V. 2010: 546163, 15 p.
28. Васильева Г.Г., Ищенко А.А., Глянько А.К. // *Журнал стресс-физиологии и биохимии.* 2011. Т. 7. № 4. С. 398–414.
29. Courtois C., Besson A., Dahan J., Bourque S., Dobrowska G., Pugin A., Wendehenne D. // *J. Exp. Bot.* 2008. V. 59. № 2. P. 155–163.

Influence of Rhizobial (*Rhizobium leguminosarum*) Inoculation and Calcium Ions on the NADPH Oxidase Activity in Roots of Etiolated Pea (*Pisum sativum* L.) Seedlings

A. K. Glyan'ko and A. A. Ischenko

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

e-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru

Received May 11, 2012

Abstract—Changes in the functional activity of the NADPH oxidase in the microsomal fraction of roots of etiolated pea seedlings, caused by rhizobial inoculation and calcium ions (Ca^{2+}), are shown. The enzyme activity in a medium with an exogenous source of Ca^{2+} (CaCl_2 , 100 μM) fluctuated, increasing 5 to 20 min and decreasing 10 and 30 min after addition. A calcium chelator (ethylene glycol tetraacetic acid (EDTA), 100 μM) potentiated the decrease in the enzyme activity in the presence of exogenous calcium. Rhizobial inoculation caused a 3.9-fold increase in the enzyme activity 5 min after inoculation compared to the control (without inoculation). The Ca^{2+} -channel activator (amiodarone, 300 μM) and the Ca^{2+} -channel blocker (lanthanum chloride, 400 μM) reduced the NADPH oxidase activity after rhizobial inoculation compared to the control level (without inoculation). It is concluded that Ca^{2+} and reactive oxygen species are involved in the regulation of the membrane NADPH oxidase activity in roots of pea seedlings.

УДК 577.217

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ БЕЛКОВ МЕМБРАНЫ МАГНЕТОСОМ

© 2013 г. Д. С. Груздев*, **, М. В. Дзюба*, А. С. Герасимов*, Б. Б. Кузнецов*

* Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312

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

e-mail: denisgrouzdev@gmail.com

Поступила в редакцию 19.11.2012 г.

Синтезированы генетические конструкции, кодирующие мембранный белок магнитотактической бактерии *Magnetospirillum magnetotacticum* Mam12 с одним (mb), двумя доменами В и Z (mbb и mzz) белка А *Staphylococcus aureus*. Проведены экспрессия, фракционирование, очистка гибридных белков и исследована активность модифицированных белков. На основании результатов ИФА был сделан вывод, что все модифицированные белки проявляют иммуноглобулинсвязывающую активность.

DOI: 10.7868/S0555109913030094

Одним из направлений использования нанотехнологий в биологии и медицине является разработка и усовершенствование методов визуализации, идентификации и анализа биоматериала, обеспечивающих высокую степень разрешения. В качестве успешного примера внедрения таких технологий можно назвать диагностику заболеваний при помощи антител, иммобилизованных на поверхности магнитных частиц [1–3]. В настоящее время наиболее часто используемым методом иммобилизации иммуноглобулинов является химическая сшивка антител с поверхностью частиц [4]. Открытие магнитотактических бактерий, способных синтезировать магнетосомы – магнитные частицы, содержащие однодоменные кристаллы магнетита (Fe_3O_4) или греггита (Fe_3S_4), размером от 35 до 120 нм, открыло новые возможности развития данного направления [5].

Принципиальной отличительной особенностью частиц, продуцируемых магнитотактическими бактериями, является их компарментализация в липопротеиновые везикулы. Липопротеиновая мембрана является удобной платформой для экспонирования диагностических мишеней на их поверхности. Существует несколько способов модификации поверхности бактериальных магнитных наночастиц. Один из наиболее перспективных методов заключается в конструировании гибридных белков мембраны магнетосом, содержащих искусственно добавленные иммуноглобулинсвязывающие домены, к примеру, стафилококкового белка А, и последующее их встраивание в мембрану магнетосом *in vitro*. Данный подход потенциально более перспективен, чем метод химической сшивки, т.к. предполагает более строгое ориентирование антител на поверх-

ности наночастиц [6]. Для конструирования гибридных белков нами был выбран белок мембраны магнетосом магнитотактической бактерии *Magnetospirillum magnetotacticum* Mam12. В других исследованиях было показано, что белок Mam12 мембраноактивен и потенциально является эффективной якорной молекулой [7].

Цель работы – получение и исследование функциональной активности гибридных белков, состоящих из белка Mam12 мембраны магнетосом магнитотактической бактерии *M. magnetotacticum* и иммуноглобулинсвязывающих доменов белка А *Staphylococcus aureus*.

МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы и питательные среды. В работе были использованы штаммы *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 (DSM-3856) и *Staphylococcus aureus* (ВКПМ 1899), штаммы *Escherichia coli* XL-1 Blue (“Stratagene”, США) и BL21(DE3) (“Novogene”, США). Для генно-инженерных манипуляций использовали вектор pET23a(+) (“Novogene”, США), нуклеотидная последовательность, кодирующая домен Z, была синтезирована компанией “Евроген” (Россия).

Бактериальные клетки *E. coli* XL-1 Blue выращивали в питательной среде LB [8]. Экспрессию рекомбинантных белков осуществляли в питательной среде ТВ [9]. Твердую среду для выращивания одиночных колоний *E. coli* на чашках Петри получали добавлением к LB 2% агара.

Конструирование экспрессионных векторов pET23a(+)/mb, pET23a(+)/mbb, pET23a(+)/mzz. Приготовление компетентных клеток *E. coli*, трансформация клеток плазмидной ДНК, выде-

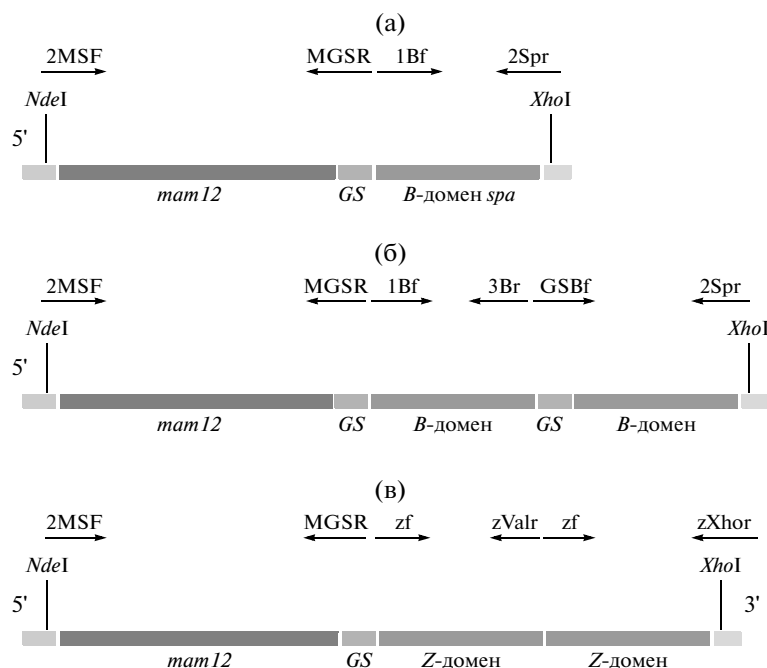


Рис. 1. Схема получения генетических конструкций mb (а), mbb (б), mzz (в).

ление плазмидной ДНК, гидролиз эндонуклеазами рестрикции, фосфорилирование, электрофорез в агарозном геле и другие стандартные манипуляции проводились в соответствии с методиками [9] и согласно рекомендациям фирм-производителей соответствующих ферментов.

Генетические конструкции mb, mbb, mzz были получены с помощью ПЦР лигазных интермедиагов (рис. 1). Амплификацию проводили с использованием разработанных праймеров (табли-

ца). Генетические конструкции гидролизовали рестриктазами NdeI и XhoI и клонировали по соответствующим сайтам в вектор pET23a(+), обеспечивающий высокий уровень конститутивной экспрессии целевого гена. Наличие гистидинового тага на С-конце гетерологично экспрессируемых белков позволяет в дальнейшем легко идентифицировать и очищать при помощи хелатирующих сорбентов. Рекомбинантными плазмидами pET23a(+)/mb, pET23a(+)/mbb, pET23a(+)/mzz (рис. 2) трансформировали клетки *E. coli* XL-1

Праймеры, использованные для проведения ПЦР

Название	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
MGSR	TCCACTTCCACTCCGGCCAGTTCGTCCCGCAAGATGT
3BR	TTTTGGTGCTTGTGCATCATTTAGC
1BF	GATAACAAATTCAACAAAGA
2MSF	GGGCATATGCCCTTTCACCTTGCCCC
2SprR	GGGCATATGCCCTTTCACCTTGCCCC
GSBf	GGAAGTGGAAGTGGAGATAACAAATTCAACAAAGAAC
T7F	TAATACGACTCACTATAGG
T7R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
GSBf	GGAAGTGGAAGTGGAGGATAACAA
zf	GACAACAAATTCAACAAAGAACAAC
zValr	TACTTTCGGCGCCTGAGCATCATT
zXhoTr	AGTCGTATTACTCGAGTACTTTCGGCGCCTGAGCATCAT

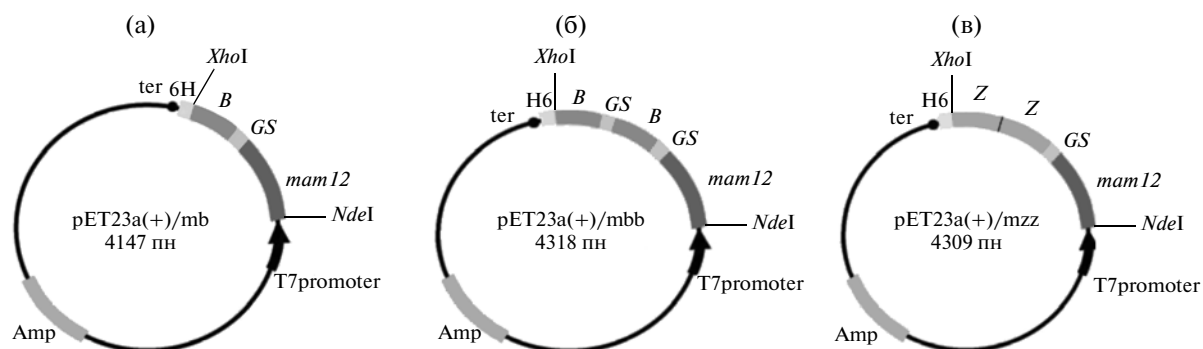


Рис. 2. Карта плазмид pET23a(+)/mb (а), pET23a(+)/mbb (б), pET23a(+)/mzz (в). Нуклеотидная последовательность, кодирующая: глицин-сериновый шарнир (GS), домен В белка А (В), домен Z (Z), H6 – гексагистидиновый таг (H6).

Blue. Клоны, несущие плазмиды с целевыми вставками, были отобраны с помощью ПЦР-скрининга и последующего секвенирования вставок с использованием набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”, США). Нуклеотидные последовательности определяли на автоматических секвенаторах ABI 3730 (“Applied Biosystems”, США).

Получение гибридных белков. Экспрессионными векторами pET23a(+)/mb, pET23a(+)/mbb, pET23a(+)/mzz трансформировали клетки *E. coli* BL21 (DE3). Экспрессию генетических конструкций проводили методом автоиндукции [9].

Анализ суммарного белка клеток *E. coli* BL21(DE3). Клетки, собранные из 1 мл среды, суспендировали в 100 мкл ТЭД-буфера (10 мМ трис-НСl, рН 6.8, 1 мМ ЭДТА, 1%-ный ДДС-Na), а затем инкубировали при 100°C в течение 5 мин. Полученный лизат анализировали при помощи электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях по Лэммли. Концентрацию белков в растворе определяли по методу, предложенному Бредфорд, исходя из калибровочной кривой для БСА.

Вестерн-блот. Для визуализации при помощи вестерн-блота разделенные гель-электрофорезом по методу Лэммли белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану “Hybond-P” (“GE Healthcare”, США) по методу [10]. Окрашивание мембраны проводили с помощью моноклональных антител к гистидинового тагу в разведении 1 : 1000 и конъюгата вторичных антител с щелочной фосфатазой в разведении 1 : 5000. Хромагенные субстраты BCIP-T и NBT (“Fermentas”, Литва) применяли согласно инструкции фирмы-изготовителя.

Фракционирование растворимых клеточных белков *E. coli*. Клетки, собранные из 1 мл среды, суспендировали в 50 мкл буфера I (100 мМ трис-НСl, рН 8.0, 0.5 М сахароза, 0.5 мМ ЭДТА). Добавляли фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) до конечной концентрации 0.1 мМ и 2.5 мкл растворенного в том же буфере лизоцима (2 мг/мл).

Инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин, добавляли 100 мкл буфера I и 100 мкл воды, перемешивали и инкубировали 10 мин. Добавляли равный объем водного раствора Triton X-100 (0.2%) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Клеточную суспензию трижды замораживали при –20°C и размораживали при комнатной температуре. Центрифугировали при 12000 g в течение 3 мин. Супернатант представлял собой фракцию растворимых белков, а осадок – фракцию нерастворимых белков. Осадок ресуспендировали в 100 мкл лизирующего буфера с добавлением Triton X-100 до конечной концентрации 0.1%.

С целью получения препарата мембранной фракции 150 мл ночной культуры центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. Клетки суспендировали в 15 мл буфера I, добавляли 3 мл лизоцима (2 мг/мл), растворенного в том же буфере. Суспензию инкубировали при комнатной температуре 30 мин, после чего добавляли 135 мл буфера I, 150 мкл 0.1 мМ ФМСФ, 300 мкл 0.5 М ЭДТА. Обрабатывали образец ультразвуком на приборе Sonopuls UW2070 (“Vandelin”, Германия) с частотой 20 кГц, в течение 10 мин. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием при 6000 g в течение 30 мин. Мембранную фракцию осаждали центрифугированием супернатанта при 100000 g в течение 2 ч при +4°C.

Очистка гибридных белков. Очистка гибридных белков была осуществлена с помощью металлохелатной аффинной хроматографии (МХАХ). Полученный препарат мембранной фракции суспендировали в буфере А (20 мМ трис-НСl, рН 8.0, 500 мМ NaCl, 5%-ный глицерин, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 10 мМ имидазол, 2 мМ ФМСФ, 1.5%-ный лаурил саркозин) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Солубилизованную мембранную фракцию наносили на сорбент “Ni-NTA agarose” (“Invitrogen”, США), предварительно уравновешенный буфе-

ром А. Далее осуществляли промывку сначала буфером А (не менее 3 объемов сорбента), а затем 3 объемами сорбента буфером В (20 мМ трис-НСl, рН 8.0, 1 М NaCl, 5%-ный глицерин, 5 мМ имидазол, 1%-ный лаурил саркозин). Элюцию целевого белка проводили буфером С (20 мМ трис-НСl, рН 7.5, 130 мМ NaCl, 5%-ный глицерин, 500 мМ имидазол, 0.5%-ный лаурил саркозин). Элюат диализовали против буфера 20 мМ трис-НСl, рН 7.5, 50 мМ NaCl, 10%-ный глицерин, 14.6 мМ лаурилсаркозин в течение ночи при +4°C.

Иммуноферментный анализ. Способность связывания модифицированных белков с антителами определяли с помощью ИФА. В лунках сорбировали 1 мг инсулина человека в течение ночи при +4°C. Остаточную сорбцию блокировали 1.5%-ным раствором БСА в твин-фосфатном буфере (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1.8 мМ KH₂PO₄, 0.01%-ный NaN₃, 0.05%-ный твин 20) в течение 1 ч. Далее добавляли 0.1 мкг моноклональных антител мыши против инсулина человека (“Имтек”, Россия) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Лунки отмывали 4 раза твин-фосфатным буфером, после чего наносили с заданными разведениями гибридные белки и инкубировали в течение 1 ч. После аналогичной отмывки в течение 1 ч инкубировали 0.1 мкг антител мыши против гистидинового тага (“Имтек”, Россия); система детекции – пероксид водорода/пероксидаза хрена, хромогенный субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (“Sigma”, США). В качестве отрицательного контроля использовали полипептид, несущий гистидиновый таг на С-конце.

Специфичность взаимодействия определяли путем вычисления константы диссоциации комплекса гибридного белка с антителом, согласно [11]. В условиях данного эксперимента в каждую лунку наносили по 1 мкг гибридного белка. После блокирования поверхности лунки, добавляли антитела кролика к Fc-фрагменту иммуноглобулина G мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена в заданных разведениях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проектирование и сборка генетических конструкций. Было осуществлено проектирование трех генетических конструкций – mb, mbb и mzz. В состав всех конструкций входила нуклеотидная последовательность, кодирующая мембранный белок Mam12 магнетосом *M. magnetotacticum*. Белок Mam12 имеет два трансмембранных домена и район между этими трансмембранными доменами, который находится внутри магнетосомальных везикул. Короткий N-конец (11 аминокислот) и длинный C-конец (36 аминокислот), обращены в цитоплазму [4]. Ранее было показано, что

Mam12 является эффективным якорным белком, поскольку наиболее распространен в мембране магнетосом, выдерживает триптический гидролиз и способен прочно удерживаться в мембране при различных условиях [12].

Генетическая конструкция mb содержала нуклеотидную последовательность, кодирующую гибридный полипептид, в котором бактериальный белок Mam12 соединен С-концом через глицин-сериновый линкер с одним иммуноглобулинсвязывающим доменом В белка А. Генетическая конструкция Mbb два домена В, разделенные глицин-сериновым линкером, и в Mzz – с двумя доменами Z (синтетическим аналогом домена В белка А *S. aureus*) [13]. Наличие гибких глицин-сериновых линкеров помогает избежать потенциальных проблем с фолдингом гибридных белков.

Экспрессия генетических конструкций mb, mbb и mzz. В качестве штамма-хозяина *E. coli* был выбран BL21(DE3). Преимуществом штамма *E. coli* BL21(DE3) является наличие фенотипа Lon OmpT, что позволяет исключить возможность протеолитического расщепления синтезируемого рекомбинантного белка и загрязнения препарата протеазами *E. coli*. В хромосомную ДНК BL21(DE3) интегрирован ген, кодирующий T7-РНК полимеразу, что, совместно с использованием T7 промотора и T7 терминатора в плазмиде pET23a(+), обеспечивает быструю и эффективную продукцию белка в клетках *E. coli* после индукции лактозой [9].

Методом автоиндукции была проведена экспрессия полученных генетических конструкций. В результате экспрессии генетической конструкции mb на электрофореграмме (рис. 3) выявляется полоса белка с молекулярной массой ~21 кДа, конструкций mbb и mzz ~26 кДа, что соответствует расчетным массам модифицированных белков.

С целью получения максимального выхода белка в растворимой форме проводили оптимизацию температуры выращивания бактерий (37, 28 или 13°C). Гибридные белки Mb, Mbb и Mzz при температуре клеточного роста 37°C накапливались преимущественно в тельцах включения. При температуре культивирования 28 или 13°C гибридные белки были локализованы в мембранной фракции белков штамма-продуцента. Так как рост бактерий происходил значительно быстрее при 28°C, эта температура была выбрана в качестве оптимальной для экспрессии запланированных генетических конструкций.

С помощью вестерн-блот-анализа (рис. 4) с окрашиванием антителами к гистидиновому тагу, было показано, что произошла экспрессия целевых генетических конструкций.

Для определения локализации целевого белка в клетке было проведено исследование фракций

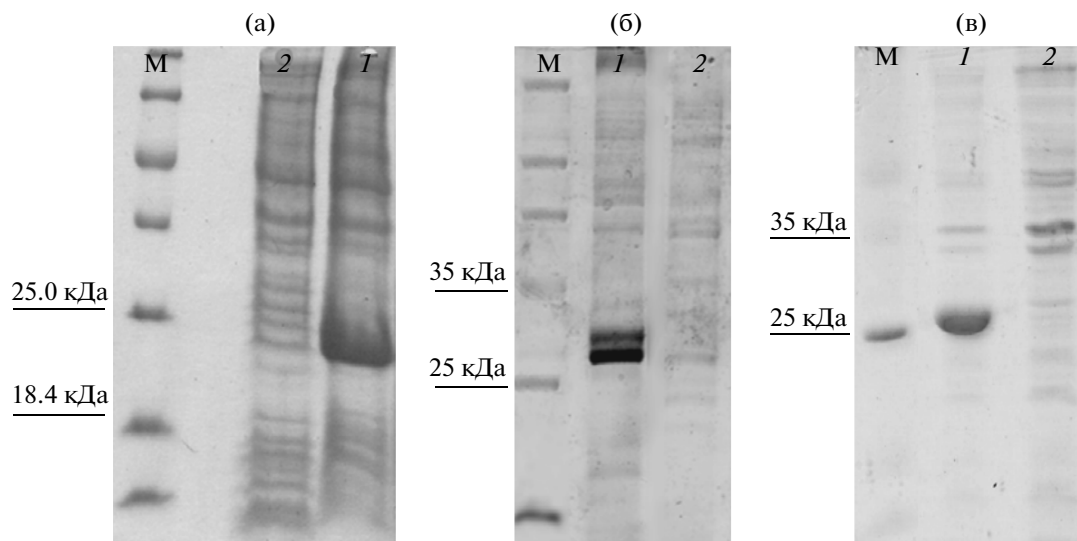


Рис. 3. Электрофоретический анализ накопления белка Mb (а), Mbb (б), Mzz (в) в клетках *E. coli* BL-21(DE3). (а) М – маркер молекулярной массы белка, лизат клеток штамма после аутоиндукции (1), лизат клеток штамма до индукции (2).

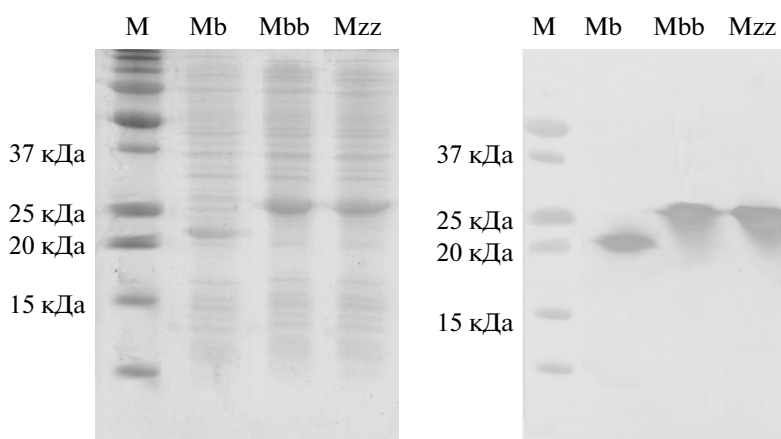


Рис. 4. Вестерн-блот-анализ экспрессии генетических конструкций.

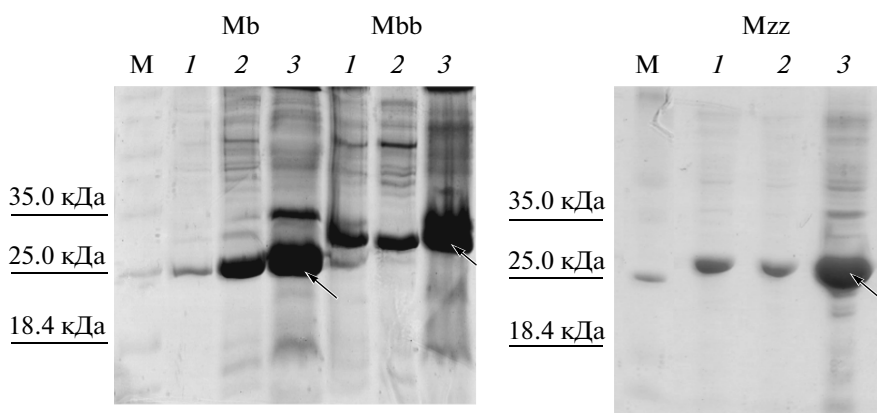


Рис. 5. Электрофоретический анализ накопления белков Mb, Mbb, Mzz в клетках *E. coli* BL-21(DE3). М – маркер молекулярной массы белка, фракции растворимых белков (1), нерастворимых белков (2), мембранных белков (3). Полосы, соответствующие целевым белкам, указаны стрелкой.

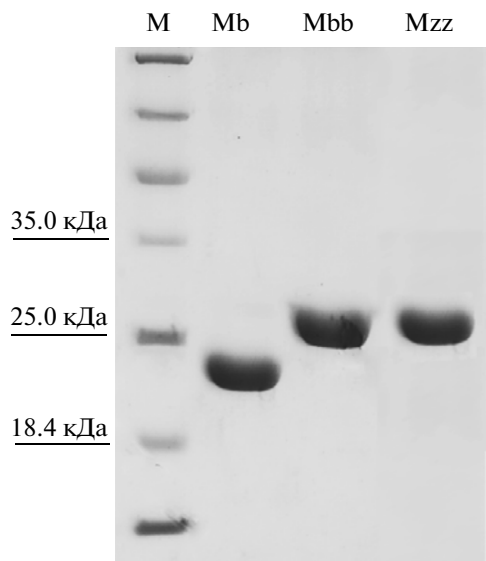


Рис. 6. Электрофоретический анализ очищенных гибридных белков с помощью МХАХ. М – маркер молекулярной массы белка.

растворимых, нерастворимых и мембранных белков клеточного лизата штамма-продуцента и показано, что гибридные белки находятся преимущественно в мембранной фракции (рис. 5).

Наличие гексагистидиновой последовательности на С-конце гибридных белков позволило одностадийно получить высокоочищенный препарат белков при помощи МХАХ (рис. 6).

Активность модифицированных белков. Для определения способности гибридных белков связывать иммуноглобулины проводили ИФА. С инсулином человека, адсорбированным на поверх-

ности лунок, связывали первичные антитела против инсулина, что обеспечивало однозначную ориентацию первичных антител. Гибридные белки, имеющие в своем составе иммуноглобулинсвязывающий домен, связывали Fc-фрагмент первичных антител. Результаты ИФА свидетельствуют о проявлении иммуноглобулинсвязывающей активности гибридными белками (рис. 7).

Для определения уровня связывания антител гибридными белками была вычислена константа аффинности комплекса гибридного белка с антителом. В результате было показано, что белки Mbb и Mzz проявляют сравнимый высокий уровень специфичности взаимодействия с антителами: $K_{aff}(Mbb) = 1.59 \pm 0.12$ нМ, $K_{aff}(Mzz) = 1.44 \pm 0.16$ нМ, тогда как константа аффинности между белком Mb и антителами существенно различалась – $K_{aff}(Mb) = 4.83 \pm 0.34$ нМ, что свидетельствует о более низком уровне специфичности взаимодействия.

На основании результатов ИФА был сделан вывод, что все модифицированные белки проявляют иммуноглобулинсвязывающую активность. Белки Mbb и Mzz связывали большее количество антител по сравнению с Mb, что подтверждает большую эффективность связывания с Fc-фрагментом антител двойного В домена и его синтетического аналога домена Z по сравнению с одинарным. Полученные данные позволяют сделать вывод, что гибридные белки пригодны для модификации бактериальных магнетосом *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта Минобрнауки РФ 16.512.11.2128 на оборудовании АЦКП “Биоинженерия” в рамках ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития

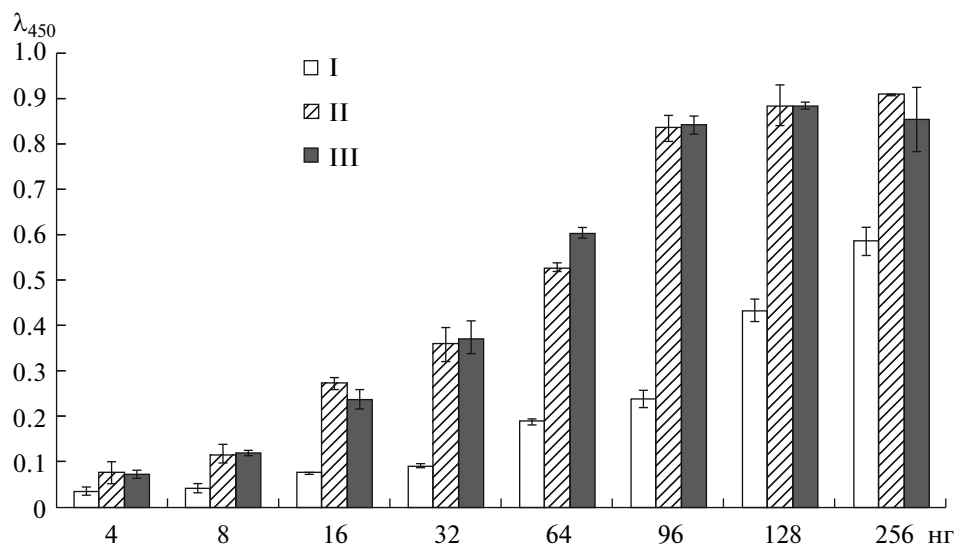


Рис. 7. Уровень связывания антител гибридными белками: Mb (I), Mbb (II), Mzz (III).

научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu X., Dai Q., Austin L. // J. Amer. Chem. Soc. 2008. V. 130. № 9. P. 2780–2782.
2. Yang J., Lee C.-H., Seo S., Lim E.-K., Song Y., Suh J.-S., Yoon H.-G., Huh Y.-M., Haam S. // J. Mater. Chem. 2007. № 17. P. 2695–2699.
3. Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Elst L.V., Muller R.N. // Chem. Rev. 2008. V. 108. № 6. P. 2064–2110.
4. Scheffel A., Gärdes A., Grünberg K., Wanner G., Schüler D. // J. Bacteriol. 2008. V. 190. № 1. P. 377–386.
5. Faivre D., Schuler D. // Chem. Rev. 2008. V. 108. № 11. P. 4875–4898.
6. Matsunaga T., Togo H., Kikuchi T., Tanaka T. // Biotechnol. Bioeng. 2000. V. 70. № 6. P. 704–709.
7. Taoka A., Asada R., Sasaki H., Anzawa K., Wu L.F., Fukumori Y. // J. Bacteriol. 2006. V. 188. № 11. P. 3805–3812.
8. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 545 p.
9. Studier F.W. // Protein Expression and Purification. 2005. № 41. P. 207–234.
10. Towbin H., Strahelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979. V. 76. № 9. P. 4350–4354.
11. Loomans E.M.G., Roelen A.J.M., Van Damme H.S., Bloemers H.P.J., Gribau T.C.J., Schielen W.J.C. // J. Immunol. Methods. 1995. V. 184. № 2. P. 207–217.
12. Grünberg K., Muller E.C., Otto A., Reszka R., Linder D., Kube M., Reinhardt R., Schüler D. // Appl. Environ. Microb. 2004. V. 70. № 2. P. 1040–1050.
13. Nilsson B., Moks T., Jansson B., Abrahmsén L., Elmlad A., Holmgren E., Henrichson C., Jones T.A., Uhlén M. // Protein Eng. 1987. № 1. P. 107–113.

Production of Modified Magnetosome Membrane Proteins and Analysis of Their Activity

D. S. Gruzdev^{a, b}, M. V. Dzyuba^a, A. S. Gerasimov^a, and B. B. Kuznetsov^a

^a Bioinzheneriya Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

e-mail: denisgrouzdev@gmail.com

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

Received November 19, 2012

Abstract—Genetic constructs coding for the fusion of the Mam12 membrane protein from the magnetotactic bacteria *Magnetospirillum magnetotacticum* with one B-domain (mb) or two B or Z domains (mbb and mzz, respectively) of *Staphylococcus aureus* protein A have been synthesized. Expression, fractionation, and purification of fusion proteins have been performed, and the activity of the modified proteins has been characterized. ELISA results showed that all modified proteins displayed immunoglobulin-binding activity.

UDC 577.15:576.80

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NITROREDUCTASE FROM RED ALKALIPHILIC BACTERIUM *Aquiflexum* sp. DL6

© 2013 S. A. Misal, V. D. Bajoria, D. P. Lingojar, and K. R. Gawai

Biochemistry Division, Department of Chemistry, University of Pune, Pune 411 007, India

e-mail: krgawai@chem.unipune.ac.in

Received March 29, 2012

Nitroaromatic compounds are toxic to living organisms. Most of them exhibit human mutagenic and carcinogenic potential. Biotransformation and bioremediation processes can convert these compounds into non-toxic compounds. Acclimatization of bacterial strain *Aquiflexum* sp. DL6 with nitro-aromatics resulted in significant induction of nitroreductase (EC 1.5.1.34). The enzyme was purified by the combination of DEAE-cellulose and Sephadex G-100 column chromatography with 80-fold purification and 22% yield. Molecular weight of purified nitroreductase was estimated to be 29 kDa by SDS-PAGE. The enzyme characteristics were explored by varying the pH and temperatures, and the optimum activity was found at pH 9.5 and 40°C. It was revealed that the substrate specificity of nitroreductase of *Aquiflexum* sp. DL6 was wide for the most of the tested nitro-aromatic compounds. The kinetic parameters like Michaelis constant and velocity maxima were determined with o-nitrophenol and NADH as substrates.

DOI: 10.7868/S0555109913030124

Nitro-aromatics compounds are found as potential environmental pollutants representing their wide use as explosives, pesticides, dyes, polyurethane foams, pharmaceuticals and plastics, etc. [1–5]. They are stable and persistent in the environment and toxic to living organisms. Its exposure poses many health hazards by affecting reproductive and central nervous systems, heart and liver, many eventually leading to death [6–9]. Moreover, its reduced intermediates also exhibit mutagenic and carcinogenic potentials in humans [2, 3, 10–11].

Most reports suggested the physico-chemical methods for removal of nitroaromatic compounds from waste water. Use of microorganisms for removal of these compounds is the best and cost effective approach [12]. Microorganisms can transform the nitro aromatic compounds by reducing the aromatic ring by means of the monooxygenase and dioxygenase enzyme. Monooxygenase and dioxygenase insert a single oxygen atom or two hydroxyl groups into the aromatic ring, respectively, which lead to an elimination of nitro group. In addition, nitroreductase is able to carry out the reduction of the nitro group to the corresponding amino derivatives [13].

In biotransformation, enzymes which catalyze the reduction of nitro aromatic compounds are termed as nitroreductases. The sensitivity of a particular nitroreductase towards oxygen has been used to classify these enzymes into oxygen-sensitive and insensitive type. The mechanism underlying the observed oxygen sensitivity of certain nitroreductases was found to involve the re-oxidation of the one-electron reduced nitroanion radical to the parent compound with the con-

comitant formation of superoxide [14] while, the oxygen-insensitive enzymes catalyze an obligatory two-electron reduction of this substrate [15–17].

More recently, studies have discovered partial reduction of the nitro group to a hydroxyl amino derivative which eventually releases nitrogen as ammonia. The reductive pathway requires one mole of an oxygen and one mole of NADH to convert nitro aromatic compound to important metabolic intermediates and release ammonia [4, 5, 13].

Alkaliphiles are the microorganisms that grow optimally at pH above 9.0 but cannot or slowly grow near neutral pH values. Differences between internal and environmental pH across the plasma membrane of the cell lead to rapid transportation of ions and substances. Accordingly, the cell keeps the intracellular pH in the range between 7.0 and 8.5 in order to thrive in alkaline environments [18–20]. Various enzymes isolated and well characterized from alkaliphiles were azoreductase, pullulanases, alkaline amylases and cellulases, xylanases and pectinases, etc. [21–23].

However, a thorough exploration of the biochemical and kinetic properties of nitroreductase purified from alkaliphiles has not been well focused in the literature. The aim of the study was to purify and carry out of preliminary characterization of a nitroreductase from red alkaliphilic bacterium *Aquiflexum* sp. DL6.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Nutrient agar, EDTA, DTT, NADH and nitro compounds were obtained from SRL (India). DEAE-cellulose and Sephadex G-100 were pur-

chased from Sigma, (USA) and Pharmacia Fine Chemicals (Sweden), respectively. All other chemicals were of the highest grade of purity and commercially available.

Microorganism and growth conditions. The *Aquiflexum* sp. DL6 strain was collected from alkaline Crater Lake of Lonar (India). Isolation of pure strain of a microorganism was done by serial dilution and plate methods. The *Aquiflexum* sp. DL6 bacterial strain was identified by 16S rRNA method described earlier [23] (data not shown). The sequence of the 16S rRNA gene of the strain *Aquiflexum* sp. DL6 is available on NCBI database (GenBank ID: JF812063).

Aquiflexum sp. DL6 bacterial strain was grown in the cultivation medium containing (g/l): yeast extract – 5.0, peptone – 5.0 and sodium chloride – 5.0 with trace elements (mg/l): KH_2PO_4 – 300, Na_2HPO_4 – 980 and MgSO_4 – 10. The pH was adjusted to 9.0. Flasks containing 100 ml of a medium were inoculated with 5 ml of microorganism suspension and incubated at 37°C. After sufficient growth for 24 h, nitro compounds were added from the stock solutions, with final concentration 1 g/l.

Crude extract preparation. After 24 h incubation, the bacterial cells were harvested by centrifugation at 10,000 × g for 10 min at 4°C, washed with physiological saline (0.85% NaCl) and thrice with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4). The pellet was suspended in 50 ml of the same buffer containing 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM lysozyme and 20% glycerol (v/v). Cells were disrupted at 4°C by sonication for 30 seconds, 6 times with 70% outputs using a Sartorius labsonic (Germany). Cell debris was removed by centrifugation at 10,000 × g for 15 min at 4°C. The supernatant obtained constituted the crude bacterial extract and was used for further studies.

Estimation of protein. Concentration of protein at each step of purification was checked by Lowry's method using BSA as a standard. Protein concentration in the chromatographic fractions was monitored by measuring absorbance at 280 nm.

Assay of nitroreductase activity. The activity of nitroreductase was determined spectrophotometrically at 37°C using a UV-visible spectrophotometer, Jasco V 630 (Japan) by monitoring a decrease of OD_{410} based on the procedure described by Bryant et al. with slight modifications [15]. The reaction mixture 3 ml contained 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4), 1 mM NADH and 0.2 mM substrate o-nitrophenol (ONP) and 100 µl of enzyme solution. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to reduce 1 mM of ONP per min. All experiments were performed at least in triplicates.

Purification of nitroreductase from *Aquiflexum* sp. DL6. The bacterial culture of *Aquiflexum* sp. DL6 was incubated with various nitro compounds for the specific induction of nitroreductase enzyme. After the ac-

climatization for 72 h at 37°C for various nitro compounds, nitroreductase was isolated and purified with the combination of following procedures at 4°C.

Ammonium sulfate precipitation. Solid ammonium sulfate was added with constant stirring to the crude extract over a period of 12 h at 4°C to get 40% of the salt saturation. The resulting precipitate was separated by centrifugation at 4°C and 15,000 × g for 20 min and the supernatant saturated up to 80% with solid ammonium sulfate. The resulting precipitate was collected and dissolved in a minimal volume of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The protein solution was dialyzed against the same buffer at 4°C for 24 h.

Ion-exchange chromatography. After dialysis, the solution was loaded on pre-equilibrated DEAE-cellulose column (2 × 30 cm) with equilibrating buffer 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The protein was eluted with a linear gradient of NaCl (0–500 mM) in the same buffer. Fractions of 5 ml were collected, those fractions showed higher nitroreductase activity were pooled and reverse dialyzed against solid sucrose at 4°C to reduce the volume.

Molecular exclusion chromatography. The reverse dialyzed enzyme preparation was applied to a Sephadex G-100 column (2 × 30 cm) equilibrated with 2 bed volumes of equilibrating buffer. The enzyme was eluted by the same buffer at a flow rate of 6 ml/h. Fractions of 3 ml were collected and those that showed higher nitroreductase activity were pooled and reverse dialyzed against solid sucrose at 4°C to concentrate the protein.

Characterization of purified nitroreductase from *Aquiflexum* sp. DL6. SDS-PAGE was made with 4.5% stacking and 10% resolving polyacrylamide gels as described by Laemmli [24]. Electrophoresis was performed with at least 20 µg of protein samples per well and 20 µg of protein molecular weight markers in a Bangalore Genei Midi Vertical Unit (India) at constant voltage of 100 V for 1 h. To check the homogeneity of nitroreductase, native PAGE was performed without SDS according to the method of Laemmli. Protein molecular mass standards (Bio Lit, India) were used. Gels were stained for proteins with silver [25].

Determination of optimal pH and temperature of purified nitroreductase. The influence of pH on the nitroreductase activity was studied over a wide range of pH (from 3.6 to 10.7) using a mixture of different buffers adjusted to the same ionic strength 100 mM (carbonate, sodium phosphate, and sodium acetate). At each pH the enzyme was incubated with buffer for 30 min at 37°C, and residual activity was checked with UV-visible spectrophotometer.

Effect of temperature on activity of nitroreductase was studied by detecting the nitroreductase assay at temperature range from 10 to 90°C in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4).

Determination of thermal stability. The purified enzyme samples were pre-incubated with 100 mM phos-

Table 1. The purification of the *Aquiflexum* sp. DL6 nitroreductase

Purification step	Total protein, mg	Total activity, U	Specific activity, U/mg protein	Purification, -fold	Yield, %
Crude extract	519.87	346.42	0.67	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	46.50	154.73	3.33	4.99	45
DEAE-cellulose	3.00	92.84	30.95	46.19	27
Sephadex G-100	1.40	74.79	53.61	80.45	22

phate buffer (pH 7.4) at different temperatures between 10 to 90°C for 30 min, brought to room temperature and the enzyme activity was measured.

Inhibition studies of nitroreductase activity. The effect of EDTA, SDS and metal salts such as MgCl₂, ZnSO₄, AgNO₃, CuSO₄ and HgCl₂ on nitroreductase activity was explored. The purified enzyme from *Aquiflexum* sp. DL6 was incubated with different concentrations of EDTA, SDS (0.2 to 2 mM) and metal salts for 30 min at 37°C followed by the measurement of residual activity under the standard assay conditions.

Kinetic studies of purified nitroreductase. Initial velocities of the enzymatic reactions were performed by varying the concentration of one substrate, *o*-nitrophenol (from 0.05 to 1 mM) or NADH (from 0.05 to 1 mM), while the concentration of the second substrate was kept constant. Michaelis constants (K_M) and maximal velocity (V_{max}) for the reduction of *o*-nitrophenol and the oxidation of NADH by the purified nitroreductase from *Aquiflexum* sp. DL6 were determined from Lineweaver–Burk plots.

In vitro transformation of nitro compounds by nitroreductase from *Aquiflexum* sp. The reaction mixture 3 ml contained 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4), 1 mM NADH and 0.2 mM nitro compounds and 0.2 ml of the purified enzyme solution. The reactions were monitored with constant stirring in water bath at 37°C, and the decrease of OD₄₁₀ was measured at every 30 min.

RESULTS

Purification of nitroreductase from *Aquiflexum* sp. DL6. Acclimatization of bacterial strain *Aquiflexum* sp. DL6 with nitro-aromatics for 72 h resulted in significant induction of nitroreductase. Total 520 mg of protein was obtained from crude extract of disrupted cells of *Aquiflexum* sp. (11.34 g wet weight). In the purification steps of the enzyme, more than 90% of contaminating proteins were eliminated during ammonium sulfate precipitation. The sample was then dialyzed to remove the salts and loaded on DEAE cellulose column; all the fractions were collected and checked for its activity. The concentrated enzyme solution applied to Sephadex G-100 yielding approximately 80-fold purification (Table 1). The molecular

weight of nitroreductase was estimated by native and SDS-PAGE and found to be ~29 kDa (Fig. 1).

Characterization of purified nitroreductase from *Aquiflexum* sp. DL6. *Effect of pH and temperature on the nitroreductase activity.* The effect of pH on purified nitroreductase from *Aquiflexum* sp. DL6 was determined at various pH from 3.6 to 11.2 at 37°C and the optimum pH was found to be 9.5 (Fig. 2).

Effect of temperature was studied by incubation of assay mixture of nitroreductase from 10 to 90°C. Optimum enzyme activity was observed around 40°C and further increase in temperature showed a decrease in activity, the enzyme activity retained more than half of its total activity at 60°C (Fig. 3).

Thermal stability was determined by incubating the purified enzyme with phosphate buffer at various temperatures. It was found that the nitroreductase from *Aquiflexum* sp. DL6 had maximum thermal stability at 40°C.

Inhibition studies of nitroreductase activity. Influence of metal ions on nitroreductase activity was tested with addition of equimolar concentration of metal

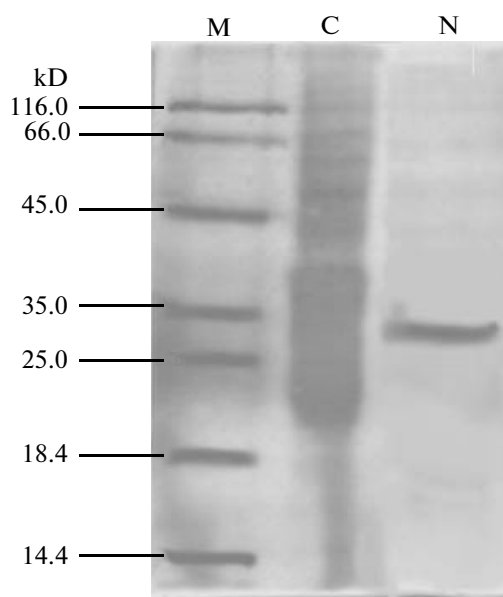


Fig. 1. SDS-PAGE pattern of the purified nitroreductase from *Aquiflexum* sp. DL6 (lane N). Lane M – protein molecular markers, C–crude extract.

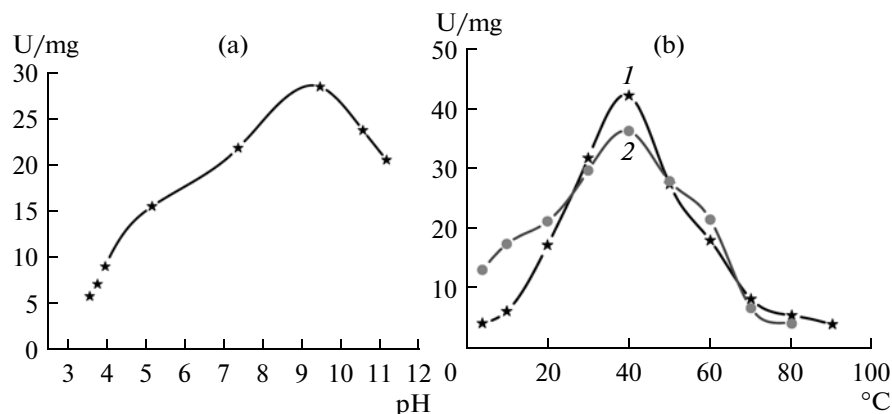


Fig. 2. Effect of pH (a) and temperature (b) on the *Aquiflexum* sp. DL6 nitroreductase activity. 1 – effect of temperature; 2 – thermal stability.

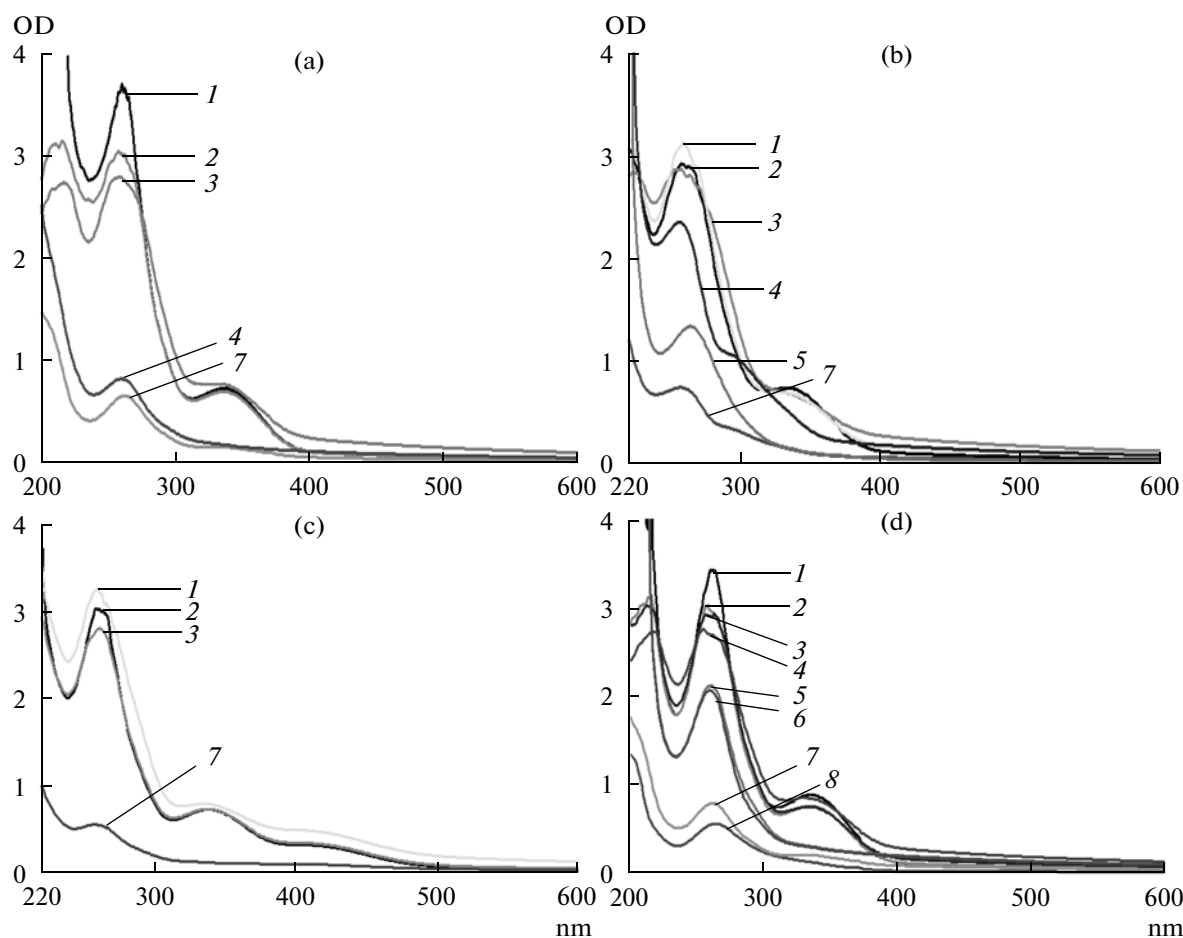


Fig. 3. UV-visible spectra of *in vitro* reduction of nitro compounds by the purified *Aquiflexum* sp. DL6 nitroreductase in the presence of 1 mM NADH. a – 3-nitrobenzaldehyde, b – m-nitrobenzoic acid, c – o-nitroaniline, d – m-nitrotoluene. 1 – 0 min, 2 – 30 min, 3 – 1 h, 4 – 2 h, 5 – 5 h, 6 – 12 h, 7 – 24 h, 8 – 48 h of incubation.

salts. Addition of 2 mM AgNO_3 completely inhibited the activity of nitroreductase while ZnSO_4 , HgCl_2 and CuSO_4 taken in the same concentration inhibited enzyme activity from 50 to 68%. MgCl_2 did not inhibit the nitroreductase activity. Addition of EDTA and SDS in the reaction mixture at the concentration 0.2

to 2.0 mM resulted in concentration-dependent decrease in the nitroreductase activity, at 2.0 mM concentration of both EDTA and SDS had shown around 45% decrease in the activity (Table 2).

Substrate specificity of nitroreductase. To determine the substrate specificity of nitroreductase, the activity

of the enzyme was determined by using 7 different nitro-aromatic compounds as a substrate at equimolar concentrations. The assay conditions were identical and ONP was considered as a control. The *Aquiflexum* sp. DL6 nitroreductase also effectively reduced other nitro compounds such as p-nitrophenol, 3-nitrobenzaldehyde, 4-nitrobenzoic acid, o-nitroaniline, m-nitrotoluene and 1-chloro-2-nitrobenzene. After addition of p-nitro phenol or 4-nitro benzoic acid more than 80% of nitroreductase activity was revealed. In the presence of 3-nitrobenzaldehyde or 1-chloro-2-nitrobenzene more than 50% of enzyme activity was found but o-nitroaniline or m-nitrotoluene showed less than 50% activity.

Kinetic studies of nitroreductase. The K_M and V_{max} (velocity maxima) was obtained by measuring the enzyme activity by varying the concentrations of one of the substrates or NADH and keeping the concentration of the second substrate fixed. In case of ONP, the K_M and V_{max} values were 1.28 mM and 12.5 U, respectively. While, in case of NADH, the K_M and V_{max} were found to be 0.35 mM and 56 U, respectively for 0.2 mM ONP.

In vitro reduction of some nitro compounds with the purified nitroreductase. The nitro reduction potential of the purified nitroreductase from *Aquiflexum* sp. DL6 has been examined by incubating 4 nitro aromatic compounds like 3-nitrobenzaldehyde, m-nitrobenzoic acid, o-nitroaniline, o-nitrotoluene. The decrease in absorbance and shift in peak position in some cases resulted in formation of aromatic amines (Fig. 4). During this *in-vitro* transformation, NADH served as an electron donor.

DISCUSSION

There is no available data on the nitroreductase from alkaliphiles and especially from red *Aquiflexum* sp. in literature. We purified the enzyme from *Aquiflexum* sp. DL6 by three-step procedure resulting in 80-fold purification and 22% at final step. A single band was observed in native and SDS-PAGE indicating that the nitroreductase active form might be a monomer. The purified *Aquiflexum* sp. DL6 enzyme was found capable of reducing nitroaromatic compounds under aerobic conditions indicating that the mechanism involved an obligatory two electron transfer from NADH. Thus, this enzyme could be classified as an oxygen-insensitive nitroreductase [15].

The nitroreductase of *Aquiflexum* sp. DL6 had optimum pH at around 9.5; however, it demonstrated comparable activity over the range of pH 7 to 11. Commonly, it is the ability of alkaliphilic microorganisms to live in high pH conditions by successfully lowering the pH across the cell wall and membrane keeping the intracellular pH near to neutral values. We observed that the nitroreductase from *Aquiflexum* sp. DL6 had the temperature optimum at 40°C. Temperature optima for different nitroreductases reported in the literature ranged from 25

Table 2. Influence of inhibitors on the *Aquiflexum* sp. DL6 nitroreductase activity

Inhibitors	Concentration, mM	Residual nitroreductase activity, %
Control (NADH)	2.0	100
EDTA	0.2	91
	0.6	81
	1.0	80
	1.4	78
	1.8	58
	2.0	49
SDS	0.2	79
	0.6	72
	1.0	66
	1.4	61
	1.8	57
	2.0	55

to 50°C [26, 27]. The purified enzyme from *Aquiflexum* sp. DL6 was found thermally stable about 75% at 60°C. Hence, this might be the most thermostable nitroreductase ever reported. The substrate specificity of the enzyme was tested with 7 different nitro compounds. The rate of decolorization or reduction changed depending on structure of the compound. Purified nitroreductase from *Aquiflexum* sp. DL6 was able to utilize all the nitro compounds used as a substrate with different efficiency according to the substituted groups on the aromatic ring present in structure that coincided with similar data in the literature [1, 9, 28, 29].

The majority of the reported nitroreductases are known to be flavoproteins [29]. For *Aquiflexum* sp. DL6 enzyme, the flavin was not detected in thin layer chromatography and any significant peak did not shown between 350–500 nm in UV-visible spectrum, indicating the absence of a bound flavin to the enzyme.

In conclusion, the purified nitroreductase from *Aquiflexum* sp. DL6 differed from those described previously from other bacteria. The enzyme could utilize NADH as cofactor and electron donor. AgNO₃ could inhibit the nitroreductase activity completely. It exhibited wide substrate specificity for nitro aromatic compounds and optimal activity at high alkaline conditions. The revealed enzyme properties might have economic potential in many industrial and biotechnological processes, specifically, agriculture, food, detergents, textile, leather and paper industries. It is expected that numerous nitroreductases will be found in alkaliphiles in the coming years and they will be used in novel biocatalytic processes and biotransformation reactions.

ACKNOWLEDGMENTS

S. Misal gratefully acknowledges the fellowship from University Grants Commission (UGC, New Delhi, India), and BCUD, University of Pune (India) for funding to carry out this work.

REFERENCES

- Noyes, R. *Chemical Weapons Destruction and Explosive Waste/unexploded Ordnance Remediation*. Noyes Publications, New Jersey, 1996, pp. 102–141.
- Tan, E.L., Ho, C.H., Griest, W.H., and Tyndall, R.L. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1992, vol. 36, no. 3, pp. 165–175.
- Padda, R.S., Wang, C., Hughes, J.B., Kutty, R., and Bennett, G.N., *Environ. Toxicol. Chem.*, 2003, vol. 22, no. 10, pp. 2293–97.
- Nishino, S.F. and Spain, J.C., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, vol. 59, no. 8, pp. 2520–2525.
- Somerville, C.C., Nishino, S.F., Spain, J.C., *J. Bacteriol.*, 1995, vol. 177, no. 13, pp. 3837–3842.
- Higson, F., *Adv. Appl. Microbiol.*, 1992, vol. 37, pp. 1–19.
- Spain, J.C., *Microbial Metabolism of Nitro Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. New York: Wiley, 1995, pp. 99–113.
- Marvin-Sikkema, F. and de Bont, J., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, vol. 60, no. 4, pp. 499–507.
- Singh, B.K. and Walker, A., *FEMS Microbiol. Rev.*, 2006, vol. 30, no. 3, pp. 428–471.
- Eddy, E.P., Howard, P.C., McCoy, G.D., and Rosenkranz, H.S., *Cancer Res.*, 1987, vol. 47, no. 12, pp. 3163–3168.
- Massaro, M., McCartney, M., Rosenkranz, E.J., Anders, M., McCoy, E.C., Mermelstein, R., and Rosenkranz, H.S., *Mutat. Res.*, 1983, vol. 122, no. 3–4, pp. 243–249.
- Fiorenza, S., Dunston, K.L., and Ward, C.H., *J. Hazard Mater.*, 1991, vol. 28, no. 1–2, pp. 171–283.
- Spain, J.C., *Rev. Microbiol.*, 1995, vol. 49, pp. 523–555.
- Peterson, F.J., Mason, R.P., Hovsepian, J., and Holtzman, J.L., *J. Biol. Chem.*, 1979, vol. 254, pp. 4009–4014.
- Bryant, C. and DeLuca, M., *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, no. 7, pp. 4119–4125.
- Watanabe, M., Nishino, T., Takio, K., Sofuni, T., and Nohmi, T., *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, no. 37, pp. 23922–23928.
- Kutty, R. and Bennett, G.N., *Arch. Microbiol.*, 2005, vol. 184, no. 3, pp. 158–167.
- Hirota, N., and Kitada, M.Y., *FEBS Lett.*, 1981, vol. 132, no. 2, pp. 278–280.
- Horikoshi, K., Nakao, M., Kurono, Y., and Sashihara, N., *Can. J. Microbiol.*, 1984, vol. 30, no. 6, pp. 774–779.
- Horikoshi, K., *Agric. Biol. Chem.*, 1971, vol. 35, no. 9, pp. 1407–1414.
- Horikoshi, K., *Agric. Biol. Chem.*, 1972, vol. 36, no. 2, pp. 1783–1791.
- Yamamoto, M., Tanaka, Y., and Horikoshi, K., *Agric. Biol. Chem.*, 1972, vol. 36, no. 2, pp. 1819–1823.
- Misal, S.A., Lingojar, D.P., Shinde, R.M., and Gawai, K.R., *Process Biochem.*, 2011, vol. 46, no. 6, pp. 1264–1269.
- Laemmli, U.K., *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685.
- Switzer, R.C., Merrill, C.R., and Shifrin, S., *Anal. Biochem.*, 1979, vol. 98, no. 1, pp. 231–237.
- Hyung-Yeel Kahng, Bheong-Uk Lee, Yun-Seok Cho, and Kye-Heon Oh, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 2007, vol. 12, no. 4, pp. 433–440.
- Kim, H.Y. and Song, H.G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, vol. 68, pp. 766–773.
- Emptage, C.D., Knox, R.J., Danson, M.J., and Hough, D.W., *Biochem. Pharmacol.*, 2009, vol. 77, no. 1, pp. 21–29.
- Watanabe, M., Nishino, T., Takio, K., Sofuni, T., and Nohmi, T., *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, no. 37, pp. 23922–23928.

УДК 579.871.08

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ [²H]ИНОЗИНА ВЫСОКОГО УРОВНЯ ДЕЙТЕРИРОВАННОСТИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ ХЕМОГЕТЕРОТРОФНОЙ БАКТЕРИЕЙ *Bacillus subtilis*

© 2013 г. О. В. Мосин*, В. И. Швец*, Д. А. Складнев**, И. Игнатов***

*Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, 117571
e-mail: mosin-oleg@yandex.ru

**Государственный научно-исследовательский центр генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва, 113545
e-mail: genetika@genetika.ru

***Научно-исследовательский центр медицинской биофизики, София 1111
e-mail: mbioph@dir.bg

Поступила в редакцию 11.05.2012 г.

Осуществлен микробиологический синтез ²H-меченого пуринового рибонуклеозида инозина (выход 3.9 г/л культуральной жидкости, КЖ) с использованием адаптированного к дейтерию штамма грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* в тяжеловодородной среде высокого уровня дейтерированности (99.8 атом. % ²H) с 2%-ным гидролизатом дейтерированной биомассы факультативной метилотрофной бактерии *Brevibacterium methylicum* как источника ²H-меченых ростовых субстратов, полученной в минимальной среде M9 с 98%-ной ²H₂O и 2%-ным [²H]метанолом. Фракционирование инозина из КЖ штамма-производителя производили адсорбцией (десорбцией) на поверхности активированного угля, экстракцией 0.3 М NH₄-формиатным буфером (pH 8.9) с последующей перекристаллизацией в 80%-ном этаноле и колоночной ИОХ на катионообменнике AG50WX 4, уравновешенном 0.3 М NH₄-формиатным буфером с 0.045 М NH₄Cl. Уровень дейтерированности инозина, исследованный методом масс-спектрометрии с бомбардировкой быстрыми атомами (ББА), составил 5 атомов дейтерия (62.5% ²H) с включением 3 атомов дейтерия в рибозный и 2 атома дейтерия в гипоксантиновый фрагменты молекулы.

DOI: 10.7868/S0555109913030136

Природные нуклеозиды, меченные дейтерием (²H), представляют значительный научно-практический интерес для прикладной биохимии и микробиологии, многочисленных биохимических и диагностических целей [1], структурно-функциональных исследований [2], а также для изучения клеточного метаболизма [3]. Тенденция к их предпочтительному использованию обусловлена отсутствием радиационной опасности и возможностью определения локализации метки в молекуле спектроскопией ¹HЯМР [4], ИК- и лазерной спектроскопией [5], а также масс-спектрометрией [6]. Развитие технической и компьютерной оснащенности современных аналитических методов за последние годы позволило существенно повысить эффективность проведения биологических исследований *de novo*, а также изучать структуру и функции нуклеозидов и их аналогов на молекулярном уровне [7]. В частности, дейтерированные рибонуклеозиды и их аналоги применяются в матричных синтезах молекул дейтерированных РНК для изучения их пространственной структуры и конформационных изменений [8].

Важным фактором в исследованиях с дейтерированными нуклеозидами и их аналогами является их доступность. ²H-меченые нуклеозиды могут быть синтезированы с использованием химических [9], ферментативных [10] и микробиологических методов [11]. Химические синтезы часто многостадийны, требуют больших расходов дорогостоящих реагентов и ²H-меченых субстратов и приводят к конечному продукту, представляющему собой рацемическую смесь D- и L-форм, для разделения которых требуются специальные методы [12]. Более тонкие химические технологии синтеза [²H]нуклеозидов связаны с комбинацией химических [13] и ферментативных [14] подходов.

Для многих научно-прикладных целей микробиология предлагает альтернативный микробиологический метод синтеза [²H]нуклеозидов, который характеризуется высокими выходами синтезируемых продуктов, эффективным включением дейтерия в молекулы и сохранению природной конфигурации синтезируемых соединений [15]. Традиционным подходом при этом является выращивание штаммов-производителей в средах с максимальными концентрациями ²H₂O и дейтериро-

ванных субстратов [16]. Однако основным препятствием практической реализации этого метода является недостаток ^2H -меченых ростовых субстратов высокого уровня дейтерированности. Прежде всего это связано с ограниченной доступностью и дороговизной высокоочищенного дейтерия, выделяемого из природных источников. Природная распространенность дейтерия составляет 0.015 атом. %, однако несмотря на невысокое содержание дейтерия в пробах, разработанные в последние годы методы обогащения и очистки дейтерия позволяют получать ^2H -меченые субстраты высокого уровня изотопной чистоты [17].

Начиная с первых экспериментов по выращиванию природных объектов в тяжелой воде, в нашей стране разрабатываются подходы с использованием гидролизатов дейтерированной биомассы бактерий и микроводорослей как ростовых субстратов для биосинтеза штаммов-продуцентов [18]. Эксперименты обнаружили бактериостатический эффект $^2\text{H}_2\text{O}$, заключающийся в ингибировании жизненно-важных функций клетки, оказываемой 50%-ным $^2\text{H}_2\text{O}$ на растительные клетки [19] и 80–90%-ным $^2\text{H}_2\text{O}$ на клетки простейших и бактерий [20]. Попытки использовать для синтеза в $^2\text{H}_2\text{O}$ природных объектов различной таксономической принадлежности, включая бактерии, микроводоросли и дрожжи [21], не получили широкого распространения в биотехнологии из-за трудности биосинтеза, использования комплексных ростовых сред, сложности технологической схемы и т.п. Поэтому целый ряд практических вопросов биосинтеза природных дейтерированных соединений в $^2\text{H}_2\text{O}$ остается неизученным.

Более перспективны технологические схемы синтеза с использованием в качестве дейтерированных ростовых субстратов биомассы метилотрофных бактерий, ассимилирующих метанол по рибулозо-5-монофосфатному (РМФ) и сериновому пути фиксации углерода, интерес к которым возрастает благодаря интенсивному развитию технологии химического синтеза метанола [22, 23]. Усваиваемость метилотрофной биомассы клетками простейших организмов и эукариот составляет 85–98%, а их производительность, измеренная по уровню биоконверсии метанола в клеточные компоненты, достигает 50–60% [24]. Как было показано нами ранее, метилотрофные бактерии — неприхотливые объекты, растут на минимальных средах с 2–4% [^2H]метанола, в которых другие бактерии не размножаются, и достаточно легко адаптируются к максимальным концентрациям $^2\text{H}_2\text{O}$, что существенно для биосинтеза дейтерированных природных соединений [25, 26].

Большой научно-практический интерес к использованию дейтерированной биомассы мети-

лотрофных бактерий для биосинтеза рибонуклеозидов определил направление исследования.

Цель работы — изучение принципиальной возможности микробиологического синтеза [^2H]инозина штаммом грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* за счет использования в качестве источника дейтерированных субстратов 99.8%-ной $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2%-ного гидролизата дейтеро-биомассы факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum*, полученной со среды с максимальным содержанием дейтерия.

МЕТОДИКА

Объект исследования. Объектом исследования являлся полиауксотрофный по гистидину, тирозину, аденину и урацилу (потребность 10 мг/л) штамм спорообразующих аэробных грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3157 — продуцент инозина, полученный из коллекции культур ГОСНИИ Генетики и селекции промышленных штаммов микроорганизмов. Исходный штамм был предварительно адаптирован к дейтерию рассевом до отдельных колоний на 2%-ном агаре со ступенчато увеличивающимся градиентом концентрации $^2\text{H}_2\text{O}$ и последующей селекции по признаку устойчивости к $^2\text{H}_2\text{O}$.

Для приготовления ростовых сред использовали $^2\text{H}_2\text{O}$ (99.8 атом. % ^2H), ^2HCl (95.5 атом. % ^2H) и [^2H]метанол (97.5 атом. % ^2H) (ЗАО “Изотоп”, Санкт-Петербург, Россия). Неорганические соли и D, L-глюкозу (“Reanal”, Венгрия) предварительно перекристаллизовывали в $^2\text{H}_2\text{O}$, $^2\text{H}_2\text{O}$ дистиллировали над KMnO_4 с последующим контролем изотопной чистоты ^1H ЯМР-спектроскопией на приборе Bruker WM-250 (“Bruker Daltonics”, ФРГ) (рабочая частота 70 МГц, внутренний стандарт Me_4Si). Согласно данным ^1H ЯМР, уровень дейтерированности ростовой среды был ниже на 8–10 атом. % изотопной чистоты исходной $^2\text{H}_2\text{O}$.

Биосинтетический [^2H]инозин. [^2H]инозин получен с выходом 3.9 г/л на тяжеловодородной (ТВ) среде (89–90% атом. ^2H). В качестве источника ^2H -меченых ростовых субстратов использовали 2%-ный гидролизат дейтерированной биомассы метанолассимилирующего штамма факультативных грамтрицательных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* ВКПМ В-5662, полученного селекцией в условиях многоступенчатой адаптации на твердой (2%-ный агар) минимальной среде М9 ((г/л): KH_2PO_4 — 3, Na_2HPO_4 — 6, NaCl — 0.5, NH_4Cl — 1) с 2%-ным [^2H]метанолом и ступенчато увеличивающимся

градиентом концентрации тяжелой воды (от 0, 24.5, 73.5 до 98% $^2\text{H}_2\text{O}$). Сырую метилотрофную биомассу (выход 200 г/л среды) суспендировали в 100 мл 0.5 н. ^2HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$), автоклавировали 30–40 мин при 0.8 атм. Полученную суспензию нейтрализовали 0.2 н. KOH (в $^2\text{H}_2\text{O}$), до pH 7.0, после чего использовали в качестве источника ростовых субстратов при выращивании штамма-продуцента инозина. Для этого посевной материал в количестве 5–6 мас. % переносили в ТВ-среду с $^2\text{H}_2\text{O}$ (мас. %): глюкоза – 12, гидролизат дейтеробиомассы *B. methylcum* – 2, NH_4NO_3 – 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1, CaCO_3 – 2, аденин – 0.01, урацил – 0.01. В качестве контроля использовали протонированную среду с 2%-ным белково-витаминным концентратом (ББК) дрожжей. Выращивание бактерий проводили в колбах Эрленмейера на 500 мл со 100 мл среды в течение 3–4 сут при 32°C в условиях интенсивной аэрации на орбитальной качалке S-380 (“Biorad Labs”, Венгрия). Бактериальный рост контролировали по способности к образованию отдельных колоний на поверхности твердых агаризованных (2%-ный агар) сред, а также по величине ОП суспензии клеток, измеренной на спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США) при $\lambda = 540$ нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм. Уровень биоконверсии углеродного субстрата определяли, используя глюкозооксидазу (КФ 1.1.3.4).

Аналитическое определение инозина. Определения проводили в пробах КЖ, объемом 10 мкл на хроматографических пластинках (150 × 150 мм) с закрепленным слоем флуоресцирующего носителя Silufol UV-254 (“Kavalier”, Чехия) с использованием стандартного набора рибонуклеозидов фирмы “Beckman-Spincor” (США) в системе растворителей: н-бутанол–уксусная кислота–вода (2 : 1 : 1, об. %). Элюцию пятен проводили 0.1 н. HCl . УФ-поглощение элюатов определяли на спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США), используя стандартную калибровочную кривую.

Выделение $[^2\text{H}]$ инозина. Пробы КЖ разделяли на центрифуге Т-26 (“Carl Zeiss”, ФРГ) при 2000 g, 10 мин, концентрировали при 10 мм рт. ст. в роторном испарителе РВО-6 (“Microtechna”, Венгрия) до объема, в два раза меньше исходного, добавляли ацетон при 0°C (3 × 5 мл). Смесь выдерживали ~10 ч при 4°C, осадок отделяли центрифугированием при 1200 g, 5 мин. К супернатанту добавляли 10 г активированного угля, выдерживали 24 ч при 4°C. Водную фракцию отделяли фильтрованием, к твердой фазе добавляли 20 мл 50%-ного этанола в 25%-ном аммиаке (1 : 1, об. %), нагревали при 60°C с обратным водяным холодильником. Через 2–3 ч смесь фильтровали и упарива-

ли при 10 мм рт. ст. Продукт экстрагировали 0.3 М NH_4 -формиатным буфером (pH 8.9), промывали ацетоном (2 × 10 мл), сушили над безводным CaCl_2 . Инозин перекристаллизовывали из 80%-ного этанола ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +1.61^\circ$, выход 3.1 г/л, 80%). Конечная очистка инозина производилась методом ИОХ на откалиброванной колонке (150 × 10 мм) с катионообменной смолой AG50WX 4 (“Pharmacia”, США). Колонку уравнивали 0.3 М NH_4 -формиатным буфером (pH 8.9) с 0.045 М NH_4Cl и элюировали тем же буфером в условиях изократической элюции (хроматографическая чистота 92%). Элюат подвергали лиофильной сушке и хранили в запаянных ампулах при –4°C.

$[^2\text{H}]$ инозин. Выход 3.1 г/л (80%); $T_{\text{пл.}} = 68\text{--}70^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +1.61^\circ$ (этанол); $R_f = 0.5$; $pK_a = 1.2$ (фосфатный буфер, pH 6.87). УФ-спектр (0.1 н. HCl): ($\lambda_{\text{макс}} = 249$ нм, $\epsilon_{249} = 7100 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$); масс-спектр БА (глицериновая матрица Cs^+ , ускоряющее напряжение 5 кВ, ионный ток 0.6–0.8 мА): $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ (I, %): 273, 20% (4 атом. ^2H); 274, 38% (5 атом. ^2H); 275, 28% (6 атом. ^2H); 276, 14% (7 атом. ^2H), $[\text{A} + \text{H}]^+ 136, 46\%$; $[\text{B} + \text{H}]^+ 138, 55\%$; $[\text{B} - \text{HCN}]^+ 111, 49\%$; $[\text{B} - \text{HCN}]^+ 84, 43\%$.

Гидролиз белков биомассы. К 10 мг сухой биомассы после обработки смесью хлороформ–метанол–ацетон (2 : 1 : 1, об. %) добавляли 5 мл 6 н. ^2HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$). Ампулы выдерживали при 110°C в течение ~24 ч. После этого реакцию массу суспендировали в горячей $^2\text{H}_2\text{O}$, фильтровали. Гидролизат упаривали при 10 мм рт. ст. Остатки ^2HCl удаляли путем выдерживания в эксикаторе над твердым NaOH .

Гидролиз внутриклеточных полисахаридов. 50 мг сухой биомассы помещали в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, добавляли 50 мл дист. H_2O и 1.6 мл 25%-ной H_2SO_4 (в $^2\text{H}_2\text{O}$) и кипятили с обратным водяным холодильником в течение ~90 мин. После охлаждения реакцию смесь суспендировали в одном объеме горячей дист. H_2O и нейтрализовали 2 н. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (в $^2\text{H}_2\text{O}$) до pH 7.0. Выпавший осадок BaSO_4 отделяли центрифугированием (1500 g, 5 мин), супернатант декантировали и упаривали при 10 мм рт. ст.

УФ-спектры. Регистрировали на программируемом спектрофотометре Beckman DU-6 (“Beckman Coulter”, США) в диапазоне длин волн $\lambda = 220\text{--}280$ нм.

Аминокислотный анализ. Анализ гидролизатов биомассы проводили на катионообменной колонке Biotronic LC-5001 (“Eppendorf-Netheler-Hinz”, ФРГ) (230 × 3.2); неподвижная фаза – сульфированная стирольная (7.25% сшивки) смола UR-30 (“Beckman-Spincor”, США); диаметр гранул 25 мкм; элюент 0.2 н. Na -цитратный буфер

(рН 2.5); рабочее давление 50–60 атм; скорость подачи элюента 18.5 мл/ч; нингидрина 9.25 мл/ч; детекция при $\lambda = 570$ нм и $\lambda = 440$ нм (для пролина).

Анализ углеводов. Анализ осуществляли на жидкостном хроматографе Knauer Smartline (“Knauer”, ФРГ), снабженном насосом Gilson (“Gilson Inc.”, ФРГ) и рефрактометром Waters K 401 (“Water Associates”, ФРГ); неподвижная фаза: Ultrasorb CN; габаритные размеры колонки 250 × 10 мм; диаметр гранул 10 мкм; подвижная фаза: ацетонитрил–вода (75 : 25, об. %); скорость подачи 0.6 мл/мин.

Масс-спектры ББА. Получены на импульсном масс-спектрометре VG-70 SEQ (“Fisons VG Analytical”, США), снабженным цезиевым источником Cs⁺ на глицериновой матрице с ускоряющим напряжением 5 кВ и ионным током 0.6–0.8 мА.

Масс-спектры электронного удара (ЭУ). Получены на приборе MB-80A (“Hitachi”, Япония) с двойным фокусированием (энергия ионизирующих электронов 70 эВ, ускоряющее напряжение 8 кВ, температура катодного источника 180–200°C) после модификации аминокислот в метиловые эфиры N-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот по разработанной ранее методике [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение ²H-меченой биомассы *B. methylicum*.

В качестве продуцента инозина использовали мутантный полиауксотрофный по гистидину, тирозину, аденину и урацилу штамм грамположительных хемогетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* ВКПМ В-3157 (предварительно адаптированный к дейтерию селекцией до отдельных колоний), который из-за нарушения метаболических путей регуляции биосинтеза пуриновых рибонуклеозидов синтезирует в стандартных условиях выращивания (БВК-среда, поздний экспоненциальный рост, 32°C) 17–20 г инозина на 1 л КЖ [28]. Максимальный выход инозина достигался при использовании протонированной среды, содержащей в качестве источника углерода и энергии глюкозу (не менее 12 мас. %), а в качестве источника ростовых факторов и аминного азота – 2%-ный БВК дрожжей. При проведении биосинтеза требовалось заменить протонированные ростовые субстраты их дейтерированными аналогами, а также использовать ²H₂O высокого уровня изотопной чистоты. Для решения поставленной задачи использовали автолизированную биомассу адаптированного к дейтерию грамотрицательного штамма факультативных метилотрофных бактерий *Brevibacterium methylicum* ВКПМ В-5662, ассимилирующего метанол по рибулозо-5-монофосфатному циклу фиксации углерода, который благодаря 50–60%-ному уровню биоконверсии метанола (при эффектив-

ности конверсии 15.5–17.3 г сух. биомассы на 1 г потребленного субстрата) и устойчивому росту в минимальной дейтерированной среде М9 с ²H₂O и [²H]метанолом оказался очень удобным источником для наработки дейтеро-биомассы, а затраты на биоконверсию определяются, в основном, стоимостью ²H₂O и [²H]метанола [29]. Проведение адаптации для *B. methylicum* определялось необходимостью улучшения ростовых характеристик штамма и достижения высокого выхода микробной биомассы в максимально дейтерированной среде М9. Для этого использовали ступенчато увеличивающийся градиент концентрации ²H₂O в ростовых средах М9 (от 24.5, 49.0, 73.5 до 98% ²H₂O¹) в присутствии 2%-ного метанола и его дейтерированного аналога, так как предполагалось, что постепенное привыкание клеток к ²H₂O будет оказывать благоприятный эффект на ростовые параметры штамма.

Для изучения влияния уровня дейтерированности источника углерода на ростовые параметры штамма в опытах (1, 3, 5, 7, 9) использовали протонированный метанол, а в опытах (2, 4, 6, 8, 10) [²H]метанол (табл. 1). Согласно полученным данным, замена протонированного метанола его дейтерированным аналогом в условиях одинаковой концентрации ²H₂O в среде приводила к небольшим уменьшениям ростовых характеристик штамма (табл. 1, опыты 2, 4, 6, 8, 10). Поэтому в дальнейших опытах использовали среды М9 с ²H₂O и [²H]метанолом. При росте исходного штамма *B. methylicum* в контрольной протонированной среде с водой и метанолом продолжительность лаг-периода и времени клеточной генерации составили 20 и 2.2 ч, а выход микробной биомассы 200 г на 1 л КЖ (табл. 1, опыт 1). В промежуточных опытах (2–10) биосинтетические параметры изменялись пропорционально концентрации ²H₂O (табл. 1). Выявленная закономерность заключалась в увеличении продолжительности лаг-периода и времени клеточной генерации при уменьшении выходов микробной биомассы с фиксированием самых низких значений этих параметров в опыте 10 с использованием максимально дейтерированной среды с 98%-ной ²H₂O и 2%-ным [²H]метанолом, где продолжительность лаг-периода и время генерации увеличивались в 3 и 2.2 раза по сравнению с контрольными условиями (табл. 1, опыт 1) на обычной воде и метаноле, а выход микробной биомассы уменьшался в 3.1 раза. Улучшить ростовые характеристики штамма *B. methylicum* в максимально дейтерированной среде М9 позволила адаптация к дейтерию, условия которой показаны в опыте 10¹ (табл. 1). За ходом адаптации наблюдали, сни-

¹ Здесь и далее использованы проценты по объему.

Таблица 1. Условия адаптации, изотопный состав ростовых сред и характеристики роста *B. methylicum*

Номер опыта	Компоненты среды, об. %				Лаг-период, ч	Выход микробной биомассы, % от контроля	Время генерации, ч
	H ₂ O	² H ₂ O	метанол	[² H] метанол			
1	98.0	0	2	0	20	100	2.2
2	98.0	0	0	2	30	92.3	2.4
3	73.5	24.5	2	0	32	90.6	2.4
4	73.5	24.5	0	2	34	85.9	2.6
5	49.0	49.0	2	0	40	70.1	3.0
6	49.0	49.0	0	2	44	60.5	3.2
7	24.5	73.5	2	0	45	56.4	3.5
8	24.5	73.5	0	2	49	47.2	3.8
9	0	98.0	2	0	58	32.9	4.4
10	0	98.0	0	2	60	30.1	4.9
10'	0	98.0	0	2	40	87.0	2.8

Примечание. Данные опытов 1–10 приведены для *B. methylicum* при выращивании в минимальной среде М9, содержащей 2%-ный метанол/ $[^2\text{H}]$ метанол и указанное количество (%) ²H₂O. Данные опыта 10' приведены для адаптированной к максимальному содержанию дейтерия в среде бактерии *B. methylicum* при выращивании в среде, содержащей 98%-ную ²H₂O и 2%-ный $[^2\text{H}]$ метанол. В качестве контроля использовали опыт 1, где применяли обычную воду и метанол.

мая динамики роста исходного (рис. 1, кривая 2) и адаптированного к дейтерию (рис. 1, кривая 3) штамма *B. methylicum* в максимально дейтерированной среде М9, содержащей 98%-ную ²H₂O и 2%-ный $[^2\text{H}]$ метанол (рис. 1, кривая 1 (контроль), получен в протонированной среде), а также по изменению продолжительности лаг-периода, времени генерации и выходов микробной биомассы (рис. 2а–2в). В отличие от адаптированного

штамма (рис. 1, кривая 3), динамика роста исходного штамма (рис. 1, кривая 2) в максимальной дейтерированной среде ингибировались дейтерием.

Согласно данным эксперимента выход микробной биомассы у адаптированного штамма *B. methylicum* (рис. 2в) уменьшался на 13% по сравнению с контрольными условиями (рис. 2а) при увеличении времени генерации до 2.8 ч, а продолжительности лаг-периода до 40 ч (рис. 2в). По-

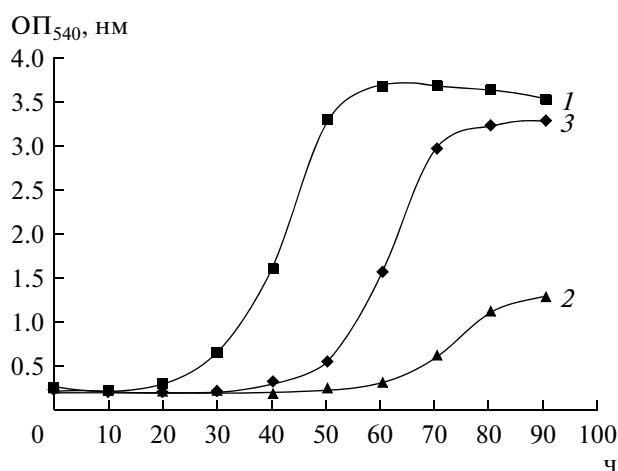


Рис. 1. Динамики роста *B. methylicum* в различных экспериментальных условиях: исходный метилотроф в протонированной среде М9 с обычной водой и метанолом (1); исходный метилотроф в максимально дейтерированной среде М9 (2); адаптированный к дейтерию метилотроф в максимально дейтерированной среде М9 (3).

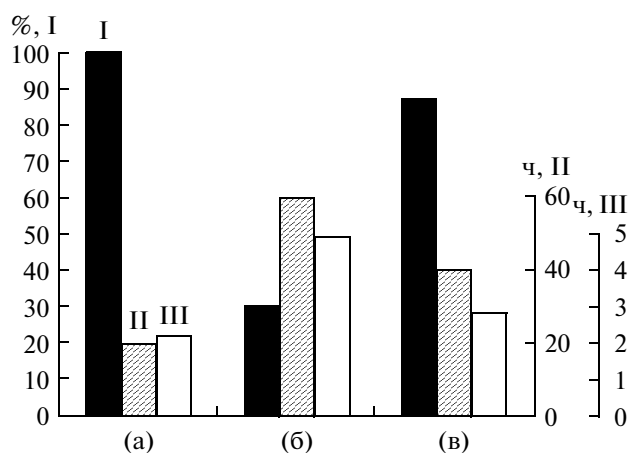


Рис. 2. Выход биомассы (% от контроля, I) *B. methylicum*, величина лаг-периода (ч, II) и время генерации (ч, III) в различных экспериментальных условиях: исходный метилотроф в протонированной среде М9 с обычной водой и метанолом (а); в максимально дейтерированной среде М9 (б); адаптированный к дейтерию на максимально дейтерированной среде М9 (в).

Таблица 2. Аминокислотный состав гидролизата биомассы факультативной метилотрофной бактерии *B. methylisum*, полученный с максимально дейтерированной среды М9 с 98%-ной $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2%-ным $[\text{H}^2]$ метанолом и уровни дейтерированности молекул

Аминокислота	Выход, %	Величина молекулярного иона производных аминокислот $[\text{M}]^{+*}$	Количество включенных атомов дейтерия в углеродный скелет молекулы**	Уровень дейтерированности молекул, % от общего количества атомов водорода***
Глицин	9.69	324	2	90.0
Аланин	13.98	340	4	97.5
Валин	3.74	369	4	50.0
Лейцин	7.33	383	5	49.0
Изолейцин	3.64	383	5	49.0
Фенилаланин	3.94	420	8	95.0
Тирозин	1.82	669	7	92.8
Серин	4.90	355	3	86.6
Треонин	5.51	не детектировался	—	—
Метионин	2.25	не детектировался	—	—
Аспарагин	9.59	396	2	66.6
Глутаминовая кислота	10.38	411	4	70.0
Лизин	3.98	632	5	58.9
Аргинин	5.27	не детектировался	—	—
Гистидин	3.72	не детектировался	—	—

* Данные получены для метиловых эфиров N-(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных (дансильных) производных аминокислот.

** При подсчете уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при карбоксильных COOH - и амино NH_2 -группах молекула аминокислот не учитывались из-за легкости изотопного (^1H - ^2H) обмена.

*** Прочерк означает отсутствие данных.

сле переноса в протонированную среду адаптированный штамм возвращался к нормальному росту после некоторого лаг-периода, что наблюдалось для других адаптированных нами штаммов бактерий [30]. Эффект реверсии роста в протонированной(дейтерированной) средах доказывает, что адаптация к $^2\text{H}_2\text{O}$ является фенотипическим явлением, хотя не исключается, что определенный генотип детерминирует проявление одного и того же фенотипического признака в средах различного изотопного состава. В целом, улучшенные ростовые характеристики адаптированного метилотрофа существенно упрощают схему получения дейтеробиомассы, оптимальным условиям которой удовлетворяет максимально дейтерированная среда М9 с 98%-ной $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2%-ным $[\text{H}^2]$ метанолом с инкубационным периодом 3–4 сут при 35°C .

Микробиологический синтез $[\text{H}^2]$ инозина. Стратегия биосинтеза ^2H -меченого инозина за счет использования в качестве ростовых субстратов метилотрофной биомассы *B. methylisum* разрабатывалась с учетом способности метилотрофных бактерий синтезировать большое количество белка (выход 50% от массы сухого вещества), 15–17% полисахаридов, 10–12% липидов (в основ-

ном, фосфолипиды) и 18% зольных веществ [31]. Для обеспечения высоких выходов этих соединений и минимизации реакций обратного (^1H - ^2H) обмена в аминокислотных остатках молекул белков гидролиз биомассы проводили автоклавированием в 0.5 н. ^2HCl (в $^2\text{H}_2\text{O}$). Поскольку штамм *B. subtilis* – продуцент инозина является полиауксотрофным штаммом, нуждающимся для роста в тирозине и гистидине, исследовали качественный и количественный состав ароматических аминокислот гидролизата метилотрофной биомассы, полученного в максимально дейтерированной среде с 98%-ной $^2\text{H}_2\text{O}$ и 2%-ным $[\text{H}^2]$ метанолом, а также уровни их дейтерированности (табл. 2). Качественный и количественный состав аминокислот метилотрофного гидролизата изучали на катионообменной колонке Biotronic LC-5001 (“Eppendorf-Nethleler-Hinz”, ФРГ) с сульфированной смолой UR-30, а уровни дейтерированности молекул – масс-спектрометрией ЭУ метиловых эфиров N(диметиламино)нафтален-1-сульфонил хлоридных производных аминокислот, полученных обработкой смеси белкового гидролизата дансилхлоридом и диазометаном. Метилотрофный гидролизат представлен пятнадцатью идентифицированными

аминокислотами (за исключением пролина, который детектировался при $\lambda = 440$ нм) при содержании тирозина и гистидина в 1 г сухого метилотрофного гидролизата 1.82 и 3.72%, что удовлетворяет ауксотрофности штамма-производителя в этих аминокислотах. Содержания других аминокислот в гидролизате также сопоставимы с потребностями штамма в источниках углерода и аминного азота (табл. 2). Индикатором, определяющим высокую эффективность включения дейтерия в синтезируемый продукт, служат высокие уровни дейтерированности молекул аминокислот, которые варьируют от 49% для лейцина(изолейцина) до 97.5% для аланина (табл. 2). Это позволило использовать гидролизат дейтеро-биомассы метилотрофных бактерий *B. methylicum* как источник ростовых субстратов для выращивания штамма *B. subtilis* – производителя инозина.

Ростовые и биосинтетические характеристики штамма-производителя инозина *B. subtilis* изучали в протонированной БВК-среде с обычной водой и 2%-ным БВК дрожжей и ТВ-среде с 98%-ной ²H₂O и 2%-ным гидролизатом дейтерированной биомассы *B. methylicum* (рис. 3). Во всех опытах отмечена корреляция в характере изменения ростовой динамики *B. subtilis* (рис. 3, кривые 1, 1'), выхода инозина (рис. 3, кривые 2, 2') и ассимиляции глюкозы (рис. 3, кривые 3, 3'). Максимальный выход инозина (17 г/л) зафиксирован на протонированной БВК-среде при уровне ассимилируемой глюкозы 10 г/л (рис. 3, кривая 2). На ТВ-среде выход инозина снижался в 4.4 (3.9 г/л) (рис. 3, кривая 2'), а уровень ассимиляции глюкозы – в 4 раза (рис. 3, кривая 3'). Экспериментальные данные показали, что при росте в ТВ-среде глюкоза ассимилируется менее эффективно, чем в контрольных условиях.

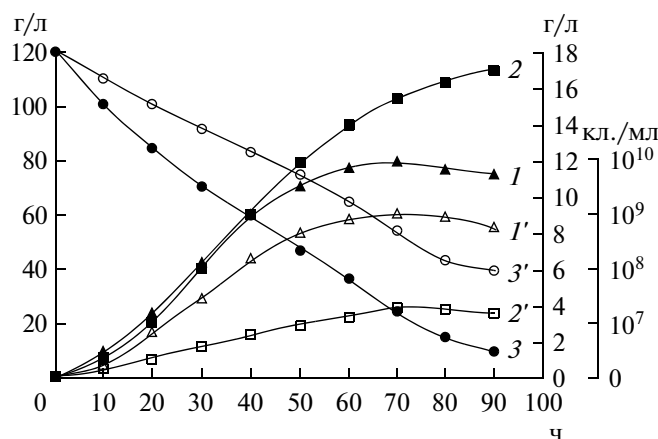


Рис. 3. Динамики роста (клет./мл) *B. subtilis* (1, 1'), накопления инозина в КЖ (г/л) (2, 2') и ассимиляции глюкозы (г/л) (3, 3') в различных экспериментальных условиях: протонированная БВК-среда (1, 2, 3); ТВ-среда с 2%-ным гидролизатом дейтерированной биомассы *B. methylicum* (1', 2, 3').

Полученный результат требовал изучения содержания глюкозы и других внутриклеточных углеводов в биомассе штамма-производителя *B. subtilis*, методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Ultrasorb CN, 10 мкм, 10 × 250 мм с подвижной фазой ацетонитрил–вода (75 : 25, об. %) (табл. 3). Фракция внутриклеточных углеводов в табл. 3 представлена моносахаридами (глюкоза, фруктоза, рамноза, арабиноза), дисахаридами (мальтоза, сахароза), а также четырьмя другими неидентифицированными углеводами с временами удерживания 3.08 (15.63%), 4.26 (7.46%), 7.23 (11.72%) и 9.14 (7.95%) мин (не показаны). Как ожидалось, выход глюкозы в

Таблица 3. Качественный и количественный состав внутриклеточных углеводов *B. subtilis* при росте в ТВ-среде и уровни дейтерированности молекул

Углевод	Содержание в биомассе, %		Уровни дейтерированности молекул, %
	Протонированный образец (контроль)	Образец, полученный в ТВ-среде	
Глюкоза	20.01	21.40	80.6
Фруктоза	6.12	6.82	85.5
Рамноза	2.91	3.47	90.3
Арабиноза	3.26	3.69	90.7
Мальтоза	15.30	11.62	—
Сахароза	8.62	не детектировалась	—

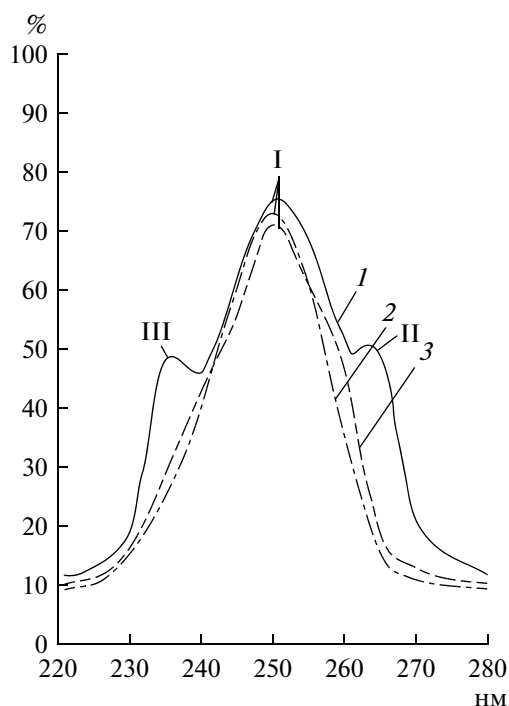


Рис. 4. Спектры УФ-поглощения (%) инозина (0.1 н. раствор HCl): исходная КЖ после выращивания штамма продуцента *B. subtilis* в ТВ-среде (1); природный инозин (2); инозин, выделенный из КЖ штамма-продуцента (3). В качестве контроля использовали природный инозин (2): I – инозин, II и III – вторичные метаболиты.

дейтерированном гидролизате составляет 21.4% от сух. массы, т.е. выше, чем фруктозы (6.82%), рамнозы (3.47%), арабинозы (3.69%) и мальтозы (11.62%) (табл. 3). Их выходы существенно не отличались от контроля на H₂O, за исключением сахарозы, которая не детектируется в дейтерированном гидролизате. Уровни дейтерированности углеводов составили 90.7% для арабинозы до 80.6% для глюкозы.

Выделение [²H]инозина из КЖ. Применение комбинации физико-химических методов для выделения биосинтетического ²H-меченого инозина из КЖ штамма-продуцента диктовалось необходимостью получения инозина высокой степени хроматографической чистоты, не менее 95%. Поскольку в КЖ наряду с инозином присутствуют примеси неорганических солей, белков и полисахаридов, а также сопутствующие вторичные метаболиты нуклеиновой природы (аденозин, гуанозин) и непрореагировавшие субстраты (глюкоза, аминокислоты), проводилось ступенчатое фракционирование КЖ с целью выделения [²H]инозина. Повышенная чувствительность инозина к кислотам и щелочам и его нестабильность при выделении требовали использование кислот-

ных и щелочных растворов низкой концентрации, а также проведения выделения при низких температурах, избегая длительного перегрева реакционной смеси. Фракционирование КЖ заключалось в низкотемпературном осаждении высокомолекулярных примесей органическими растворителями – ацетоном и метанолом, адсорбции(десорбции) на поверхности активированного угля, экстракции продукта, перекристаллизации и ИОХ. Белки и полисахариды удаляли низкотемпературным осаждением ацетоном при 4°C, проводя последующую адсорбцию суммы рибонуклеозидов активированным углем на холоду. Десорбированные рибонуклеозиды извлекали из прореагировавшей твердой фазы элюцией этанольно-аммиачным раствором при 60°C, а сам инозин экстракцией 0.3 М NH₄-формиатным буфером (рН 8.9) с последующей перекристаллизацией в 80%-ном этаноле. Окончательная стадия очистки заключалась в колоночной ИОХ на катионообменнике AG50WX 4, уравновешенном 0.3 М NH₄-формиатным буфером с 0.045 М NH₄Cl со сбором фракций при R_f = 0.5. Данные по выделению инозина из КЖ штамма-продуцента представлены в виде спектров УФ-поглощения на рис. 4, кривые 1–3. Наличие в полученном образце (рис. 4, кривая 3) основной полосы поглощения I, соответствующей природному инозину ($\lambda_{\text{макс}}$ 249 нм, ϵ_{249} 7100 М⁻¹ см⁻¹) и отсутствие вторичных метаболитов II и III доказывает его однородность и эффективность разработанного метода выделения.

Изучение уровня дейтерированности [²H]инозина. Уровень дейтерированности инозина исследовали методом масс-спектрометрии ББА из-за высокой чувствительности, позволяющей детектировать 10⁻⁸–10⁻¹⁰ моль вещества в пробе, что существенно выше, чем при использовании ¹НЯМР-спектроскопии [32]. Для этого получали масс-спектры ББА дейтерированного и протонированного инозина, по разности величин пиков молекулярных ионов, для которых проводили расчет уровня дейтерированности молекулы. Формирование пика молекулярного иона инозина в масс-спектрометрии ББА сопровождался миграцией протона Н⁺. Биосинтетический ²H-меченый инозин (масс-спектр приведен на рис. 5б относительно контроля (рис. 5а)), представлял смесь изотопнозамещенных форм молекул с различным количеством атомов водорода, замещенных на дейтерий. Поэтому пик молекулярного иона инозина [M + H]⁺ полиморфно расщеплялся на отдельные кластеры с примесью молекул со статистическим набором массовых чисел m/z с различным вкладом в суммарный уровень дейтерированности молекулы. Его подсчет проводили по вкладу наиболее интенсивного пика молекулярного иона (пик с наибольшим вкладом в уровень дейтерирован-

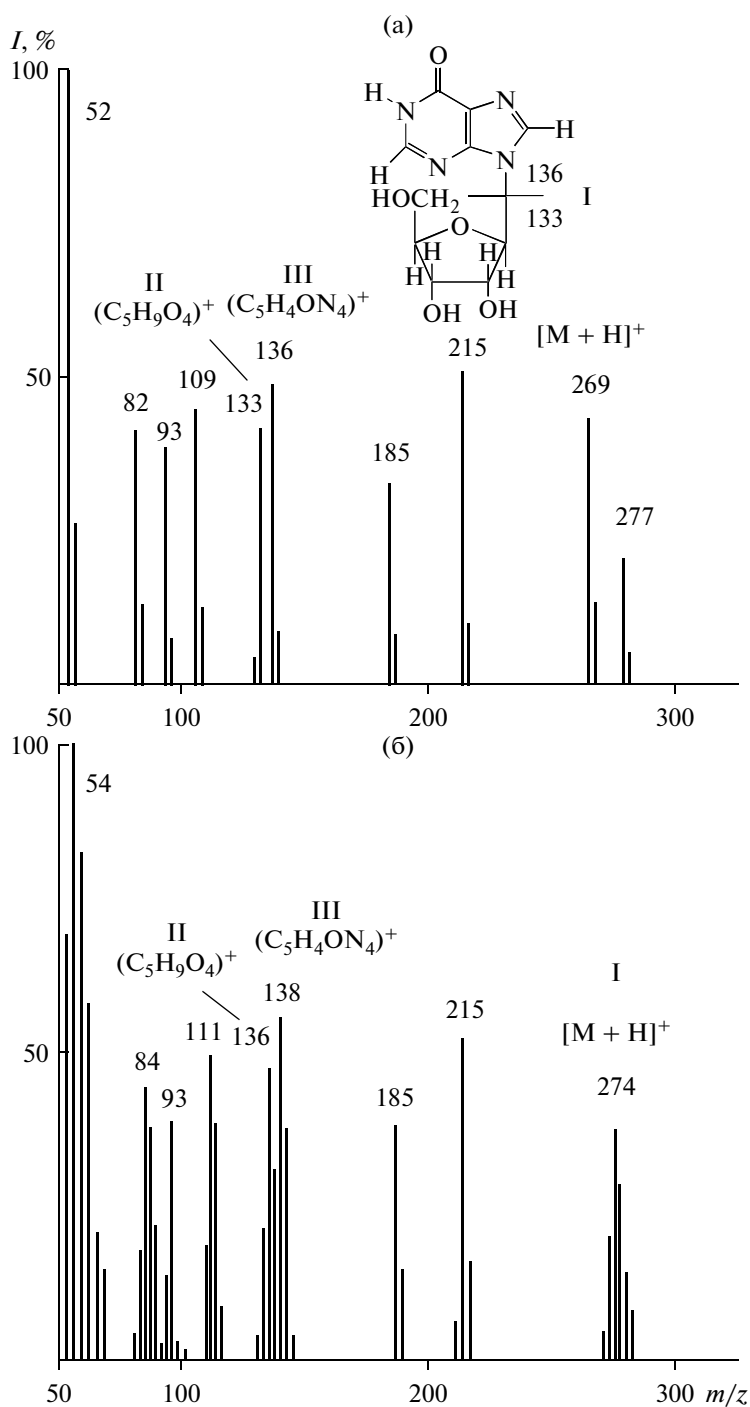


Рис. 5. Масс спектры ББА инозина (глицериновая матрица) в различных экспериментальных условиях: природный инозин (а); [²H]инозин, выделенный из ТВ-среды (б). Интервал сканирования при m/z 50–350, базовые пики с относительной интенсивностью 100% при m/z 52 и m/z 54, условия ионизации: цезиевый источник, ускоряющее напряжение 5 кВ, ионный ток 0.6–0.8 мА. Разрешающая способность 7500 усл. ед. *I* – относительная интенсивность пиков (%). I – инозин, II – рибозный фрагмент, III – гипоксантиновый фрагмент.

ности), зарегистрированным в данных условиях масс-спектрометром. Этим условиям удовлетворял пик $[M + H]^+$ при m/z 274, 38% (вместо $[M + H]^+$ при m/z 269, 42% в контрольных условиях

(рис. 5а)), что соответствует включению 5 атомов дейтерия в молекулу инозина (рис. 5б). В пике молекулярного иона инозина также фиксировались менее интенсивные пики с примесями молекул с

Таблица 4. Величины пиков $[M + H]^+$ в масс-спектрах БА и уровни дейтерированности инозина, выделенного с ТВ-среды

Величина пика $[M + H]^+$	Вклад в уровень дейтерированности, мол. %	Количество атомов дейтерия	Уровень дейтерированности, % от общего количества атомов водорода*
273	20	4	20.0
274	38	5	62.5
275	28	6	72.5
276	14	7	87.5

* При вычислении уровня дейтерированности протоны (дейтероны) при гидроксильных ОН-группах, а также имидазольные NH-протоны при гетероатомах азота не учитывались из-за легкости изотопного (^1H - ^2H) обмена в $^2\text{H}_2\text{O}$.

включением 4 (m/z 273, 20%), 5 (m/z 274, 38%), 6 (m/z 275, 28%) и 7 атомов дейтерия (m/z 276, 14%) (табл. 4).

С учетом вклада пиков молекулярных ионов суммарный уровень дейтерированности (УД) молекулы инозина, вычисленный по нижеприведенной формуле, составил 62.5% от общего количества атомов водорода в углеродном скелете молекулы.

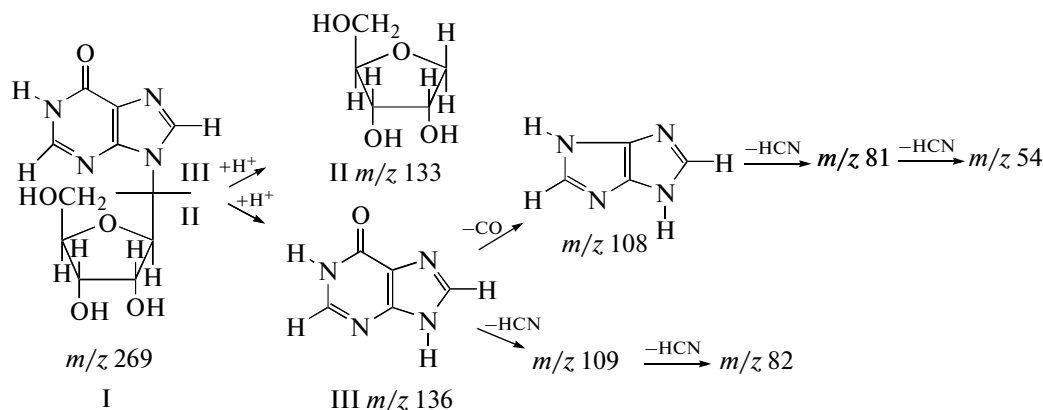
$$\text{УД} = \frac{[M]_{r1}^+ C_1 + [M]_{r2}^+ C_2 + \dots + [M]_{rn}^+ C_n}{\Sigma C_n},$$

(где $[M]_r^+$ – величины пиков молекулярного иона инозина; C_n – вклад в уровень дейтерированности, мол. %).

Более точную информацию о распределении дейтерия в молекуле инозина дает фрагментация молекулы, показанная на рис. 6. Пути фрагментации молекулы инозина методом БА приводят к распаду инозина I на фрагмент рибозы II при массовом соотношении m/z 133 и гипоксантиновый фрагмент III при m/z 136 (их распад сопровождается миграцией протона H^+), который в свою очередь расщепляется на ряд менее низкомолекулярных осколочных фрагментов при m/z 109, 108, 82, 81 и 54 за счет элиминирования HCN и CO из ги-

поксантина (рис. 6). Следовательно, присутствие в масс-спектре БА инозина двух “тяжелых” пиков фрагментов рибозы II m/z 136, 46% (вместо m/z 133, 41%) и гипоксантина III m/z 138, 55% (вместо m/z 136, 48%), а также пиков низкомолекулярных фрагментов, продуктов распада гипоксантина при m/z 111, 49% (вместо m/z 109, 45%) и m/z 84, 43% (вместо m/z 82, 41%) свидетельствует о включении трех атомов дейтерия в рибозный и двух атомов дейтерия в гипоксантиновый фрагменты молекулы инозина (рис. 5 и рис. 6). Таким образом, экспериментальные данные свидетельствуют о включении 5 атомов дейтерия по 1', 3', 4', 2, 8 положениям молекулы инозина, что подтверждается ^1H ЯМР-спектроскопией.

При анализе дейтерированности инозина учитывалось, что уровень и характер включения дейтерия в молекулу определялся способом получения дейтерированного инозина микробиологическим синтезом. Вследствие того, что протоны (дейтероны) в C_1 – C_2' положениях рибозного фрагмента молекулы инозина могли происходить из глюкозы, характер биосинтетического включения дейтерия в рибозный фрагмент определяется, в основном, функционированием процессов гексозо-6-монофосфатного (ГМФ) шунта, связанного с ассимиляцией глюкозы и других углеводов.

**Рис. 6.** Схема фрагментации молекулы инозина методом БА.

Поскольку глюкоза использовалась в протонированном виде, ее вклад в уровень дейтерированности рибозного фрагмента пренебрегался. Однако, вопреки этому предположению, наблюдалось включение дейтерия в рибозный фрагмент молекулы инозина за счет сохранения минорных путей биосинтеза глюкозы *de novo*. Многочисленные (¹H–²H) обменные процессы также могли привести к специфическому включению атомов дейтерия по определенным положениям в молекуле инозина. Такими доступными положениями в молекуле инозина являются гидроксильные протоны ОН⁻ и имидазольные протоны при гетероатомах NH⁺, которые могут обмениваться на дейтерий в ²H₂O за счет кето-енольной таутомерии. Три атома дейтерия в рибозном фрагменте инозина могли происходить за счет функционирования реакций ГМФ-шунта, два атома дейтерия в гипоксантиновом фрагменте могли синтезироваться *de novo* за счет [²H]аминокислот, источником которых являлся метилотрофный гидролизат. В частности, гликозидный протон в положении С₁' в рибозном фрагменте мог заместиться на дейтерий в процессе реакции элиминирования СО₂ на стадии образования рибулозо-5-монофосфата из 3-кето-6-фосфоглюконовой кислоты с последующим присоединением протона(дейтерона) по С₁-положению рибулозо-5-монофосфата. В целом, наши исследования подтверждают эту схему. Следует подчеркнуть, что уровень дейтерированности инозина определяется изотопной чистотой ²H₂O и дейтерированных субстратов.

Таким образом, в работе показана возможность препаративного микробиологического синтеза [²H]инозина штаммом грамположительных хемогетеротрофных бактерией *B. subtilis* за счет использования в качестве источников ростовых субстратов гидролизата биомассы факультативных метилотрофных бактерий *B. methylicum*, полученной с максимально дейтерированной ростовой среды. Выход [²H]инозина на максимально дейтерированной среде с 2%-ным гидролизатом ²H-меченой биомассы *B. methylicum* составил 3.9 г/л, а уровень дейтерированности – 62.5% (5 атомов с включением 3 атомов дейтерия в рибозный и 2 атомов дейтерия в гипоксантиновый фрагменты молекулы). Для достижения более высокого уровня дейтерированности конечного продукта необходимо тщательным образом контролировать изотопный состав ростовой среды и исключить все источники дополнительных протонов, в т.ч. использовать [²H]глюкозу. В будущем планируется получать разработанным методом другие дейтерированные природные нуклеозиды и их аналоги.

Настоящая работа осуществлялась при финансовой поддержке Научно-исследовательско-

го центра медицинской биофизики (Болгария). Грант № 32.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Andres H.* Synthesis and Applications of Isotopically Labeled Compounds / Eds. U. Pleiss, R. Vöges. N.Y.: John Wiley & Sons, 2001. V. 7. 728 p.
2. *Kundu M.K., Trifonova A., Dinya Z., Foldes A., Chattopadhyaya J.* // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2001. V. 20. № 4–7. P. 1333–1337.
3. *Kushner D.J., Baker A., Dunstall T.G.* // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1999. V. 77. № 2. P. 79–88.
4. *Crespi H.L.* // Synthesis and Applications of Isotopically Labeled Compounds. Proc. 2nd Intern. Sympos / Eds. T. Baillie, J.R. Jones. Amsterdam: Elsevier, 1989. 332 p.
5. *Caire G., de la Barca C.A.M., Bolanos A.V., Valencia M.E., Coward A.W., Salazar G., Casanueva E.* // Food Nutr. Bull. 2002. V. 23. № 3. P. 38–41.
6. *Shvets V.I., Yurkevich A.M., Mosin O.V., Skladnev D.A.* // Karadeniz J. Med. Sci. 1995. V. 8. № 4. P. 231.
7. *Lukin M., de los Santos C.* // Nucleosid., Nucleotid. Nucleic Acids. 2010. V. 29. № 7. P. 562–573.
8. *Chirakul P., Litzer J.R., Sigurdsson S.T.* // Nucleosid., Nucleotid. Nucleic Acids. 2001. V. 20. № 12. P. 1903–1913.
9. *Jung M.E., Xu Y.* // Cheminform Abstract. 1998. V. 29. № 16. P. 235–238.
10. *Daub G.H.* // Stable Isotopes. Proc. 3d Intern. Conference / Ed. E.R. Klein. N.Y.: Acad. Press, 1979. P. 3–10.
11. *Мосин О.В., Складнев Д.А., Швец В.И.* // Изв. РАН. Сер. биол. 1999. Т. 4. № 6. С. 403–413.
12. *Huang X., Yu P., LeProust E., Gao X.* // Nucleic Acids Res. 2006. V. 25. № 23. P. 4758–4763.
13. *Kezar H.S., Hutchison T.L., Tyler P.S., Morris P.E.* // J. Labell. Compounds and Radiopharmaceuticals. 2001. V. 45. № 1. P. 71–78.
14. *Miroshnikov A.I., Esipov R.S., Muravyova T.I., Konstantinova I.D., Fateev I.V., Mikhailopulo I.A.* // Open Conf. Proc. J. 2010. V. 1. P. 98–102.
15. *Mosin O.V., Skladnev D.A., Shvets V.I.* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1999. V. 62. № 2. P. 225–229.
16. *Мосин О.В., Швец В.И., Складнев Д.А., Игнатов И.* // Биофармацевт. журн. 2012. Т. 4. № 1. С. 11–22.
17. *Stable Isotopes in the Life Sciences* / Ed. H.L. Crespi. Vienna: Internat. Atom. Energy Agency Press, 1977. 111–121 p.
18. *Денько Е.И.* // Усп. совр. биол. 1970. Т. 70. № 4. С. 41–49.
19. *Еремин В.А., Чекулаева Л.Н., Харатьян Е.Ф., Островский Д.Н.* // Микробиология. 1978. Т. 47. № 4. С. 629–636.
20. *Лобышев В.Н., Калиниченко Л.П.* Изотопные эффекты D₂O в биологических системах. М.: Наука, 1978. 120 с.
21. *Vertes A.* Physiological Effect of Heavy Water. Elements and Isotopes: Formation, Transformation, Distribution. Vienna, Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 2003. 112 p.
22. *Trotsenko Y.A., Khmelenina V.N., Beschastny A.P.* // Microbial Growth on C1 Compounds. Proc. 8th In-

- tern. Symp. / Eds. M.E. Lindstrom, F.R. Tabita. Boston: Kluwer Acad. Publ., 1995. P. 24–26.
23. Karnaukhova E.N., Reshetova O.S., Semenov S.Y., Skladnev D.A., Tsygankov Y.D. // *Amino Acids*. 1994. V. 6. № 2. P. 165–176.
 24. Skladnev D.A., Tsygankov Y.D. // *Conversion of Stable Isotope Labeled Methanol to Components of Bacterial Biomass*. 6 th Eur. Conf. of Biomass for Energy, Athens: Elsevier, 1991. P. 234–235.
 25. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Швеиц В.И. // *Биотехнология*. 1996. № 3. С. 3–12.
 26. Складнев Д.А., Мосин О.В., Егорова Т.А., Еремин С.В., Швеиц В.И. // *Биотехнология*. 1996. № 5. С. 25–34.
 27. Мосин О.В., Складнев Д.А., Швеиц В.И. // *Изв. РАН. Сер. биол.* 1999. № 4. С. 1–10.
 28. Мосин О.В., Казаринова Л.А., Преображенская К.А., Складнев Д.А., Чеботаев Д.В., Юркевич А.М., Швеиц В.И. // *Биотехнология*. 1996. № 4. С. 19–27.
 29. Мосин О.В., Карнаухова Е.Н., Пшеничникова А.Б., Складнев Д.А., Акимова О.Л. // *Биотехнология*. 1993. № 9. С. 16–20.
 30. Мосин О.В., Складнев Д.А., Егорова Т.А., Швеиц В.И. // *Биоорганич. химия*. 1996. Т. 22. № 10–11. С. 856–869.
 31. Зорина А.В., Бабусенко Е.С. // *Современные проблемы биотехнологии микроорганизмов. Тезисы докл. молодых ученых*. Рига: Зинятне, 1988. С. 35–40.
 32. Caprioli R.M. *Continuous-flow Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry*. N.Y.: Wiley, 1990. 125 p.

Microbiological Synthesis of [²H]-Inosine with a High Degree of Isotopic Enrichment by the Gram-Positive Chemoheterotrophic Bacterium *Bacillus subtilis*

O. V. Mosin^a, V. I. Shvets^a, D. A. Skladnev^b, and I. Ignatov^c

^a Lomonosov State University of Fine Chemical Technology, Moscow, 117571 Russia

e-mail: mosin-oleg@yandex.ru

^b State Research Center of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, 113545 Russia

e-mail: genetika@genetika.ru

^c Scientific Research Center of Medical Biophysics, Sofia, 1111 Bulgaria

e-mail: mbioph@dir.bg

Received May 11, 2012

Abstract—A ²H-labeled purine ribonucleoside inosine was microbiologically synthesized (yield, 3.9 g/L of culture liquid) using a deuterium-adapted strain of the gram-positive chemoheterotrophic bacterium *Bacillus subtilis*, cultivated in a heavy water medium with a high degree of deuteration (99.8 at % ²H) containing 2% hydrolysate of deuterated biomass of the methylotrophic bacterium *Brevibacterium methylicum* as a source of ²H-labeled growth substrate produced in an M9 minimal medium with 98% ²H₂O and 2% [²H]-methanol. The inosine extracted from the culture liquid of the producer strain was fractionated by adsorption (desorption) on an activated carbon surface, extraction with 0.3 M ammonium–formate buffer (pH 8.9), subsequent crystallization in 80% ethanol, and ion exchange chromatography on a column with AG50WX 4 cation exchange resin equilibrated with 0.3 M ammonium–formate buffer containing 0.045 M NH₄Cl. Fast atom bombardment (FAB) mass spectrometry demonstrated incorporation of five deuterium atoms in the inosine molecule (62.5% ²H), three of which were contained in the ribose moiety and two in the hypoxanthine moiety.

УДК 579.87:579.222.2:579.252.5:622'17

ДЕСТРУКЦИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ ШТАММОМ *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7, ВЫДЕЛЕННЫМ ИЗ ОТХОДОВ СОЛЕДОБЫВАЮЩЕГО ПРЕДПРИЯТИЯ

© 2013 г. Д. О. Егорова, Е. С. Корсакова, В. А. Демаков, Е. Г. Плотникова

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081

e-mail: peg@iegm.ru

Поступила в редакцию 28.06.2012 г.

Исследована деструкция ароматических углеводородов штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7, выделенным из техногенно-минеральных образований предприятия БКРУ1 ОАО «Уралкалий» (г. Березники, Пермский край). Показано, что *R. wratislaviensis* КТ112-7 осуществляет утилизацию высоких концентраций о-фталевой кислоты (о-ФК) (8 г/л), бензойной кислоты (БК) (3.4 г/л) и растет на о-ФК, БК, бифениле при содержании NaCl в среде культивирования до 75, 90 и 100 г/л соответственно. На основании анализа метаболического профиля и нуклеотидных последовательностей генов *bphA1*, *benA* и *phlB* установлено, что штамм КТ112-7 осуществляет разложение о-ФК через стадии образования 3,4-дигидроксифталевой и 3,4-дигидроксибензойной кислот, разложение бифенила – через БК и далее, при низких концентрациях NaCl (до 50 г/л) через образование 4-гидроксибензойной кислоты с последующим ее окислением, а при высоких концентрациях NaCl (от 60 г/л) – путем прямого окисления бензойной кислоты до катехола. Полученные данные указывают на перспективность использования штамма-деструктора *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7 при разработке новых биотехнологий, направленных на утилизацию (трансформацию) ароматических соединений, в том числе в условиях повышенной минерализации.

DOI: 10.7868/S0555109913030070

В результате промышленной деятельности человека увеличивается поступление в окружающую среду моно(поли)ароматических углеводородов и их производных, которые устойчивы к внешним воздействиям, обладают токсичностью и канцерогенными свойствами [1], что представляет существенную опасность для здоровья человека и биосферы в целом. Большое количество таких соединений обнаруживается в отходах горнодобывающих производств, в том числе в глинисто-солевых шламах, избыточных (маточных) рассолах, образующихся в результате промышленной разработки Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (Пермский край) [2]. Высокий уровень загрязнения в процессе добычи калийных солей обусловлен использованием в технологическом цикле обогащения калийных руд целой гаммы реагентов: оксигетилированных жирных кислот, нефтепродуктов, диоксановых спиртов и других соединений. При подобной комплексной нагрузке (поллютанты и высокий уровень минерализации) возникают условия для формирования уникальных микробиоценозов. Микробные сообщества и индивидуальные микроорганизмы, способные выживать в условиях осмотического стресса и разлагать широкий спектр ароматических соединений, вызывают повышенный интерес у исследователей [3].

Анализ литературы показывает, что способность к трансформации и утилизации моно(поли)ароматических соединений в условиях повышенной солености среды встречается среди бактерий различных таксономических групп [3, 4]. Рассматривается вопрос об использовании бактерий-деструкторов в биоремедиации загрязненных (засоленных) почв. Наиболее перспективными претендентами для таких многофакторных биоэкологических являются актинобактерии рода *Rhodococcus*. Кроме того, что родококки проявляют деградирующую активность к самому широкому спектру ароматических соединений, они обладают способностью адаптироваться к экстремальным условиям существования [4–7]. В то же время встречаются лишь единичные сообщения о разложении и использовании ароматических соединений в качестве субстратов штаммами рода *Rhodococcus* в условиях повышенной минерализации [4–6]. В связи с вышеизложенным, изучение родококков, выделенных из экотопов с экстремальными экологическими нагрузками (в том числе, химическая загрязненность, высокая минерализация, климатические факторы), представляет особый интерес.

Цель работы – изучение особенностей разложения моно(поли)ароматических соединений штаммом *Rhodococcus wratislaviensis* КТ112-7, вы-

деленным из шламоохранилища соледобывающего предприятия.

МЕТОДИКА

Объект исследования. Штамм КТ112-7 был выделен методом накопительного культивирования из техногенно-минеральных образований (ТМО) предприятия БКРУ1 ОАО “Уралкалий” (г. Березники, Пермский край). Образец ТМО был отобран с глубины 10 см шламоохранилища. Накопительная культура была получена путем инкубирования 1 г образца в 100 мл минеральной среды Раймонда (МСР) [8], содержащей о-фталевою кислоту (о-ФК) (1 г/л) и NaCl (3 г/л), в условиях, описанных ранее [4]. Из накопительной культуры путем высева на агаризованную МСР, содержащую о-ФК (1 г/л) и NaCl (3 г/л), были выделены 8 штаммов бактерий-деструкторов. Чистоту культур контролировали по однородности колоний при высева на агаризованную богатую среду Раймонда (БСР), в качестве которой использовали МСР с добавлением 5 г/л триптона и 2.5 г/л дрожжевого экстракта. ПЦР-анализ изолятов при использовании праймеров, комплементарных консервативным повторяющимся внегенным полиндромным последовательностям бактериальной ДНК [9], показал, что все они имеют одинаковый набор ПЦР-продуктов (данные не показаны). Для дальнейших исследований был отобран один из штаммов, обозначенный КТ112-7.

Определение таксономического положения изолированного штамма. Морфологические и физиологические свойства штамма КТ112-7 изучали по общепринятым методикам [10]. Амплификацию нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК проводили, как описано ранее, с использованием бактериальных праймеров 27F и 1492R [11]. Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК определяли с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL (“Applied Biosystems”, США). Полученные нуклеотидные последовательности были проанализированы с использованием программы CLUSTAL X 1.83 [12]. Поиск гомологичных последовательностей производили по базам данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и EzTaxon (<http://www.eztaxon.org>).

Рост на ароматических углеводородах. Способность штамма КТ112-7 разлагать ароматические углеводороды оценивали путем культивирования на агаризованной МСР при 28°C с добавлением в качестве источника углерода и энергии моно(поли)ароматических углеводородов (“Fluka”, США). Фенантрен, нафталин, бифенил, бензол, толуол и фенол помещали на крышку перевернутой чашки Петри; о-ФК, бензойную кислоту (БК), 2-гидроксibenзойную кислоту (ГБК), 4-ГБК, 2,5-ГБК и 3,4-ГБК вносили в среду до конечной концентра-

ции 1 г/л. Способность штамма расти на вышеперечисленных субстратах оценивали по образованию колоний диаметром более 2 мм. Для исключения ложноположительного результата осуществляли высева штамма на агаризованную МСР без внесения органического субстрата.

Рост штамма на ароматических углеводородах оценивали также при культивировании в жидкой МСР, не содержащей NaCl, при условиях, описанных ниже. о-ФК, БК, бензол, бифенил, нафталин вносили до конечной концентрации 1 г/л. Оптическую плотность (ОП) культуральной жидкости определяли на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini (“Shimadzu”, Япония) при 600 нм в кювете толщиной 10 мм.

Рост штамма при изменении осмолярности среды или концентрации субстрата. Ростовые характеристики штамма изучали в периодической культуре при выращивании в колбах Эрленмейера объемом 250 мл в 100 мл жидкой среды при 28°C и аэрации на круговой качалке со скоростью 180 об/мин: 1) в БСР без NaCl и при содержании соли до 120 г/л; 2) в МСР, не содержащей NaCl, с внесением в качестве субстрата о-ФК до конечной концентрации от 1.0 до 8.0 г/л, и БК – от 0.4 до 5.0 г/л; 3) в МСР с БК (0.5 г/л), о-ФК (1 г/л) или бифенилом (1 г/л), и NaCl в концентрации от 10 до 120 г/л (интервал между концентрациями NaCl – 10 г).

Утилизация о-ФК и БК. Концентрацию о-ФК и БК в среде при периодическом культивировании штамма КТ112-7 определяли методом ВЭЖХ в культуральной жидкости, освобожденной от клеток (центрифуга miniSpin, “Eppendorf”, Германия, 9660 g, 3 мин), как описано [13].

Деструкция бифенила, БК и о-ФК. Деструкцию проводили с отмытыми клетками. Бактериальную культуру выращивали в жидкой МСР с соответствующим субстратом (1 г/л) при 28°C до $OP_{600} = 1.0$. Отмытые дважды в МСР клетки (1 мл, $OP_{600} = 2.0$) переносили во флаконы с тефлоновыми крышками. Бифенил добавляли до конечной концентрации 100 мг/л, БК и о-ФК – до 500 мг/л, хлорид натрия – до концентрации от 10 до 60 г/л (интервал концентраций – 10 г). Флаконы встряхивали на круговой качалке (180 об/мин) при 28°C. Анализ количества бифенила проводили методом ГХ-МС в гексановых экстрактах [13]; анализ БК, о-ФК и продуктов деструкции – методами ВЭЖХ и спектрофотометрии, как описано [13, 14]. Концентрацию веществ рассчитывали согласно калибровочных графиков.

Статистическая обработка результатов. Все эксперименты были выполнены в трехкратной повторности. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных пакетов компьютерных программ Microsoft Excel.

Анализ функциональных генов. Амплификацию функциональных генов с использованием тотальной ДНК штамма КТ112-7 [5] и праймеров, представленных в табл. 1 осуществляли на приборе MyCycler (“Bio-Rad Laboratories”, США) при условиях, приведенных в публикациях (табл. 1) [5, 15–24]. Анализ продуктов амплификации и документирование полученных результатов осуществляли, как описано ранее [5]. Секвенирование ампликонов и анализ нуклеотидных последовательностей осуществлялся, как описано выше.

Метаболические пути бифенила, БК и о-ФК. Пути разложения бифенила, БК и о-ФК штаммом КТ112-7 анализировали, основываясь на базах данных Brenda (<http://www.brenda-enzymes.info>), KEGG (<http://www.genome.jp>), ExplorEnz (<http://www.enzyme-database.org>), GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), с учетом экспериментальных результатов по метаболическому профилю и исследованию функциональных генов.

Плазмидная ДНК. Наличие плазмидной ДНК выявляли методом пульс-электрофореза с использованием прибора CHEF DR II (“Bio-Rad Laboratories”, США). Штамм выращивали в 10 мл БСР без внесения NaCl, или в 10 мл МСР, содержащей 10 мг/мл NaCl и один из углеводов (о-ФК, БК, бифенил (1 г/л)), до ОП₆₀₀ = 1.0. Клетки осаждали центрифугированием (9660 g, 3 мин) и отмывали дважды в ТЭ-буфере (10 мМ трис/HCl, pH 7.6; 1 мМ ЭДТА, pH 8.0). Агарозные блоки готовили согласно рекомендациям производителя (“Bio-Rad Laboratories”, США). Блоки обрабатывали лизоцимом (1 мг/мл) при 37°C в течение 5–16 ч, протеиназой К (1 мг/мл) – при 50°C в течение 12–18 ч, нуклеазой S1 (5 ед. на агарозный блок) – при 37°C, 3.5 ч. Электрофорез образцов осуществляли в 1%-ном агарозном геле (Pulsed Field Certified Agarose, “Bio-Rad Laboratories”, США) в 0.5 ТБЭ-буфере (108 г трис, 55 г борная кислота, 40 мл 0.5 М ЭДТА, до 1 л H₂O) при 14°C, 6 В/см, время пульсации от 60 с до 120 с, в течение 24 ч. Гель окрашивали бромистым этидием (0.5 мг/л, 10 мин) и фотографировали в ультрафиолете с использованием системы гель-документации (“Bio-Rad Laboratories”, США). Размер внехромосомальной ДНК оценивали в сравнении с электрофоретической подвижностью маркера молекулярных масс “DNA Size Markers – Yeast Chromosomal” (“Bio-Rad Laboratories”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика штамма КТ112-7. Штамм выделен из техногенно-минеральных образований калийного производства (г. Березники, Пермский край) путем накопительного культивирования на о-ФК (см. Методику). При инкубировании в течение 3 сут на агаризованной БСР штамм КТ112-7

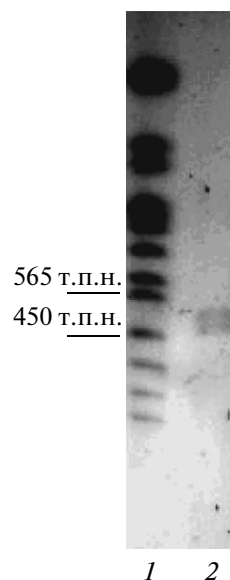


Рис. 1. Электрофореграмма плазмидных ДНК штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7, выращенного на БСР: 1 – маркер молекулярных масс “DNA Size Markers – Yeast Chromosomal” (“Bio-Rad Laboratories”, США), 2 – плазмидные ДНК штамма КТ112-7.

образует округлые, матовые, светло-розовые колонии размером 1–3 мм. Клетки штамма грамположительные, неподвижные, не образуют спор, каталазоположительные, с трехстадийным морфогенетическим циклом развития. Штамм растет при температуре 10–45°C с оптимумом роста 28°C. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рНК штамма КТ112-7, размером 1400 п.н., показал 100% сходство с аналогичным геном типового штамма *Rhodococcus wratislaviensis* NCIMB 13082^T (GenBank Z37138). На основании морфо-физиологических и молекулярно-генетических признаков на настоящем этапе работы штамм идентифицирован как *Rhodococcus wratislaviensis*.

В клетках штамма КТ112-7, выращенных на БСР, методом пульс-электрофореза обнаружено две мега-плазмиды размером около 470 т.п.н. и 500 т.п.н. (рис. 1), сопоставимые по размеру с мега-плазмидами рRHL2 (443 т.п.н.) и рRHL3 (332 т.п.н.) активного деструктора ароматических соединений *R. jostii* RHA1 [25]. Стоит отметить, что плазмидный профиль штамма КТ112-7 не изменялся при культивировании как в полноценной среде, так и на ароматических субстратах: бифенил, БК, о-ФК (данные не показаны).

Так как штамм КТ112-7 был выделен из отходов соледобывающего производства, нами исследованы возможности штамма расти в условиях повышенной минерализации среды. При культивировании в БСР штамм был способен расти как без NaCl, так и при концентрации соли до 105 г/л.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные при ПЦР-анализе функциональных генов штамма *R. wratistlaviensis* KT112-7

Ген (праймеры)	Фермент	Нуклеотидная последовательность праймеров	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.	Литература	Амплификация с ДНК штамма KT112-7
<i>tdcC</i>	Толуол диоксигеназа (КФ 1.14.12.11)	F: 5'-CGGGTGGGCTTACGACACCCGGCCGGAATCT-3' R: 5'-TCCAGCCCGCTCCACGCTACSSCAGACGGTT-3'	560	[15]	+
<i>xylM</i> , (<i>Tol</i>)	Ксилол монооксигеназа (КФ 1.14.15.-)	F: 5'-TGAGGCTGAACTTACGTAGA-3' R: 5'-CTCACCTGGAGTTGCGTAC-3'	475	[16]	-
<i>C23O</i> , (<i>cat238</i>)	Катехол 2,3-диоксигеназа (КФ 1.13.11.2)	F: 5'-CGACCTGATCTCCATGACCCGA-3' R: 5'-TCAAGTCCAGCAGCGTCA-3'	238	[17]	-
<i>clcA</i>	Хлоркатехол 1,2-диоксигеназа (КФ 1.13.11.1)	F: 5'-ACGAGTCATGGATAAACGA-3' R: 5'-TTGCGTTGCTCGGCCCTGCTCA-3'	720	[18]	+
<i>benA</i>	Бензоат диоксигеназа (α-субъединица) (КФ 1.14.12.10)	F: 5'-GCCACGAGAGCCAGATPCCS-3' R: 5'-GGTGGCGGCTAGTTCAGTGTG-3'	521	[18]	+
<i>bphA1</i> , (<i>bphA</i>)	Бифенил диоксигеназа (α-субъединица) (КФ 1.14.12.18)	F: 5'-AAGGCCGCGGACTTCAATGAC-3' R: 5'-TGCTCCGCTCGGAACTTCC-3'	452	[16]	+
<i>bphB</i>	2,3-дигидрокси 2,3-дигидробифенил дегидрогеназа (КФ 1.3.1.56)	F: 5'-ATGTGGCATCGAAGCACGC-3' R: 5'-CGCGAGGCTAGCAAGGCA-3'	253	[19]	+
<i>bphC</i>	бифенил 2,3-диол 1,2-диоксигеназа (КФ 1.13.11.39)	F: 5'-CGCTTTCATAACCAAG-3' R: 5'-TCAAGCTGGCCGCGG-3' (модифицированные)	700	[20]	+
<i>bphD</i>	ГОФДК-гидролаза (КФ 3.7.1.8)	F: 3'-CCGCACTACCAGAAAGTTCTAC-5' R: 5'-TTACGGCTGCCGAGGAAGTCAATC-3'	857	[21]	+
<i>bphK</i>	Глутатион S-трансфераза (КФ 2.5.1.18)	F: 5'-ATGAACTTACTACAGCCCTGGT-3' R: 5'-TCACTCCTTGATCAAGCCCTCG-3'	612	[21]	-
<i>bphH/bphJ</i>	2-гидроксипента-2,4-диеноат гидратаза/ацетальдегид дегидрогеназа (КФ 4.2.1.-/КФ 1.2.1.10)	F: 5'-GCCGTGAAGCCGTTACAGTCAAG-3' R: 5'-ACGGGCTGGAGTGTCAACTG-3'	1669	[21]	-
<i>febA</i>	4ХБК-КоА-лигаза (КФ 6.2.1.33)	F: 5'-AACTGATCCCGCCGAGACAATTC-3' R: 5'-AGGCATTTTCGAGACGCTTCA-3'	599	[22]	-
<i>febB</i>	4ХБК-КоА-деталогеназа (КФ 3.8.1.6)	F: 5'-GGTCCAGCGAGCGAAATCCAGTCC-3' R: 5'-CCCCCGCACACCCGATCAAG-3'	599	[22]	-
<i>pcaH</i> (<i>Pto3.4</i>)	Протокатехат 3,4-диоксигеназа (β-субъединица) (КФ 1.13.11.3)	F: 5'-GCSCSCTSGAGCCSAACCTTC-3' R: 5'-GCCCGSAGSACGATRTCGAA-3'	336	[23]	-
<i>phlAa</i> , (<i>phlA</i>)	Фталат 3,4-диоксигеназа (α-субъединица) (КФ 1.14.12.-)	F: 5'-GTACGCACTGGCATGATTC-3' R: 5'-GCCGTTGATTTCTCTCGTTGTAGC-3'	1258	[24]	-
<i>phlB</i>	Фталат 3,4-дегидрогеназа (КФ 1.3.1.-)	F: 5'-GGAGCAGGTTCCGGTATCCGG-3' R: 5'-ACTTCCAGCCACATACAG-3'	445	[24]	+
<i>narAa</i> (<i>GN1</i>)	Нафталин 1,2-диоксигеназа (α-субъединица) (КФ 1.14.12.12)	F: 5'-RAAGGTTTGCAYGACG-3' R: 5'-GTCTGTGGATGATGCTC-3'	1930	[5]	-

Установлена прямая корреляционная зависимость между повышением концентрации соли в среде и увеличением продолжительности лаг-фазы роста (до 245 ч при 105 г/л NaCl). Величина максимальной оптической плотности культуры при этом уменьшалась незначительно (с 2.08 отн. ед. до 1.87 отн. ед.). Скорость экспоненциального роста культуры (μ) составляла 0.06–0.04 ч⁻¹, время удвоения (t_d) 11.5–16.2 ч. Полученная закономерность вероятно обусловлена адаптационными процессами, протекающими в клетках штамма. Известно, что увеличение концентрации NaCl выше 3% приводило к изменениям в строении клеточной стенки штамма *Rhodococcus erythropolis* DCL14 и снижению его ростовых параметров [6].

Биодеградационный потенциал штамма KT112-7. Показано, что штамм KT112-7 обладает широкой субстратной специфичностью и способен расти на ароматических углеводородах и продуктах их разложения, используя их в качестве единственного источника углерода и энергии (табл. 2).

При выращивании штамма в жидкой среде наиболее эффективный рост был отмечен при культивировании на о-ФК, БК и бифениле (рис. 2). Рост штамма при использовании в качестве субстрата о-ФК и бифенила наблюдался практически без подготовительной фазы роста, в то время как при выращивании культуры на нафталине или бензоле рост культуры начинался только через 168 и 237 ч соответственно. Удельная скорость роста при культивировании на бифениле ($\mu = 0.040 \pm 0.003$ ч⁻¹), о-ФК и БК ($\mu = 0.050 \pm 0.004$ ч⁻¹) незначительно отличалась от таковой при культивировании штамма на бензоле и нафталине ($\mu = 0.030 \pm 0.007$ ч⁻¹).

Изучена способность штамма расти при содержании высоких концентраций о-ФК и БК в среде (рис. 3). С увеличением количества субстрата в среде происходило накопление биомассы штамма, оптическая плотность при выращивании на 8 г/л о-ФК или на 3.4 г/л БК достигала ОП₆₀₀ = 2.2. Однако характер роста культуры на данных субстратах отличался. Увеличение концентрации о-ФК приводило к повышению удельной скорости роста (от 0.050 ± 0.002 до 0.070 ± 0.003 ч⁻¹), снижению времени удвоения культуры (от 13.8 ± 0.1 до 9.6 ± 0.1 ч) и практически не влияло на продолжительность подготовительной фазы роста. В отличие от ряда штаммов рода *Pseudomonas* штамм KT112-7 рос при высоких концентрациях о-ФК (до 8 г/л) [26, 27]. При этом удельная скорость роста на сопоставимых концентрациях субстрата у исследуемого штамма была в два раза ниже, что может быть обусловлено метаболическими и физиологическими особенностями псевдомонад и родококков.

Повышение концентрации БК приводило к увеличению подготовительной фазы роста, а динамика изменения ростовых параметров носила

Таблица 2. Рост штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 на МСР на ароматических углеводородах

Субстрат	Рост*	Субстрат	Рост
Бензол	++++	4-ГБК	+++
Толуол	++	2,5-ГБК	+++
Фенол	++	3,4-ГБК	++
о-ФК	++++	Бифенил	++++
БК	++++	Нафталин	++++
2-ГБК	–	Фенантрин	–

* Диаметр колоний: “+” – до 1 мм, “++” – “+++” – 1–2 мм, “++++” – больше 2 мм, “–” – рост отсутствует.

обратный характер. Максимальная удельная скорость роста наблюдалась при минимальной концентрации субстрата и составляла 0.24 ± 0.02 ч⁻¹, при концентрации БК в диапазоне 0.8–1.7 г/л удельная скорость роста составляла 0.05 ± 0.01 ч⁻¹, при 2.5–3.4 г/л БК – 0.01 ± 0.002 ч⁻¹. При содержании в среде БК в концентрации 4.2–5.0 г/л рост культуры не был зафиксирован, но отмечалось потемнение среды, что свидетельствовало о частичной трансформации бензоата, предположительно, до производных катехола. Полученные результаты для штамма KT112-7 были сопоставимы с данными для штамма *Halomonas campisalis* ATCC 700597 и не уступали штаммам родов *Pseudomonas* и *Alcaligenes*, культивируемых при соответствующих концентрациях бензоата [28].

Таким образом, нами обнаружено, что кинетика ростовых параметров штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 при культивировании при различных

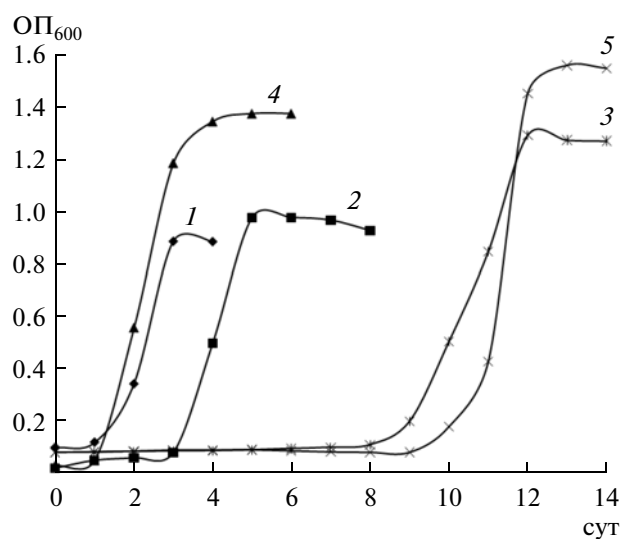


Рис. 2. Рост штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 в МСР на ароматических углеводородах: 1 – о-ФК, 2 – БК, 3 – бензол, 4 – бифенил, 5 – нафталин.

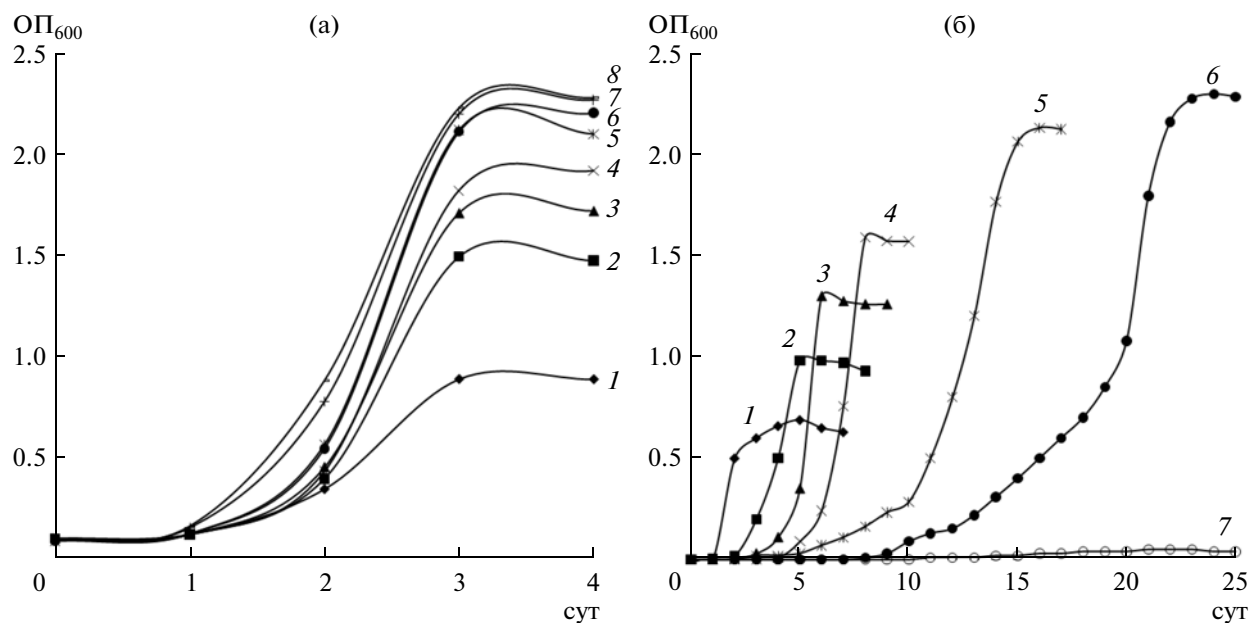


Рис. 3. Рост штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 в МСР на о-ФК (а) и БК (б) (г/л): (а) 1 – 1, 2 – 2, 3 – 3, 4 – 4, 5 – 5, 6 – 6, 7 – 7, 8 – 8; (б) 1 – 0.4, 2 – 0.8, 3 – 1.3, 4 – 1.7, 5 – 2.5, 6 – 3.4, 7 – 4.2.

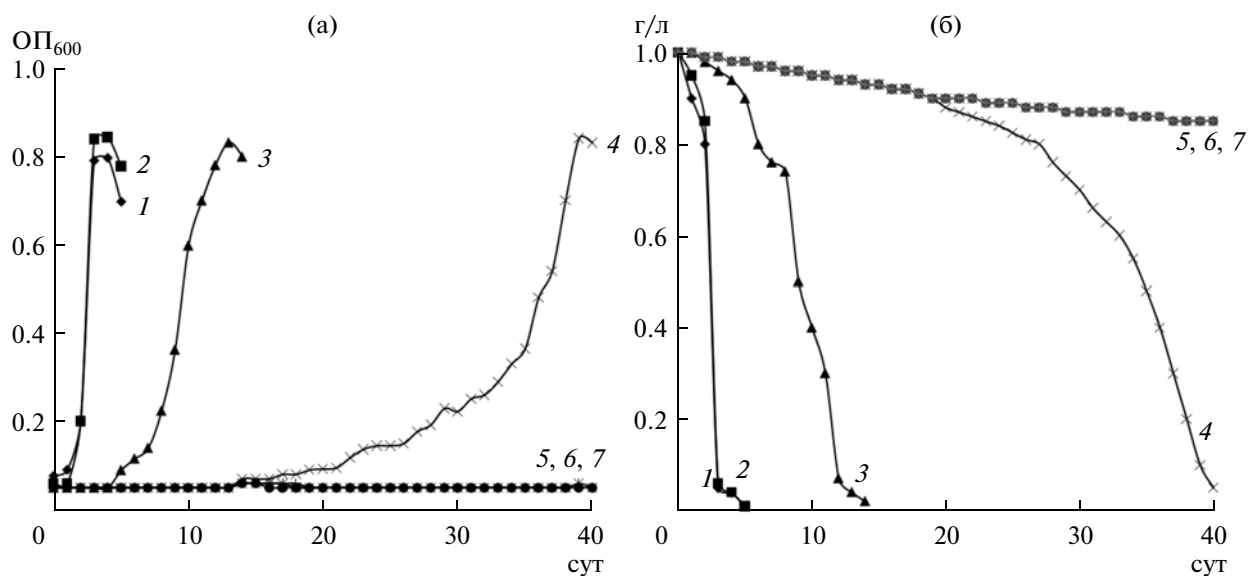


Рис. 4. Рост штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 в МСР на о-ФК (а) и убыль субстрата (б) при различных концентрациях NaCl (%): 1 – 0, 2 – 3, 3 – 7, 4 – 9, 5 – 10, 6 – 11, 7 – 12.

концентрациях о-ФК и БК носит разнонаправленный характер.

Деструкция ароматических углеводов при разной солености среды. В минеральной среде Раймонда с о-ФК в качестве единственного источника углерода и энергии исследуемый штамм способен к росту при содержании до 90 г/л NaCl (рис. 4). Повышение концентрации соли в среде приводило к значительному увеличению подготовительной фазы роста (24–480 ч), снижению

удельной скорости роста (от 0.050 ± 0.004 до 0.006 ± 0.001 ч⁻¹), но практически не сказывалось на максимальной плотности культуры. Отмечена корреляционная зависимость между ростом культуры и убылью о-ФК ($r = -0.92$).

Анализ культуральной среды в экспериментах с отмытыми клетками показал присутствие трех метаболитов разложения о-ФК (табл. 3). С повышением содержания NaCl в среде отмечалось уве-

Таблица 3. Разложение о-ФК штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 при разной концентрации NaCl

NaCl, %	Время, ч	Деструкция, %	Метаболиты		
			3,4-ГФК*, ОП ₃₀₉ , ед.	3,4-ГБК, мг/л	катехол, мг/л
0	2	78.3 ± 0.1	0.372	н.д.**	н.д.
	24	99.9 ± 0.1	0.374	н.д.	н.д.
3	2	80.1 ± 0.2	0.336	н.д.	26.5 ± 0.2
	24	93.2 ± 0.2	0.371	15.2 ± 0.2	59.1 ± 0.1
5	2	79.6 ± 0.4	0.315	н.д.	41.9 ± 0.1
	24	90.5 ± 0.3	0.377	88.8 ± 0.2	30.4 ± 0.1
6	2	75.8 ± 0.4	0.421	92.0 ± 0.3	268.5 ± 0.4
	24	86.6 ± 0.3	0.376	66.9 ± 0.1	167.6 ± 0.3

* 3,4-ГФК – 3, 4-дигидроксифталева кислота, ** н.д. – не детектировалось.

личение концентрации интермедиатов и снижение уровня деструкции субстрата.

При культивировании штамма КТ112-7 в МСР с БК в качестве субстрата рост штамма наблюдался при содержании в среде до 75 г/л NaCl (рис. 5). Подготовительная фаза роста была сопоставима с таковой при культивировании на о-ФК при аналогичных концентрациях соли в среде. Повышение концентрации NaCl приводило к снижению максимальной оптической плотности культуры (ОП₆₀₀ = 0.65 – 0.45) и уменьшению удельной скорости роста (от 0.23 ± 0.01 до 0.040 ± 0.005 ч⁻¹). Рост штамма КТ112-7 сопровождался убылью субстрата ($r = -0.93$).

Основные метаболиты деструкции БК штаммом КТ112-7 установлены в опытах с отмытыми

клетками (табл. 4). При высоком содержании соли (60 г/л) был обнаружен только катехол и снижался уровень деструкции БК. При концентрации NaCl до 50 г/л зафиксировано образование катехола, 4-ГБК и 3,4-ГБК в качестве промежуточных соединений.

В условиях, когда источником углерода и энергии являлся бифенил, штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 был способен расти в присутствии NaCl в концентрации до 100 г/л (рис. 6). Продолжительность подготовительной фазы роста находилась в прямой зависимости от количества NaCl в среде. Максимальная оптическая плотность культуры с увеличением концентрации соли снижалась (ОП₆₀₀ = 1.4 – 0.9). Удельная скорость роста была сопоставима с аналогичным показателем при культивировании на о-ФК и соответствующими

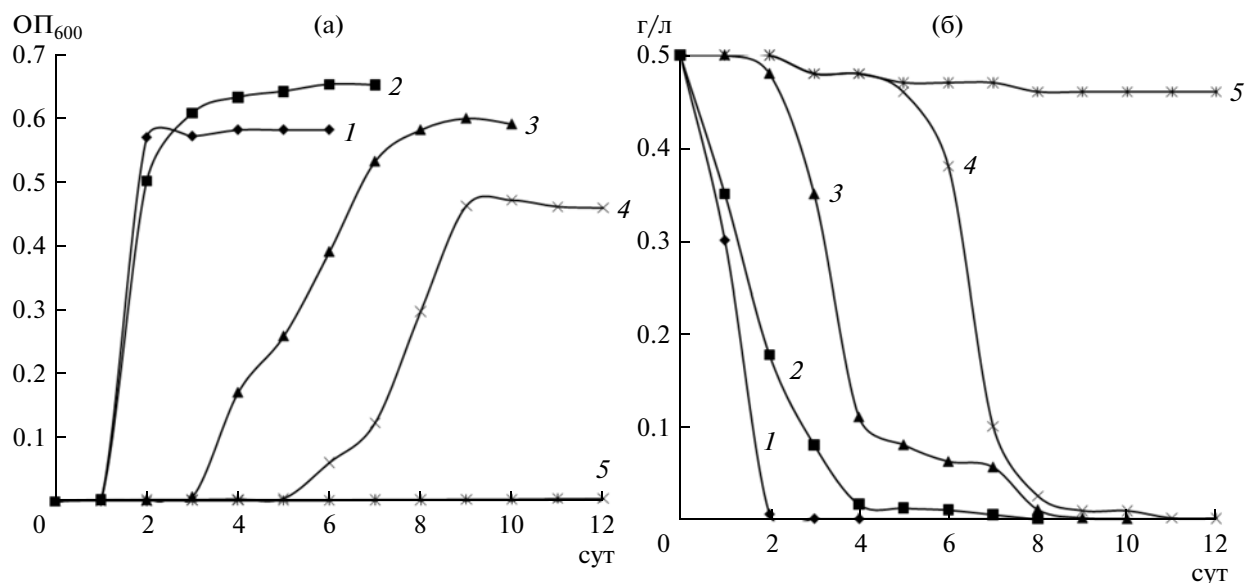


Рис. 5. Рост штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 в МСР на БК (а) и убыль субстрата (б) при различных концентрациях NaCl (%): 1 – 0, 2 – 3, 3 – 6, 4 – 7.5, 5 – 9.

Таблица 4. Разложение БК штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 при разной концентрации NaCl

NaCl, %	Время, ч	Деструкция, %	Метаболиты, мг/л		
			4-ГБК	3,4-ГБК	катехол
0	2	81.3 ± 0.3	27.7 ± 0.3	н.д.*	н.д.
	24	99.9 ± 0.1	5.4 ± 0.2	8.84 ± 0.4	2.3 ± 0.1
3	2	65.4 ± 0.2	14.2 ± 0.1	н.д.	52.7 ± 0.2
	24	92.3 ± 0.2	6.9 ± 0.1	3.2 ± 0.2	27.5 ± 0.1
5	2	66.4 ± 0.4	27.1 ± 0.3	9.4 ± 0.2	71.4 ± 0.1
	24	87.3 ± 0.2	37.4 ± 0.2	15.5 ± 0.5	86.8 ± 0.2
6	2	62.0 ± 0.3	н.д.	н.д.	110.8 ± 0.4
	24	85.4 ± 0.4	н.д.	н.д.	136.1 ± 0.3

* н.д. — не детектировалось.

щем содержания NaCl в среде (от 0.040 ± 0.003 до 0.009 ± 0.001 ч⁻¹).

В опытах с отмытыми клетками установлено, что эффективность деструкции бифенила не изменялась при содержании NaCl до 40 г/л и составляла 100% (различия лежат в пределах интервала достоверности). Дальнейшее увеличение концентрации хлорида натрия в среде приводило к снижению уровня деструкции до 60–67% (табл. 5). Анализ метаболитов, обнаруженных методом ВЭЖХ, показал, что начальные этапы трансфор-

мации субстрата (разложение бифенила до БК) не зависят от солёности среды. При дальнейшей трансформации образовавшегося метаболита (БК) до соединений основного обмена, как и в случае культивирования на БК, зафиксированы различия в спектре метаболитов при повышении концентрации соли в среде (табл. 5).

Полученные данные об отрицательном влиянии повышения концентрации соли в среде на эффективность деструкции ароматических соединений у *R. wratislaviensis* КТ112-7 согласуются и с результатами, обнаруженными при культивировании других бактерий в условиях различной минерализации среды [4, 6, 28–30]. Так, увеличение концентрации NaCl от 50 до 100 г/л приводило к снижению скорости деструкции БК штаммом *Halomonas campisalis* ATCC700597 в 1.7 раза [28]. При культивировании штамма *Pseudomonas fluorescens* В-1 в диапазоне концентраций NaCl от 0 до 35‰, максимальная скорость деструкции н-бутил бензил фталата отмечена при 15‰ NaCl [29]. Значительное снижение эффективности деструкции бифенила штаммом *Dyella ginsengisoli* LA-4 отмечено при превышении 30 г/л NaCl в среде [30]. Таким образом, штамм КТ112-7 активно разлагает о-ФК и бифенил при более высоком содержании NaCl в среде, чем описанные бактерии.

Функциональные гены деструкции ароматических соединений. Путем выявления ключевых генов, контролирующих разложение ароматических углеводов, был исследован генетический потенциал штамма-деструктора *R. wratislaviensis* КТ112-7. В табл. 1 приведены результаты амплификации при использовании праймеров, сконструированных для обнаружения генов деструкции ряда моно(поли)ароматических соединений.

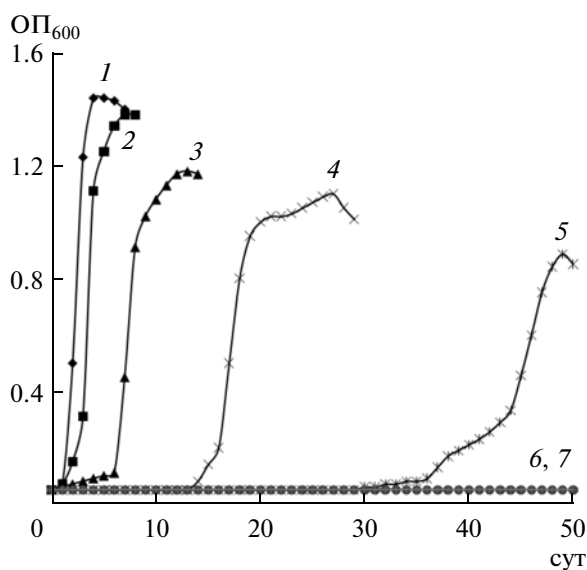


Рис. 6. Рост штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 в МСР на бифениле при различных концентрациях NaCl (%): 1 – 0, 2 – 3, 3 – 7, 4 – 9, 5 – 10, 6 – 11, 7 – 12.

Таблица 5. Разложение бифенила штаммом *R. wratislaviensis* КТ112-7 при разной концентрации NaCl

NaCl, %	Время, ч	Деструкция, %	Метаболиты, мг/л				
			ГОФДК, ОП ₄₃₄ , ед.	БК	4-ГБК	3,4-ГБК	Катехол
0	2	11.4 ± 0.01	0.034	1.15 ± 0.02	н.д.*	н.д.	н.д.
	24	100	н.д.	0.97 ± 0.03	3.76 ± 0.04	9.98 ± 0.04	4.6 ± 0.1
1	2	97.9 ± 0.01	0.134	1.26 ± 0.02	1.0 ± 0.2	н.д.	0.4 ± 0.1
	24	99.4 ± 0.05	0.121	1.16 ± 0.02	21.3 ± 0.1	1.26 ± 0.04	16.0 ± 0.2
2	2	79.9 ± 0.02	0.133	9.2 ± 0.1	8.6 ± 0.3	н.д.	н.д.
	24	98.1 ± 0.09	0.149	11.6 ± 0.1	4.1 ± 0.3	н.д.	1.75 ± 0.05
3	2	93.0 ± 0.1	0.241	27.8 ± 0.1	11.7 ± 0.1	н.д.	3.9 ± 0.2
	24	99.8 ± 0.02	0.045	30.6 ± 0.2	1.53 ± 0.1	4.36 ± 0.02	4.35 ± 0.1
4	2	98.1 ± 0.05	0.230	21.3 ± 0.2	6.24 ± 0.2	н.д.	н.д.
	24	100	0.175	12.7 ± 0.1	19.8 ± 0.1	н.д.	3.67 ± 0.03
5	2	25.6 ± 0.04	0.139	16.2 ± 0.1	н.д.	н.д.	1.4 ± 0.1
	24	66.9 ± 0.05	0.161	3.6 ± 0.4	6.7 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.2 ± 0.1
6	2	40.5 ± 0.04	0.145	6.9 ± 0.4	н.д.	н.д.	1.8 ± 0.4
	24	58.4 ± 0.08	0.256	6.1 ± 0.3	н.д.	н.д.	1.6 ± 0.3

* н.д. — не детектировалось.

Показано, что при использовании праймеров к генам *clcA*, *benA*, *bphA1*, *bphB*, *bphC*, *bphD*, *phtB* с тотальной ДНК штамма КТ112-7 получены ампликоны, соответствующие по размеру фрагментам генов референтных нуклеотидных последовательностей. Результаты позволяют предположить наличие у штамма КТ112-7 генов, кодирующих хлоркатехол 1,2-диоксигеназу (КФ 1.13.11.1), бензоат 1,2-диоксигеназу (КФ 1.14.12.18), бифенил 2,3-диоксигеназу (КФ 1.14.12.18), бифенил дигидродиол-дегидрогеназу (КФ 1.3.1.56), бифенил-2,3-диол 1,2-диоксигеназу (КФ 1.13.11.39), гидроксико-фенилгексадиеноат-гидролазу (КФ 3.7.1.8), фталат-3,4-дегидрогеназу (КФ 1.3.1.-).

Нами были получены и проанализированы нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов генов *bphA1*, *benA* и *phtB* штамма КТ112-7. Наибольшее сходство фрагмента гена *bphA1* (99%) наблюдалось с геном *bphA1* штамма-деструктора бифенила (полихлорированных бифенилов) *Rhodococcus* sp. P1 (GenBank FJ752167). Сходство гена *bphA1* штамма КТ112-7 с аналогичными последовательностями известного деструктора полихлорированных бифенилов *R. jostii* RHA1 (GenBank CP000432.1) составляло 95%. Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена *benA* штамма КТ112-7 показал, что наибольший уровень сходства (98%) наблюдался с аналогичными участками гена бензоат 1,2-диоксигеназы деструкторов ароматических соединений

R. jostii RHA1 (GenBank AB055706.1) и *Rhodococcus* sp. DK17 (GenBank EU833983.1). Наибольший уровень сходства (97%) фрагмента гена *phtB* штамма КТ112-7 отмечен с геном нафталин-дигидродиол-дегидрогеназы штамма *Rhodococcus opacus* B4 (GenBank AP011117.1).

Метаболические пути деструкции бифенила, о-ФК и БК у штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7. Анализ соединений, образующихся при культивировании штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 на о-ФК, БК и бифениле (табл. 3–5), а также анализ функциональных генов (табл. 1) позволил представить вероятную схему метаболических путей деструкции данных соединений у исследуемого штамма (рис. 7). Разложение бифенила осуществляется по классическому пути, через стадию образования 2-гидроксо-6-оксо-фенилгекса-2,4 диеновой кислоты (ГОФДК) до расщепления молекулы бифенила на пентадиеновую и бензойную кислоты. Такой путь описан для большинства известных деструкторов бифенила, в том числе наиболее изученных *Burkholderia xenovorans* LB400 и *R. jostii* RHA1 [31].

Известно, что разложение о-ФК аэробными бактериями может осуществляться через стадию образования 3,4-дигидроксо- или 4,5-дигидроксофталевой кислоты, каждая из которых далее трансформируется до 3,4-дигидроксibenзойной кислоты [27]. На основании анализа метаболитов нами показано, что штамм КТ112-7 осуществляет

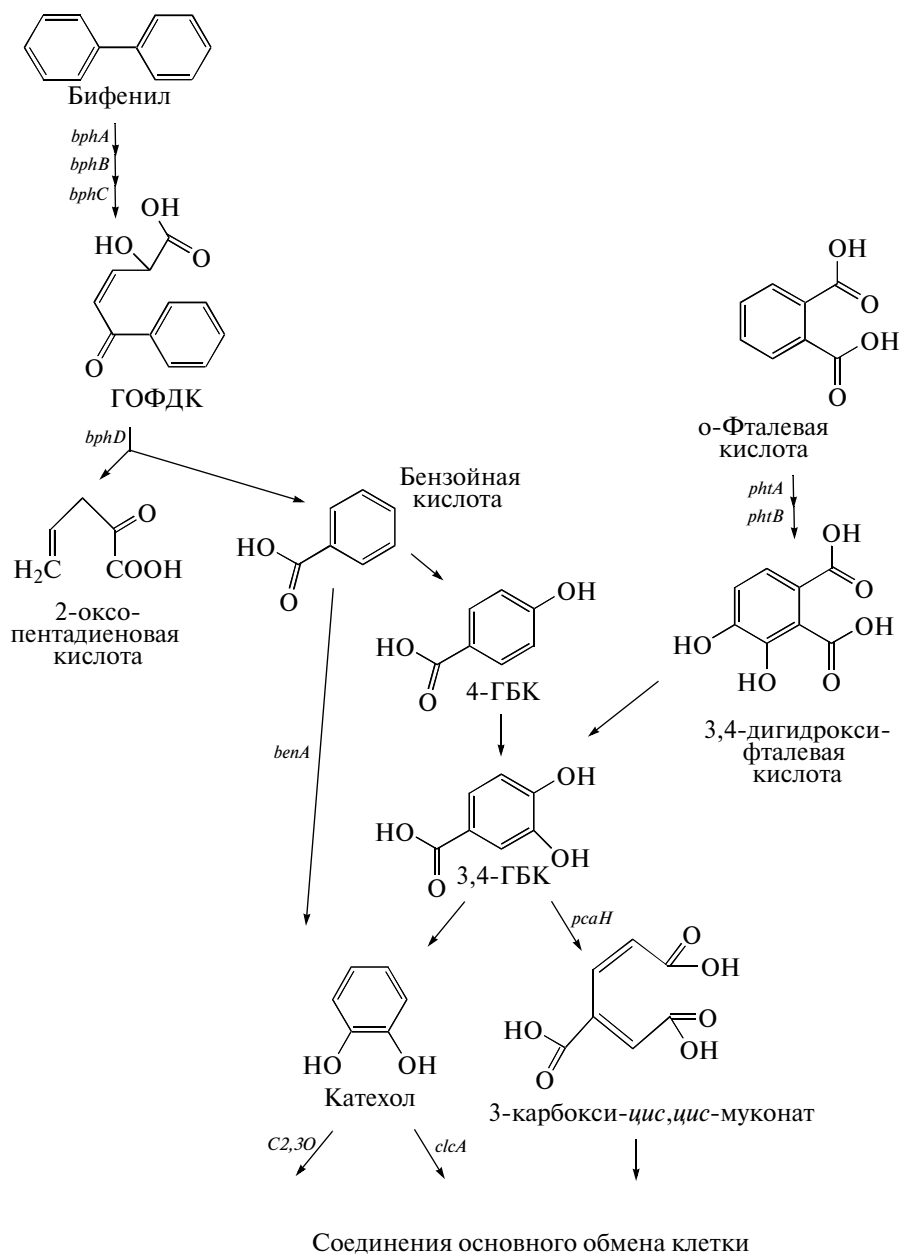


Рис. 7. Схема метаболических путей разложения бифенила, БК и о-ФК штаммом *R. wratislaviensis* KT112-7. Выделены соединения и гены, детектированные в настоящем исследовании.

разложение о-ФК через 3,4-дигидроксифталевою кислоту. Данное предположение подтверждает и тот факт, что в результате специфичной амплификации получен фрагмент гена *phtB*, кодирующий фталат-3,4-*цис*-дигидродиол дегидрогеназу (табл. 1). В работе [27] представлен путь трансформации о-ФК, в котором 3,4-дигидроксибензойная кислота, один из основных метаболитов, окисляется протокатехат 3,4-диоксигеназой (КФ 1.13.11.3) до 3-карбоксии-*цис*, *цис*-муконовой кислоты. Однако отсутствие специфичной амплификации с праймерами к гену *pcaH* позволяет предположить, что у

штамма KT112-7 разложение образующейся 3,4-ГБК идет по пути, отличному от описанного для штаммов *Pseudomonas* sp. PPD, *P. aeruginosa* PP4 и *Acinetobacter lwoffii* ISP4 [27].

Интересный результат получен при анализе метаболического пути разложения БК (как самостоятельного субстрата, так и метаболита бифенила) штаммом KT112-7 (табл. 4, 5, рис. 7). ВЭЖХ-анализ показал присутствие в среде 4-гидроксибензойной, 3,4-дигидроксибензойной кислот и катехола. При этом при высоких концентрациях соли (60 г/л), для которых отмечено снижение

эффективности деструкции бифенила, среди возможных метаболитов бензойной кислоты фиксировался только катехол. Мы предполагаем, что в штамме *R. wratislaviensis* КТ112-7 присутствуют два метаболических пути разложения бензоата и при высоком уровне осмотической нагрузки на клетки штамма активируется только классический путь трансформации БК [3, 7]. Известно, что окисление БК до катехола осуществляется бензоат 1,2-диоксигеназой (ген *benA*). С ДНК исследуемого штамма амплифицирован фрагмент гена *benA*, характеризующийся высоким уровнем гомологии с геном бензоат 1,2-диоксигеназы – известных деструкторов *R. jostii* RHA1 и *Rhodococcus* sp. DK17.

Анализ литературы и баз данных показал, что среди бактерий метаболический путь, при котором БК под действием бензоат 4-монооксигеназы (КФ 1.14.13.12) окисляется до 4-ГБК, встречается крайне редко и описан для ряда штаммов рода *Pseudomonas* [32] и для штамма *Burkholderia* sp. 383 (GenBank CP 000152). Стоит отметить, что у штамма *Burkholderia* sp. 383 трансформация БК осуществляется последовательно путем образования 4-ГБК, 3,4-ГБК и катехола (<http://www.genome.jp>). В результате проведенного исследования нами впервые для штаммов рода *Rhodococcus* описан путь разложения БК через стадию образования 4-ГБК.

Окисление 4-ГБК до 3,4-ГБК описано для широкого круга бактерий [3, 7]. Присутствие среди метаболитов 3,4-ГБК и катехола (табл. 3–5), а также тот факт, что у штамма КТ112-7 отсутствовала специфичная амплификация с праймерами к гену протокатехат 3,4-диоксигеназы (табл. 1), позволяет предположить, что трансформация 3,4-ГБК происходит путем декарбоксилирования (<http://www.brenda-enzymes.info>).

Известно, что разложение катехола осуществляется бактериями по пути орто- или мета-расщепления [7]. Анализ функциональных генов показал, что в клетках штамма КТ112-7 может присутствовать фермент пути мета-расщепления катехола – хлоркатехол 1,2-диоксигеназа (табл. 1). Стоит отметить, что у штаммов *Pseudomonas* sp. XP-M2 и *P. putida* КТ2440, активно разлагающих БК, так же выявлено наличие хлоркатехол 1,2-диоксигеназы, но не катехол 2,3-диоксигеназы [33, 34].

Таким образом, штамм *R. wratislaviensis* КТ112-7 обладает уникальным сочетанием путей разложения ароматических соединений и способен осуществлять эффективную деструкцию о-ФК, БК и бифенила в условиях высокой солености среды. Полученные результаты позволяют рекомендовать данный штамм для использования в биотехнологиях утилизации (трансформации) ароматических соединений в условиях повышенной минерализации.

Авторы выражают благодарность Гусеву В.А. и Шишкину М.А. (ИЭГМ УрО РАН) за помощь в исследовании образцов деструкции бифенила методом газохроматографического масс-спектрометрического анализа.

Исследования поддержаны Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” (проект № 01201256872), грантом РФФИ-Урал № 11-04-96028-р_урал_а, междисциплинарным проектом УрО РАН № 01201252808.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp17.html>.
2. Бачурин Б.А., Одинцова Г.А. // Горн. информ.-аналит. бюлл. 2009. № 7. С. 374–380.
3. Le Borgne S., Paniagua D., Vazquez-Duhalt R. // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 15. № 2–3. P. 74–92.
4. Плотникова Е.Г., Рыбкина Д.О., Ананьина Л.Н., Ястребова О.В., Демаков В.А. // Экология. 2006. № 4. С. 261–268.
5. Anan'ina L.N., Yastrebova O.V., Demakov V.A., Plotnikova E.G. // Antonie van Leeuwenhoek. 2011. V. 100. № 2. P. 309–316.
6. de Carvalho C.C.C.R. // Res. Microbiol. 2012. V. 163. № 2. P. 125–136.
7. Solyanikova I.P., Travkin V.M., Rybkina D.O., Plotnikova E.G., Golovleva L.A. // J. Environ. Sci. Health. Part B. 2008. V. 43. № 3. P. 241–252.
8. Raymond R.L. // Develop. Ind. Microbiol. 1961. V. 2. № 1. P. 23–32.
9. Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J., Lupski J.R. // Methods Cell. Mol. Biol. 1994. V. 5. № 1. P. 25–40.
10. Методы общей бактериологии / Ред. Ф. Герхардт, Р. Мюррей, Р. Костилоу, Ю. Нестер, В. Вуд, Н. Криг, Г. Филиппс. М.: Мир, 1983. Т. 1. С. 16–89, 277–511; 1984. Т. 2. С. 283–373; 1984. Т. 3. С. 8–97.
11. Tiitola M.A., Mannisto M.K., Puhakka J.A., Kulomaa M.S. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 1. P. 173–180.
12. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. // Nucleic Acids. Res. 1994. V. 22. № 22. P. 4673–4680.
13. Егорова Д.О., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 644–650.
14. Eaton R.W. // J. Bacteriol. 2001. V. 183. № 12. P. 3689–3703.
15. Paniker G., Mojib N., Aislabie J., Bej A.K. // Antonie van Leeuwenhoek. 2010. V. 97. № 3. P. 275–287.
16. Baldwin B.R., Nakatsu C.H., Nies L. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. № 6. P. 3350–3358.
17. Mesarch M.B., Nakatsu C.H., Nies L. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 2. P. 678–683.
18. Baggi G., Bernasconi S., Zangarossi M., Cavalca L., Andereoni V. // Int. Biodeter. Biodegrad. 2008. V. 62. № 1. P. 57–64.
19. Jouanneau Y., Meyer C. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. № 7. P. 4726–4734.

20. Xu S., Ju J., Misono H., Ohnishi K. // Gene. 2006. V. 368. № 1. P. 126–137.
21. Hong Q., Dong X., He L., Jiang X., Li S. // Int. Biodeter. Biodegrad. 2009. V. 63. № 4. P. 365–370.
22. Rodrigues J.L.M., Kachel C.A., Aiello M.R., Qensen J.F., Maltseva O.V., Tsoi T.V., Tiedje J.M. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. № 4. P. 2476–2482.
23. García M.T., Ventosa A., Mellado E. // FEMS Microbiol. Ecol. 2005. V. 54. № 1. P. 97–109.
24. Stingley R.L., Brezna B., Khan A.A., Cerniglia C.E. // Microbiology. 2004. V. 150. № 11. P. 3749–3761.
25. Vedler E. // Megaplastids and the degradation of aromatic compounds by soil bacteria. Microbial Megaplastids / Ed. E. Schwartz. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. P. 33–53.
26. Murad S., Hasan F., Shah A.A., Hameed A., Ahmed S. // Pakist. J. Bot. 2007. V. 39. № 5. P. 1833–1841.
27. Vamsee-Krishna C., Mohan Y., Phale P.S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 72. № 6. P. 1263–1269.
28. Oie C.S.I., Albaugh C.E., Peyton B.M. // Water Res. 2007. V. 41. № 6. P. 1235–1242.
29. Xu X.-R., Li H.-B., Gu J.-D. // Ecotoxicol. Environ. Safety. 2007. V. 68. № 3. P. 379–385.
30. Li A., Qu Y., Zhou J., Gou M. // J. Environ. Sci. 2009. V. 21. № 2. P. 211–217.
31. Pieper D.H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 67. № 2. P. 170–191.
32. Reddy C.C., Vaidyanathan C.S. // Arch. Biochem. Biophys. 1976. V. 177. № 2. P. 488–498.
33. Xie N., Tang H., Feng J., Tao F., Ma C., Xu P. // Biochem. Eng. J. 2009. V. 46. № 1. P. 79–82.
34. van Duuren J.B.J.H., Wijte D., Leprince A., Karge B., Puchałka J., Wery J., dos Santos V.A.P.M., Eggink G., Mars A.E. // J. Bacteriol. 2011. V. 156. № 3. P. 163–172.

Destruction of Aromatic Hydrocarbons by the *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 Strain Isolated from Waste Products of a Salt-Mining Factory

D. O. Egorova, E. S. Korsakova, V. A. Demakov, and E. G. Plotnikova

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences,
ul. Pushkina 1-57, Perm, 614000 Russia*

Received June 28, 2012

Abstract—The destruction of aromatic hydrocarbons by the *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 strain isolated from technogenic mineral waste products of the BKRU1 Uralkalii factory has been investigated (city of Berezniki, Perm krai). The *R. wratislaviensis* KT112-7 was shown to utilize increased concentrations of *o*-phthalic (*o*-PA) (8 g/L) and benzoic (BA) (3.4 g/L) acids. The strain grows with *o*-FA, BA, and biphenyl at a NaCl content of up to 50, 90, and 75 g/L in the culture medium, respectively. Based on an analysis of the metabolic profile and nucleotide sequences of the *bphA1*, *benA*, and *phtB* genes, the KT112-7 strain was established to decompose *o*-PA via the formation of 3,4-dihydroxyphthalic and 3,4-dihydroxybenzoic acids. The decomposition of biphenyl is carried out via the formation of BA and then at low concentrations of NaCl (up to 50 g/L) via the formation of 4-hydroxybenzoic acid followed by its oxidation; at high concentrations of NaCl (over 60 g/L), via the direct oxidation of benzoic acid with the production of catechol. These data indicate that the *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 destructor strain is a promising strain for the development of new biotechnologies directed at the utilization (transformation) of aromatic compounds, including under the conditions of increased mineralization.

UDC 576.80

METAL SOLUBILIZATION FROM POWDERED PRINTED CIRCUIT BOARDS BY MICROBIAL CONSORTIUM FROM BAUXITE AND PYRITE ORES

© 2013 N. N. Adhapure*, S. S. Waghmare**, V. S. Hamde***, and A. M. Deshmukh*

*Department of Microbiology, Dr. Babasaheb Ambedkar Marathwada University, Osmanabad 413 501 (M.S.) India

**Department of Microbiology, Fergusson College, Pune (M.S.) India

***Department of Microbiology, Yogeshwari College, Ambajogai, Dist Beed (M.S.) India

e-mail: adhapurenn@gmail.com

Received June 27, 2012

With the current rapid developments in technology, there is an increasing accumulation of outdated electronic equipment. The primary reason for this increase is the low rate of recycling due to the complex nature of such waste. Bioleaching offers a promising solution for this problem.

Study was conducted on the solubilization of heavy metals from electronic waste (e-waste). For this purpose, a microbial consortium from bauxite and pyrite ore samples was obtained using a simple “top down” approach. Essentially, printed circuit boards (PCB) were obtained and used as representative samples of e-waste. Various concentrations (1–5%) of PCB powder were subjected to bioleaching, and the effects on metal solubilization, changes in pH and concentration of ferrous iron produced were assessed. It was observed that a maximum of 96.93% Cu and 93.33% Zn was solubilized by microbial consortium from 10 g/l of PCB powder, whereas only 10.26% Ni was solubilized from 30 g/l of PCB powder. For lead, only 0.58% solubilization was achieved from 20 g/l of PCB powder. An analysis of the precipitate formed during bioleaching using scanning electron microscopy with energy dispersive x-ray analysis revealed the presence of Tin (59.96%), Cu (23.97%), Pb (9.30%) and Fe (5.92%).

DOI: 10.7868/S0555109913030033

Rapid advancements in technology have led to an increasing amount of electronic waste (e-waste), as older electronic equipment, such as computers and mobile phones, are discarded or approach the end of their usefulness. Interestingly, e-waste has a low level of recycling because its complex composition makes the separation of each component difficult.

It is believed that biotechnology is one of the most promising technologies in metallurgical processing. For many years, bioleaching has been used for the solubilization of metals from ores [1]. Bioleaching is useful for treating ores with low concentrations of metals; it is also simple and cheap to operate. It has been successfully applied toward the leaching of metals from ores, though it has not yet been commercially applied toward the recovery of metals from printed circuit boards (PCB) [2]. Several authors [2–7] have recently published studies on the bioleaching of metals from electronic waste. Xin and colleagues [8] and Mishra with coworkers [9] have reported attempts to extract metals from waste batteries.

The aim of the study was to formulate microbial consortium for solubilization of metals from waste PCB and evaluate its efficacy.

MATERIALS AND METHODS

Growth of consortium. The bioleaching consortium was selected using the simple “top down” approach following Rawlings and Johnson in 2007 [10]. In the “top down” approach (“see-who-wins” approach), a mixture of microorganisms is used to inoculate the test material (in laboratory or pilot-scale operations), and it is assumed that a limited number of these acidophiles will emerge as a stable and effective bioleaching consortium.

In the present investigation, the microorganisms were derived from natural environments. Bauxite (Radhanagari, Kolhapur, India) and pyrite (Chitradurga, India) ore samples were used as a source of acidophiles. The acidophiles were cultivated in modified 9K medium having composition (g/l): part A – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3.0; KCl – 0.20; K_2HPO_4 – 0.050; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.050; part B – $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 45. Part A was sterilized by autoclaving at 121°C for 15 min at 15 lb pressure and part B was sterilized by filtration using 0.25 μm filter (Merck Millipore, USA). After sterilization equal amount of part B was added to part A, aseptically. The pH of the medium (2.4) was adjusted using 1.0 N H_2SO_4 . The enriched acidophiles obtained from both the ore samples were mixed and again cultivated in the same medium. The obtained consortium was used for the bioleaching studies. The complete bi-

Chemical analysis of metals (%) in waste PCB powder

Metal	Solvent use for extraction*	
	aqua regia	nitric acid
Copper	19.10	28.68
Iron	0.002	0.002
Zinc	0.81	0.46
Lead	2.81	5.14
Nickel	0.042	0.432
Aluminum	1.383	Nil
Silver	0.0044	Nil
Chromium	0.029	0.0033
Manganese	0.0007	0.00133
Cadmium	Nil	Nil
Silicon	0.1678	N.D.
Calcium	2.8405	9.77

* N.D. – not performed; Nil – absence of metal.

oleaching experiments were carried out in non-sterile conditions to obtain a stable and compatible consortium and mimic the conditions of the commercial bioleaching process.

The individual organisms from the consortium were not purified. However, the presence of iron oxidizers and acidophilic heterotrophs was confirmed using solid Fe-TSB non-overlay medium [11]. The Fe-TSB non-overlay medium was prepared in 3 parts. Part A was prepared as follows: 0.36 g ammonium sulfate, 0.005 g di-potassium hydrogen phosphate, 0.14 g magnesium sulfate, and 0.070 g tryptone soya broth (TSB) was added to 140 ml of double distilled water in a 250-ml Erlenmeyer flask. The pH was adjusted to 2.3. For part B, 2.0 g of agarose was dissolved in 70 ml of double distilled water in a 150 ml conical flask and maintained at a neutral pH. Parts A and B were autoclaved at 121°C and 15 lbs of pressure for 15 min. For part C, 6.9 g of ferrous sulfate heptahydrate was added to 10 ml of double distilled water, pH 2.15–2.3, and the concentration of the final solution was 2.5 M. The solution was filter-sterilized using a 0.25- μ m filter (Merck Millipore, USA). A volume of 1.5 ml of part C was added to part A. Part B was added to the mixture of A and C, and the plates were poured. All reagents used were of analytical grade.

Preparation of the waste PCB sample. Printed circuit board assemblies (PCBA) were collected from a scrap market. The PCBA consisted of different electronic components, such as random access memory (RAM) chips, peripheral component interconnect (PCI) slot, condensers, transistors, heat sink, etc., attached to PCB. The PCB consisted of metals required for the functioning of electronic equipment and non-metallic support.

The attached plastic parts, including RAM, PCI slots, and chip slots were removed from the PCBA. The PCB were shredded using a file (a file is a metal and woodworking tool used to cut fine particles of material from a workpiece). The obtained powder was composed of metallic and nonmetallic components of varied composition (mainly epoxy or phenolic resin).

The powder was sieved using a –14/+20 mesh. It was not pretreated prior to the bioleaching studies.

Chemical analysis of the waste PCB powder. A chemical analysis of the waste PCB powder was conducted to determine the heavy metal content in it. The content was determined using 2 different methods:

I) Approximately 1.0 g of homogenized powder was added to 100 ml of aqua regia, heated at 100°C for 1 h, cooled and subsequently filtered through Whatman filter paper no. 1 (UK). The volume was increased to 100 ml with double distilled water. The prepared sample was used for the detection of heavy metals with an atomic absorption spectrophotometer (Perkin Elmer A Analyst 300, USA).

II) A few drops of HNO₃ were added to 1.0 g of homogenized powder in a 100-ml volumetric flask, and the volume was made to 100 ml with double distilled water. The sample was filtered with Whatman filter paper no. 1 prior to heavy metal analysis. The heavy metals were detected using method of atomic absorption spectroscopy.

Determining the metal solubilization ability and tolerance of the consortium. The metal solubilizing ability was determined using pure copper and solder. This metal adaptation increased the efficiency of the consortium in solubilizing the metals from PCB powder.

Solubilization of elemental copper. To determine the solubilization of elemental copper, we used 0.1–0.8% copper turnings of <0.5 mm in length and <0.05 mm in width. Copper turnings were added to a 500-ml Erlenmeyer flask containing 200 ml of modified 9K medium and a 15% inoculum of consortium. The flask was incubated at 30°C on a rotary shaker at 140 rpm for 10 days.

Solubilization of lead from solder. The solder was purchased from the market and shredded into pieces of 1–2 cm in length. Approximately 0.1% of these pieces were treated in the same way as copper chips.

Bioleaching of metals from PCB. PCB powder (10, 20, 30, 40 and 50 g/l) was added to separate 500-ml Erlenmeyer flasks containing 200 ml of non-sterile modified 9K medium previously adjusted to pH 2.4 and a 15% microbial consortium inoculum. The flasks were subsequently incubated at 30°C on a rotary shaker at 140 rpm for 10 days. Samples were collected every 48 h for 10 days to determine the pH, and the ferrous iron and soluble metal content. The pH was measured using a digital pH meter (Elico LI 127, India). The ferrous iron content was measured using phenyl anthranilic acid [12], and the soluble metal content (Cu, Pb, Zn and Ni) was detected using method of atomic absorption spectroscopy. After 240 h, the precipitate formed during bioleaching was collected, dried and

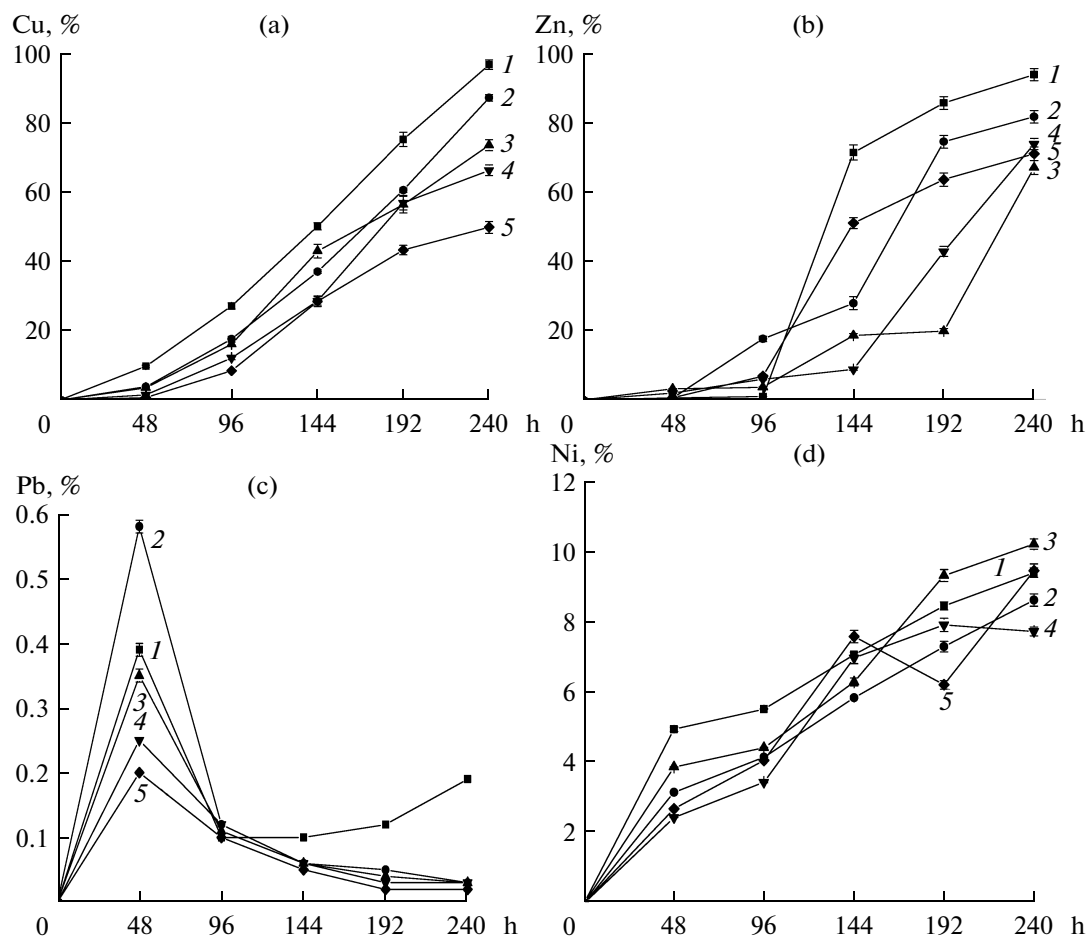


Fig. 1. Copper (a), zinc (b), lead (c) and nickel (d) mobilization under different concentrations of PCB powder (g/l: 1 – 10; 2 – 20; 3 – 30; 4 – 40; 5 – 50) relative to the time of incubation with microbial consortium. The data present the average of 3 replicates.

mounted on carbon-coated copper grids for scanning electron micrograph and energy dispersive X-ray analysis (SEM-EDAX). The micrographs were obtained using a JEOL (6360) JED-2300 analysis station (Japan) operating at 200 keV.

RESULTS AND DISCUSSION

Growth of microbial consortium. The objective of this study was to evaluate the solubilization of metals from PCB; therefore, the specificity of microorganisms that carried out this process was not important. However, the most efficient organisms for bioleaching were typically the most desirable. Because the process was conducted under non-sterile conditions, there was a continuous selection of more efficient microorganisms for the bioleaching system, which included the selection for genes present in the horizontal gene pool (e.g., genes for metal resistance) that might improve the efficiency of the resident microorganisms [10, 13, 14]. Furthermore, in many leaching experiments conducted in laboratories, minerals or e-waste were inoculated with a pure or defined mixture of cultures, and it was uncertain whether these organisms would be

competitive in the non-sterile conditions of the commercial bioleaching process [1].

The presence of iron oxidizers and acidophilic heterotrophs in microbial consortium obtained using a simple “top down” approach was confirmed using solid Fe-TSB non-overlay medium, which yielded reddish brown-colored colonies of iron oxidizers and off-white colored colonies of acidophilic heterotrophs.

Chemical analysis of the PCB. Chemical analysis of the PCB was performed to determine its heavy metal content. It was conducted using 2 different dissolving agents: aqua regia and nitric acid. The metals in the solution were detected by atomic absorption spectroscopy. The results obtained are given in table. When aqua regia was used as a dissolving agent, the major metals detected were copper (19.1%), lead (2.81%), aluminum (1.383%) and zinc (0.81%). When nitric acid was used as a solvent, the main metals revealed were copper (28.68%), lead (5.14%) and zinc (0.46%).

Aqua regia was a good solvent for the most metals, which were less soluble in nitric acid. However, copper and lead were more soluble in nitric acid than in aqua regia.

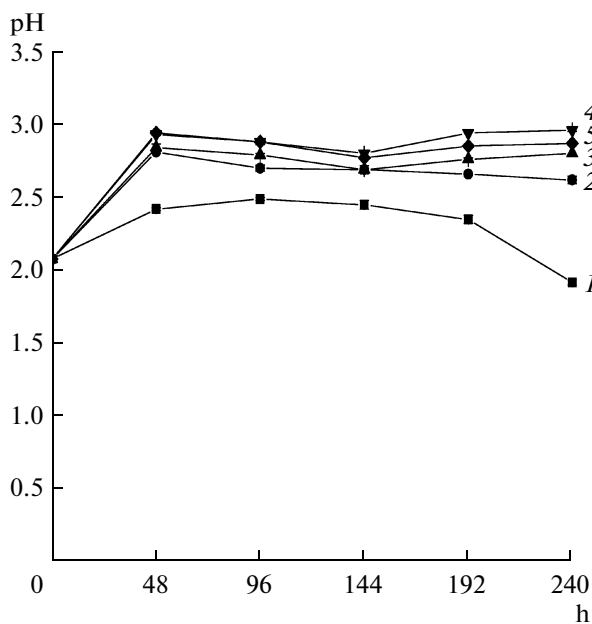


Fig. 2. Changes in pH under different concentrations of PCB powder (1 – 10; 2 – 20; 3 – 30; 4 – 40; 5 – 50 g/l) relative to the time of incubation with microbial consortium. The data present the average of 3 replicates.

Detection of metal solubilization ability and metal tolerance of microbial consortium.

In the pure metal solubilization experiments, it was observed that 0.8% (w/v) copper was completely solubilized (100% solubilization) by microbial consortium within 7 days. This result confirmed the copper bioleaching activity of the consortium and its tolerance to 0.8% (w/v) copper. In contrast, even 0.1% solder (w/v) did not get completely solubilized, and only 0.004% solubilization of lead was achieved in 10 days. These results demonstrated the high copper solubilization and poor lead solubilization ability of the microbial consortium used.

Bioleaching of PCB. The purpose of using a consortium of iron oxidizers and acidophilic heterotrophs was to provide natural conditions for the oxidation of iron. Acidophilic heterotrophs do not directly participate in iron oxidation but contribute to the stability of the mixed mineral-oxidizing population by consuming organic excretion products produced by mineral oxidizers [15].

The percent metal mobilization was determined from the higher values obtained in the chemical analysis of the corresponding metals, irrespective of the solvent used for dissolving the PCB powder.

We observed that the solubilization of Cu by microbial consortium after 240 h of incubation was 96.93, 87.34, 73.68, 66.42 and 49.93% at 10, 20, 30, 40 and 50 g/l of PCB powder in the medium, respectively (Fig. 1a). The dissolution of Zn after the same time reached 93.33, 81.23, 66.66, 73.45, 73.45 and 70.61% at 10, 20, 30, 40 and 50 g/l of PCB powder in the broth, respectively (Fig. 1b). The maximum

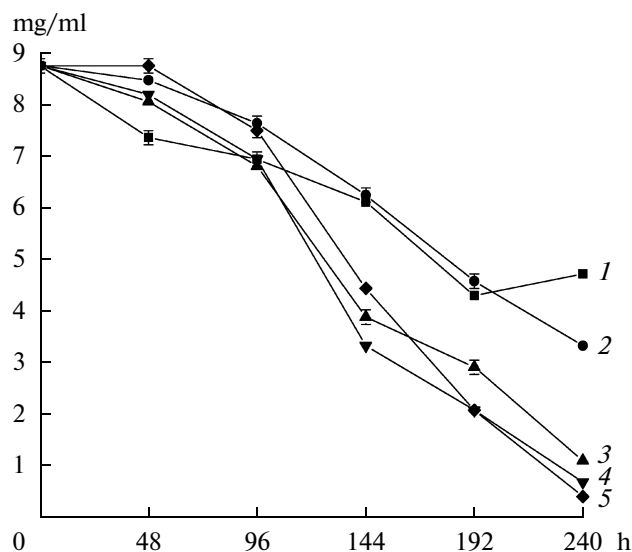


Fig. 3. Fe^{2+} amount under different concentrations of PCB powder (1 – 10; 2 – 20; 3 – 30; 4 – 40; 5 – 50 g/l) relative to the time of incubation with microbial consortium. The data present the average of 3 replicates.

solubilization of Pb during bioleaching after 48 h of incubation was 0.39, 0.58, 0.35, 0.25 and 0.20% at 10, 20, 30, 40 and 50 g/l of PCB powder in the broth, respectively (Fig. 1c). After 240 h the concentration of Pb in bioleachate amounted 0.19, 0.03, 0.03, 0.03 and 0.02% at 10, 20, 30, 40 and 50 g/l of PCB powder, respectively. The solubilization of Ni by microbial consortium after 240 h was 9.44, 8.66, 10.26, 7.76 and 9.50% at 10, 20, 30, 40 and 50 g/l of PCB powder in the medium, respectively (Fig. 1d).

During the bioleaching of the PCB powder, the solubilization of copper was achieved at a faster rate compared with the other metals (Fig. 1). The maximum copper solubilization (96.93%) and zinc (93.33%) was obtained at 10 g/l of PCB powder (Figs. 1a and 1b). The solubilization rate of these metals increased with time. In case of lead mobilization (Fig. 1c), the maximum mobilization (0.58%) was achieved when 20 g/l of PCB powder was used. Interestingly, the lead content slowly decreased with increasing incubation time, reaching 0.03%. However, when 10 g/l of PCB powder was used, the soluble lead content decreased during bioleaching from 2.038 mg/l (0.40%) to 0.520 mg/l (0.10%), and subsequently increased, reaching 0.998 mg/l (0.19%). One possible reason for the later increase would be the decreasing pH. Compared with the leaching of copper and zinc, the lead solubilization rate was low. The nickel solubilization was less compared with Cu and Zn. The highest dissolution achieved was 10.26% (Fig. 1d). Moreover, even at 50 g/l of PCB powder, the solubilization was 9.5%.

Brandl with coworkers [3] observed that at scrap concentrations of 5 and 10 g/l, *Thiobacilli* were able to leach more than 90% of the available Al, Cu, Ni and

Zn, but at higher scrap concentrations, metal solubilization was reduced, especially for Al and Cu.

According to Ilyas and colleagues [6], approximately 64, 80, 86 and 74% of Al, Zn, Cu and Ni, respectively, were leached out (in 300 days) using a mixed consortium of metal-adapted cultures of *Sulfobacillus thermosulfidoxidans* and the acidophilic heterotrophs.

During the bioleaching studies, the pH of the medium was continuously monitored as a change in pH affects the leaching efficiency [2]. The changes in pH during the metal solubilization by microbial consortium in this study are shown in Fig. 2. We observed that the pH of the medium increased initially due to the alkalinity of the PCB powder that corresponded to previous results [3] and subsequently decreased.

Fig. 3 shows the pattern of Fe^{2+} change during bioleaching. The results obtained demonstrated that when 10 g/l of PCB powder was used, the rate of Fe^{2+} oxidation (biological reaction) was minimal, but the rate of oxidation of copper and zinc by Fe^{3+} (chemical reaction) was maximal (Figs. 1a, 1b, 3). In contrast, when 50 g/l of PCB powder was used, the rate of Fe^{2+} oxidation was maximal, while the rate of oxidation of copper and zinc by Fe^{3+} was minimal. The rate of Fe^{2+} oxidation increased with increasing PCB powder concentration. Hence, it is rational to conclude that the PCB powder concentration stimulated Fe^{2+} oxidation (biological reaction) but adversely affected the rate of oxidation of copper and zinc by Fe^{3+} (chemical reaction).

Figs. 4a, 4b show the slope of the curves obtained in Figs. 1a, 1b, respectively. The largest positive slope obtained for Cu was at 192 h of incubation with microbial consortium when 40 g/l of PCB powder was used. In the case of Zn, the largest slope was observed at 144 h using 10 g/l of PCB powder. Because there was a continuous selection for microorganisms during bioleaching, the largest positive slope might suggest the point where the optimum consortium composition and pH for the bioleaching of PCB powder could be obtained. These results suggest that pH 2.94 and 2.45 could be the optimum pH for the solubilization of Cu and Zn, respectively (Fig. 2).

For the overall bioleaching efficiency, we observed that the microbial consortium used could solubilize up to 7620 mg/l of copper, 286 mg/l of zinc, 6 mg/l of lead and 21 mg/l of nickel. This result indicates not only the high metal tolerance of the consortium but also its high metal solubilization ability.

The mechanism for the dissolution of metals from PCB powder is similar to that of the metal sulfide [4]. Under acidic conditions, iron oxidizers use ferrous iron as an energy source and convert it to ferric iron. The last oxidizes zero valent metals present in the PCB powder and converts them to soluble forms (Equations 1 and 2) [2].

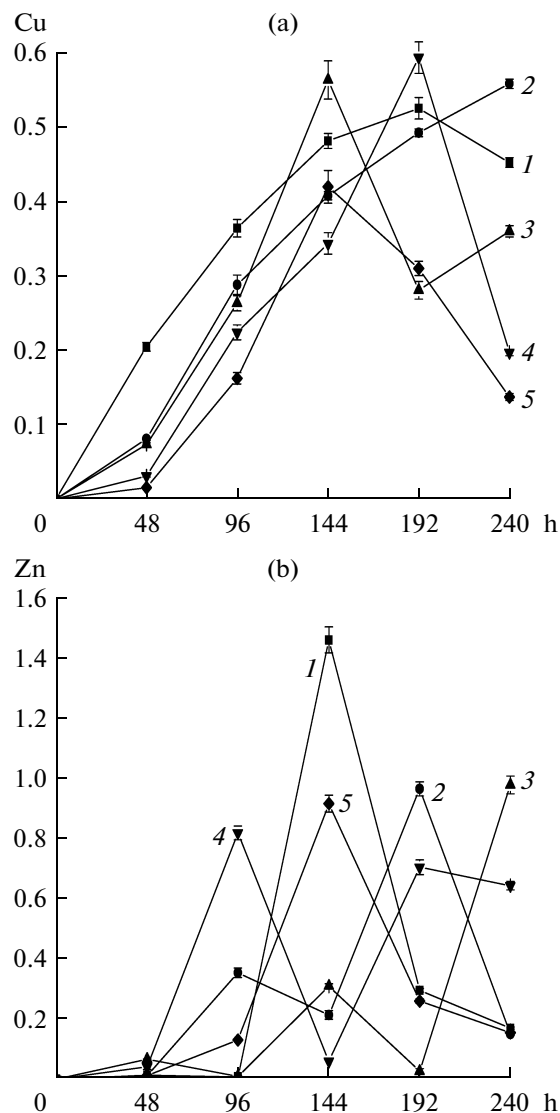
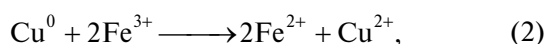
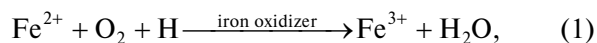


Fig. 4. Rate of change in copper (a) and zinc (b) mobilization under different concentrations of PCB powder (1 – 10; 2 – 20; 3 – 30; 4 – 40; 5 – 50 g/l), relative to the time of incubation with microbial consortium. The data present the average of 3 replicates.

$$G_r^{\circ} = -82.90 \text{ kJ/mol.}$$

A reddish brown-colored precipitate was formed during the bioleaching process (Fig. 5). After its analyzing using SEM-EDX, the presence of Sn, Cu and Pb was confirmed. The precipitate obtained in the bioleaching experiment was composed of Tin (59.96%), Cu (23.97%), Pb (9.30%) and Fe (5.92%). According to the previous reports, Pb and Sn were not detected in the leachate, rather these metals were speculated to be precipitated as PbSO_4 and SnO , respectively [3]. The presence of Pb and Sn was also confirmed by Ilyas with coworkers [6] through a mineralogical analysis of the precipitate, which also contained $0.65 \pm 0.08\%$ aluminum, $1.88 \pm 0.05\%$ copper, $2.5 \pm 0.07\%$ iron, $27.0 \pm 0.08\%$ lead, $0.22 \pm 0.005\%$

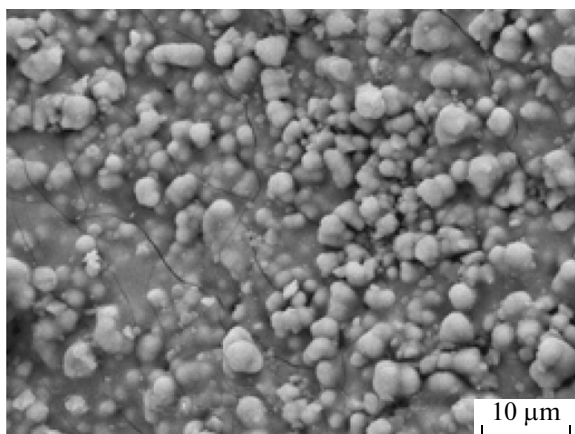
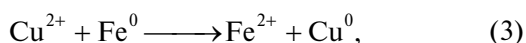


Fig. 5. Scanning electron micrograph of the precipitate formed during the bioleaching of the PCB powder.

nickel, $74 \pm 0.07\%$ tin and $0.10 \pm 0.01\%$ zinc. Choi and colleagues [4] observed the presence of 63% copper in the precipitate, though the copper content was minimized to approximately 18% by the addition of 1.0% citric acid.

The copper precipitation could occur due to a cementation reaction in which the presence of Fe, Zn or Al led to copper precipitation [16] as shown in Equation 1 [17]. The process of cementation generally recovers soluble copper from pregnant liquor following the addition of scrap iron after the bioleaching process is complete. In the present investigation, the precipitation of copper during bioleaching could be attributed to the presence of Fe, Zn or Al in the PCB powder, which could have led to the precipitation of copper, assuming that the rate of the solubilization of copper was faster than that of Fe, Zn or Al. Due to the faster solubilization of copper, dissolved copper would be cemented on Fe, Zn or Al. The occurrence of 'early cementation' also makes it difficult to distinguish whether any PCB powder is left after the completion of bioleaching experiment.



$$G_f^0 = -144.6 \text{ kJ/mol.}$$

From the present study, we concluded that bioleaching is a possible alternative for extracting metals from PCB.

The chemical analysis of the PCB powder was performed using two solvents: aqua regia and nitric acid. The combination of the two solvents provided more accurate results for the chemical analysis.

The present study revealed the effectiveness of the natural microbial consortium obtained from bauxite and pyrite ore samples in terms of leaching efficiency compared with the conventional use of pure cultures or a defined consortium. The microbial consortium used for metal solubilization was efficient, as 96.93% copper and 93.33% zinc solubilization was achieved in 240 h (with 10 g/l PCB powder). More importantly,

the consortium used in the present study would be competitive under the non-sterile conditions of the commercial bioleaching process.

These studies provide evidence for the presence of Sn and Pb in the precipitate. Hence, further studies should be conducted to avoid the precipitate formation. For this purpose, a consortium growing at $\text{pH} < 2.0$ could be useful because increased acidic conditions minimize precipitate formation. Using a consortium growing at $\text{pH} < 2.0$ might lead to an increase in leaching efficiency.

An alternative strategy needs to be developed to deal with the problem of 'early cementation.'

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Dr. P. Wakte, Mr. P. Sirdeshpande, Dr. S. Shaikh, Prof. Dr. D.B. Johnson and Prof. Dr. D.E. Rawlings for useful discussions during the investigation.

REFERENCES

1. Rawlings, D.E., *Ann. Rev. Microbiol.*, 2002, vol. 56, pp. 65–91.
2. Yang, T., Zheng, X., Wen, J., and Yang, L., *Hydrometallurgy*, 2009, vol. 97, no. 1–2, pp. 29–32.
3. Brandl, H., Bosshard, R., and Wegmann, M., *Hydrometallurgy*, 2001, vol. 59, no. 2, pp. 319–326.
4. Choi, M., Cho, K., Kim, D., and Kim, D., *J. Environ. Sci. Health, Part A: Environ. Sci. Eng. Toxic Hazard. Substances Control A.*, 2004, vol. 39, no. 11–12, pp. 2973–2982.
5. Ilyas, S., Anwar, M.A., Niazi, S.B., and Ghauri, M.A., *Hydrometallurgy*, 2007, vol. 88, no. 1–4, pp. 180–188.
6. Ilyas, S., Ruan, C., Bhatti, H.N., Ghauri, M.A., and Anwar, M.A., *Hydrometallurgy*, 2010, vol. 101, no. 3–4, pp. 135–140.
7. Wang, J., Bai, J., Xu, J., and Liang, B., *J. Hazard Mater.*, 2009, vol. 172, no. 2–3, pp. 1100–1105.
8. Xin, B., Zhang, D., Zhang, X., Xia, Y., Feng, W., Chen, S., and Li, L., *Biores. Technol.*, 2009, vol. 100, no. 24, pp. 6163–6169.
9. Mishra, D., Kim, D.J., Ralph, D.E., Ahn, J.G., and Rhee, Y.H., *Waste Manage.*, 2008, vol. 28, no. 2, pp. 333–338.
10. Rawlings, D.E. and Johnson, D.B., 2007, *Microbiology*, vol. 153, no. 2, pp. 315–324.
11. Johnson, D.B., Macvicar, J.H.M., and Rolfe, S., *J. Microbiol. Meth.*, 1987, vol. 7, no. 1, pp. 9–18.
12. Vogel, A.I., *Textbook of Quantitative Chemical Analysis*, 5th ed., London: Longman Group Ltd., 1989, pp. 287–310.
13. Tuffin, I.M., Hector, S.B., Deane, S.M., and Rawlings, D.E., *Microbiology*, 2005, vol. 151, pp. no. 9, 3027–3039.
14. Tuffin, I.M., Hector, S.B., Deane, S.M., and Rawlings, D.E., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, no. 3, pp. 2247–2253.
15. Harrison, Jr., A.P., *Annu. Rev. Microbiol.*, 1984, vol. 38, pp. 265–392.
16. Karavasteva, M., *Hydrometallurgy*, 2005, vol. 76, no. 1–2, pp. 149–152.
17. Ballor, N.R., Nesbitt, C.C., and Lueking, D.R., *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, vol. 93, no. 6, pp. 1089–1094.

УДК 577.15

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ЛИГНОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ, У ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

© 2013 г. Е. А. Шевченко, Е. А. Бессолицына, И. В. Дармов

Вятский государственный университет, Киров, 610000

e-mail: bess2000@mail.ru

Поступила в редакцию 28.02.2012 г.

Изучено более 20 видов трутовых грибов, выделенных в лесах Кировской области и не относящихся к классическим продуцентам лигнолитических ферментов, на наличие генов лигнинпероксидазы, лакказы и марганецпероксидазы. Выявлено 15 изолятов 11 видов базидиомицетов, имеющих гены всех трех лигнолитических ферментов. Впервые гены указанных ферментов обнаружены у *D. mollis*, *D. quercina*, *F. pinicola*, *G. trabeum*, *G. lucidum*, *H. fasciculare*, *L. betulina*, *P. betulinus*, *P. igniarius*, *P. pomaceus*, *P. pini*, *P. cinnabarinus*.

DOI: 10.7868/S055510991303015X

Структурный каркас почти всех наземных растений состоит из полимеров: лигнина, гемицеллюлозы и целлюлозы. Объединяясь в разных пропорциях, они образуют лигноцеллюлозный комплекс. Лигнин (в составе данного комплекса) является природным трехмерным гетерополимером на основе фенилпропановых единиц. Лигнин чрезвычайно медленно разлагается в естественных условиях и среди других биополимеров наиболее устойчив к микробной деградации. Дереворазрушающие грибы являются единственными организмами, способными разрушать лигноцеллюлозу за счет использования набора внеклеточных лигнолитических ферментов.

Как известно, наиболее активными биодеструкторами лигнина древесины являются базидиомицеты – возбудители белой гнили. В состав лигнолитического комплекса базидиомицетов входят ферменты лигнинпероксидаза, марганецпероксидаза и лакказа.

Лигнинпероксидаза представляет собой гемсодержащий гликопротеин с молекулярной массой 39–45 кДа. Это ключевой фермент, способный частично деполимеризовать нативный и синтетический лигнин, а также расщеплять некоторые модельные соединения [1].

Другой представитель этого комплекса – марганецзависимая пероксидаза – может катализировать окисление нефенольных подструктур лигнина в присутствии пероксида водорода, ионов марганца(II) и лактата. Марганецпероксидаза имеет молекулярную массу 46 кДа и содержится в своей структуре гем (простетическая группа) [2].

В лигнолитический комплекс входит и лакказа – медьсодержащий гликопротеин, катализирующий реакции окисления различных произ-

водных фенола (*o*-, *p*-дифенолов, аминифенолов, производных пара-гидроксикоричной кислоты и др.) кислородом воздуха. Молекулярная масса лакказы из различных источников варьирует в пределах 14–390 кДа. Некоторые грибы способны продуцировать одновременно несколько изоформ лакказы с различными молекулярными массами.

Очищенная лакказа слабо действует на лигнин, поэтому было высказано предположение, что основная функция фермента заключается в окислении не самих лигнинов, а низкомолекулярных продуктов их деполимеризации. С этим процессом связана и детоксицирующая функция лакказы: окисление токсичных низкомолекулярных фенольных компонентов с последующей полимеризацией приводит к образованию полимеров, для которых клеточная стенка непроницаема. Лакказа считается эффективной “ловушкой” кислородных радикалов и, таким образом, может предохранять клеточные белки от взаимодействия с гидроксилрадикалом [3].

Комплекс лигнолитических ферментов имеет первостепенное значение в биодеградации лигнина, что открывает перспективы их использования для биоотбеливания тканей и бумаги; для очистки окружающей среды от ксенобиотиков, в том числе ароматических соединений; в качестве маркеров в иммуноферментном анализе [4].

Несмотря на активное изучение ферментов лигнолитического комплекса базидиомицетов и кодирующих их синтез генов, спектр исследуемых грибов ограничен отдельными представителями родов *Trametes*, *Phanerochaete*.

Цель работы – выявить гены, кодирующие лигнолитические ферменты у изолятов базидиомицетов, выделенных в лесах Кировской области.

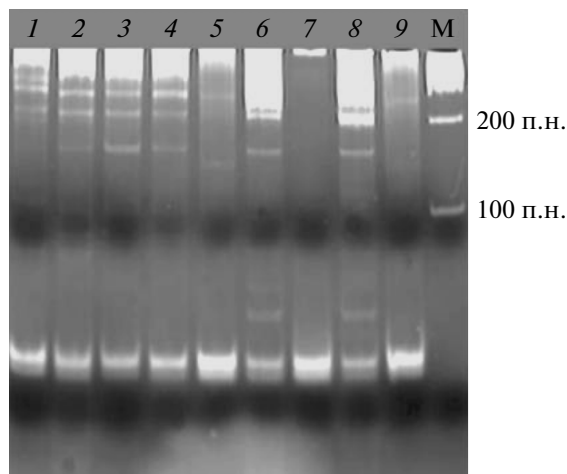


Рис. 1. Гель-электрофорез продуктов амплификации последовательностей гена лигнинпероксидазы в 6%-ном нативном полиакриламидном геле. Праймеры LgpF/LgpR. 1 – *D. quercina* (6); 2 – *F. pinicola* (7); 3 – *F. pinicola* (8); 4 – *F. pinicola* (9); 5 – *F. pinicola* (11); 6 – *G. lipsiense* (15); 7 – *B. fumosa* (8k); 8 – положительный контроль *T. versicolor* (*Tv*); 9 – отрицательный контроль (вода); М – маркер “СибЭнзим”.

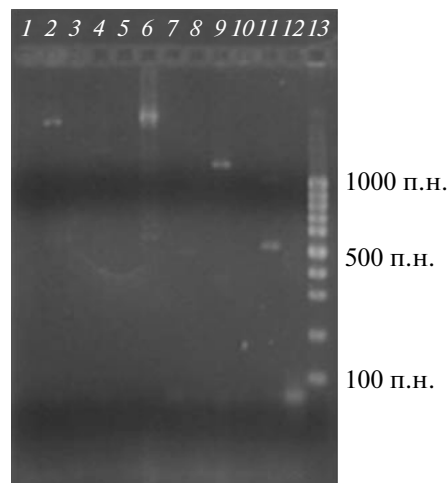


Рис. 2. Гель-электрофорез продуктов амплификации последовательностей гена лакказы в 1.5%-ном агарозном геле. Праймеры LccF и LccR. 1 – *D. quercina* (6); 2 – *F. pinicola* (7); 3 – *F. pinicola* (8); 4 – *F. pinicola* (9); 5 – *F. pinicola* (11); 6 – *F. pinicola* (23); 7 – *F. fomentarius* (35); 8 – *A. mellea* (10); 9 – *P. ostreatus* (1B); 10 – *F. fomentarius* (17); 11 – положительный контроль *T. versicolor* (*Tv*); 12 – отрицательный контроль (вода); 13 – маркер “СибЭнзим”.

МЕТОДИКА

Плодовые тела были собраны в 2008–2010 гг. в лесной зоне Кировской области в период их массового появления, в сухую погоду. Для выделения культуры выбирали молодые, неповрежденные плодовые тела. Определение вида грибов проводили на основании изучения культуральных, макро- и микроморфологических признаков. При этом учитывали форму и цвет плодового тела, форму и цвет гименофора, цвет и структуру тканей плодового тела [5]. Структуру мицелия исследовали с помощью светового микроскопа (“Primo Star, Zeiss”, Германия).

Получение культуры базидиомицетов из плодовых тел осуществляли методом, описанным в работе Билай В.И. [6]. Плодовое тело очищали, быстро обеззараживали дистиллированной водой, затем стерильной водой. Предварительно обработанное плодовое тело разламывали, и кусочки «ткани» из середины стерильным скальпелем переносили в чашку Петри на смоченную стерильной водой фильтровальную бумагу. Чашки Петри для предохранения от высыхания заклеивали и помещали в термостат при температуре $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Когда инокулом покроется растущим мицелием, его переносили на сусло-агар с антибиотиками (500 мг пенициллина и 150 мг амфотерицина В на 250 мл среды).

Мицелий снимали шпателем с поверхности плотной питательной среды с площади 1 см^2 . К массе мицелия добавляли 1 мл буфера NET 100 (50 mM трис-HCl; 10 mM ЭДТА; 100 mM NaCl;

pH 8.0) и стерильный кварцевый песок (1/2 от объема мицелия), растирали в ступке стерильным пестиком. Затем отбирали 500 мкл полученного лизата в микропробирку типа эппендорф объемом 1.5 мл, добавляли раствор Na-ДДС до конечной концентрации 1%, инкубировали 40 мин при 55°C . Добавляли равный объем смеси фенол-хлороформ (1 : 1), перемешивали и центрифугировали (5 мин, 10000 g). После этого отбирали водную фазу и повторяли с ней предыдущую процедуру. Затем к водной фазе, образовавшейся после второй экстракции смесью фенол-хлороформ, добавляли равный объем хлороформа, перемешивали и центрифугировали (5 мин, 10000 g), отбирали водную фазу. К водной фазе, полученной после обработки хлороформом, добавляли 1/10 объема 5 M раствора ацетата натрия (pH 5.2) и 2 объема охлажденного до -20°C этанола, перемешивали и центрифугировали (15 мин, 10000 g). Полученный осадок промывали 70%-ным этанолом, высушивали и растворяли в деионизированной воде.

Для амплификации искомым участкам ДНК было подобрано несколько пар праймеров; использовали полные последовательности генов и мРНК лигнинпероксидазы, марганецпероксидазы и лакказы из базы данных NCBI. Выбор праймеров осуществляли с использованием резидентных программ AliBee – Multiple alignment Release 3.0. и BLAST с сайта <http://www.genebee.msu.ru>. Последовательности используемых праймеров, температура отжига и размер ожидаемых ПЦР-продуктов представлены в табл. 1. Праймеры были синтезированы АО “Синтол” (г. Москва, Россия).

Таблица 1. Характеристика выбранных праймеров для определения генов лигнолитических ферментов

Наименование праймера	Структура праймера (5' – 3')	Расчетная температура отжига, °С	Ожидаемый размер амплификата, п.н.	№ последовательностей в GenBank*
Лакказы				
LccF	GAC-AAC-(AT)TG-ACG-AAC-CA(CT)-ACC-ATG	52	350	DQ431715.1, EU492907.1, AF414808.1, AY839940.1, AY839941.1, DQ234060.1, AY081188.1
LccR	CCC-CT(GC)-A(AG)A-CCA-TCA-CAG-TAC-TG			
Лакказы				
lLccF	TTC-CAG-(AC)TC-AA(CT)-GTC-(AG)T(CT)-GAC	67	130	AY616035.1, AF053472.2, AJ542532.1, BK004111.1, BK004112.1, BK004113.1, BK004114.1, BK004116.1, BK004118.1, BK004119.1, BK004122.1, BK004125.1, DQ431715.1, EU282002.1, AY485826.1, AF185275.2, FJ231092.1, AY686700.1, AB089612.1, AJ005017.2, AJ344434.2, FJ473384.2, AF170093.1, EU492907.1, AF414808.1, AY839940.1, AY839941.1, DQ234060.1, AY081188.1
lLccR	T(AC)G-G(AG)C-ACT-GGT-T(AG)A-(CT)GA-A(GC)G-C			
Марганецпероксидаза				
MnpF	CTC-A(CT)C-TTC-CAC-GAC-GC(GC)-ATC-GGC	68	450	Z30668, AJ745879, AJ745080, AY677131, AY677130, AY677129, AY677128, D86493, AF008585, AF102515, PCU10306, PHAMNP2A, PHAMNP1A, PHAMP1A, PHAMNP1, PHAMNP, E39216, E39215, E39214, E39213, E39212, E39211, AB078606, AB078604, AB078605, E39210
MnpR	CTC-GA(CT)-GAA-GAA-CTG-(GC)G(CT)-GTC-G			
Лигнинпероксидаза				
LgpF	GAC-GG(CT)-CT(CT)-GT(CT)-CC(GTC)-GAG-CC	67	207	Z30667, Z30666, Z31011, AB158478, PHALIPERE, EU289404, AB455007, AB455006, PHALIP2X, PHALIGPER, EU649680, Z31011, X75655, X54257, X15599, X55343, AM397952, X51590, E07702, E05520, E05519, E05517, E03952, AY743218, AY749105, AB237774, AB191466, AB158478, X14446, TMTVLG2A, PHALPO, TMTLIGPERO, PHALIP6, PHALIGPERM, PHALIGPERG, AF140063, AF140062, PHALNPOX
LgpR	C(AT)G-NG(ATC)-CTC-GA(CT)-GAA-GAA-CTG			

* Последовательности МРНК и генов, использованные при подборе праймеров, взяты из базы данных www.ncbi.nlm.nih.gov.

Таблица 2. Результаты видовой идентификации изолятов базидиомицетов

Видовое название	Номера изолята
<i>Antrodiella</i>	67
<i>Armillaria mellea</i>	10
<i>Bjerkandera fumosa</i>	8k, 66
<i>Datronia mollis</i>	64
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	706
<i>Daedaleopsis quercina</i>	6
<i>Fomes fomentarius</i>	17, 35, 55
<i>Fomes pinicola</i>	37
<i>Fomitopsis penicola</i>	3k, 23, 7, 8, 9, 11, 16, 60
<i>Ganoderma applanatum</i>	22
<i>Ganoderma lucidum</i>	2k
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	56, 59
<i>Huipholoma fasciculare</i>	68, 69
<i>Lenzites betulina</i>	708
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1В
<i>Piptoporus betulinus</i>	39
<i>Phellinus hartigii</i>	13k
<i>Phellinus igniarius</i>	1k
<i>Phellinus pomaceus</i>	5k
<i>Phellinus pini</i>	57, 58, 61, 62
<i>Polyporus betulinus</i>	36
<i>Pseudotrampetes gibbosa</i>	4k
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	704
<i>Trametes</i>	72, 73
<i>Trametes gibbosa</i>	42, 700
<i>Trametes hirsuta</i>	65, 70, 71
<i>He определен</i>	706', 503, 31k, 26, 29

Состав реакционной смеси: 0.5 мкл пробы (50 нг ДНК), 1 мкл 10X буферного раствора для ПЦР без ионов магния (“Сибэнзим”, Россия), 0.5 мкл смеси дидезоксинуклеозидтрифосфатов, прямого и обратного праймеров по 1 мкл каждого. Taq-полимеразы (“Сибэнзим”, Россия), вода до конечного объема 10 мкл; концентрация хлорида магния — 2.0 мМ для пар праймеров LccF/LccR, MnpF/MnpR и 3.0 мМ — для пар праймеров 1LccF/1LccR, LgpF/LgpR.

Амплификацию проводили с использованием программируемого термостата “Терцик” (“ДНК-технология”, г. Москва). Условия ПЦР: 1 цикл 95°C — 3 мин; 35 циклов 94°C по 30 с, температура отжига, подобранная для каждой из указанных пар праймеров — 30 с и 72°C — 1.5 мин; 1 цикл 68°C — 5 мин.

Продукты амплификации последовательностей генов лакказы (праймеры LccF/LccR), лигнинпе-

роксидазы и марганецпероксидазы разделяли с помощью гель-электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле, фрагментов генов лакказы (праймеры 1LccF/1LccR) разделяли в 6%-ном нативном полиакриламидном геле, гели окрашивали этидиумом бромидом [7]. Размер амплификатов определяли с использованием стандартного набора маркеров “Сибэнзим” (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Всего было выделено и получены мицелиальные культуры 50 природных изолятов базидиомицетов, преимущественно трутовиков. Из 50 изолятов видовой принадлежности была определена у 42, 3 изолята были идентифицированы до рода. Результаты видовой идентификации представлены в табл. 2.

Пять изолятов идентифицировать не удалось. Среди изолятов встречались как представители классических продуцентов лигнолитических ферментов — виды рода *Trametes* (изоляты 42, 65, 70, 71, 72, 73, 700), так и менее изученный в этом отношении вид *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная, изолят 10). Также были получены мицелиальные культуры представителей малоизученных родов *Pycnoporus*, *Daedaleopsis*, *Lenzites*. Такие виды, как *Trametes gibbosa*, *Fomitopsis penicola*; *Fomes fomentarius*; *Phellinus pini* и др., были представлены несколькими изолятами (от 2 до 8).

Культуры грибов использовали для выделения ДНК и последующей идентификации генов ферментов лигнолитического комплекса. Для выявления генов марганецпероксидазы и лигнинпероксидазы мы использовали по одной паре праймеров; для обнаружения гена(ов) лакказы выбрали две пары праймеров — первая (LccF/LccR) — по референс-последовательности наиболее изученного объекта (*Trametes versicolor*), вторая (1LccF/1LccR) — по последовательностям двух видов грибов рода *Trametes* (*T. hirsuta*). Первая пара соответствовала более специфическому участку гена по сравнению с участком, который был использован для выбора второй пары. В качестве положительного контроля использовали ДНК классического продуцента лигнинпероксидазы — *Trametes (Coriolus) versicolor*, штамм Tv из коллекции культур кафедры микробиологии ВятГУ. Результаты детекции продуктов амплификации приведены в табл. 3. В качестве примера на рис. 1–3 представлены электрофореграммы амплификатов ДНК некоторых изолятов.

С помощью пары праймеров LccF/LccR продукты амплификации были выявлены у *A. mellea* (10), *F. penicola* (7), *G. trabeum* (56), *L. betulina* (708), *P. betulinus* (39), *T. gibbosa* (700, 42) и у неидентифицированного изолята (31k). Размеры амплификатов ни в одном случае не совпадали с

Таблица 3. Продукты амплификации последовательностей генов лигнолитических ферментов природных изолятов базидиомицетов

Видовое название	Изолят	Размер ампликата (п.н.), полученного с использованием праймеров...			
		LccF–LccR	lLccF–lLccR	LgpF–LgpR	MnpF–MnpR
<i>Trametes versicolor</i> (контроль)	Tv	350	130	200, 300	500, 750
<i>Armillaria mellea</i>	10	1000	130, 210, 400	200	700
<i>Bjerkandera fumosa</i>	8k	–	–	–	–
<i>Datronia mollis</i>	64	–	100, 220	130, 190	–
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	706	–	130	200, 250	–
<i>Daedaleopsis quercina</i>	6	–	130	200, 300	–
<i>Fomes fomentarius</i>	17	–	–	–	–
	35	–	210	200, 300	400
	55	–	–	>300	–
<i>Fomes pinicola</i>	37	–	–	–	–
<i>Fomitopsis penicola</i>	3k	–	130	200, 300	–
	7	1000	140, 210, 300	180, 200, 300	600, 850
	8	–	130, 140, 210	180, 200, 300	850
	9	–	130, 140, 210	180, 200, 300	600, 850
	11	–	–	150, 300	–
	16	–	–	100, 200, 300	600
	23	1000	–	–	850
	60	–	–	–	–
<i>Ganoderma applanatum</i>	22	–	–	–	–
<i>Ganoderma lucidum</i>	2k	–	130, 150	–	–
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	56	300, 1000	300, 320	150	300, 500
	59	–	–	300	700
<i>Hypholoma fasciculare</i>	69	–	160, 210, 400	200, 300	200, 250
<i>Lenzites betulina</i>	708	1000	–	200, 250, 300	200
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1B	–	210, 250, 300	180, 300	800, 900
<i>Piptoporus betulinus</i>	39	200	130	200	200, 500
<i>Phellinus hartigii</i>	13k	–	–	–	–
<i>Phellinus igniarius</i>	1k	–	130, 150	200, 250	–
<i>Phellinus pomaceus</i>	5k	–	–	200, 300	900
<i>Phellinus pini</i>	57	–	400	300	220, 280
	61	–	400	300	–
<i>Polyporus betulinus</i>	36	–	–	–	–
<i>Pseudotrhametes gibbosa</i>	4k	–	130	200	–
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	704	–	200	200	400, 750
<i>Trametes gibbosa</i>	42	200	180	200	500
	700	650	–	150, 200, 180, 300	600
<i>He определен</i>	26	–	130, 200	200, 250	–
	29	200	–	200, 250	–
	31k	–	–	–	–
	706'	–	130, 300	200, 250	–
	503	–	130	200	350, 500

Примечание: Знак “–” – ампликат не обнаружен.

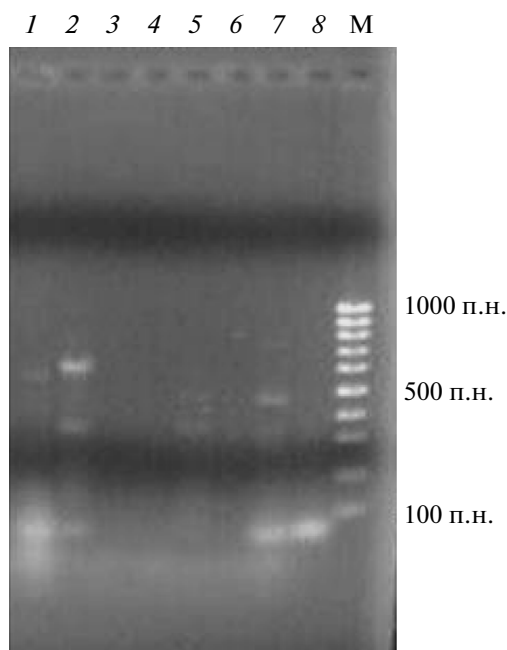


Рис. 3. Гель-электрофорез продуктов амплификации последовательностей гена марганецпероксидазы в 1.5%-ном агарозном геле. Праймеры MnpF / MnpR. 1 – *T. gibbosa* (700); 2 – *P. cinnobarinus* (704); 3 – *D. confragosa* (706); 4 – 706'; 5 – 503; 6 – *P. igniarius* (1к); 7 – *T. gibbosa* (№ 42); 8 – положительный контроль *T. versicolor* (Tv); М – маркер “СибЭнзим”.

ожидаемым, даже у представителей близкого вида *T. gibbosa*, что подтверждает высокую специфичность пары праймеров LccF/LccR для вида *T. versicolor*.

С использованием менее специфичной пары праймеров 1LccF/1LccR последовательности гена лакказы были выявлены у 23 изолятов, относящихся к 16 идентифицированным и 3 неидентифицированным видам. Размер полученного ПЦР-продукта соответствовал ожидаемому у *A. mellea* (10), *D. confragosa* (706), *D. quercina* (6), *F. penicola* (3к, 8, 9), *G. lucidum* (2к), *P. igniarius* (1к), *P. gibbosa* (4к) и у двух неидентифицированных изолятов (26, 706'). Амплификаты у остальных изолятов различались по размерам, что свидетельствует о высокой вариативности последовательностей генов лакказы у разных видов базидиомицетов. Более чем у половины изолятов, проявивших положительную реакцию с праймерами 1LccF/1LccR, обнаружено по два и более амплификата разных размеров. Это может быть связано с наличием у одного изолята нескольких изоформ фермента. Так, было показано наличие двух изоформ лакказы у одного гриба – продуцента [8].

Ген марганецпероксидазы был выявлен у 18 идентифицированных и 1 неидентифицированного изолята, относящихся к 13 видам. Размер

ПЦР-продукта был близок к ожидаемому у *G. trabeum* (56), *P. betulinus* (39), *T. gibbosa* (42) и неидентифицированного изолята (503). Как и при детекции гена лакказы с помощью праймеров 1LccF/1LccR обнаружена вариативность ампликонов у большинства изолятов и наличие у некоторых из них двух продуктов реакции с праймерами MnpF/MnpR. Гены марганецпероксидазы образуют суперсемейство последовательностей, кодирующих изоформы этого фермента; также некоторые грибы могут продуцировать несколько изоформ одновременно [9].

Последовательности гена лингнинпероксидазы были выявлены у 30 изолятов, относящихся к 17 идентифицированным и 4 неидентифицированным видам. Ампликоны, соответствующие ожидаемому по длине (200 и 300 п.н.), были выявлены почти у всех из них, за исключением трех (*D. mollis* (64), *F. fomentarius* (55) и *G. trabeum* (56)). У ряда изолятов обнаружены продукты ПЦР, отличные по длине как друг от друга, так от ампликонов ожидаемого размера. Так же, как и другие ферменты лигнолитического комплекса, лингнинпероксидазы имеют несколько изоформ. Различия ампликонов по размерам и обнаружение дополнительных полос могут быть связаны с этим.

Последовательности генов всех трех ферментов одновременно были выявлены у 15 изолятов: *A. mellea* (10), *F. fomentarius* (35), *F. penicola* (7, 8, 9), *G. trabeum* (56), *H. fasciculare* (69), *L. betulinus* (708), *P. ostreatus* (1В), *P. betulinus* (39), *P. pini* (57), *P. cinnobarinus* (704), *T. gibbosa* (700, 42) и неидентифицированного изолята (503).

Не у всех изолятов, отнесенных к одному виду, показана идентичность спектров продуктов амплификации генов лигнолитических ферментов. Такие результаты могут быть связаны с тем, что один гриб может синтезировать несколько изоформ ферментов, следовательно, возможны различия и между изолятами. Ферменты лигнолитического комплекса различаются и по катализируемым реакциям, и по субстратам, следовательно, могут окислять различные мономеры и фрагменты молекулы лигнина или промежуточные продукты на разных этапах его деградации [1]. Эта особенность лигнолитического комплекса позволяет объяснить тот факт, что, помимо видов, имеющих гены всех трех лигнолитических ферментов, существуют еще и виды, имеющие по два или по одному из этих генов; возможно, данные грибы либо одновременно обитают на одном субстрате, либо сменяют друг друга по мере разрушения древесины.

В результате проделанной работы выявлены 15 изолятов грибов 11 видов, имеющих гены всех трех ферментов лигнолитического комплекса, в том числе: *A. mellea* (10), *F. pinicola* (35), *F. penicola* (7, 8, 9), *G. trabeum* (56), *H. fasciculare* (69), *L. betu-*

lina (708), *P. ostreatus* (1B), *P. betulinus* (39), *P. pini* (57), *P. cinnabarinus* (704), *Tr. gibbosa* (700, 42), неидентифицированный изолят (503). У большинства указанных видов активность лигнолитических ферментов ранее не изучалась. Впервые гены лигнолитических ферментов обнаружены у *D. mollis*, *D. quercina*, *F. pinicola*, *G. trabeum*, *G. lucidum*, *H. fasciculare*, *L. betulina*, *P. betulinus*, *P. igniarius*, *P. pomaceus*, *P. pini*, *P. cinnabarinus*. Отобранные изоляты перспективны для дальнейшего изучения как возможные продуценты ферментов лигнолитического комплекса, сравнительного исследования указанных ферментов, их субстратной специфичности, физико-химических характеристик и роли в биодеструкции лигнина древесины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Елинов Н.П. Основы биотехнологии. Для студентов институтов, аспирантов и практических работников. СПб.: Наука, 1995. 600 с.
2. Nariishi H., Valli K., Gold M.H. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 33. P. 23688–23695.
3. Кадималиев Д.А., Ревин В.В., Атыкян Н.А., Самуилов В.Д. // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 5. С. 555–560.
4. Патент РФ. 1994. № 2014610.
5. Бондарцева М.А. Определитель грибов России. Порядок афиллофоровые. СПб: Наука, 1998. 391 с.
6. Билай В.И. Фузарии. Киев: Наукова думка, 1977. 442 с.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984. 480 с.
8. Болобова А.В. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Ферменты, модели, процессы. М.: Наука, 2002. 343 с.
9. Johanson T. // J. Bacteriology. 1991. № 13.

Identification of Genes Encoding Ligninolytic Enzymes in Naturally Occurring Basidiomycete Isolates

E. A. Shevchenko, E. A. Bessolitsyna, and I. V. Darmov

Vyatka State University, Kirov, 610000 Russia

e-mail: bess2000@mail.ru

Received February 28, 2012

Abstract—The presence of genes encoding lignin peroxidase, laccase, and manganese peroxidase was assessed in more than 20 types of polypore fungi collected in the woods of Kirov oblast; the fungi studied had not been previously characterized with regard to ligninolytic enzyme production. Fifteen isolates of eleven basidiomycete species were shown to contain genes coding for all three ligninolytic enzymes. Genes coding for these enzymes were detected in *D. mollis*, *D. quercina*, *F. pinicola*, *G. trabeum*, *G. lucidum*, *H. fasciculare*, *L. betulina*, *P. betulinus*, *P. igniarius*, *P. pomaceus*, *P. pini*, and *P. cinnabarinus* for the first time.

УДК 579.222

ТРАНСФОРМАЦИЯ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ ВЫСОКООКИСЛЕННОГО БУРОГО УГЛЯ БАЗИДИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ

Trametes hirsuta И *Trametes maxima*

© 2013 г. О. И. Кляйн*, Н. А. Куликова***, А. И. Константинов***, Т. В. Фёдорова*,
Е. О. Ландесман*, О. В. Королёва*

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

e-mail: klein_olga@list.ru

**Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Москва, 119991

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

Поступила в редакцию 19.09.2012 г.

Исследована способность базидиальных грибов белой гнили *Trametes hirsuta* и *Trametes maxima* трансформировать гуминовые вещества (ГВ) угля в условиях твердофазного культивирования в присутствии и отсутствие легкодоступного источника углерода (глюкоза). Показано, что в процессе роста выбранных штаммов грибов на средах, содержащих ГВ, одновременно протекают деструктивные и конденсационные процессы трансформации ГВ. На основании сравнительного физико-химического анализа исходных и трансформированных грибами ГВ установлено, что, хотя внесение глюкозы может способствовать более глубокой трансформации ГВ базидиомицетами, общее направление их модификации – преимущественное восстановление или окисление – определяется физиолого-биохимическими особенностями штамма.

DOI: 10.7868/S0555109913030100

С того момента, когда Коэн и Габриель в 1982 г. впервые показали, что грибы могут расти непосредственно на угле и метаболизировать его [1], процессы биологической конверсии угля, прежде всего, бурого, являются предметом многочисленных исследований [2–7].

В последнее время интерес к биоконверсии угля неуклонно растет, что обусловлено негативными последствиями для окружающей среды, возникающими при использовании угля в качестве источника энергии. Особенно актуальна эта проблема для стран, характеризующихся высоким уровнем производства угля, к которым относится и Россия, занимающая второе место после ФРГ по этому показателю. Производство бурого угля в нашей стране составляет около 90 млн. т в год [8]. По сравнению с конверсией химическими или физическими методами, микробиологические и энзиматические способы обладают рядом преимуществ, такими, как отсутствие необходимости создания повышенных температур и давления [9].

Несмотря на перспективность использования биологического подхода для конверсии угля, его разработка требует тщательного выбора микроорганизма, на основе которого планируется создание технологий биоконверсии. Это обусловлено особенностями угля как субстрата, накладывающими целый ряд ограничений на предлагаемый микроорганизм. Одно из основных свойств угля – его

токсичность, которая затрудняет его биodeградацию, объясняется присутствием труднодеградируемых соединений, например, полиядерных ароматических углеводородов, а также высокая гетерогенность структуры и твердофазное состояние [8]. Указанные негативные, с точки зрения биотрансформации, свойства угля определяют относительно небольшой спектр микроорганизмов, способных к его разложению, к которым, прежде всего, относятся базидиальные грибы – продуценты лигнолитических ферментов. Они принадлежат к немногочисленной группе микроорганизмов, обладающих уникальной системой экстрацеллюлярных лигнолитических ферментов и способных благодаря этому разрушать труднодеградируемые вещества со сложной структурой фенольной природы, такие, как лигнин и уголь. Установлено, что ведущую роль в этом процессе играет лигниндеградационная система, в которую входят ферменты лигнолитического комплекса: лигнинпероксидаза, Mn-пероксидаза и лакказы, а также низкомолекулярные вторичные метаболиты [10–14]. Эффективность процесса деградации лигнина под действием этой системы в значительной мере зависит от доступности источника углерода. Показано, что присутствие в питательной среде легкодоступного источника углерода интенсифицирует процесс биodeградации лигнина [14]. Однако взаимосвязь между

эффективностью деградации угля и составом питательной среды остается неизученной.

Цель работы – сравнительное изучение биодеградации бурого угля под действием продуцентов высокоактивных пероксидаз и лакказ – базидиомицетов *Trametes hirsuta* и *Trametes maxima* на полной питательной среде и при недостатке легкодоступного источника углерода (бедная среда).

МЕТОДИКА

При проведении экспериментов использовали штаммы *T. hirsuta* (Wulf.:Fr.) Pil. и *T. maxima* (Mont.) David & Rajchenb из коллекции культур Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН. Для изучения деградации угля выбранными штаммами базидиальных грибов проводили их твердофазное культивирование на угле высокой степени разложения – леонардите (Солнцевское месторождение, о. Сахалин) согласно [15].

При твердофазном культивировании в колбы объемом 750 мл вносили 20 г измельченного леонардита с размером частиц ≤ 1 мм и 5 мл полной или бедной питательной среды. При выращивании грибов на полной среде использовали питательную среду следующего состава (г/л): глюкоза – 10.0; пептон 3.0; NaNO_3 – 3.0; KH_2PO_4 – 0.6; $\text{ZnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.001; K_2HPO_4 – 0.4; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.0005; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; CaCl_2 – 0.5; CuSO_4 – 0.25; pH 6.0). Среда без легкодоступного источника углерода (бедная) имела аналогичный состав, но не содержала глюкозы. Далее проводили засев субстрата мицелием базидиальных грибов (объем инокулята 20 мл). В ходе эксперимента влажность в колбах поддерживали на уровне 80–90%. Стерилизацию угля проводили путем автоклавирования (120°C, 1 атм., 30 мин). Культивирование проводили в течение 30 сут при 28°C.

Для оценки функционального состояния выращиваемых базидиальных грибов при культивировании проводили мониторинг основных ферментов, входящих в лигнолитический комплекс: лигнинпероксидазы, Mn-пероксидазы и лакказы.

Определение активности лигнинпероксидазы. Активность фермента оценивали по скорости окисления вератрового спирта до вератрового альдегида, измеряя снижение поглощения при 310 нм в 0.1 М Na-тарtratном буфере, pH 3.0 [16].

Определение активности Mn-пероксидазы. Активность фермента определяли согласно [17], используя в качестве субстрата Mn^{2+} . За единицу активности принимали окисление 1 мкмоль Mn(II) за 1 мин.

Определение активности лакказы. Активность лакказы определяли спектрофотометрически при длине волны 410 нм, используя в качестве хромогенного субстрата 10 мМ катехол в 0.1 М Na-аце-

татном буфере, pH 4.5 [18]. За условную единицу активности принимали увеличение оптической плотности на 1 ед. за 1 мин. Скорости ферментативных реакций регистрировали на спектрофотометре “PerkinElmer” (США). Для перевода ферментативных активностей в международные единицы (МЕ) проводили нормирование условных единиц на коэффициент экстинкции использованного субстрата.

Для контроля структурных изменений леонардита при культивировании базидиальных грибов, после окончания эксперимента проводили выделение из него гуминовых веществ (ГВ) и последующую характеристику их физико-химических свойств. Для этого к леонардиту прибавляли 0.1 М NaOH в весовом соотношении 1 : 2, получаемую кашеобразную массу количественно переносили в диализный мешок с размером пор 12–14 кДа и диализовали против дистиллированной воды 48 ч с многократной сменой воды при комнатной температуре для удаления избытка щелочи. Затем ГВ центрифугировали в течение 20 мин при 3000 g и собирали супернатант. Полученный раствор ГВ высушивали в сушильном шкафу при температуре 50°C. В качестве контрольного образца использовали ГВ, полученные из леонардита, прошедшего аналогичную обработку (автоклавирувание, добавление питательных сред, инкубирование), но без внесения грибов. Характеристику основных физико-химических свойств ГВ проводили по таким параметрам, как элементный состав, молекулярная масса и структурно-групповой состав.

Элементный анализ. Анализ С, Н и N был выполнен на элементном анализаторе модели 1106 фирмы “Carlo Erba Strumentazione” (Италия). Содержание кислорода рассчитывали по разнице между массой навески и суммарным содержанием золы и CHN. Зольность определяли сжиганием препарата в муфельной печи (850°C, 40 мин).

Определение молекулярной массы. Молекулярную массу ГВ определяли с помощью эксклюзивной хроматографии по методике, описанной в работе [19]. Фракционирование препаратов осуществляли на колонке, заполненной гелем Тоуоpearl-NW-50(S) (Япония), в качестве калибровочных веществ использовали полистиролсульфонаты с молекулярными массами 4.48, 14.0, 20.7, 45.1 и 80.8 кДа (“Polymer Standard Service” Германия). Концентрация ГВ в анализируемых пробах составляла 40 мг/л. Подвижной фазой служил фосфатный буфер (0.028 М, pH 6.8), скорость элюирования составляла 1 мл/мин. Регистрацию ГВ на выходе из колонки проводили с помощью УФ-детектора по поглощению при 254 нм. Расчет средневесовых молекулярных масс (ММ) проводили с помощью программы GelTreat [20].

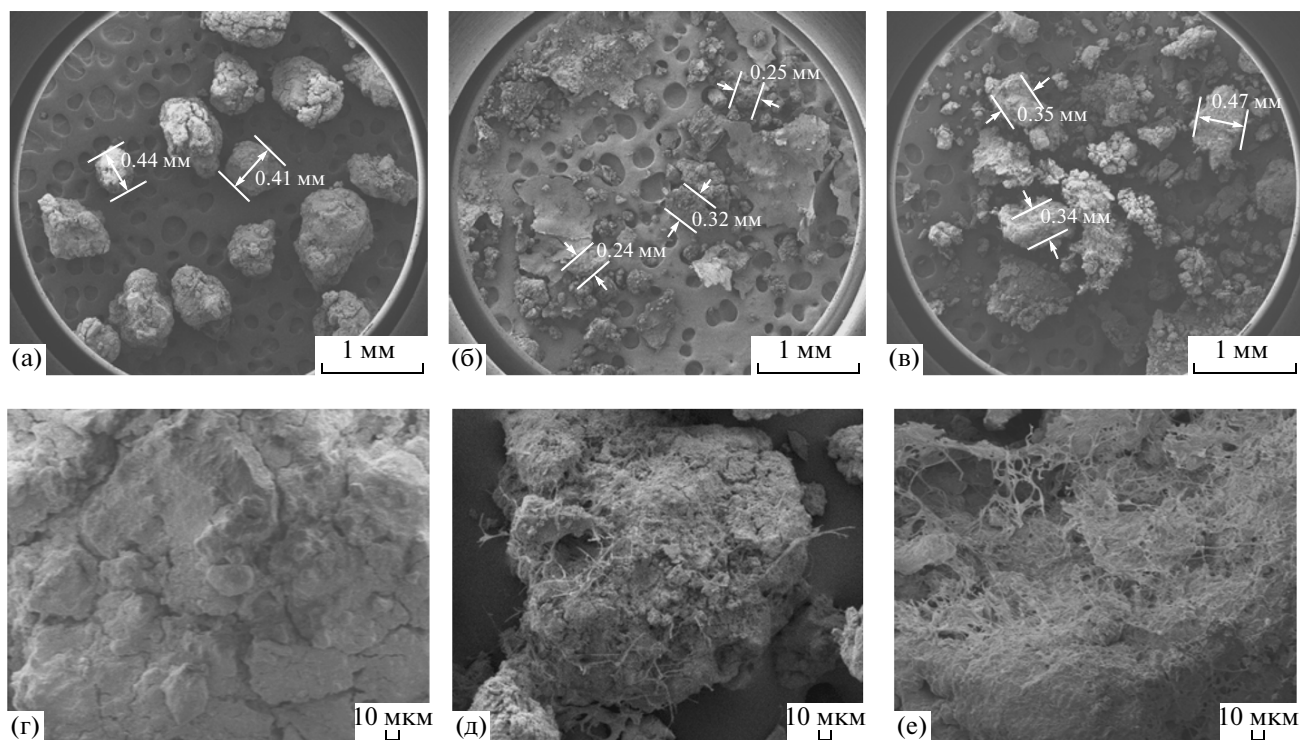


Рис. 1. РСЭМ образцов леонардита после взаимодействия со штаммами *T. hirsuta* + *T. maxima*; а, г – контроль; б, д – на среде без глюкозы; в, е – на среде с глюкозой, а, б, в – $\times 25$, г, д, е – $\times 300$.

Структурно-групповой состав ГВ. Анализ структурно-группового состава ГВ проводили методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии. Спектры регистрировали на спектрометре Avance (“Bruker”, ФРГ) при времени задержки 4 с. Указанное время задержки позволяет достичь полной релаксации ядер углерода практически всех типов, что обеспечивает количественность получаемых ^{13}C ЯМР-спектров [21]. Концентрация ГВ в измеряемых пробах составляла около 30 г/л. Содержание углерода различных структурных фрагментов определяли интегрированием соответствующих спектральных областей (м.д.): 5–108 – атомы С-незамещенных, О- и N-замещенных алифатических фрагментов ($\Sigma\text{C}_{\text{Alk}}$), 108–165 – атомы С-незамещенных, О- и N-замещенных ароматических фрагментов ($\Sigma\text{C}_{\text{Ar}}$), 165–187 – атомы С карбоксильных и эфирных групп (C_{COO}), 187–220 – атомы С кетонных и хинонных групп ($\text{C}_{\text{C=O}}$).

Растровая сканирующая электронная микроскопия (РСЭМ). Для визуализации изменений, происходящих с леонардитом, использовали метод РСЭМ. Частицы леонардита после окончания совместного культивирования исследуемых штаммов высушивали до постоянной массы при 50°C , помещали на титановый столик и фиксировали при помощи проводящего двухстороннего скотча. Для получения изображений поверхности угля использовали сканирующий электронный микроскоп вы-

сокого разрешения с автоэмиссионным катодом JSM-7500F фирмы “JEOL” (Япония). Изображения получали в режиме низкоэнергетических вторичных электронов, поскольку этот режим обеспечивал наиболее высокое разрешение. При энергии первичного пучка 1 кэВ разрешение составляло 1.5 нм, при 5 кэВ – 1 нм. Перед микрофотографированием на образцы наносили металлическую пленку платины толщиной порядка 5 нм методом магнетронного распыления.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали результаты РСЭМ, исследованные штаммы базидиальных грибов активно взаимодействовали с леонардитом, что приводило к заметному разрыхлению его поверхности (рис. 1а–1в), что является прямым доказательством способности базидиальных грибов деградировать угли высокой степени разложения, используя их в качестве источника питательных веществ. Ранее способность к биосолоubilизации углей была продемонстрирована у таких базидиальных грибов, как *Gymnopus erythropus* [22], *Clitocybula dusenii* и *Nematoloma frowardii* [23], *Phanerochaete chrysosporium* [24], *Trametes versicolor* и *Lentinula edodes* [25].

При большем увеличении (рис. 1г, д, е) хорошо видно систему гиф, демонстрирующую рост исследуемых грибов на леонардите. На среде без глюкозы видны отдельные гифы на поверхности

Таблица 1. Элементный состав и ММ исходных и трансформированных базидиальными грибами *T. hirsuta* и *T. maxima* ГВ

Вариант	Содержание, %				ММ, кДа
	С	Н	N	зольность	
Контроль	72.4	5.8	3.3	22.4	14.3
	Среда без глюкозы				
<i>T. hirsuta</i>	75.3	5.9	3.6	22.5	26.9
<i>T. maxima</i>	70.4	5.1	3.1	20.2	28.5
<i>T. hirsuta</i> + <i>T. maxima</i>	69.5	5.1	2.9	19.9	25.1
	Среда с глюкозой				
<i>T. hirsuta</i>	73.9	5.6	3.7	21.2	31.0
<i>T. maxima</i>	69.2	5.2	3.0	19.7	22.7
<i>T. hirsuta</i> + <i>T. maxima</i>	70.0	4.9	3.2	19.5	25.7

и гифы, проросшие внутрь частиц леонардита, тогда как на полной среде, где рост грибной культуры был более интенсивный, мицелий образовывал пленку на поверхности угля. Интенсивный поверхностный рост базидиомицетов не позволил визуализировать их рост внутрь леонардита.

Исследование элементного состава исходных и трансформированных ГВ леонардита показало, что наблюдаемые изменения определяются только использованным штаммом, но мало зависят от наличия в среде легкодоступного источника углерода. В случае культивирования *T. hirsuta* изменения содержания углерода и водорода практически не наблюдали, в то время как для *T. maxima* происходило снижение содержания водорода и углерода в ГВ (табл. 1). Принимая во внимание, что содержание азота практически не изменялось, можно предположить, что культивирование *T. hirsuta* сопровождается частичным восстановлением ГВ, а культивирование *T. maxima* — их окислением.

Для проверки высказанного предположения были рассчитаны атомные отношения О/С и Н/С, позволяющие оценить степень окисленности и степень ненасыщенности ГВ. Результаты расчетов, представленные на диаграмме ван Кревелена (рис. 2), показывают, что изменение свойств ГВ происходило в двух направлениях. В случае *T. hirsuta* одновременно снижались оба исследуемых атомных отношения, т.е. модификация ГВ этим штаммом базидиомицета протекала по пути восстановления и дегидратации. При трансформации ГВ под действием *T. maxima* или в варианте совместного культивирования *T. hirsuta* и *T. maxima* также наблюдали снижение отношения Н/С, но при этом одновременно происходил рост показателя О/С, т.е. можно предполагать протекание окислительных процессов, таких, как карбоксилирование.

Связь между трансформацией ГВ и восстановительной способностью грибов была ранее продемонстрирована для большого количества базидиомицетов, включая представителей родов *Polystictus*, *Huophiloma*, *Trametes* и *Polyporus* [10]. На основании скрининга более чем 20 штаммов грибов было установлено, что способностью обесцвечивать растворы ГВ обладают только штаммы, в присутствии которых наблюдается восстановление оксibenзойных и метоксибензойных кислот до первичных спиртов. Таким образом, восстановление следует рассматривать как обязательный этап деградации ГВ базидиальными грибами. Предполагается, что за процессы восстановления может отвечать целлобиозодегидрогеназа — флавоцитохром, способный осуществлять процессы одно-

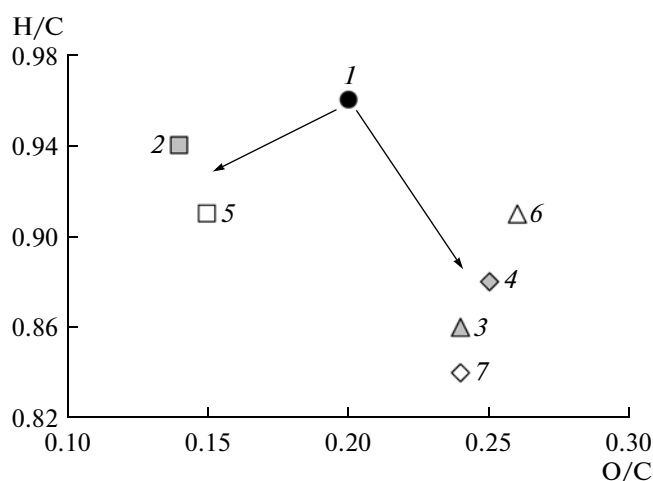


Рис. 2. Диаграмма Ван Кревелена для исходных (1) и трансформированных базидиальных грибами *T. hirsuta* и *T. maxima* ГВ леонардита. 2–4 — среда без глюкозы, 5–7 — среда с глюкозой. 2, 5 — *T. hirsuta*; 3, 6 — *T. maxima*; 4, 7 — *T. hirsuta* + *T. maxima*.

Таблица 2. Структурно-групповой состав исходных и трансформированных базидиальными грибами *T. hirsuta* и *T. maxima* ГВ

Вариант	Содержание, %				$\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$
	ΣC_{Alk}	ΣC_{Ar}	C_{COO}	$C_{C=O}$	
Контроль	31.7	46.0	18.3	4.5	1.5
	Среда без глюкозы				
<i>T. hirsuta</i>	27.7	52.8	15.3	4.2	1.9
<i>T. maxima</i>	28.3	45.3	18.1	8.3	1.6
<i>T. hirsuta</i> + <i>T. maxima</i>	19.9	56.1	18.6	5.4	2.8
	Среда с глюкозой				
<i>T. hirsuta</i>	26.5	47.6	18.3	7.5	1.8
<i>T. maxima</i>	21.2	53.8	18.9	6.1	2.5
<i>T. hirsuta</i> + <i>T. maxima</i>	28.1	42.8	16.7	12.5	1.5

электронного восстановления ароматических радикалов или двухэлектронного восстановления хинонов с параллельным окислением полуацетального гидроксила сахаров до карбонила [26]. Следовательно, восстановление ароматических кислот до спиртов можно считать первым этапом трансформации ГВ базидиальными грибами.

Во всех исследованных вариантах было отмечено снижение отношения Н/С, что указывает на уменьшение доли алифатических цепочек в структуре ГВ. Интересно отметить, что изменения, наблюдаемые при модификации ГВ в присутствии *T. hirsuta*, аналогичны изменениям, характерным при переходе от фульво- к гуминовым кислотам почв, тогда как трансформация ГВ под действием *T. maxima* аналогична процессам, протекающим при формировании фульвокислот из растительных остатков [27].

Возрастание ММ ГВ во всех исследованных вариантах (табл. 1) указывает на процессы полимеризации, происходящие при трансформации ГВ и связанные, по-видимому, с процессами опосредованной ферментативной дегградации, базирующейся на формировании радикалов в качестве основных и побочных продуктов ферментативных реакций с последующим запуском радикальных процессов [28]. Другим объяснением отмеченной полимеризации продуктов частичной дегградации ГВ может являться такая особенность лигнолитического ферментативного комплекса выбранных для исследования штаммов, как присутствие высокоредокспотенциальных лакказ, которые, как правило, обладают конденсирующей активностью по отношению к широкому ряду субстратов фенольной природы [28]. В любом случае, полученные данные свидетельствуют об одновременном протекании деструктивных и конденсационных процессов в ГВ при их трансформации *T. hirsuta* и *T. maxima*. Аналогичная разнонаправленность процессов была ранее показана при изучении взаи-

модействия базидиальных грибов белой гнили с лигнинами [26]. Было установлено, что лигнины осиновой и лиственничной древесины, подвергшиеся трансформации под действием *Phanerochaete sanguinea*, могли иметь ММ, превышающие ММ лигнинов исходной древесины в 1.5 раза. Анализ показал, что конденсационные процессы преимущественно идут через С5 ароматического кольца.

Исследование структурно-группового состава ГВ методом ^{13}C ЯМР-спектроскопии (рис. 3, табл. 2) подтвердило ранее установленные закономерности и позволило установить более детально изменения, происходящие с ГВ при взаимодействии с исследованными штаммами базидиомицетов. Было обнаружено, что снижение содержания углерода в ГВ практически во всех вариантах обусловлено, главным образом, уменьшением относительного содержания алифатических структурных фрагментов. Об этом свидетельствует как уменьшение показателя ΣC_{Alk} , так рост степени ароматичности $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$. Исключение составил вариант *T. hirsuta* + *T. maxima* на среде с глюкозой, где падение доли углерода было обусловлено одновременным уменьшением содержания углерода как алифатических, так и ароматических фрагментов, что привело к отсутствию роста показателя степени ароматичности $\Sigma C_{Ar}/\Sigma C_{Alk}$. Следовательно, можно предположить, что при использовании базидиальными грибами ГВ в качестве источника питательных веществ, прежде всего, происходит отщепление именно алифатических цепочек, а не ароматических структур. Более выраженное снижение содержания алифатических групп в ГВ при трансформации штаммами *T. hirsuta* и *T. maxima* наблюдали в вариантах полной питательной среды. Это может быть обусловлено как ускоренным ростом биомассы и, как следствие, увеличением продукции лигнолитических ферментов, так и использованием глюкозы в качестве субстрата радикальных реакций.

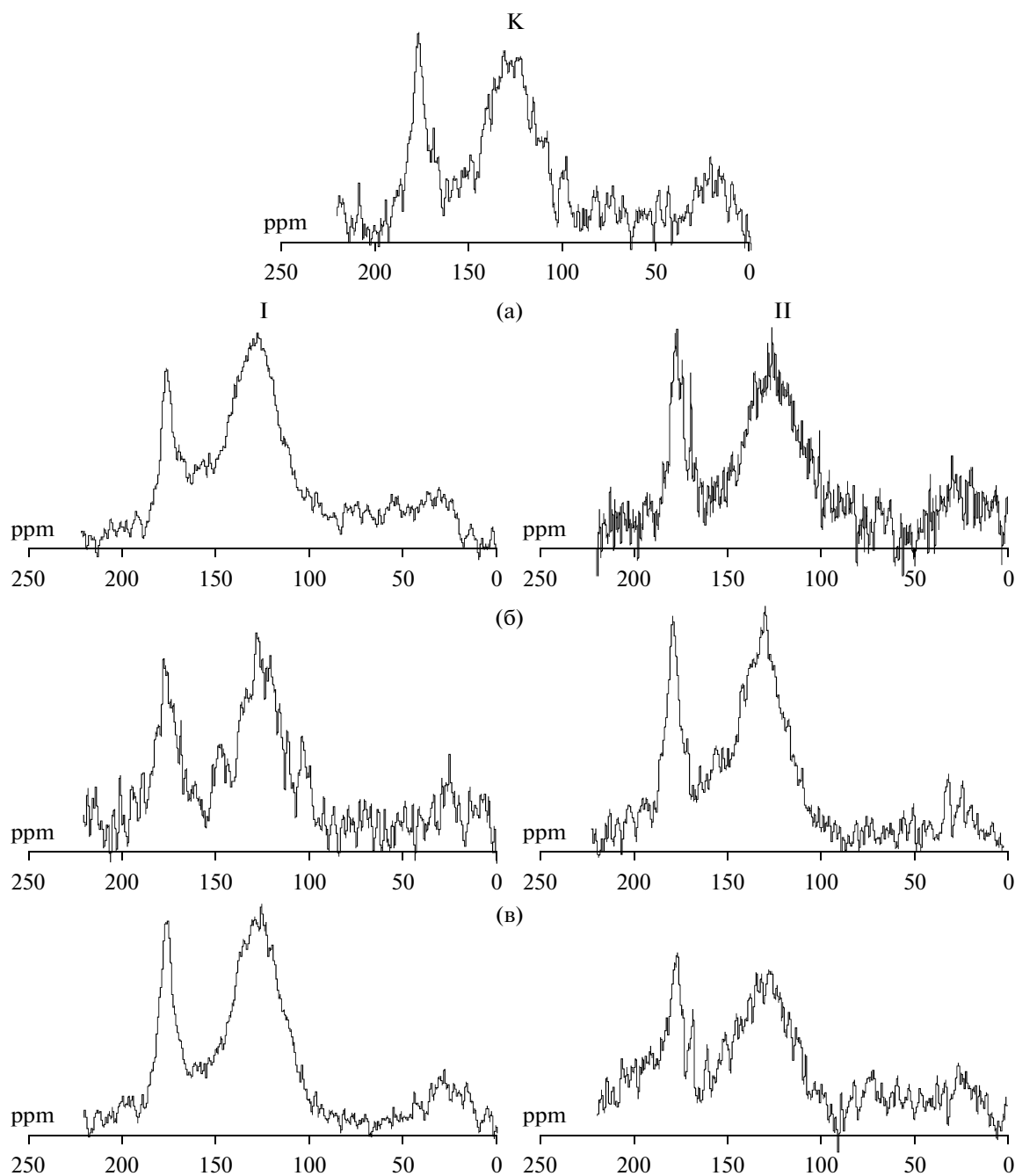


Рис. 3. Спектры ^{13}C ЯМР исходных (К) и трансформированных базидиальными грибами *T. hirsuta* (а) и *T. maxima* (б), *T. hirsuta* + *T. maxima* (в) ГВ; I – среда без глюкозы, II – среда с глюкозой.

При культивировании *T. hirsuta* на среде без глюкозы было отмечено снижение содержания в ГВ углерода карбоксильных групп C_{COO} , что согласуется с данными элементного анализа по уменьшению содержания кислорода в ГВ в этих условиях. Это подтверждает высказанное предположение о восстановлении карбоксильных групп до спиртовых на первом этапе деградации ГВ. В присутствии глюкозы содержание углерода карбоксильных групп не изменялось, а кетонных и хинонных

групп – возрастало. Возможно, это указывает на более глубокие процессы деградации ГВ, включающие в себя также окисление спиртов, образовавшихся на первом этапе трансформации, до кетонных. Снижение степени окисленности ГВ, установленное при анализе элементного состава (рис. 2), обусловлено, по-видимому, потерей ГВ кислородзамещенных алифатических фрагментов. Таким образом, присутствие легкодоступного источника

Таблица 3. Сравнительная оценка активности лигнинпероксидазы, Mn-пероксидазы и лакказы базидиальных грибов *T. hirsuta* и *T. maxima* при культивировании на леонардите

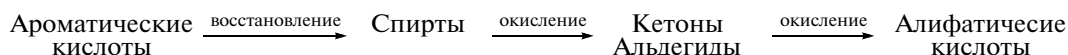
Вариант	Активность, МЕ		
	лигнинпероксидаза, $\times 10^3$	Mn-пероксидаза, $\times 10^3$	лакказа
	Среда без глюкозы		
<i>T. hirsuta</i>	5	18	0.2
<i>T. maxima</i>	6	8	0.3
<i>T. hirsuta</i> + <i>T. maxima</i>	3	7	0.1
	Среда с глюкозой		
<i>T. hirsuta</i>	15	10	0.2
<i>T. maxima</i>	4	8	0.2
<i>T. hirsuta</i> + <i>T. maxima</i>	10	14	1.9

углерода способствует более глубокой трансформации ГВ этим штаммом базидиальных грибов.

При трансформации ГВ штаммом *T. maxima* на бедной среде происходило увеличение относительного содержания углерода кетонных и хинонных групп при одновременном незначительном снижении алифатических, ароматических и карбоксильных фрагментов. Принимая во внимание общее увеличение окисленности по данным элементного анализа (рис. 2), можно предположить, что трансформация ГВ в данном случае протекала по механизму окисления спиртовых групп до кетонов. Так как содержание карбоксильных групп, которые могут служить источником спиртовых групп, при этом не уменьшалось, окислению подвергались

алифатические фрагменты. В присутствии глюкозы содержание $C_{C=O}$ также возрастало, однако при этом параллельно происходило также и увеличение карбоксильных групп. Это указывает на то, что, как и в случае *T. hirsuta*, внесение легкодоступного источника углерода приводит к более глубокой трансформации ГВ.

Таким образом, проведенный анализ изменений основных физико-химических свойств ГВ при трансформации их исследованными штаммами базидиальных грибов позволяет предположить следующую последовательность основных процессов деградации ГВ под действием ферментов лигнолитического комплекса базидиальных грибов:



Мониторинг ферментативной активности культуральных жидкостей показал, что динамика активности всех трех исследуемых ферментов имела сложный характер и зависела от фазы развития культуры. Поэтому для сравнения использовали средние значения активностей за изучаемый период трансформации ГВ (табл. 3).

Данные, представленные в табл. 3, показывают, что в лигнолитическом комплексе *T. hirsuta* и *T. maxima* наблюдалась преимущественная лакказная активность, что характерно для выбранных штаммов [15]. На среде без глюкозы исследованные штаммы обладали одинаковыми активностями лигнинпероксидазы и лакказы, но различались по активности Mn-пероксидазы, которая была значительно выше у *T. hirsuta*. Ранее было показано, что в этих условиях под действием *T. hirsuta* происходит уменьшение содержания карбоксильных групп в ГВ (табл. 2). Трансформация в этих условиях под действием *T. maxima* не приводила к снижению карбоксильных групп, но способствовала ро-

сту количества кетонных и хинонных фрагментов в ГВ. Следовательно, можно предположить, что под действием Mn-пероксидазы происходило декарбоксилирование ГВ. Действительно, проведенный корреляционный анализ показал, что существует обратная линейная зависимость ($r^2 = -0.86$) между активностью присутствующей в среде Mn-пероксидазы и содержанием карбоксильных групп в трансформированных ГВ (рис. 4). Полученная зависимость хорошо согласуется с данными других исследователей, отмечавших декарбоксилирование ГВ под действием грибной Mn-пероксидазы, катализирующей образование низкомолекулярного медиатора с высоким редокс-потенциалом — хелатированного иона Mn(III) [23].

При выращивании на полной питательной среде активность Mn-пероксидазы и лигнинпероксидазы была выше у *T. hirsuta*, чем у *T. maxima*. Изменение ферментативного профиля привело к тому, что при трансформации ГВ *T. hirsuta* наблюдали более выраженное увеличение содержания кетон-

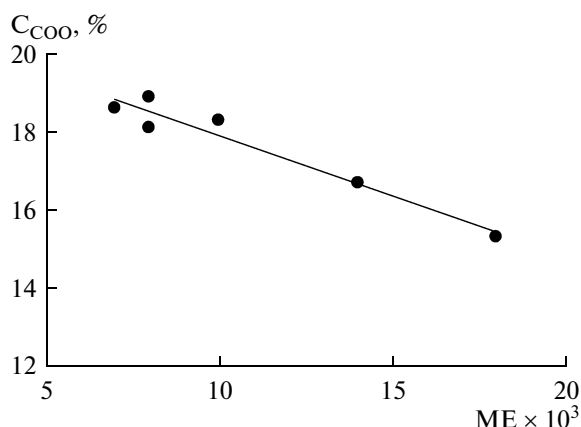


Рис. 4. Корреляционное поле переменных: активность Mn-пероксидазы и содержание углерода карбоксильных групп C_{COO} ГВ, трансформированных *T. hirsuta* и *T. maxima*.

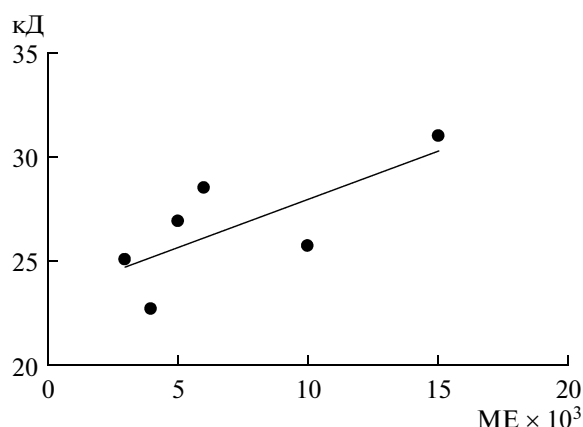


Рис. 5. Корреляционное поле переменных: молекулярная масса ГВ, трансформированных *T. hirsuta* и *T. maxima*, и активность лигнинпероксидазы.

ных и хинонных групп. Следовательно, можно предположить, что лигнинпероксидаза, синтезируемая *T. hirsuta*, отвечает за окисление спиртовых фрагментов в ГВ до кетонов, что соответствует субстратной специфичности лигнинпероксидаз [28].

Интересно отметить, что на двух выбранных питательных средах, наблюдалась положительная линейная зависимость ($r^2 = 0.73$) между активностью лигнинпероксидазы и ММ ГВ (рис. 5). Вероятно, установленное влияние лигнинпероксидазы на ММ ГВ свидетельствует о роли этого фермента в полимеризации продуктов частичной дегградации ГВ.

Проведенное исследование показало, что в случае *T. hirsuta* наличие легкодоступного источника углерода влияет, главным образом, на соотношение в продуцируемом мультиферментном комплексе лигнинпероксидазы и Mn-пероксидазы. При отсутствии глюкозы отмечалась более высокая активность Mn-пероксидазы, а в ее присутствии — лигнинпероксидазы. Изменение соотношения этих ферментов приводило к тому, что процесс восстановительного декарбонирования ГВ, преобладающий в условиях бедной среды и являющийся, по-видимому, первым этапом трансформации ГВ, менялся на более глубокие процессы окислительной деструкции, приводящие к образованию кетонных фрагментов и алифатических карбоновых кислот. Несмотря на наличие окислительных процессов при трансформации ГВ исследуемым штаммом *T. hirsuta*, в целом как на среде с глюкозой, так и без нее, преобладали восстановительные процессы.

При выращивании *T. maxima* влияние легкодоступного источника углерода на продукцию компонентов мультиферментного комплекса было менее выражено: активность Mn-пероксидазы не менялась, а активность лигнинпероксидазы немного уменьшалась при внесении в питатель-

ную среду глюкозы. Это приводило к меньшему образованию кетонных групп в ГВ и росту содержания карбоксильных фрагментов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что наличие глюкозы в среде способствует более глубокой трансформации ГВ исследованными штаммами базидиальных грибов, однако общее направление модификации — преимущественное восстановление или окисление — определяется физиолого-биохимическими особенностями штамма. Можно предположить, что преобладание восстановительных процессов при трансформации ГВ определялось присутствием в составе комплекса внеклеточных целлюлозодегидрогеназ, однако для проверки этого предположения требуется проведение дополнительных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы” (Соглашение 8111).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cohen M.J., Gabriele P.D. // Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 44. P. 23–27.
2. Scott C.D., Scott T.C., Woodward C.A. // Fuel. 1993. V. 72. P. 1695–1700.
3. Ralph J.P., Graham L.A., Catchside D.E.A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996. V. 46. P. 226–232.
4. Hölker U., Fakoussa R.M., Höfer M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995. V. 44. P. 351–355.
5. Hölker U., Höfer M. // Biotechnol. Lett. 2002. V. 24. P. 1643–1645.
6. Yuan H.L., Yang J.S., Wang F.Q., Chen W.X. // Appl. Biochem. Microbiol. 2006. V. 42. P. 52–55.
7. Gupta A., Birenda K. // Fuel. 2000. V. 79. P. 103–105.

8. *Fakoussa R.M., Hofrichter M.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 52. P. 25–40.
9. *Faison B.D.* Microbial transformations of lowrank coals / Ed. D.L. Crawford. Boca Raton: CRC Press, 1993. P. 1–26.
10. *Hurst H.M., Burges A., Latter P.* // Phytochemistry. 1962. V. 1. P. 227–231.
11. *Solarska S., May T., Roddick F.A., Lawrie A.C.* // Chemosphere. 2009. V. 75. P. 751–758.
12. *Gramss G., Ziegenhagen D., Sorge S.* // Microbial Ecol. 1999. V. 37. P. 140–151.
13. *Rezacova V., Hrselova H., Gryndlerova H., Miksik I., Gryndler M.* // Soil Biol. Biochem. 2006. V. 38. P. 2293–2299.
14. *Moilanen A.M., Lundell T., Vares T., Hatakka A.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996. V. 45. P. 792–799.
15. *Кляйн О.И., Куликова Н.А., Степанова Е.В., Софьян А.В., Филиппова О.И., Ландесман Е.О., Королева О.В.* // Проблемы агрохимии и экологии. 2011. № 3. С. 36–39.
16. *Marzullo L., Cannio R., Giardina P., Santini M.T., Sanna G.* // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 3823–3827.
17. *Paszczynski A., Grawford R.L., Huynh V.-B.* Methods Enzymology / Eds. W.A. Wood, S.T. Kellogg. N.Y.: Acad. Press, 1988. P. 264–271.
18. *Королева О.В., Явметдинов И.С., Шлеев В.Г., Степанова Е.В., Гаврилова В.П.* // Биохимия. 2001. Т. 66. № 6. С. 618–622.
19. *Perminova I.V., Frimmel F.H., Kudryavtsev A.V., Kulikova N.A., Abbt-Braun G., Hesse S., Petrosyan V.S.* // Environ. Sci. Technol. 2003. V. 37. P. 2477–2485.
20. *Kudryavtsev A.V., Perminova I.V., Petrosyan V.S.* // Anal Chim. Acta. 2000. V. 407. P. 193–202.
21. *Ковалевский Д.В., Пермин А.Б., Перминова И.В., Петросян В.С.* // Вестник МГУ, сер. 2 (Химия). 2000. № 41. С. 39–42.
22. *Snajdr J., Steffen K.T., Hofrichter M., Baldrian P.* // Soil Biol. Biochem. 2011. V. 42. P. 1541–1548.
23. *Hofrichter M., Ziegenhagen D., Sorge S., Ullrich, R., Bublitz F., Fritsche W.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 52. P. 78–84.
24. *Kabe Y., Osawa T., Ishihara A., Kabe T.* // Coal Preparation. 2005. V. 25. P. 211–220.
25. *Gotz G.K.E., Fakoussa R.M.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 52. P. 41–48.
26. *Рабинович М.Л., Болобова А.В., Кондращенко В.И.* Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Кн. 1. Древесина и разрушающие ее грибы. М.: Наука, 2001. С. 264.
27. *Орлов Д.С.* Химия почв. М.: Изд-во МГУ, 1985. С. 376.
28. *Куликова Н.А., Кляйн О.И., Степанова Е.В., Королева О.В.* // Прикл. биохимия и микробиология 2011. Т. 47. № 6. С. 619–634.

Transformation of Humic Substances of Highly Oxidized Brown Coal by the Basidiomycetes Fungi *Trametes hirsuta* and *Trametes maxima*

O. I. Klein^a, N. A. Kulikova^{a, b}, A. I. Konstantinov^c, T. V. Fedorova^a,
E. O. Landesman^a, and O. V. Koroleva^a

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

^b *Lomonosov Moscow State University, Department of Soil Science, Moscow, 119991 Russia*

^c *Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, 119991 Russia*

e-mail: klein_olga@list.ru

Received September 19, 2012

Abstract—The ability of the white rot basidiomycetes *Trametes hirsuta* and *Trametes maxima* to transform coal humic substances (HS's) under the conditions of solid phase cultivation in the presence or absence of an easily available source of carbon (glucose) has been studied. It was shown that during the growth of the fungal strains used in media containing HS's, destructive and condensation processes of HS transformation proceeded simultaneously. Based on a comparative physicochemical analysis of the initial HS's and HS's transformed by the fungi, it was established that, despite the introduction of glucose may favor a deeper transformation of HS's by basidiomycetes, the general direction of their modification is dominant reduction or oxidation and is determined by the physiological biochemical peculiarities of the strain used.

УДК 577.154.2+542.952+579.22

ИММОБИЛИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА–ПРОДУЦЕНТА ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЛИПАЗЫ ИЗ *Thermomyces lanuginosus* В НАНОУГЛЕРОД-СИЛИКАТНЫЕ МАТРИЦЫ И СВОЙСТВА ПРИГОТОВЛЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

© 2013 г. Г. А. Коваленко*, **, А. Б. Беклемишев***, Л. В. Перминова*, Т. В. Чуенко*, А. Л. Мамаев***, И. Д. Иванов***, С. И. Мосеенков*, В. Л. Кузнецов*, **

*Институт катализа СО РАН, Новосибирск 630090

e-mail: galina@catalysis.ru

**Новосибирский государственный университет

***Научно-исследовательский институт биохимии СО РАН, Новосибирск 630117

Поступила в редакцию 11.05.2012 г.

Исследованы многокомпонентные композитные биокатализаторы с липолитической активностью, приготовленные путем включения клеток рекомбинантного штамма-продуцента термостабильной липазы из *Thermomyces lanuginosus* в SiO₂-ксерогеле, содержащем наноуглеродный компонент – многослойные углеродные нанотрубки разного диаметра, а также углеродные наносферы луковичной структуры. Изучены свойства липазы как в клеточных суспензиях рекомбинантного штамма-продуцента, сконструированного на основе *E. coli* BL21(DE3), так и в иммобилизованном состоянии в зависимости от структуры и дисперсности наноуглеродного компонента, вводимого в состав биокатализаторов. Показано, что рекомбинантная внутриклеточная липаза проявляла активность в реакции гидролиза трибутирина, равную в среднем 50 Е/мг сухих клеток, и обладала высокой термостабильностью. При прогревании в оливковом масле при 100°C константа инактивации и время полуинактивации составили, соответственно, 6×10^{-3} мин⁻¹ и 2 ч, что на порядок превышает термостабильность липазы в буфере. Биокатализаторы с введенными в их состав агрегированными “толстыми” нанотрубками диаметром 20–22 нм проявляли максимальную начальную активность – 250 Е/г.

DOI: 10.7868/S0555109913030112

Липазы (триацил-глицерол эфир гидролазы, К.Ф. 3.1.1.3) природных микроорганизмов – бактерий, дрожжей и микроскопических грибов, предназначены для первичной атаки молекул мало- или нерастворимых триглицеридов и осуществляют гидролиз масел и жиров до жирных кислот, диглицеридов, моноглицеридов и глицерина. Эти ферменты являются преимущественно внеклеточными, секреторируются в среду при культивировании микроорганизмов. Коммерческие ферментные препараты липаз давно используют в производстве моющих средств как биодобавки. В настоящее время проводятся интенсивные исследования по применению липаз в других областях промышленности, таких, как тонкий органический синтез (разделение рацематов, синтез энантиомеров фармацевтических соединений), биоконверсия масел и жиров (переэтерификация, ацидолиз), производство биодизеля (гидролиз, синтез эфиров жирных кислот) [1, 2]. Внимание уделяется применению липаз в качестве биокатализаторов процессов переэтерификации в смесях растительных масел и жиров для получения ценных продуктов масложировой промышленности – специализированных жиров как важнейших ин-

гредиентов пищевых продуктов, а также заменителей масла какао и молочных жиров [3–6]. Коммерческие биокатализаторы компании Novozymes, предназначенные для этих процессов, приготовлены путем иммобилизации рекомбинантных липаз на различных носителях – силикагеле, ионообменных смолах [5–7].

В настоящее время для иммобилизации липаз исследуют современные силикатные материалы, такие, как синтетические силикаты с контролируемой пористостью, кремниевые аэрогели. На мезопористом диоксиде кремния SBA-15 (с удельной поверхностью 1007 м²/г и диаметром пор 6.7 нм) проводили иммобилизацию липазы из *Mucor javanicus* путем физической адсорбции фермента с последующей кросс-сшивкой глутаровым диальдегидом [8]. Приготовленный биокатализатор проявлял высокую активность в реакции гидролиза трибутирина и очень низкую активность в реакции гидролиза триолеина, после проведения 10 реакционных циклов его активность уменьшалась незначительно. В работе [9] описаны биокатализаторы, приготовленные методом адсорбции липазы из *Mucor miehei* на губчатых мезопористых силикатных материалах MCM-41 с контролируемой пори-

стостью и различными гидрофобно-гидрофильными свойствами поверхности. Для приготовления активных биокатализаторов подбирали оптимальный баланс по гидрофильности-гидрофобности поверхности адсорбентов: гидрофильный носитель – чистый диоксид кремния, гидрофобный – силикагель с привитыми бутил-группами. Было обнаружено, что активность липазы в реакциях гидролиза и переэтерификации растительных масел возрастала при иммобилизации на гидрофобных носителях, что, по-видимому, было связано с массопереносом гидрофобных субстратов к иммобилизованному ферменту [9]. Биокатализатор для гидролиза октил лаурата готовили путем инкапсулирования липазы из *Pseudomonas cepacia* в аэрогель диоксида кремния, полученный при гидролизе производных силанов, затем биокатализаторы сушили в сверхкритических условиях с участием CO₂ [10]. В работе [11] предложен многостадийный способ приготовления биокатализатора путем инкапсулирования липазы из *P. cepacia* в силикатную матрицу, полученную при гидролизе различных производных силанов в водном растворе, содержащем фермент. Сначала к водному раствору фермента добавляли катализатор (NaF) и силан. Образовавшийся гель с включенной липазой сушили и многократно промывали для удаления токсичных примесей (метанол, силиканол). После отмывки высушенный тонкодисперсный биокатализатор использовали в реакции гидролиза соевого масла в периодическом режиме. После завершения реакционного цикла набухший биокатализатор отфильтровывали и использовали в следующем реакционном цикле.

Биокатализатор для этерификации лауриновой кислоты октан-1-олом в среде изо-октана был приготовлен путем иммобилизации липазы из *P. cepacia* внутри силикатной матрицы, которую в свою очередь получали путем сшивки природной глины и силикатного полимера, образующегося при гидролизе тетра-метил-орто-силана в присутствии соли алкиламмония и неорганического катализатора [12]. В работе [13] липазы из *Candida rugosa* были инкапсулированы в аэрогель диоксида кремния, упрочненного кварцевым войлоком. Для этого кварцевый войлок пропитывали золам, содержащим фермент, с последующим переходом золя в гель. Приготовленные биокатализаторы использовали многократно без существенной потери активности.

Как отмечалось выше, большинство коммерческих биокатализаторов приготовлено путем иммобилизации частично очищенных ферментов. Очевидно, что если для приготовления биокатализаторов использовать биомассу микроорганизмов, продуцирующих внутриклеточную липазу, то стадии выделения и очистки ферментов исключаются, и стоимость биокатализаторов существенно снижается, что важно для крупнотон-

нажных процессов, например для получения биодизеля.

Микроорганизмы, продуцирующие внутриклеточную липазу, встречаются в природе довольно редко. Описан единственный штамм *Geotrichum candidum* 4013, продуцирующий как вне-, так и внутриклеточную липазу [14]. В реакции гидролиза масла, выделенного из черной смородины, было обнаружено различие в специфичности этих двух форм липазы. Целые микробные клетки с активностью липазы, иммобилизованные на гранулированных минералах и синтетических волокнах, использовали в патенте [15] для проведения различных реакций с участием растительных масел. Например, в реакции этерификации кукурузного масла этанолом выход конечных продуктов составил 60–95% [15]. В работе [16] были получены клетки *E. coli* и *P. putida* GM730 с иммобилизованной на клеточной стенке термостабильной липазой из *P. fluorescens*. Иммобилизацию фермента проводили с помощью “якорного” белка (ice-nucleation protein, INP) из *P. syringae*. При таком способе иммобилизации была ликвидирована проблема массопереноса субстрата внутрь клетки. Активность биокатализатора составила 350 ЕА/г сухих клеток. Иммобилизованная таким способом липаза полностью сохранила свою активность в двухфазной реакционной среде “вода–изо-октан” при гидролизе оливкового масла, синтезе триацилглицерида и разделении хиральных изомеров. Несомненно, что поиск природных и конструирование новых штаммов-продуцентов внутриклеточных липаз с заданными свойствами, является интересным и перспективным направлением в молекулярной биологии, микробиологии и гетерогенном биокатализе.

Цель работы – исследование многокомпонентных гетерогенных биокатализаторов с липолитической активностью, приготовленных путем иммобилизации целых клеток рекомбинантного штамма-продуцента термостабильной липазы из *T. lanuginosus*. Исследование свойств (активность, термостабильность) внутриклеточной рекомбинантной липазы как в суспензиях рекомбинантного штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3), так и в иммобилизованном состоянии. Изучение свойств приготовленных многокомпонентных биокатализаторов в зависимости от структуры и дисперсности вводимого в состав наночастицы компонента.

МЕТОДИКА

Рекомбинантный штамм-продуцент был сконструирован методами генетической инженерии путем клонирования химически синтезированного гена зрелой липазы из *Thermomyces lanuginosus* в составе экспрессирующего вектора pJExpress401 в клетках *E. coli* BL21(DE3) (обозначен **rE.coli/lip**).

Кодирующая область гена была оптимизирована для экспрессии в *E. coli* с помощью компьютерной программы Gene Designer2 фирмы DNA2.0 (США) и с учетом частот встречаемости пар кодонов [17] и положения второго аминокислотного остатка с N-конца полипептидной цепи [18]. Штамм *rE.coli/lip* обеспечивал экспрессию гена, индуцируемую изопропил- β -D-1-тиогактопиранозидом (ИПТГ), под контролем промотора бактериофага T5.

Глубинное выращивание клеток *rE.coli/lip* проводили на качалке (150 об/мин) в 2 л колбах Эрленмейера в течение 12 ч при 30°C. Питательная среда имела следующий состав (г/л): пептон ферментативный – 10.0, NaCl – 10.0, дрожжевой экстракт – 5.0, канамицин – 0.03, pH 7.5. В качестве посевного материала в колбу вносили 10 мл культуры клеток *rE.coli/lip*, выращенных на описанной выше среде в течение 18–20 ч при 37°C. После внесения посевного материала клетки выращивали до оптической плотности (ОП), равной 1.0 при 600 нм ($l = 1$ см), после чего вносили ИПТГ до конечной концентрации 0.5, 1 или 2 мМ и продолжали культивирование в течение 18 ч при 30°C. По окончании культивирования клетки отделяли центрифугированием (5 000 \times g, 20 мин, +4°C). Для расчета концентрации клеток (мг/мл) и удельной активности (Е/мг) использовали коэффициент, равный 0.32 мг/мл ОП ($l = 1$ см).

Иммобилизацию клеток *rE.coli/lip* и приготовление гетерогенных биокатализаторов проводили методом включения клеточной биомассы в структуру ксерогеля диоксида кремния, как описано в [19–21]. В качестве компонента № 1 и связующего использовали отмытый и отфильтрованный гидрогель диоксида кремния, полученный путем взаимодействия силиката натрия с аммонийными солями азотной кислоты при pH 8.0 и 50°C. Содержание SiO₂ в гидрогеле составило 12 мас. %. Активная биомасса *rE.coli/lip* (компонент № 2) была получена в описанных выше условиях и содержала 20–25 мас. % сухих клеток. В качестве компонента № 3 использовали тонкодисперсные порошки нанокремниевых материалов – многослойные углеродные нанотрубки (МУНТ) разного диаметра и нанокремниевый луковичной структуры (НУЛС). Многослойные углеродные нанотрубки диаметром 9–11 нм (МУНТ-1, “тонкие”) имели удельную поверхность ($S_{уд}$), равную 320 м²/г. Нанотрубки диаметром 20–22 нм (МУНТ-2, “толстые”) имели $S_{уд} = 140$ м²/г, НУЛС с диаметром сферы 5–6 нм (“нанолук”) – 485 м²/г. Для приготовления биокатализаторов использовали МУНТ как в виде агрегатов размером ≥ 150 нм, получаемых в пиролизической установке, так и предварительно диспергированные ультразвуком. Диспергирование “тонких” МУНТ проводили следующим образом: смешивали агрегированные

нанотрубки с SiO₂-гидрогелем, добавляли дистиллированную воду и проводили диспергирование при частоте 22 кГц и мощности излучения 300 Вт в течение 30 мин в водоохлаждаемой емкости. Полученную суспензию МУНТ-1 фильтровали, и использовали для приготовления биокатализаторов. Состав приготовленных биокатализаторов был следующим, в мас. % сухих веществ: биомасса – 35–40, нанокремниевый – 10, SiO₂ – 50–55.

Реакцию гидролиза триглицеридов – триацетина, трибутирина, оливкового масла, проводили в периодическом режиме в замкнутых системах при интенсивном встряхивании и температурах от 0 до 60°C. Реакцию инициировали путем внесения рекомбинантной липазы в реакционную среду следующего состава: 0.2 М трибутирин, 1.2 М глицерин, 0.6% гуммиарабик, 0.02 М фосфатный буфер, pH 7.0. Кинетику реакции гидролиза триглицеридов до жирной кислоты изучали, отбирая пробы. Концентрацию образующейся жирной кислоты определяли титриметрически на установке, состоящей из pH-метра, блока автоматического титрования БАТ-15 и бюретки, заполненной титрантом 0.025 н. NaOH. После завершения каждого реакционного цикла биокатализаторы оставляли в реакционной среде на 1–3 сут, затем среду сливали и заливали свежей эмульсией триглицерида и снова следили за скоростью гидролиза субстрата, периодически отбирая пробы. За единицу ферментативной активности (Е) принимали скорость реакции, равную 1 мкмоль/мин. Активность выражали в Е/мг сухих клеток или в Е/г биокатализатора для клеток в суспензии и в иммобилизованном состоянии соответственно. Поскольку эмульсии триглицеридов не стабильны, и через 15–20 мин наблюдалось укрупнение “масляных” частиц и расслоение реакционной среды на две фазы, то измерения проводили в начальный период времени (1–5 мин) с погрешностью 15–20%.

Обработку приготовленных биокатализаторов маслом проводили путем выдерживания сухих гранул в оливковом масле (“MP Biomedicals, LLC”, США) в течение 18–20 ч при 20–22°C. Затем масло тщательно удаляли, и биокатализаторы использовали в реакции гидролиза трибутирина.

Определение термостабильности рекомбинантной липазы проводили путем прогревания клеток *rE.coli/lip* в буфере, pH 7.0, и в оливковом масле при 60–100°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантный штамм *rE.coli/lip* продуцировал термостабильную липазу из *T. lanuginosus*, содержащую дополнительную аминокислотную последовательность из 6 гистидиновых остатков на C-конце полипептидной цепи, в количестве

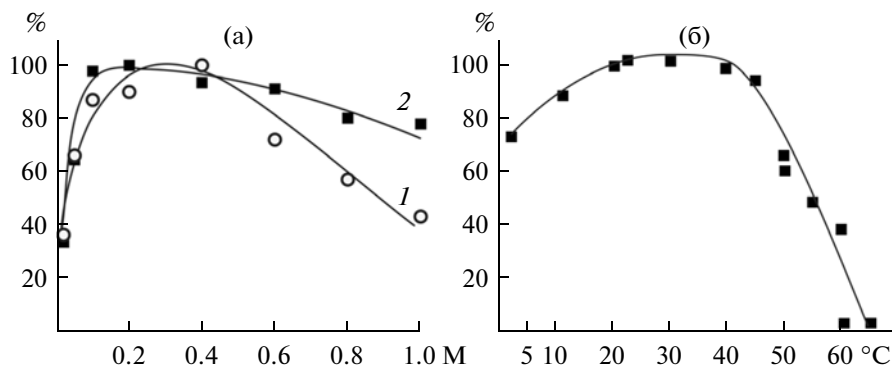


Рис. 1. Изменение относительной скорости реакции гидролиза (%) в зависимости от начальной концентрации трибутирина (М) (а): 1 – с участием гетерогенного биокатализатора, 2 – в суспензии клеток *rE.coli/lip*; и от температуры реакции (б).

~30–40% от суммарного белка клетки. Было показано, что синтезируемая штаммом рекомбинантная липаза локализуется как в цитоплазме в растворимом виде (до 70% от общего количества фермента), так и в ассоциированной с мембранами субклеточной фракции и в тельцах включения в количествах ~10 и ~20 соответственно.

Удельная активность рекомбинантной липазы в реакции гидролиза триацетина (С2), трибутирина (С4) и оливкового масла (преимущественно С18) составила соответственно 0.06, 149 и 2.3 Е/мг сухих клеток, т.е. в одинаковых условиях скорости реакции гидролиза триацетина и оливкового масла в ~1000 и ~100 раз меньше, чем скорость гидролиза трибутирина, поэтому дальнейшие исследования были проведены с использованием эмульсий трибутирина. Проведено сравнение свойств рекомбинантной липазы штамма *rE.coli/lip* со свойствами хроматографически очищенной липазы, впервые выделенной в 80 годы XX века из природного термофильного штамма микроскопических грибов *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* и описанной в работе [22]. В этой работе было найдено, что скорость гидролиза трибутирина была в ~2 раза выше, чем скорость гидролиза триацетина и триолеина.

Кинетика реакции. Изучена реакция гидролиза трибутирина в суспензиях *rE.coli/lip* при различных температурах. В первые 1–5 мин наблюдалось резкое увеличение концентрации выделившейся масляной кислоты, прирост ($C_t - C_0$) являлся положительной величиной, $\Delta C > 0$. При 20 и 30°C через 10 мин прирост масляной кислоты не происходил, $\Delta C = 0$, скорость реакции $dC/dt = 0$. При 50 и 60°C через 10 мин концентрация кислоты в реакционной среде достигала максимального значения, затем уменьшалась, $\Delta C < 0$, что могло указывать на возможное протекание обратной реакции с участием масляной кислоты и глицерина. Однако в модельных экспериментах, проведенных в реакционной среде, содержащей масляную

кислоту (0.01 М) и глицерин (0.01 М), при 50 и 60°C концентрация масляной кислоты не изменялась в течение 30 мин, т.е. химическая связь между жирной кислотой и глицерином под действием липазы не образовывалась. Трибутирин гидролизировался полностью через 2–4 сут при 20°C. Реакционная среда становилась гомогенной, не содержала “масляных” частиц триглицерида; концентрация масляной кислоты, рассчитанная из предположения полного гидролиза трибутирина в 1,3-положениях, соответствовала анализируемой. Следовательно, процесс гидролиза трибутирина является необратимым, и лимитирующей стадией этого процесса является переход молекул трибутирина из “масляной” частицы в раствор. Именно в микроокружении “масляной” частицы и/или на границе раздела фаз протекает ферментативная реакция. Величина ΔC определяется концентрацией молекулярного триглицерида в реакционной среде и суммарной активностью внесенного фермента. Для корректного расчета удельной липолитической активности в каждом эксперименте подбирали не только количество внесенного фермента/или биомассы/или биокатализатора, но и время отбора первых проб.

Кинетика Михаэлиса–Ментен. Исследование реакции гидролиза трибутирина в суспензиях клеток *rE.coli/lip* показало, что в изученных условиях кинетическая кривая в координатах Михаэлиса–Ментен имеет выраженный максимум (рис. 1а, 2). Известно, что максимум на кинетической кривой Михаэлиса–Ментен в большинстве случаев обусловлен ингибированием продуктами реакции, в данном случае масляной кислотой и/(или) глицерином. Было обнаружено, что повышение концентрации масляной кислоты (от 10 до 50 мМ), добавленной в начальный момент в реакционную смесь, содержащую 0.2 М трибутирина, незначительно (на 10–20%) снижает скорость гидролиза. Учитывая погрешности измерения, можно сказать, что масляная кислота практически не ингибирует процесс гидролиза

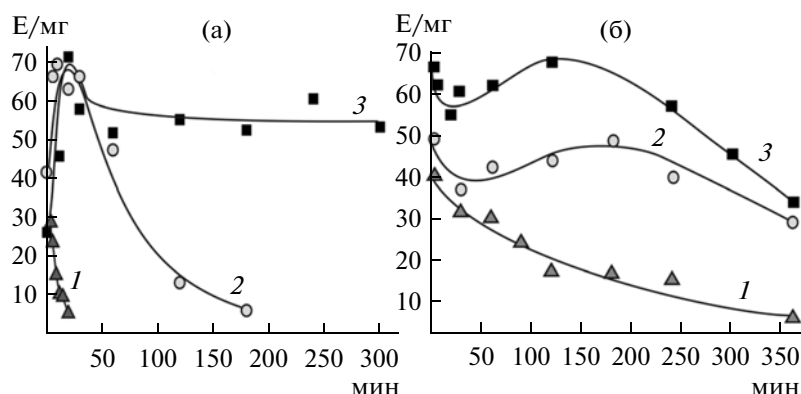


Рис. 2. Изменение удельной активности рекомбинантной липазы (Е/мг) в зависимости от температуры ($^{\circ}\text{C}$) и продолжительности прогрева (мин) клеток *rE.coli/lip* в буферном растворе, рН 7.0 (а: 1 – 70, 2 – 65, 3 – 60) и в оливковом масле (б: 1 – 100, 2 – 80, 3 – 70).

триглицерида. Увеличение концентрации глицерина от 0 до 1.2 М также не приводит к уменьшению скорости реакции гидролиза трибутирина, т.е. глицерин также не является ингибитором.

Максимум на кинетической кривой Михаэлиса–Ментен, представленной на рис. 1а, может быть обусловлен уменьшением стойкости эмульсий “масло–вода”. Действительно, при повышении концентрации трибутирина, стойкость эмульсий уменьшается, и реакционная среда расслаивается на две фазы. Поверхность раздела фаз, доступная для каталитической атаки липазой, уменьшается обратно пропорционально радиусу “масляной” частицы. Уменьшение скорости реакции, близкое к линейному после прохождения максимума на кинетической кривой Михаэлиса–Ментен, вероятно, обусловлено именно укрупнением “масляных” частиц эмульгированного триглицерида. Дополнительно было обнаружено, что при уменьшении стойкости эмульсий, например в отсутствие эмульгатора, скорость реакции гидролиза трибутирина падает. Так, если в “стандартной” реакционной среде активность *rE.coli/lip* составила 83.3 Е/мг сухих клеток, то в средах без глицерина или без глицерина + гуммиарабик липолитическая активность клеток была равной 75.8 и 50.8 ЕА/мг соответственно. Таким образом, максимум на кинетической кривой возникает из-за уменьшения стойкости эмульсий трибутирина при повышении его концентрации.

Температурный оптимум. Показано, что $T_{\text{опт}}$ в реакции гидролиза трибутирина в клеточных суспензиях *E. coli/lip* является очень широким (рис. 1б). Так, реакция протекает с достаточной скоростью даже на холоду ($2\text{--}10^{\circ}\text{C}$), а при температурах выше $40\text{--}45^{\circ}\text{C}$ наблюдается резкое падение начальной скорости гидролиза трибутирина; и при $60\text{--}65^{\circ}\text{C}$ скорость реакции равна нулю (рис. 1б). Эта зависимость отличается от температурной кривой для очищенного фермен-

та, описанной в работе [22]; так, в реакции гидролиза оливкового масла $T_{\text{опт}} = 45^{\circ}\text{C}$, а при 70°C начальная скорость реакции составляет $\sim 20\%$ от максимальной скорости.

Термостабильность. Изучена термостабильность рекомбинантной липазы при прогревании клеток *rE.coli/lip* в буферном растворе, рН 7.0. Было обнаружено, что кратковременный прогрев клеток в буфере при 60 и 65°C приводит к активации рекомбинантной липазы в 2.6 и 1.6 раз соответственно (рис. 2а, 2, 3). При 60°C клетки *rE.coli/lip* проявляют сравнительно высокую активность в течение >5 ч прогрева, а при 70°C наблюдается полная потеря активности в течение 1 ч (рис. 2а, 1). Константы инактивации ($k_{\text{ин}}$) рекомбинантной липазы составляют 0.007 и 0.11 мин^{-1} при 65 и 70°C соответственно. Эти результаты совпадают с данными, описанными в работе [22]. Таким образом, рекомбинантная липаза выдерживает продолжительный прогрев при повышенных температурах, тогда как температурный оптимум реакции гидролиза трибутирина лежит в диапазоне $20\text{--}45^{\circ}\text{C}$. В этом случае, можно предположить, что при температурах выше 60°C равновесие смещено в сторону образования триглицеридов (обратная реакция), и скорость прямой реакции гидролиза приближается к нулю.

Исследована термостабильность рекомбинантной липазы в оливковом масле. Клетки *rE.coli/lip* предварительно высушивали, затем помещали в масло и прогревали. При 70 и 80°C термостабильность липазы была практически одинаковой; и время полуинактивации составило 6 ч (рис. 2б, 2, 3). При 100°C константа инактивации $k_{\text{ин}}$ составила 0.006 мин^{-1} , время полуинактивации – 2 ч (рис. 2б, 1). Такая же величина константы инактивации, $k_{\text{ин}} = 0.007 \text{ мин}^{-1}$, наблюдалась при прогреве при 65°C в буфере. Таким образом, термостабильность рекомбинантной липазы в

Таблица 1. Влияние обработки биомассы *rE.coli/lip* на липолитическую активность в реакции гидролиза трибутирина

Условия обработки	Удельная активность, Е/мг сухих клеток
Интактные клетки, без обработки	2.5
Сушка, 22°C, 20 ч	43.5
Обработка толуолом, 1 : 1, 22°C, 20 ч	59.6
Замораживание (–20°C) – размораживание	36.0
Размораживание + сушка	45.0
Лизоцим (3 мг/мл, 0°C, 5 мин) + ультразвук (20 кГц, 3 раза, 30 с)	117.2
Лизоцим + ультразвук + сушка	211.0

масле на порядок выше, чем в водной среде, что является очень важной характеристикой фермента для его успешного практического применения в реакциях переэтерификации масел и жиров, протекающих при 60–70°C.

Исследованы свойства гетерогенных биокатализаторов, приготовленных путем включения клеток *rE.coli/lip* в ксерогель диоксида кремния. При сравнении данного метода с методами, описанными в работах [10–13], видно, что для приготовления биокатализаторов не используются дорогостоящие силаны; и токсичные побочные продукты их гидролиза и конденсации (метанол, силиканол) не образуются. Используемый гидрогель диоксида кремния отличается химической инертностью и микробиологической устойчивостью.

Кинетика Михаэлиса–Ментен. Исследование кинетики реакции гидролиза трибутирина иммобилизованными клетками *rE.coli/lip* показало, что кинетические кривые в координатах Михаэлиса–Ментен имеют выраженный максимум в диапазоне концентраций субстрата 0.1–0.4 М (рис. 1а, 1), аналогично суспендированным клеткам. Значение константы Михаэлиса (K_M), оцененные в координатах Лайнуивера–Берка, для рекомбинантной липазы в клеточных суспензиях и для гетерогенного биокатализатора составили 0.1 М и 0.08 М соответственно, т.е. при включении биомассы в SiO_2 -ксерогель K_M практически не изменилась.

Температурный оптимум. На температурной кривой для реакции гидролиза трибутирина с участием гетерогенного биокатализатора наблюдается более узкий и выраженный максимум по сравнению с рекомбинантной липазой в суспензиях, $T_{\text{опт}} = 40–45^\circ\text{C}$. При температуре выше 45°C наблюдается резкое падение скорости реакции, аналогичное наблюдаемому в суспензиях; при 60°C скорость гидролиза трибутирина с участием биокатализатора практически равна нулю.

Активность и стабильность гетерогенных биокатализаторов в реакции гидролиза трибутирина. При

включении клеток *rE.coli/lip* в SiO_2 -ксерогель сохраняется не более 1–2% липолитической активности суспендированных клеток. Такая “драматическая” потеря активности при иммобилизации может быть обусловлена разными причинами: (1) инактивацией липазы при приготовлении биокатализаторов – высушивание + прессование, (2) внутридиффузионными ограничениями при массопереносе субстрата внутрь пористой гранулы биокатализатора и отвода продукта, обладающего ингибирующим действием, (3) чрезвычайно малой величиной поверхности раздела фаз “масло–твердый биокатализатор”, на которой протекает реакция гидролиза эмульгированного трибутирина.

Сначала определили, как влияет замораживание-размораживание, а также сушка биомассы *rE.coli/lip* на липолитическую активность, регистрируемую в клеточных суспензиях. Было обнаружено, что удельная липолитическая активность ($A_{\text{уд}}$) интактных клеток *rE.coli/lip*, собранных сразу после глубинного культивирования центрифугированием, была очень низкая, не более 2.5 Е/мг сухих клеток при 20°C (табл. 1). Удельная липолитическая активность размороженной биомассы составила от ~10 до 50 Е/мг (в среднем, ~40), что на порядок выше удельной активности интактных клеток. При высушивании интактных клеток *rE.coli/lip* при 20–22°C и влажности воздуха 20–30% наблюдаемая удельная липолитическая активность также увеличивалась в среднем на порядок. При высушивании размороженной биомассы *rE.coli/lip* удельная липолитическая активность не изменялась даже при многократной сушке. Из табл. 1 видно, что независимо от способа воздействия на биомассу, ее удельная активность повышается на порядок по сравнению с интактными клетками, что указывает на увеличение доступности внутриклеточной липазы для субстрата. Удельная липолитическая активность клеточных лизатов, полученных при обработке биомассы лизоцимом и ультразвуком, является максимальной (табл. 1). Таким образом, стадия сушки не является причиной значительной потери фермента-

Таблица 2. Характеристика и свойства биокатализаторов в зависимости от прессования*

Давление при прессовании, атм	$S_{уд}$, м ² /г	V_{Σ} , см ³ /г	Диаметр пор (средний), нм	Активность (начальная), ЕА/г	Время полуинактивации, ч	Активность после 6 циклов, %
0	92.0	0.58	25	324	72	12
50	88.7	0.51	23	339	84	16
150	81.6	0.30	15	252	48	9

* Состав биокатализаторов (в мас. %): биомасса – 40, SiO₂ – 60.

тивной активности при приготовлении биокатализаторов. Стадия прессования также не оказывала существенного влияния на величину начальной активности биокатализаторов с одинаковым содержанием биомассы (30–45%). Так, начальная липолитическая активность биокатализаторов практически не зависела от того, используют или нет прессование для их приготовления. Для непрессованных биокатализаторов скорость гидролиза, измеренная в 2–3 реакционных циклах, была в ~1.5–2 раза больше, чем скорость гидролиза, измеренная в первом цикле, что, вероятно, было обусловлено частичным разрушением SiO₂-матрицы и выходом рекомбинантной липазы в реакционную среду. Для биокатализаторов, приготовленных путем прессования при 50–150 атм, скорость реакции в течение 6 реакционных циклов монотонно падала на 10–15% в каждом цикле, затем оставалась постоянной. Все приготовленные биокатализаторы после 6 циклов реакции (через 144 ч) сохранили не более 20% первоначальной активности свежеприготовленного биокатализатора. Гранулы биокатализаторов, запрессованные при 150 атм, сохраняли высокую механическую прочность в течение более 10 циклов реакции (каждый по 24–72 ч, т.е. в течение 600 ч) и не разрушались. Таким образом, наблюдаемая потеря липолитической активности на 2 порядка не обусловлена сушкой и прессованием при приготовлении биокатализаторов.

Влияние массопереноса субстрата внутрь пористой гранулы на наблюдаемую скорость гидролиза трибутирина (область внутренней диффузии) оценивали, изучая зависимость скорости реакции от размера гранул и текстурных характеристик биокатализаторов. Известно, что масштаб внутридиффузионного торможения оценивается по величине фактора эффективности f , равного отношению наблюдаемой скорости реакции к скорости реакции в кинетической области. Фактор эффективности приближенно вычисляется по формуле

$$f = \frac{9D_{\text{эф}}[S]V_{\Sigma}}{r^2W},$$

где r – радиус гранулы катализатора, W – скорость реакции в кинетической области, $D_{\text{эф}}$ – эффективный коэффициент диффузии субстрата, $[S]$ – по-

верхностная концентрация субстрата, V_{Σ} – суммарный объем пор. Из формулы следует, что если процесс протекает во внутридиффузионной области, то уменьшение радиуса гранулы в 2 раза, приводит к ~4-кратному увеличению наблюдаемой скорости реакции. Было показано, что при уменьшении размера гранул в 2 раза (1–2 мм до 0.3–0.6 мм) начальная скорость реакции гидролиза и характер инактивации биокатализаторов не изменились.

Методом азотной порометрии было найдено, что в пористой структуре всех приготовленных биокатализаторов преобладают нанопоры диаметром 15–25 нм (табл. 2). При прессовании с увеличением давления удельная поверхность биокатализаторов ($S_{уд}$) уменьшается незначительно (на ~10 м²/г), а суммарный объем пор V_{Σ} , уменьшается в 2 раза (табл. 2). Из формулы, приведенной выше, следует, что при наличии внутридиффузионного торможения при уменьшении V_{Σ} в 2 раза величина f падает также в ~2 раза. Однако, как отмечалось выше и видно из табл. 2, начальная активность биокатализаторов, а также их стабильность в периодическом процессе гидролиза трибутирина, не столь существенно зависят от того, используют или не используют прессование при их приготовлении (табл. 2). Анализируя все полученные результаты, можно сделать вывод о том, что гетерогенный гидролиз трибутирина протекает в области, близкой к кинетической. Наблюдаемые незначительные диффузионные ограничения не могут вызвать потерю активности на 2 порядка при включении клеток *rE.coli/lip* в SiO₂-ксерогель.

Исключая причины (1) и (2), описанные выше, можно прийти к заключению, что “драматическая” потеря липолитической активности при включении биомассы клеток *rE.coli/lip* в SiO₂-ксерогель происходит по причине (3), а именно, из-за чрезвычайно малой величины поверхности раздела фаз “масло–твердый биокатализатор”, на которой протекает реакция гидролиза эмульгированного трибутирина. Очевидно, что в гетерогенных условиях поверхность раздела фаз, доступная для биокатализа, значительно меньше, чем в эмульсиях. Поскольку, как отмечалось выше, при измельчении гранул и соответствующем увеличе-

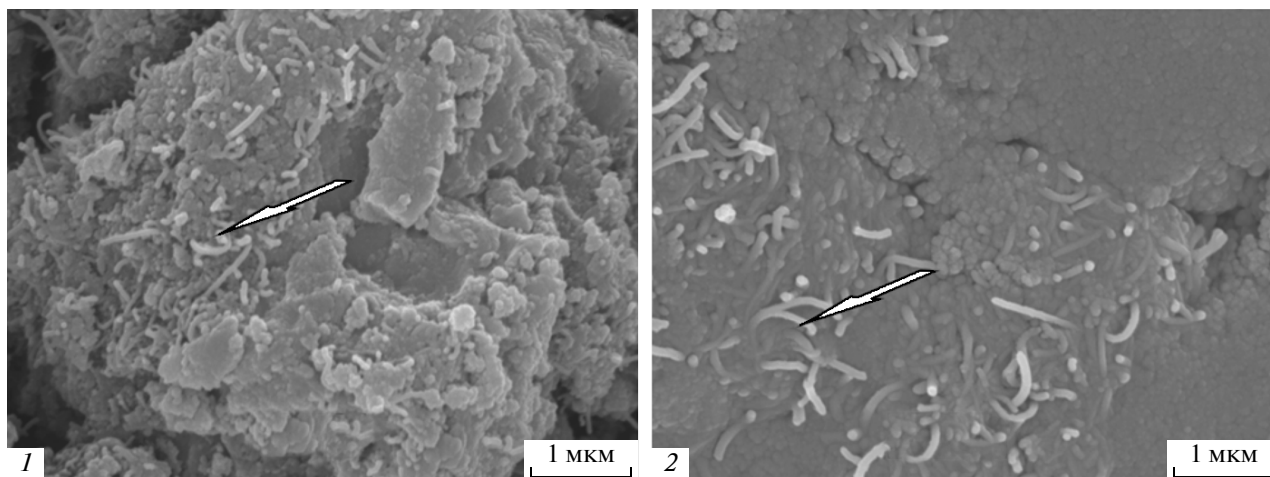


Рис. 3. Электронно-микроскопическое изображение биокатализаторов, приготовленных путем включения клеток *rE.coli/lip* в SiO_2 -ксерогель, содержащий нанокремниевый компонент: 1 – диспергированные МУНТ-1, 2 – МУНТ-2. Стрелками показаны МУНТ.

нии геометрической поверхности, доступной для контакта биокатализаторов с “масляной” частицей, наблюдаемая скорость реакции практически не увеличивается, то определяющую роль, по-видимому, играет размер “масляных” частиц трибутирина, а также их возможное сродство к твердому биокатализатору.

Для увеличения устойчивости эмульсий и сродства частиц трибутирина было предложено дополнительно вводить в SiO_2 -ксерогель гуммиарабик. Известно, что гуммиарабик является эффективным стабилизатором дисперсных систем (эмульсии, пены), а также пленко-образователем. Было обнаружено, что введение гуммиарабика в состав многокомпонентного биокатализатора (в количестве от 2 до 10 мас. %) не изменило активности приготовленных биокатализаторов в реакции гидролиза трибутирина.

Для увеличения сродства “масляных” частиц к биокатализаторам было предложено также вводить в их состав нанокремниевые материалы, которые обладали выраженными гидрофобными свойствами. На электронно-микроскопических изображениях гранул биокатализаторов и их сколов видно, что углеродные нанотрубки включены в структуру SiO_2 -ксерогеля вместе с клетками *rE.coli/lip* (рис. 3), и даже присутствуют на поверхности прессованных биокатализаторов (рис. 3, 2). Следует отметить, что предварительное диспергирование “тонких” МУНТ-1 приводило к более равномерному распределению нанокремниевых компонентов в объеме биокатализатора, при этом устойчивость гранул и их механическая прочность в реакционной среде существенно возрастала.

В результате сравнительных исследований липолитической активности нанокремниевых биокатализаторов было установлено, что увеличение гидрофобности путем введения нанокремниевых компонентов МУНТ-1 и НУЛС приводит к уменьшению начальной активности биокатализаторов по сравнению с исходными образцами (без углерода); причем, чем гидрофобнее нанокремниевый компонент, тем меньше начальная активность приготовленных биокатализаторов. По-видимому, в результате гидрофобного взаимодействия трибутирина с углеродными материалами МУНТ-1 и НУЛС концентрация субстрата внутри биокатализатора существенно возрастала, и реакция гидролиза протекала в той области кинетической кривой Михаэлиса–Ментен (рис. 1а, 1), где наблюдается падение активности после прохождения максимума. Как видно из рис. 4а, наиболее активными были биокатализаторы, приготовленные с использованием агрегированных “толстых” МУНТ-2. Очевидно, что внутри данных биокатализаторов концентрация трибутирина также повышается, но неравномерно, образуя локальные депо субстрата, и реакция гидролиза протекает в области максимума на кинетической кривой, представленной на рис. 1, 1. Можно сказать, что в этом случае гидрофильно-гидрофобный баланс внутри приготовленного биокатализатора является оптимальным.

Исследование влияния дисперсности углеродных нанотрубок, вводимых в состав биокатализаторов, на их активность и стабильность показало, что предварительное диспергирование агрегатов “тонких” МУНТ-1 и, как отмечалось выше, их более равномерное распределение в силикатной матрице приводит к 4-кратному падению начальной активности биокатализаторов. Агрегаты МУНТ-1, аналогично агрегатам МУНТ-2, рас-

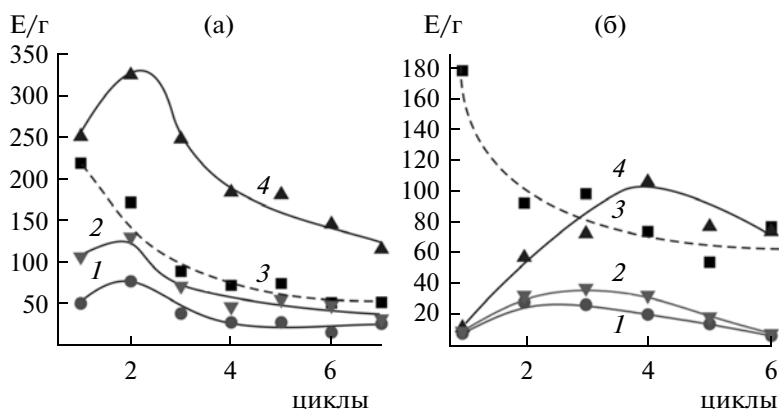


Рис. 4. Зависимость активности приготовленных биокатализаторов (Е/г) от количества реакционных циклов и типа введенного наноуглеродного компонента в состав биокатализаторов (а): 1 – диспергированные МУНТ-1, 2 – “нанолук”, 3 – без наноуглерода (контрольный биокатализатор), 4 – МУНТ-2; а также биокатализаторов, обработанных в оливковом масле (б): 1 – диспергированные МУНТ-1, 2 – “нанолук”, 3 – контрольный биокатализатор (без наноуглерода и без обработки в масле), 4 – МУНТ-2.

пределены внутри биокатализатора неравномерно, и значительная доля объема гранул приходится на SiO_2 . Введение агрегированных МУНТ-1 не изменяет величину начальной активности биокатализаторов (~ 220 Е/г) по сравнению с исходным, контрольным образцом (без углерода, ~ 220 Е/г). Таким образом, увеличение гидрофобности биокатализаторов путем введения в их состав наноуглеродных материалов по-разному влияет на их липолитическую активность, что определяется типом и дисперсностью вводимого наноуглерода. По влиянию введенного наноуглеродного компонента на активность свежеприготовленных биокатализаторов (A_0) изученные материалы можно расположить в следующий ряд: агрегаты МУНТ-2 ($A_0 \sim 250$ ЕА/г) > агрегаты МУНТ-1 и без углерода (~ 220 ЕА/г) > “нанолук” (106 ЕА/г) > диспергирован. МУНТ-1 (~ 50 ЕА/г) (рис. 4а). Анализируя эти результаты, можно сделать вывод о необходимости оптимального соотношения гидрофильности–гидрофобности внутри биокатализаторов, учитывая особенности ферментативной реакции – гидролиза эмульгированного триглицерида. Более гидрофобные материалы – “тонкие” МУНТ-1 и “нанолук”, обладающие удельной поверхностью выше $300 \text{ м}^2/\text{г}$, значительно повышают концентрацию трибутирина внутри матрицы SiO_2 -ксерогеля, и реакция переходит в область кинетической кривой Михаэлиса–Ментен после прохождения максимума. Как отмечалось выше, агрегаты МУНТ-1 и МУНТ-2 распределены в SiO_2 -ксерогеля неравномерно, формируя локальные депо субстрата внутри биокатализатора, и реакция протекает в области максимума на кинетической кривой Михаэлиса–Ментен.

Характерной особенностью наноуглерод-силикатных биокатализаторов являлось увеличение

их активности после проведения первого реакционного цикла (рис. 4а). Масштаб такого увеличения, равный отношению максимально наблюдаемой активности ($A_{\text{макс}}$) к начальной активности свежеприготовленного биокатализатора (A_0), составил 1.2–1.5. Стабильность МУНТ-содержащих биокатализаторов была сравнительно высокой: после проведения 7 циклов реакции (по 24 ч каждый) биокатализаторы сохранили $\geq 50\%$ активности свежеприготовленных биокатализаторов (рис. 4а). Ранее в работе [21] было показано, что стабильность биокатализаторов увеличивается за счет адсорбции/адгезии ферментативно-активного компонента на наноуглеродном материале и его удерживания внутри силикатной матрицы биокатализатора. Биокатализаторы, содержащие диспергированные МУНТ-1, после 4 реакционного цикла достигали стационарного состояния с активностью 26 ЕА/г (рис. 4а, 1), по-видимому, из-за сравнительно прочной адсорбции рекомбинантной липазы на “тонких” МУНТ-1. Биокатализаторы, содержащие агрегаты МУНТ-2 и “нанолук”, а также контрольные (без углерода), монотонно теряли активность в последующих циклах периодического процесса гидролиза (рис. 4а, 2–4).

Были изучены биокаталитические свойства иммобилизованных клеток *rE.coli/lip* после обработки оливковым маслом. Как отмечалось выше, термостабильность рекомбинантной липазы в масле на порядок выше, чем в буферном растворе. Было обнаружено, что биокатализаторы, выдержанные в оливковом масле, в реакции гидролиза эмульгированного трибутирина проявляют активность, на порядок меньшую, чем контрольные образцы, не обработанные маслом. По-видимому, масло блокировало доступ субстратов – трибутина и, в особенности, воды, к иммобилизованной

рекомбинантной липазе. Для наноглерод-силикатных биокатализаторов, обработанных в масле, наблюдался суммарный эффект как от негативного влияния масла, так и от введенного наноглерода (рис. 4б), причем все зависимости, описанные для наноглеродного компонента ранее, сохранились. Так, максимальной активностью обладали биокатализаторы, в состав которых были введены агрегаты “толстых” МУНТ-2, минимальной – диспергированные “тонкие” МУНТ-1 (рис. 4б). Характерной особенностью наноглерод-силикатных биокатализаторов, обработанных в масле, являлось продолжительное увеличение активности после проведения 1 реакционного цикла в течение 3–4 последующих циклов (рис. 4б). Наблюдаемое увеличение активности свежеприготовленных биокатализаторов, по-видимому, происходило из-за вымывания оливкового масла из матрицы и оптимизации гидрофильно–гидрофобного баланса внутри биокатализатора. Величина отношения $A_{\text{макс}}/A_0$ определялась структурой наноглеродного компонента. Так, для агрегатов МУНТ-2 $A_{\text{макс}}/A_0 = 9.6$, для агрегатов МУНТ-1 и “нанолука” $A_{\text{макс}}/A_0 = 4.1–4.5$, для диспергированных МУНТ-1 – $A_{\text{макс}}/A_0 = 3.4$, без углерода – $A_{\text{макс}}/A_0 = 1.8$. После проведения 6 реакционных циклов реакции активность биокатализаторов, содержащих агрегаты МУНТ-2 и МУНТ-1, была соответственно в 6.5 и 2 раза выше активности свежеприготовленных биокатализаторов. Видно, что введение в состав биокатализаторов агрегатов МУНТ оказывает наиболее выраженный положительный эффект.

Таким образом, для приготовления гетерогенных биокатализаторов с липолитической активностью был сконструирован рекомбинантный штамм *rE.coli/lip*, продуцирующий термостабильную липазу из *Thermomyces lanuginosus* в количестве ~30–40% от суммарного белка. Многокомпонентные биокатализаторы с липолитической активностью были приготовлены путем включения клеток штамма-продуцента *rE.coli/lip* в наноглеродсодержащий SiO₂-ксерогель. В качестве наноглеродного компонента использовали многослойные углеродные нанотрубки (МУНТ) разного диаметра, а также “нанолук”.

Активность рекомбинантной липазы в клеточных суспензиях *rE.coli/lip*, измеренная в реакции гидролиза трибутирина, составила в среднем 50 Е/мг сухих клеток при 20°C. Термостабильность рекомбинантной липазы при прогревании в оливковом масле на порядок выше, чем в буфере; и при 100°C константа инактивации в масле составила 6×10^{-3} мин⁻¹, время полуинактивации – 2 ч. С другой стороны, после обработки оливковым маслом липолитическая активность многоком-

понентных биокатализаторов уменьшалась на порядок.

Исследование эффектов от введения наноглеродного компонента в состав многокомпонентных биокатализаторов показало, что использование агрегатов “толстых” МУНТ диаметром 20–22 нм приводило к получению биокатализатора с максимальной величиной начальной активности (250 Е/г). При введении диспергированных “тонких” МУНТ-1 диаметром 9–11 нм активность биокатализаторов была минимальной (50 Е/г).

Полученные результаты позволили сделать вывод о необходимости оптимального баланса гидрофильно–гидрофобных свойств внутри биокатализаторов с учетом особенностей ферментативной реакции гидролиза гидрофобного субстрата – трибутирина. Так, увеличение гидрофобности за счет введения диспергированных МУНТ-1 и “нанолука” приводит к многократной потере активности наноглерод-силикатных биокатализаторов по сравнению с силикатными биокатализаторами (без углерода). Оптимальный баланс гидрофильности–гидрофобности был достигнут при введении агрегатов “толстых” МУНТ-2, что привело к увеличению липолитической активности в 1.3–1.5 раз по сравнению с биокатализаторами без углерода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J., Haas M.J. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2000. V. 9. № 4–6. P. 113–148.
2. Akhil Bajaj, Purva Lohan, Prabhat N. Jha, Rajesh Mehrotra // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 62. № 1. P. 9–14.
3. Aravindan R., Anbumathi P., Viruthagiri T. // Ind. J. Biotechnol. 2007. V. 6. № 2. P. 141–158.
4. Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 66. № 1. P. 15–32.
5. Зайцева Л.В. // Пищ. промышл. 2011. № 5. С. 22–25.
6. Nese S., Casimir C.A., Artemis K. // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 14. P. 5779–5783.
7. Christensen M.W., Andersen L., Tommy L.H., Ole K. // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2003. V. 105. № 4. P. 318–321.
8. Salis A., Meloni D., Ligas S., Casula M.F., Monduzzi M., Solinas V., Dumitriu E. // Langmuir. 2005. V. 21. № 12. P. 5511–5516.
9. Galarneau A., Muresanu M., Aiger S., Renard G., Fajula F. // New J. Chem. 2006. V. 30. № 4. P. 562–571.
10. Maury S., Pierre A.C. // Macromol. Biosci. 2001 V. 1. № 4. P. 119–125.
11. Nouredini H., Gao X., Joshi S., Wagner P.R. // J. Amer. Oil Chem. Soc. 2002. V. 79. № 1. P. 33–40.
12. Hsu An-Fe, Foglia T.A., Shen Siyan // Biotechnol. Appl. Biochem. 2000. V. 31. № 3. P. 179–183.
13. Buisson P., Pierre A.C. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2006. V. 39. № 1–4. P. 77–82.

14. Hlavsova K., Zarevucka M., Wimmer Z., Mackova M., Sovova H. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2009. V. 61. № 3–4. P. 188–193.
15. Патент Италии. 2007. № 0858 A1.
16. Jung Heung-Chae, Ko Sumin, Ju Suk-Ja, Kim Eui-Joong, Kim Mi-Kyung, Pan Jae-Gu // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2003. V. 26. № 3–6. P. 177–184.
17. Hatfield G.W., Roth D.A. // Biotechnol. Annu. Rev. 2007. V. 13. № 1. P. 27–42.
18. Bivona L., Zou Z., Stutzman N., Sun P.D. // Protein Expr. Purif. 2010. V. 74. № 2. P. 248–256.
19. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Чуенко Т.В., Сапунова Л.И., Шляхотко Е.А., Лобанок А.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 2. С. 168–175.
20. Перминова Л.В., Коваленко Г.А., Чуенко Т.В., Рудина Н.А. // Кинет. Катал. 2012. Т. 53. № 1. С. 150–159.
21. Kovalenko G.A., Perminova L.V., Rudina N.A., Mazov I.N., Moseenkov S.I., Kuznetsov V.L. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2012. V. 76. № 2. P. 116–124.
22. Ibrahim Che Omar, Mitsunori Hayash, Shiro Nagai // Agric. Biol. Chem. 1987. V. 51. № 1. P. 37–45.

Recombinant Strain Producing Thermostable Lipase from *Thermomyces lanuginosus* Immobilized into Nanocarbon Silica Matrices and Properties of the Prepared Biocatalyzers

G. A. Kovalenko^{a, b}, A. B. Beklemishev^c, L. V. Perminova^a, T. V. Chuenko^a, A. L. Mamaev^c, I. D. Ivanov^c, S. I. Moseenkov^a, and V. L. Kuznetsov^{a, b}

^a Borekov Institute of Catalysis, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, pr. akademika Lavrent'eva 5, Novosibirsk, 630090 Russia

^b Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

^c Institute of Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630117 Russia
e-mail: galina@catalysis.ru

Received May 11, 2012

Abstract—Multicomponent composite biocatalyzers with lipolytic activity have been studied. These biocatalyzers were prepared through the immobilization of a recombinant producer strain of thermostable lipase from *Thermomyces lanuginosus* into SiO₂ xerogel, which contains a nanocarbon component, i.e., multilayered carbon nanotubes with varying diameters, and also bulblike structured carbon nanospheres (“nanobulb”). The properties of lipase were studied both in cell suspensions of a recombinant producer strain constructed based on *E. coli* BL21(DE3) and in the immobilized state with regard to the structure and dispersibility of the nanocarbon component used in the composition of the biocatalyzers. It was shown that the recombinant intracellular lipase exerted its activity in a reaction of tributirin hydrolysis on average comprising 50 U/mg of dried cells and had a high level of thermostability. Upon heating in olive oil at 100°C, the inactivation constant and the period of semi-inactivation comprised $6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ and 2 h, respectively, exceeding by one order the thermostability of lipase in a buffer solution. Biocatalyzers that contained aggregated “thick” nanotubes with a diameter of 20–22 nm had the maximum initial activity—250 U/g.

УДК 577.2.08

ДЕТЕКЦИЯ ПИРЕТРОИДОВ С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРАЛЬНО-КОРРЕЛЯЦИОННОЙ ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ

© 2013 г. А. Г. Буренин*, М. П. Никитин*, А. В. Орлов*, Т. И. Ксенович**, П. И. Никитин**

*Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва, 117303
e-mail: AGBurenin@gmail.com

**Институт общей физики им. А.М. Прохорова, Москва, 119991

Поступила в редакцию 7.09.2012 г.

Разработан безмаркерный метод на основе спектрально-корреляционной интерферометрии для высокочувствительной детекции пиретроидов с помощью конкурентного иммуноанализа на поверхности сенсорных чипов, в качестве которых используются широкодоступные микроскопные покровные стекла. Показано, что данный метод позволяет независимо оптимизировать каждую стадию модификации сенсорной поверхности, что может применяться для повышения эффективности разработки протоколов широкого круга иммуноанализов, использующих стеклянную поверхность в качестве твердой фазы. С помощью предложенного метода продемонстрирована регистрация на поверхности оптимизированных сенсорных чипов одного из наиболее стабильных метаболитов целого ряда пиретроидов – 3-феноксibenзойной кислоты – на уровне 15 пг/мл, что в 50 раз лучше чувствительности иммуноферментного анализа.

DOI: 10.7868/S0555109913030057

Пиретроиды – один из классов синтетических инсектицидов различных по строению, но сходных по механизму действия с пиретринами (естественные инсектициды, выделяемые такими растениями, как *Pyrethrum cinerariifolium* и *Tanacetum cinerariifolium*). Долгое время пиретроиды считались безопасными для человека [1], что способствовало их широкому применению в сельском хозяйстве, ветеринарии и санитарно-эпидемиологическом контроле. Как следствие, эти химические соединения в значительных количествах могут поступать в организм человека с продуктами питания и водой. В ходе последних исследований установлено, что пиретроиды могут оказывать негативное влияние на иммунную систему [2], вызывать нарушения в работе эндокринной системы [3] и даже обладать канцерогенным действием [4]. В связи с этим в настоящее время большое внимание уделяется разработке методов контроля содержания этих веществ в продуктах питания, почве и естественных водоемах.

Поскольку сами молекулы пиретроидов быстро разлагаются под действием света, детекцию обычно осуществляют по их метаболитам. Среди производных, наиболее часто используемых для оценки загрязнения окружающей среды, про-

дуктов питания или дозы пиретроидов, попавших в организм человека, следует отметить 3-феноксibenзойную кислоту (**3-ФБК**) [5]. Этот метаболит был выбран в качестве маркера пиретроидов из-за своей стабильности и универсальности: он является продуктом деградации целого ряда пиретроидов второго поколения, например циперметрина, перметрина и дельтаметрина [6]. Отсутствие других распространенных источников 3-ФБК делают ее одним из самых часто употребляемых маркеров, используемых для экологического мониторинга [7].

Для детекции малых молекул, к которым относится 3-ФБК, традиционно используются жидкостная хроматография [8] и масс-спектрометрия [9]. Эти методы обладают высокой чувствительностью на уровне десятков пикограмм на 1 мл. Однако необходимость длительной пробоподготовки, высокая цена оборудования и расходных материалов ограничивают их применение.

В последнее время все большее развитие получают иммунологические методы детекции 3-ФБК [5, 7]. Это связано с тем, что иммуноанализ позволяет существенно сократить время пробоподготовки и значительно повысить специфичность анализа. Для детекции малых молекул, как правило, используется конкурентный иммуноферментный анализ (**ИФА**), позволяющий специфично определять вещества по их взаимодействию с антителами. Наиболее быстрые ИФА-методы дают возможность определять концентрацию вещества в образце за 2 ч [7] при пределе детекции, на уровне

Список сокращений. ППР – поверхностный плазмонный резонанс, ДМФА – диметилформамид, 3-ФБК – 3-феноксibenзойная кислота, БСА – бычий сывороточный альбумин, ФСБ – фосфатно-солевой буфер, АПТЭС – (3-аминопропил)триэтоксисилан, ГОТС – глицидоксипропилтриэтоксисилан.

нескольких нанограмм на 1 мл, что достаточно для многих практических целей.

Использование оптических безмаркерных методов на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [10] позволяет значительно сократить время анализа, например до 0.5 ч при регистрации атразина [11]. Более того, такие методы дают возможность наблюдать также кинетику сорбции биомолекул, что увеличивает динамический диапазон анализа. Коммерчески доступные биосенсорные системы, основанные на ППР, хорошо зарекомендовали себя как удобный инструмент для проведения биохимических исследований. Однако их применение для задач экологического мониторинга и иммунодиагностики затруднено в силу высокой стоимости расходных материалов – сенсорных чипов. Это связано с тем, что для таких методов необходимо с точностью до единиц нанометров напылять пленки золота. Кроме того, ППР-методы обладают паразитной чувствительностью к объемному показателю преломления, который, в свою очередь, сильно зависит от температуры исследуемой жидкости.

Ранее авторами данной работы был предложен метод спектрально-корреляционной интерферометрии [12, 13] для высокочувствительной регистрации в реальном времени биохимических реакций на сенсорных чипах, в качестве которых могут применяться недорогие покровные микроскопные стекла без нанесения каких-либо металлических или диэлектрических покрытий. Этот метод позволяет регистрировать изменение усредненной по поверхности сенсорного чипа оптической толщины слоя молекул, сорбированных за время протекания биохимической реакции. Такой подход обеспечивает сигнал, не зависящий от показателя преломления исследуемого раствора. Метод спектрально-корреляционной интерферометрии был успешно использован для разнообразных иммунохимических исследований [14], выявления механизмов действия лекарственных препаратов [15], изучения взаимодействия белков с новыми полимерами [16], детекции ряда аутоантител в сыворотке крови человека [17].

Цели работы – адаптация спектрально-корреляционного интерферометрического метода для высокочувствительной детекции ряда пиретроидов по их стабильному метаболиту – 3-ФБК, а также разработка с помощью данного метода протоколов модификации поверхности стекла для использования в качестве твердой фазы для широкого круга иммуноанализов.

МЕТОДИКА

Реагенты. В работе использовались серная кислота (H_2SO_4), пероксид водорода (H_2O_2), диметилформамид (ДМФА) (квалификация о.с.ч.,

“Диаэм”, Россия), метанол (CH_3OH) (маркировка “Аналитический реагент”, “LabScan”, США), биотин, биотин-NHS, бычий сывороточный альбумин (БСА), малеимидо-R-N-сукцинимидный эфир (“Sigma-Aldrich”, США), стрептавидин (“Thermo Scientific”, США). Все прочие реактивы имели маркировку “Аналитический реагент”.

Иммунореагенты. 3-феноксibenзойная кислота, конъюгат 3-ФБК с БСА и кроличья антисыворотка на него, титр 1 : 10000, были предоставлены Государственным научным центром прикладной микробиологии и биотехнологии (г. Оболensk, Россия).

Приготовление буферов. Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) – NaCl 130 мМ, KCl 3 мМ, Na_2HPO_4 10 мМ, KH_2PO_4 2 мМ, pH 7.4. Для приготовления карбонатно-бикарбонатного буфера (КББ) использовались готовые таблетки (“Sigma-Aldrich”, США, pH 8.6). Блокирующий буфер (ББ) состоял из КББ и 10 мМ глицина. Для конъюгации использовался буфер (КБ) со следующим составом: 100 мМ Na_2CO_3 , 300 мМ NaCl, pH 8.5.

Метод спектрально-корреляционной интерферометрии. Протекание биохимических реакций регистрировалось в реальном времени с помощью оптического безмаркерного биосенсора Пикоскоп® [16, 17], принцип действия которого основан на методе спектрально-корреляционной интерферометрии. Метод позволяет применять в качестве сенсорных чипов стандартные покровные микроскопные стекла толщиной 100 мкм. Подача реагентов осуществлялась с помощью специально сконструированной проточной системы, имеющей 3 независимых канала. Один из каналов являлся опорным. Два других канала, каждый размером 3 мм × 2 мм × 0.1 мм и объемом 0.6 мкл, использовались для проведения и мониторинга биохимических реакций в реальном времени. По одному из них пропускался контрольный образец, который содержал поликлональные антитела и 3-ФБК в концентрации 100 нг/мл и, соответственно, не вызывающий прирост сигнала при используемом формате анализа. По второму каналу пропускался исследуемый образец.

Иммобилизация органосиланов на поверхность стекла. Для аминирования и эпоксилирования поверхности покровных микроскопных стекол они в течение 1 ч промывались в кислоте Каро (1 : 3 30%-ный пероксид водорода – серная кислота) при 70°C. Затем стекла погружались в 5%-ный раствор соответственно (3-аминопропил)триэтоксисилана или глицидоксипропилтриметоксисилана в метаноле. Продолжительность силанизации, а также объемная доля воды, содержащаяся в растворителе, являлись предметом оптимизации для целей настоящего исследования. Результаты такой оптимизации описаны ниже. Затем, после трое-

кратной промывки ДМФА, стекла подвергались термической обработке при 105°C в течение 1 ч.

Оценка эффективности силанизации стекла. Для проверки качества аминирования стекла биотинилировались. Для этого на каждое стекло наносилась смесь, состоящая из 200 мкл ДМФА, 12.5 мкл триэтиламина и 1 мг биотин-NHS. Стекла в течение 2 ч инкубировались в камере, предотвращающей испарение растворителя. После трехкратной промывки ДМФА они нагревались до 105°C для удаления физически сорбированного растворителя. Модифицированные таким образом стекла использовались в качестве сенсорных чипов. В проточной системе биосенсора наблюдалась посадка на данные стеклянные сенсорные чипы стрептавидина в ФСБ, концентрация белка – 50 мкг/мл. По величине сигнала оценивалось качество аминирования слайдов.

Для оценки эффективности эпоксилирования в проточной системе биосенсора наблюдалась сорбция на сенсорный чип иммуноглобулина G в ФСБ, концентрация белка – 50 мкг/мл.

Иммобилизация конъюгата на сенсорные чипы. Для аминированных чипов малеимида-R-N-сукцинимидный эфир растворялся в ДМФА до концентрации 20 мМ. Затем на сенсорный чип наносилось по 50 мкл полученного раствора. Стекла инкубировались в течение 3 ч при комнатной температуре. Для предотвращения испарения использовался плотно закрывающийся контейнер. После трехкратной промывки ДМФА на поверхность наносилось по 200 мкл конъюгата 3-ФБК с БСА в КБ, концентрация конъюгата 50 мкг/мл. Стекла инкубировались в течение 16 ч при 4°C. Для блокировки поверхность обрабатывалась 3%-ным раствором обезжиренного молока в ФСБ в течение 4 ч при комнатной температуре. После трехкратной промывки дистиллированной водой стекла высушивались и хранились при 4°C.

Иммобилизация конъюгата на поверхность эпоксилированных сенсорных чипов осуществлялась непосредственно перед началом анализа в проточной системе биосенсора. Она производилась в КББ при pH 8.6 и концентрации конъюгата 50 мкг/мл. Для снижения неспецифического связывания поверхность стекла дополнительно обрабатывалась ББ.

Приготовление тестовых образцов. 3-ФБК растворяли в смеси вода–метанол (6 : 4) до получения необходимой концентрации. Затем к полученному раствору добавлялся БСА в количестве, необходимом для получения концентрации белка 50 мкг/мл. Перед анализом к полученному раствору добавлялось по 20 мкл антисыворотки на 1 мл образца.

Конкурентный иммуноанализ. В проточной системе биосенсора регистрировалась сорбция свободных поликлональных антител из образца, приготовленного, как описано выше, на сенсорный

чип с иммобилизованным конъюгатом. Скорость протекания раствора устанавливалась равной 5 мкл/мин. Сигналом считалось регистрируемое при пропускании образца изменение толщины биослоя. Для контроля величины неспецифического сигнала проводилось два типа экспериментов: использовались сенсорные чипы с иммобилизованным БСА, не содержащим сайтов для специфической сорбции, и образцы с концентрацией 3-ФБК 100 нг/мл, которой достаточно для связывания всех антител в образце.

Статистическая обработка результатов. В качестве итогового значения в каждой серии экспериментов принималось среднее арифметическое между результатами отдельных экспериментов серии, а в качестве погрешности – среднеквадратичное отклонение. Предел детекции определялся по критерию двух σ , т.е. принимался равным такой концентрации, при которой сигнал отличался от получаемого в отсутствие антигена в образце на удвоенное среднеквадратичное отклонение нулевого контроля. Значение верхней границы динамического диапазона вычислялось, как концентрация, при которой сигнал отличается от нуля на значение, равное удвоенному среднеквадратичному отклонению.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Специфичность и чувствительность иммуноанализа во многом зависят от способа иммобилизации биомолекул на твердую фазу, поскольку именно он определяет плотность центров специфической сорбции и степень нарушения нативной структуры биораспознающих молекул. Исходя из этого, при разработке метода детекции малых молекул, особое внимание было обращено на оптимизацию протоколов присоединения конъюгата к твердой фазе.

Один из возможных подходов к иммобилизации биологических молекул на стеклянную поверхность – использование самоорганизующихся монослоев (СОМ) [18], состоящих из молекул, способных соединиться с поверхностью стекла и между собой. При этом образуется упорядоченный монослой, ковалентно прикрепленный к сенсорному чипу во многих точках. Примерами коммерчески доступных СОМ являются триэтокси- и триметоксисиланы. При работе с белками удобно использовать аминопропилтриэтоксисилан (АПТЭС) и глицидокситриметоксисилан (ГОТС). При их иммобилизации на стекло на поверхности образуется упорядоченный слой из amino- или эпокси-групп, которые могут применяться для ковалентного присоединения биомолекул или низкомолекулярных лигандов.

Многостадийность процесса иммобилизации белков на сенсорные чипы затрудняет разработку соответствующих протоколов с помощью традиционных методов, использующих флуоресцентные и ферментные метки. Такие методы позволяют наблюдать только конечный результат и требуют одновременной оптимизации всех стадий анализа. Использование спектрально-корреляционной интерферометрии существенно облегчает и ускоряет процесс разработки протоколов, поскольку позволяет наблюдать все стадии иммуноанализа в реальном времени. Соответственно, оптимизация каждого этапа может проводиться независимо от других.

Первым этапом при иммобилизации биомолекул на сенсорный чип, роль которого в предлагаемом методе выполняет микроскопное покровное стекло, является модификация его поверхности органосиланами. Для оптимизации этой стадии исследовалась зависимость плотности посадки сорбционных центров на получаемых модифицированных стеклах от таких параметров, как продолжительность силанизации стекла и объемная доля воды в растворе. Для оценки указанной характеристики сенсорного чипа с помощью биосенсора Пикоскоп® наблюдалась специфическая сорбция белка, как описано в разделе "Методика". Зависимость сигнала для аминированных слайдов от времени инкубации приведена на рис. 1.

Из приведенного графика видно, что спустя 16 ч достигалась сорбционная емкость поверхности, отличающаяся от максимально достигнутой в экспериментах не более, чем на 5%. Такое время является оптимальным для практического использования, поскольку дальнейшее увеличение длительности инкубирования приводило к ухудшению оптического качества получаемых сенсорных чипов из-за сорбции полимеризовавшихся агломератов молекул АПТЭС.

В ходе экспериментов было установлено, что эффективность аминирования слабо зависит от объемной доли воды в растворе при изменении данного параметра в пределах от 0.01 до 3%. В дальнейшем для изготовления сенсорных чипов аминирование стекла проводилось в течение 16 ч, объемная доля воды в используемом метаноле при этом составляла 1%.

Максимальная величина сигнала при сорбции стрептавидина составила 1.2 нм. Теоретическая оценка показывает, что сигнал при иммобилизации плотного монослоя данного белка должен составлять около 3.5 нм. Таким образом, разработанный протокол аминирования позволяет получить степень заполнения поверхности чипа около 30%.

При оптимизации протоколов эпоксилирования покровных стекол было экспериментально показано, что величина сигнала при сорбции бел-

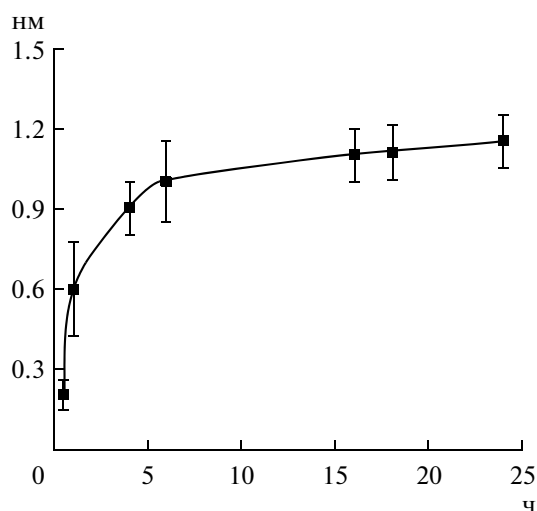


Рис. 1. Зависимость сигнала (нм), наблюдаемого при сорбции стрептавидина, от времени аминирования (ч).

ка на сенсорные чипы не зависит от времени силанизации в диапазоне от 2 до 24 ч. Зависимость от объемной доли воды в растворе при этом носит более сложный характер, а максимум достигается при значении 0.1%. Согласно проведенным экспериментам, наиболее оптимальными для изготовления сенсорных чипов являются время эпоксилирования 16 ч и объемная доля воды 0.1%. При сорбции стрептавидина на изготовленные по данному протоколу стеклянные сенсорные чипы наблюдался сигнал величиной 2.4 нм, что соответствовало степени заполнения поверхности 60%.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов были разработаны протоколы создания аминированных и эпоксилированных сенсорных чипов. Для последних была достигнута в два раза большая сорбционная емкость, что эквивалентно увеличению количества иммобилизованных центров специфической сорбции. При этом эпоксилированные чипы позволяют использовать простые и удобные протоколы иммобилизации на них белка за счет ковалентного связывания с аминоклуппами последнего.

Поскольку для многих практических применений важным параметром является время хранения сенсорных чипов, была проведена серия экспериментов, направленных на изучение зависимости регистрируемого сигнала от времени хранения модифицированного стекла. Было установлено, что при применении разработанных протоколов эпоксилирования, сигнал остается неизменным при хранении до полугода. Так, разница между сигналами, наблюдаемыми при сорбции белка на эпоксилированный чип непосредственно после его изготовления и после хранения в течении 6 месяцев при 4°C, не превышала 10%. Ввиду того, что основная причина снижения специфических сигналов —

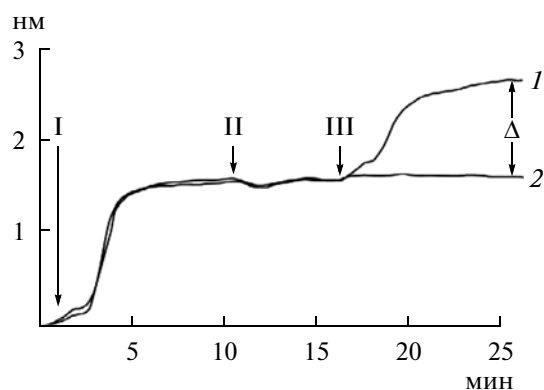


Рис. 2. Сенсограммы при пропускании в проточной системе биосенсора Пикоскоп® по поверхности эпоксилированного сенсорного чипа: I – конъюгата 3-ФБК с БСА, II – карбонатно-бикарбонатного буфера с добавлением глицина, III – тестируемого образца.

1 – нулевой контроль (образец, не содержащий 3-ФБК), 2 – образец 3-ФБК в концентрации 100 нг/мл.

гидролиз эпокси-групп на поверхности, хранение в инертной атмосфере может дополнительно увеличить срок годности. Амнирование слайдов позволяет снизить влияние времени хранения чипа на сигнал, такая поверхность обеспечивает стабильный сигнал более 1 года. Однако для иммобилизации биомолекул на амнированную поверхность требуются более сложные протоколы, включающие стадию предварительной активации, что несколько увеличивает время проведения анализа.

Поскольку для обоих исследованных вариантов сенсорных чипов существуют практические задачи, в которых их преимущества наиболее востребованы, дальнейшие эксперименты проводились как с амнированными, так и с эпоксилиро-

ванными по оптимизированным протоколам сенсорными чипами.

Полученные сенсорные чипы далее использовались при проведении конкурентного иммуноанализа для детектирования малых молекул. С помощью биосенсора Пикоскоп® в режиме реального времени регистрировалась сорбция поликлональных антител из образцов, приготовленных, как описано в разделе “Методика”, содержащих различную концентрацию 3-ФБК, на поверхность сенсорных чипов с иммобилизованным конъюгатом – 3-ФБК-БСА. Характерный вид регистрируемых при этом сенсограмм приведен на рис. 2.

В качестве сигнала Δ рассматривается прирост толщины биослоя на этапе пропускания образца. Как видно из рис. 2, специфическая сорбция антител из образцов с высокой концентрацией 3-ФБК отсутствует. Аналогично в контрольных опытах отсутствовали сигналы при пропускании образцов над поверхностью с иммобилизованным БСА. Это свидетельствует об отсутствии неспецифического связывания компонентов образца с поверхностью. При отсутствии 3-ФБК в образцах для амнированных стекол величина сигнала составляла 0.3 нм при среднеквадратичном отклонении 0.02 нм, для эпоксилированных слайдов значения этих параметров составили соответственно 1.1 и 0.05 нм.

Зависимость сигнала от концентрации 3-ФБК при сорбции антител из образца для эпоксилированных слайдов приведена на рис. 3а. Как видно из приведенной зависимости, предел детекции 3-ФБК на эпоксилированных сенсорных чипах составил 0.2 нг/мл, что почти на порядок лучше, чем у существующих методов определения метаболитов пиретроидов с помощью ИФА, позволяющего детектировать концентрации больше 1 нг/мл [7]. Динамический диапазон составил 3 порядка величины, что охватывает весь спектр концентраций, важных с точки зрения задач экологиче-

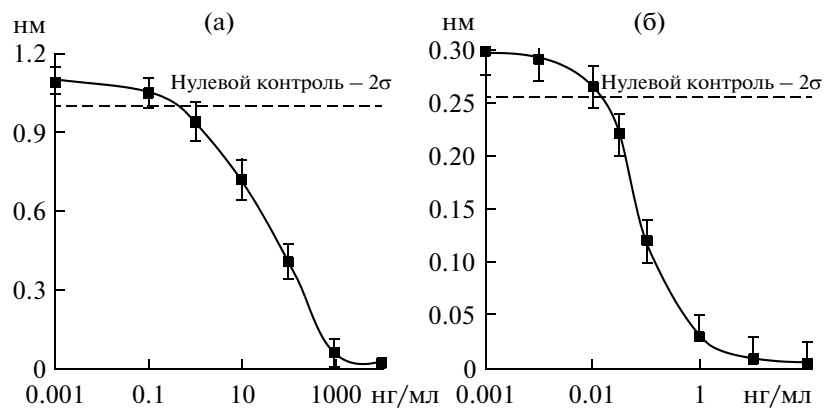


Рис. 3. Зависимость сигнала (нм) при проведении конкурентного анализа от концентрации 3-ФБК в образце (нг/мл). а – на эпоксилированных чипах, б – на амнированных чипах.

ского мониторинга и проведения токсикологического анализа.

Дальнейшее улучшение предела детекции было достигнуто путем иммобилизации конъюгата на поверхность аминированных сенсорных чипов. Полученная зависимость сигнала от концентрации 3-ФБК в образце приведена на рис. 3б. Как видно из приведенной зависимости, предел детекции 3-ФБК на аминированных слайдах составил 0.015 нг/мл, что на порядок лучше показанного для эпоксилированных сенсорных чипов и находится на уровне результатов, получаемых методами жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии [19]. Такой результат был достигнут благодаря малому разбросу результатов, получаемых в отсутствие 3-ФБК и большому наклону кривой вблизи предела детекции. Динамический диапазон при этом составляет 2 порядка. Более широкий диапазон в случае эпоксилированных сенсорных чипов может объясняться большей сорбционной емкостью.

Достигнутые пределы детекции как в случае эпоксилированных, так и аминированных сенсорных чипов, позволяют использовать их для целей высокочувствительной биосенсорики. Большой динамический диапазон, удобство работы и скорость проведения анализа делают эпоксилированные слайды привлекательным решением для задач токсикологической проверки продуктов питания. Высокая чувствительность, достигнутая при использовании аминированных сенсорных чипов, может быть востребована в экологическом мониторинге и контроле потенциально опасных производств.

Таким образом, проведенная оптимизация протоколов модификации поверхности сенсорных чипов и адаптация разработанного оптического метода мониторинга в реальном времени конкурентных иммунохимических реакций позволяют оперативно определять концентрацию малых молекул с высокой чувствительностью. Эффективность данного подхода продемонстрирована на примере детекции 3-ФБК. Достигнут предел детекции 15 пг/мл, что превосходит существующие методы детекции пиретроидов с помощью иммуноанализа более чем в 50 раз и находится на уровне современных методов жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Использование стандартных микроскопных покровных стекол в качестве широкодоступных расходных материалов – сенсорных чипов, а также компактность и простота используемого оборудования наряду с малым временем анализа, позволяют применять разработанную технологию не только в исследовательских целях, но и для экологического мониторинга окружающей среды.

Авторы благодарят Государственный научный центр прикладной микробиологии (г. Оболонск, Россия) за предоставленные иммунореагенты.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (ГК 16.512.11.2124 и 14.740.11.1179) и грантов РФФИ (11-04-12181, 10-02-01185 и 11-02-01440).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Class T.J., Kintrup J.* // *J. Anal. Chem.* 1991. V. 340. № 7. P. 446–453.
2. *Hadnagy W., Leng G., Sugiri D., Ranft U., Idel H.* // *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 2003. V. 206. № 2. P. 93–102.
3. *Liu J., Yang Y., Zhuang S., Yang Y., Li F., Liu W.* // *Toxicology.* 2011. V. 290. № 1. P. 42–49.
4. *Fortes C. Cancer* // *Encyclopedia of Environmental Health.* N.Y.: Elsevier B. V. 2011. P. 489–497.
5. *Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Trubaceva J.N.* // *Analytica Chimica Acta.* 1997. V. 347. № 1–2. P. 131–138.
6. *Kaneko H.* // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. № 7. P. 2786–2791.
7. *Wang J., Yu G., Sheng W., Shi M., Guo B., Wang S.* // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. № 7. P. 2997–3003.
8. *Karcher B.D., Davies M.L., Delaney E.J., Venit J.J.* // *Clinics in Laboratory Medicine.* 2007. V. 27. № 1. P. 93–111.
9. *Toyooka T.* // *Journal of Chromatography B.* 2012. V. 883–884. P. 59–67.
10. *Liedberg B., Nylander C., Lundstrom I.* // *Sensors and Actuators.* 1983. V. 4. P. 299–304.
11. *Farré M., Martínez E., Ramón J., Navarro A., Radjenovic J., Mauriz E., Lechuga L., Marco M. P., Barceló D.* // *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2007. V. 388. № 1. P. 207–214.
12. *Nikitin P.I., Valeiko M.V., Gorshkov B.G.* // *Sensors and Actuators B.* 2003. V. 90. № 1–3. P. 46–51.
13. *Nikitin P.I., Gorshkov B.G., Nikitin E.P., Ksenevich T.I.* // *Sensors and Actuators B.* 2005. V. 111–112. P. 500–504.
14. *Nikitin P.I.* // *Handbook-Biosensors & Biochips* / Ed. R.S. Marks et al. N.Y.: John Wiley & Sons, Ltd. ISBN 978-0-470-01905-4. 2007. Chapter 27. P. 1–13.
15. *Красникова Т.Л., Никитин П.И., Кseneвич Т.И., Горшков Б.Г., Орлов А.В., Сидорова М.В., Азьмуко А.А., Арефьева Т.И., Кухтина Н.Б., Беспалова Ж.Д.* // *Докл. РАН.* 2010. Т. 433. № 1. С. 559–562.
16. *Иванов А.Е., Солодухина Н.М., Нильсон Л., Никитин М.П., Никитин П.И., Зубов В.П., Вихров А.А.* // *Высокомолекулярные соединения, Серия А.* 2012. Т. 54. № 1. С. 3–13.
17. *Дирюгина Е.Г., Буренин А.Г., Никитин М.П., Орлов А.В., Никитин П.И.* // *Труды МФТИ.* 2012. Т. 4. № 15. С. 11–17.
18. *Chaki N.K., Vijayamohanan K.* // *Biosensors and Bioelectronics.* 2002. V. 17. № 1–2. P. 1–12.
19. *Wang Y., Du R.* // *Forensic Science International.* 2010. V. 198. № 1–3. P. 70–73.

Detection of Pyrethroids by Spectral Correlation Interferometry

A. G. Burenin^a, M. P. Nikitin^a, A. V. Orlov^a, T. I. Ksenevich^b, and P. I. Nikitin^b

^a *Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, 117303 Russia*

e-mail: AGBurenin@gmail.com

^b *Prokhorov General Physics Institute, Moscow, 119991 Russia*

Received September 7, 2012

Abstract—A marker-free method of highly sensitive detection of pyrethroids was developed on the basis of spectral correlation interferometry using competitive immunoanalysis on the surface of sensor chips made of readily available microscopy cover slips. The method was demonstrated to allow for the independent optimization of each step of sensor surface modification which may be used to increase the efficiency in the development of protocols for a wide spectrum of immunoanalyses using a glass surface as a solid phase. One of the most stable metabolites of a number of pyrethroids—3-phenoxybenzoic acid—at a level of 15 pg/mL on the surface of optimized sensor chips; the assay sensitivity exceeded that of the enzyme-linked immunosorbent assay 50 times.

УДК 577.152.14.

ТРОМБОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ГЛЮКОЗОСОДЕРЖАЩИХ ГИДРОГЕЛЕЙ

© 2013 г. И. Л. Валуев*, Л. И. Валуев*, Л. В. Ванчугова*, И. В. Обыденнова*, Т. А. Валужева**

*Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Москва, 119991, e-mail: valuev@ips.ac.ru

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

Поступила в редакцию 10.09.2012 г.

Изучена тромборезистентность глюкозочувствительных полимерных гидрогелей, моделирующих одну из функций поджелудочной железы, а именно способность выделять инсулин в ответ на появление глюкозы в окружающей среде. Гидрогели синтезировали сополимеризацией гидроксиэтилметакрилата с N-акрилоилглюкозамином в присутствии сшивающего агента с последующей обработкой конканавалином А. Показано, что введение в состав гидрогеля остатков глюкозы не приводило к существенному изменению количества адгезированных гидрогелем тромбоцитов и степени денатурации взаимодействующих с гидрогелем белков плазмы крови. Следствием чего была неизменность биологической активности инсулина после выделения из гидрогеля. Высказано предположение, что применение глюкозочувствительных гидрогелей позволит разработать новую стратегию лечения сахарного диабета.

DOI: 10.7868/S0555109913030161

Использование результатов фундаментальных исследований для решения конкретных задач по обеспечению максимально комфортных условий жизнедеятельности человека, особенно связанных с охраной его здоровья, является главной задачей любой прикладной науки. Одной из наиболее сложных таких задач является создание систем, способных моделировать отдельные функции органов живого организма, например выделять в окружающую среду по сигналу самого организма биологически активные вещества по мере возникновения в них потребности.

Примером таких систем служат глюкозочувствительные гидрогели, моделирующие одну из функций поджелудочной железы, а именно способность выделять инсулин (гормон белковой природы, отсутствие которого приводит к сахарному диабету) в ответ на появление глюкозы в окружающей среде [1–3]. Такие гидрогели представляют собой трехмерные сополимеры N-акрилоилглюкозамина (АГА), дополнительно сшитые между собой конканавалином А (Кон А) – белком, имеющим четыре места связывания глюкозы. При появлении глюкозы в окружающей среде она вытесняет остатки АГА из их комплекса с Кон А, что приводит к повышению степени набухания гидрогеля и выделению предварительно введенного в гидрогель инсулина. Выделение инсулина происходит при строго определенной концентрации глюкозы, значение которой можно регулировать изменением количества остатков ненасыщенного производного глюкозы в сополимере.

Практическое использование таких гидрогелей, естественно, подразумевает их длительное пребывание в контакте с кровью без иницирова-

ния ее свертывания, что обычно происходит при взаимодействии крови с любым чужеродным материалом.

Цель работы – изучение тромборезистентности полимерных гидрогелей, содержащих иммобилизованные в их объеме производные глюкозы.

МЕТОДИКА

Гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА), сшивающий агент – тридекаэтиленгликольдиметакрилат (ТГМ-13), конканавалин А, глюкозу и инсулин фирмы “Sigma-Aldrich” (США) использовали без дополнительной очистки.

N-акрилоилглюкозамин (АГА) синтезировали реакцией D-(+)-глюкозамина с хлорангидридом акриловой кислоты [4].

Гидрогели в виде пленки толщиной 0.5 мм получали полимеризацией между двух стекол водного раствора, содержащего 55% ГЭМА, 1.5% ТГМ-13 и 0.3, 1.0 или 2.0% АГА, используя в качестве инициатора систему N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин–персульфат аммония. Полученные гидрогели затем инкубировали с 0.1%-ным раствором Кон А в течение 2 ч. В качестве контроля были использованы пленки, полученные в отсутствие АГА.

Оценку тромборезистентности проводили по общепринятым методикам, определяя количество адгезированных тромбоцитов и оценивая константу скорости активации системы комплекта как показателя степени денатурации белков в результате взаимодействия с полимером [5].

Таблица 1. Тромборезистентность глюкозосодержащих гидрогелей

Содержание АГА в гидрогеле, мас. %	Адгезия тромбоцитов, шт./100 мкм ² ± 0.3	k^* , $c^{-1} \text{ см}^{-2} \times 10^6 \pm 0.2$
0	2.1	3.3
0.3	2.3	2.7
1.0	1.8	2.4
2.0	2.0	1.9

* Константа скорости активации системы комплемента.

Для определения количества адгезированных тромбоцитов на поверхность гидрогеля наносили плазму, обогащенную тромбоцитами. Гидрогель и плазму инкубировали при 20°C в течение 10 мин. Образцы промывали 0.9%-ным раствором NaCl для удаления неадгезированных тромбоцитов и белков, а затем образцы обрабатывали 2.5%-ным раствором глутарового альдегида в течение 1 ч и последовательно промывали водой, 20, 70, 90 и 100%-ным этанолом. Образцы высушивали и покрывали медью. На поверхности образца выбирали 20 площадок (28 × 28 мкм) и в каждой площадке определяли количество тромбоцитов с использованием метода сканирующей электронной микроскопии.

Для определения константы скорости активации системы комплемента свежую человеческую сыворотку инкубировали с гидрогелем при 37°C в течение 60 мин. Затем измеряли время полулизиса эритроцитов барана человеческой сывороткой до и после ее контакта с гидрогелем и рассчитывали константу скорости активации системы комплемента. В качестве контроля была использована поверхность гидратцеллюлозной мембраны Купрофан ($k = 1.8 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1} \text{ см}^{-2}$) [5].

Биологическую активность инсулина оценивали путем измерения концентрации глюкозы в крови кроликов или крыс после инъекционного введения раствора инсулина в количестве 0.2 мг/кг массы кролика или 0.6 мг/кг массы крысы. Концентрацию глюкозы определяли с использованием глюкометра "Johnson & Johnson" (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первой стадией взаимодействия крови с чужеродной поверхностью является адсорбция белков. Затем на поверхности материала происходит адгезия тромбоцитов и их агрегация с разрушением клеточной мембраны и выделением в окружающую среду внутреннего содержимого клеточных гранул, которое, в свою очередь, ускоряет адгезию этих форменных элементов. Коэффициент диффузии белков в плазме крови ($\sim 10^{-6} - 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$) значительно выше, чем коэффициент диффузии тромбо-

цитов ($\sim 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с}$), поэтому контакт клеток крови с поверхностью происходит, как правило, с участием адсорбированных молекул белка [5]. При этом в многочисленных экспериментах, в том числе на животных, было установлено, что определяющим для адгезии тромбоцитов является состав адсорбционного слоя белка (соотношение между количеством альбумина и фибриногена). Повышение концентрации альбумина на поверхности полимера в значительной степени предотвращает адгезию тромбоцитов, в то время как увеличение концентрации фибриногена в адсорбционном слое приводит к повышению количества адгезированных тромбоцитов [6, 7]. Предполагают, что этот эффект обусловлен биоспецифическим взаимодействием полисахаридного участка молекулы фибриногена с ферментом — гликозилтрансферазой, локализованной на мембране тромбоцита.

Подтверждением этого предположения является тот факт, что в природных кровеносных сосудах ингибиторы гликозилтрансферазы, например глюкозамин, взаимодействуя с этим ферментом и подавляя его активность, эффективно предотвращают адгезию тромбоцитов к стенкам поврежденного сосуда [8–10].

Естественно, возникал вопрос, в какой мере химически связанное с гидрогелем производное глюкозы способно повышать адгезию тромбоцитов на его поверхности за счет взаимодействия с гликозилтрансферазой на мембране тромбоцита.

Проведенные исследования показали, что иммобилизация глюкозамина практически не изменяет характер взаимодействия тромбоцитов с поверхностью гидрогеля (табл. 1). Причина этого, скорее всего, связана с невозможностью взаимодействия иммобилизованного глюкозамина с мембраной тромбоцита из-за возникающих при этом стерических препятствий.

В проявлении полимером тромборезистентных свойств важная, если не определяющая, роль принадлежит степени изменения нативной конформации белков крови в результате их контакта с поверхностью полимера. В настоящее время индикатором конформационных изменений белков принято считать систему комплемента [5]. У человека эта система состоит из 21 белка глобулиновой природы. Компоненты этой системы свободно циркулируют в крови в форме неактивных предшественников, которые активируются, в том числе и в результате взаимодействия с чужеродным материалом, и приобретают свойства ферментов. Ферментативную активность оценивают, измеряя время полулизиса эритроцитов барана плазмой крови. Из табл. 1 видно, что введение в состав гидрогеля остатков глюкозы приводило к некоторому уменьшению константы скорости активации системы комплемента, т.е. способствовало сохранению белками нативной конформации.

Отсутствие драматических изменений в характере адгезии тромбоцитов и степени денатурации

Таблица 2. Зависимость концентрации глюкозы в крови от времени после подкожного введения инсулина (0.2 мг/кг массы кролика или 0.6 мг/кг массы крысы). Приведены средние значения для 3-х животных

Животное	Препарат	Концентрация глюкозы в крови, мг/100 мл $\pm 5\%$					
		0	15*	30*	60*	90*	120*
Кролик	Исходный	124	96	65	60	44	42
	Выделившийся	116	102	58	56	40	40
Крыса	Исходный	145	126	84	62	51	56
	Выделившийся	132	112	78	56	50	50

* Время после инъекции инсулина (мин).

белков крови обеспечивает неизменность биологической активности инсулина, выделяющегося из гидрогеля (табл. 2). Видно, что инъекционное введение раствора исходного и выделившегося из гидрогеля инсулина приводило к практически одинаковому снижению уровня глюкозы в крови подопытных животных.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой тромборезистентности глюкозочувствительных полимерных гидрогелей, что позволяет высказать надежду на возможность их практического использования в качестве модели поджелудочной железы, обеспечивающей выделение необходимого количества инсулина в ответ на повышение концентрации глюкозы в крови. Это, в свою очередь, может открыть достаточно интересные перспективы в плане разработки новой стратегии лечения сахарного диабета.

Авторы выражают искреннюю благодарность профессору Л.К. Старосельцевой (Эндокринологический научный центр РАМН) за организацию и помощь в проведении экспериментов на животных.

Работа была выполнена в рамках программы Президиума РАН “Фундаментальные науки — медицине” при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-08-00123).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kashyap N., Viswanad B., Sharma G., Bhardwaj V., Ramarao P., Ravi Kumar M.N. // *Biomaterials*. 2007. V. 28. № 11. P. 2051–2060.
2. Валуев И.Л., Чупов В.В., Сытов Г.А., Валуев Л.И., Платэ Н.А. // *Высокомолек. соед.* 1997. Т. 39Б. № 4. С. 751–754.
3. Валуев И.Л., Ванчугова Л.В., Валуев Л.И. // *Высокомолек. соед.* 2011. Т. 53А. № 5. С. 691–695.
4. Ivakura Y., Imai Y., Vagu Y. // *J. Polym. Sci. A-1*. 1968. V. 6. № 6. P. 1625.
5. Биосовместимость / Ред. В.И. Севастьянов. М.: “Информационный центр ВНИИгеосистем”, 1999. 367 с.
6. Kim S.W., Lee R.D., Coleman D., Oster H., Andrade J.D., Olsen D.B. // *Trans. Amer. Soc. Art. Int. Org.*, 1974. V. 20. P. 449–454.
7. Jorgensen K.A., Stoffersen E. // *Thromb. Res.* 1980. V. 17. P. 13–18.
8. Jamieson G.A. // *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1973. V. 9. № 2. P. 202–205.
9. Jamieson G.A., Smith D.F., Kosow D.P. // *Thromb. Diath. Haemorrh.* 1975. V. 33. № 3. P. 668–671.
10. Smith D.F., Kosow D.P., Jamieson G.A. // *Thromb. Diath. Haemorrh.* 1975. V. 34. № 1. P. 334–337.

Thromboresistance of Glucose-Containing Hydrogels

I. L. Valuev^a, L. I. Valuev^a, L. V. Vanchugova^a, I. V. Obydenova^a, and T. A. Valueva^b

^a Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

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

e-mail: valuev@ips.ras.ru

Received September 10, 2012

Abstract—The thromboresistance of glucose-sensitive polymer hydrogels, modeling one of the functions of the pancreas, namely, the ability to secrete insulin in response to the introduction of glucose into the environment, has been studied. Hydrogels were synthesized by the copolymerization of hydroxyethyl methacrylate with N-acryloyl glucosamine in the presence of a cross-linking agent and subsequently treated with concanavalin A. Introduction of glucose residues into the hydrogel did not result in significant changes in either the number of trombocytes adhered to the hydrogel or the degree of denaturation of blood plasma proteins interacting with the hydrogel. Consequently, the biological activity of insulin did not change after release from the hydrogel. The use of glucose-sensitive hydrogels is supposed to contribute to the development of a novel strategy for the treatment of diabetes.

УДК 619.611.573.616:092.632.636.578:582.29

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЛИШАЙНИКАХ

© 2013 г. А. А. Буркин*, Г. П. Кононенко*, Т. Ю. Толпышева**

*Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН,
Москва, 123022

e-mail: kononenkogp@mail.ru

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

Поступила в редакцию 11.05.2012 г.

Разработан метод иммуноферментного анализа усниновой кислоты в лишайниках с чувствительностью 0.1 мкг/г воздушно-сухого материала (0.00001%). Поликлональные кроличьи антитела к бычьему сывороточному альбумину, конъюгированному с (+)-усниновой кислотой в условиях формальдегидной конденсации, при взаимодействии с гомологичным по способу связывания иммобилизованным конъюгатом с желатином позволяли определять анализируемое вещество в растворах с концентрацией от 1 нг/мл. Усниновая кислота найдена во всех 236 исследованных образцах лишайников, относящихся к 53 видам и 8 семействам, в количествах 2–26600 мкг/г (0.0002–2.6%).

DOI: 10.7868/S0555109913030069

Усниновая кислота (УК) [2,6-диацетил-7,9-дигидрокси-8,9b-диметилдибензофуран-1,3(2H,9bH)-дион] – один из метаболитов лишайников, обладающих широким спектром антимикробного, противовирусного и противовоспалительного действия [1]. Многие годы УК использовали для лечения особо опасных инфекций, а в наши дни, несмотря на доказанную аллергенность и токсичность, продолжают рекомендовать в качестве профилактического средства в диетологии и косметологии [2]. Биопрепараты на основе лишайников готовят, как правило, из экстрактов слоевищ, поэтому они всегда содержат сложный комплекс структурно подобных и совершенно различных по строению физиологически активных веществ. Многие из них могут оказывать прямое или опосредованное негативное воздействие на организм, поэтому контроль компонентного состава подобных препаратов является обязательным.

В настоящее время в распоряжении исследователей есть несколько методов определения УК на основе газовой и жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым, фотодиодным и масс-спектрометрическим детектированием, обеспечивающих нижние пределы измерения от 50 до 400 нг/мл [3–6]. Однако иммунохимический анализ, который не уступает хроматографическим методам по селективности, обладает гораздо большей чувствительностью и требует минимальной пробоподготовки, для определения УК до сих пор не разработан.

Цель работы – создание и применение иммуноферментного анализа (ИФА) для количествен-

ного определения УК в составе экстрактивных веществ лишайников разной видовой и родовой принадлежности.

МЕТОДИКА

Использовали (+)-УК (кат. № 329967) (“Aldrich”, Швейцария), эмодин (кат. № E 7881) (“Sigma”, США), формальдегид, диметилформамид (ДМФА) фирмы “Fluka” (Германия), бычий сывороточный альбумин (БСА), яичный альбумин (ЯА) и желатин (Жел) производства “Биохимреактив” (Россия). Антивидовой ферментный конъюгат получали по методу [7] из пероксидазы хрена (КФ 1.11.1.7) (“Sigma”, США) и гамма-глобулина антисыворотки осла к иммуноглобулинам кролика (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН). Атранорин предоставлен сотрудниками кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. ИФА выполняли на высокосвязывающих полистирольных планшетах (# 9018, “Costar”, США), для измерений использовали фотометр АКИ-Ц-01 (Россия). УФ-спектры записывали на приборе Hitachi-557 (“Hitachi”, Япония).

Синтез белковых конъюгатов УК осуществляли методом формальдегидной конденсации. Для получения БСА-УК(10), т.е. конъюгата с 10-кратным мольным избытком УК, а также БСА-УК(30) и БСА-УК(100), к растворам, содержащим по 5 мг БСА (0.07 мкмоль) в 1.5 мл 0.1 М водного раствора ацетата натрия, добавляли 24, 72, 241 мкл раствора УК в ДМФА с концентрацией 10 мг/мл (241,

723 и 2410 мкг УК соответственно). Для получения Жел-УК(30) и ЯА-УК(30) к растворам, содержащим по 4 мг ЯА (0.1 мкмоль) и 8 мг Жел (0.05 мкмоль) в 1.5 мл 0.1 М водного раствора ацетата натрия, добавляли 1032 и 516 мкг УК в виде раствора в ДМФА с концентрацией 10 мг/мл. Далее к каждой смеси добавляли по 300 мкл 37%-ного формальдегида (3690 мкмоль) и после 6 ч перемешивания при 30°C реакционные смеси диализовали против трех смен 1000-кратного объема 0.5%-ного раствора хлористого натрия. Для получения БСА-УК(100/16) после добавления формальдегида реакционную смесь перемешивали 16 ч при 30°C и диализовали. Затем ко всем диализатам добавляли равный объем глицерина и хранили при минус 10–15°C. Для записи УФ-спектров использовали водные растворы конъюгатов с концентрацией 100 мкг/мл.

Иммунизацию кроликов-самцов серой масти (2–3 кг) проводили конъюгатом БСА-УК(100/16). В первую инъекцию животные получали 200 мкг иммуногена в полном адьюванте Фрейнда подкожно в 10–15 точек области спины, во вторую и третью – по 300 мкг в физиологическом растворе. Повторные инъекции осуществляли с 1 мес интервалом. Через 7 сут после третьей инъекции антигена у животных из краевой вены уха отобрали кровь, отделили сыворотку, добавили равный объем глицерина и хранили при минус 10–15°C.

Для выполнения анализа ячейки планшетов заполняли 0.2 мл растворов конъюгатов, предназначенных для иммобилизации, в 0.05 М карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9.5, и инкубировали 16 ч при 4°C. Затем ячейки отмывали 4–5 раз 0.15 М фосфатно-солевым буфером, pH 7.5, содержащим твин 20 (ФСБ-т), и в ячейки вносили по 0.1 мл растворов анализируемого вещества и антител в этом же буфере. Через 1 ч инкубации ячейки вновь отмывали и заполняли 0.2 мл рабочего раствора ферментного конъюгата. После 1 ч инкубации и отмывки вносили по 0.2 мл субстратного раствора, содержащего 0.4 мг/мл *o*-фенилендиамина и 0.005% H₂O₂ в 0.15 М цитрат-фосфатном буфере, pH 5.0. Через 45 мин в ячейки добавляли по 50 мкл 4 М серной кислоты, содержащей 0.1 М Na₂SO₃, и проводили измерение оптической плотности при 492 нм.

Приготовление рабочих растворов УК для конкурентного ИФА проводили из исходного раствора в ацетонитриле с концентрацией 10 мкг/мл, определенной спектрофотометрически ($\lambda = 282$ нм, $\epsilon = 25350$). Градуировочный график в координатах “процент связывания антител – концентрация раствора УК” получали в условиях промежуточной прецизионности ($n = 10$) ежедневно или с интервалами 1–2 сут.

Объектами анализа были образцы слоевищ лишайников, использованные ранее для микотоксикологического анализа [8], а также эпилитные, эпифитные и эпигейные лишайники, отобранные в 2010–11 гг. в Лапландском, Печоро-Ильчском заповедниках, на Таймыре, в окрестностях Петропавловска-Камчатского и Якутска. Способ экстракции материала не отличался от описанного [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Конденсация УК, взятой в 10-, 30- и 100-кратных мольных избытках по отношению к БСА, в присутствии формальдегида при 30°C в течение 6 ч завершилась получением продуктов, имеющих вполне ожидаемые спектральные характеристики. Следует отметить, что нередко формальдегидная конденсация сопровождается изменением спектров поглощения конъюгатов, что, однако, не приводит к утрате их иммунореактивности как в случаях с альтернариолом и тетрациклином [9, 10]. Максимумы УФ-поглощения УК, которые находятся при длинах волн 233 нм ($\epsilon 34740$) и 282 нм ($\epsilon 25350$) [8], перекрываются поглощением БСА при 280 нм, поэтому факт присутствия гаптена в конъюгатах можно было обнаруживать только по приросту оптической плотности на этой длине волны. У всех полученных конъюгатов наблюдалось усиление поглощения при 280 нм в сравнении с исходным БСА (рис. 1). Интенсивность его закономерно возрастала с увеличением количества гаптена в реакции, и значения эпитопных плотностей у первых трех продуктов составили 3.1, 7.3 и 14.3. Конъюгированием БСА со 100-кратным мольным избытком УК в условиях более продолжительного – 16 ч выдерживания реакционной смеси с формальдегидом (рис. 1) эпитопную плотность удалось повысить до 15.8. Отношение к теоретически возможным значениям эпитопной плотности составило в среднем 21%, оно оказалось близким такому же показателю для других физиологически активных веществ, например ципрофлоксацина (20%) [11], циклопиазоновой кислоты (29%) [12] и было гораздо выше, чем у цитринина (8%) [13]. У белковых конъюгатов УК не наблюдалось равенства эпитопных плотностей теоретически возможным значениям или их превышения, как это было отмечено для микотоксина зеараленона при аналогичной процедуре связывания [14].

Конъюгат БСА-УК(100/16), взятый для иммунизации, обеспечил получение антисыворотки с рабочими титрами 1:1000–1:5000, которая могла быть использована в конкурентном анализе УК при иммобилизации всех синтезированных конъюгатов (табл. 1). С твердофазным антигеном Жел-УК (30) оказалось возможным определять

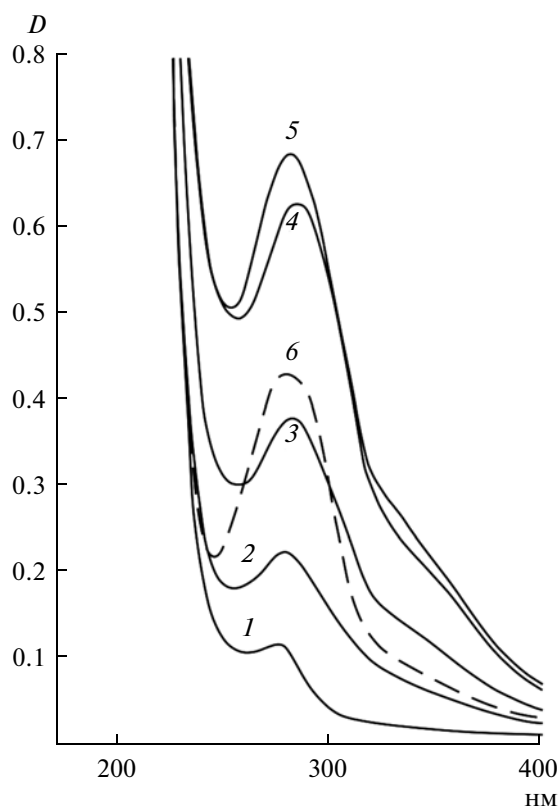


Рис. 1. Спектры УФ-поглощения 1 – БСА, 2 – БСА-УК(10), 3 – БСА-УК(30), 4 – БСА-УК(100), 5 – БСА-УК(100/16), 6 – УК.

УК в растворах вплоть до концентрации 1 нг/мл. Линейность аналитического сигнала сохранялась в интервале концентраций от 1 до 100 нг/мл, а значения доверительных интервалов, рассчитанных по 10 определениям, составили 5–8% (рис. 2).

Известно, что, кроме дибензофуранов, в составе ароматических веществ лишайников представлены и другие структурные группы, такие, как депсиды, депсидоны и антрахиноны. Антитела в условиях конкурентного анализа не обнару-

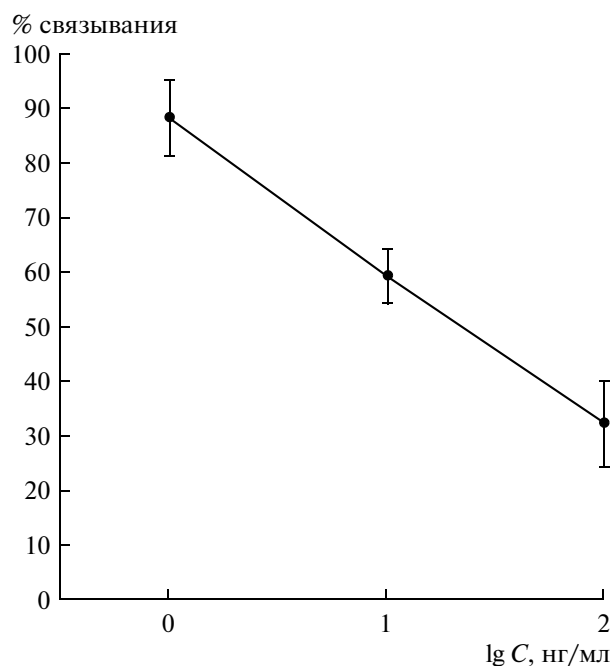


Рис. 2. Градуировочная кривая ИФА с анти-БСА-УК(100/16) сывороткой и твердофазным антигеном Жел-УК(30) ($n = 10$) для растворов УК в присутствии ацетонитрила.

живали два из них – депсид атранорин и соединение антрахинонового ряда – эмодин даже в концентрации 1 мкг/мл. Это указывало на высокую специфичность анализа и возможность использования его при работе с нативными экстрактами. С иммунологической точки зрения интересно было бы оценить перекрестную реактивность полученных антител в отношении оптического изомера (–)-усниновой кислоты, а также ее ближайших структурных аналогов, но мы, к сожалению, не имели такой возможности.

С помощью созданной тест-системы при анализе исходных водно-ацетонитрильных экстрактов лишайников, разведенных в 10 раз ФСБ-т,

Таблица 1. Конкурентное взаимодействие (процент связывания антител) анти БСА-УК(100/16) сыворотки с разными твердофазными антигенами

Твердофазный антиген и его концентрация, мкг/мл		Рабочий титр антител	Концентрация раствора УК, нг/мл		
			100	10	1
БСА-УК(10)	0.15	1:3000	42	73	92
БСА-УК(30)	0.15	1:5000	34	77	97
БСА-УК(100)	0.05	1:4000	39	76	93
БСА-УК(100/16)	0.05	1:4000	43	76	95
ЯА-УК(30)	0.5	1:1000	35	72	91
Жел-УК(30)	0.5	1:1000	33	61	88

оказалось возможным проводить определение УК в диапазоне содержания от 0.1 до 10 мкг/г сухого вещества или 0.00001–0.001%. Для того чтобы перейти к определению УК в тех лишайниках, где она преобладает среди других метаболитов и накапливается в количествах от сотых долей до десятков процентов, необходимо было разбавлять экстракты в 100 и более раз. Методом хроматографического анализа ранее было показано, что среди представителей рода *Cladonia* (семейство Cladoniaceae) накопление УК более 0.05% свойственно всем обследованным видам секции *Unciales* [15], большинству видов *Cladina* [16], многим видам секции *Cocciferae* [17] и подсекции *Foliosae* в секции *Helopodium* [18], а также отдельным видам секции *Perviae* [19], секции *Cladonia* и группы *Furcatae* [20].

Выполненная нами оценка лишайников из семейства Cladoniaceae показала, что у видов *Cladonia* наблюдаются существенные различия по содержанию УК. В *Cladonia amaurocraea*, *C. deformis*, *C. stellaris*, *C. sulphurina* и *C. uncialis* количество УК составляет 0.5–2.3% (табл. 2), что вполне согласуется с ранее полученными данными [15–17, 21]. Для другой группы – *C. arbuscula*, *C. macroceras*, *C. mitis*, *C. rangiferina* накопление этого вещества соответствовало диапазону 0.05–0.4% (табл. 2). Однако ранее в двух образцах *C. arbuscula*, собранных в Ленинградской области и в Эстонии на о. Ворсми, количество УК составило 0.99 и 1.60%, а *C. mitis* – 0.97 и 1.72% [21]. В одном образце *C. macroceras* из Финляндии, исследованным хроматографическим методом с порогом обнаружения 0.05%, УК найти не удалось [20], а в двух анализированных нами образцах, отобранных на севере Мурманской области (в окрестностях г. Кола) и на побережье Белого моря вблизи Полярного круга, ее содержание составило 0.1 и 0.2% (табл. 2).

При анализе лишайников *C. cenotea* (Ach.) Schaer., *C. cornuta*, *C. rangiformis* методом ВЭЖХ с чувствительностью 0.05% были получены отрицательные результаты [15, 16]. По нашим данным, УК присутствует в слоевищах этих видов, но в количествах менее 0.02%, при этом для *C. cornuta* отмечена значительная изменчивость по местам сбора (табл. 2).

Все эти сведения имеют непосредственное отношение к выпуску биопрепаратов, поскольку нередко основным действующим началом в них заявляют просто смесь видов р. *Cladonia*, часто без какой-либо конкретизации и уточнений по условиям сбора материала.

Для того чтобы получить достоверные сведения при таксономических исследованиях р. *Cladonia*, необходимо использовать большие выборки. Пока

Таблица 2. Содержание усниновой кислоты в лишайниках семейства Cladoniaceae

Вид лишайника (исследовано образцов)	УК, мкг/г мин.— среднее —макс.
<i>Cladonia amaurocraea</i> (Flörke) Schaerer (4)	9200— 13 100 —20 900
<i>C. arbuscula</i> (Wallr.) Flot. (6)	480— 2020 —4100
<i>C. cenotea</i> (Ach.) Schaer. (1)	158
<i>C. cornuta</i> (L.) Hoffm. (7)	5— 63 —200
<i>C. deformis</i> (L.) Hoffm. (3)	13 000— 14 100 —14 700
<i>C. macroceras</i> (Flörke) Ahti (2)	1350, 2500
<i>C. mitis</i> Sandst. (6)	600— 900 —1600
<i>C. rangiferina</i> (L.) Web. (9)	390— 840 —1900
<i>C. rangiformis</i> Hoffm. (2)	4, 5
<i>C. stellaris</i> (Opiz) Pouz. et Vězda (4)	10 000— 15 600 —23 200
<i>C. sulphurina</i> (Michx.) Fr. (9)	9000— 12 600 —19 600
<i>C. uncialis</i> (L.) Wigg. (4)	5000— 5800 —6400

выводы о видовых особенностях накопления УК сделаны лишь на немногих или единичных образцах. Использование ИФА позволит в дальнейшем значительно расширить знания в этой области, поскольку появляется возможность одновременного испытания десятков образцов.

Среди лишайников семейства Parmeliaceae высокие уровни содержания УК от 0.7 до 2.6% имели представители рода *Flavocetraria* (табл. 3), а также виды *Vulpicida pinastri* и *Alectoria sarmentosa* (табл. 3). У *A. ochroleuca* количество УК было ниже – от 0.1 до 0.4%. По данным работы [22], виды р. *Alectoria* часто являются богатым источником УК и накапливают ее до 6% от сухого образца. Ранее сообщенный уровень накопления УК у *Flavocetraria cucullata* (= *Cetraria cucullata*) [21], соответствовал нижней границе определенного нами содержания (табл. 3).

Лишайники р. *Evernia* и р. *Usnea*, а также *Cetraria islandica* уступали по этому показателю (табл. 3). Уровни накопления УК у *E. mesomorpha* варьировали от 0.05 до 0.6%, а у *E. prunastri* – от 0.01 до 0.02%. Для двух видов рода *Usnea* – *U. dasy-poga* и *U. subfloridana* – диапазоны измеренных количеств были близки – 0.06–0.1 и 0.01–0.1%.

В 6 образцах *C. islandica* из географически различных мест количество УК варьировало от 25 до 1200 мкг/г, что, по-видимому, связано с условиями их обитания. Тот факт, что в этом лишай-

Таблица 3. Содержание усниновой кислоты в лишайниках семейства Parmeliaceae

Вид лишайника (исследовано образцов)	УК, мкг/г мин.—среднее—макс.
<i>Alectoria ochroleuca</i> (Hoffm.) Massal. (4)	1200— 2900 —3800
<i>A. sarmentosa</i> (Ach.) Ach. (9)	7900— 11 600 —25 100
<i>Arctoparmelia centrifuga</i> (L.) Hale (2)	200, 360
<i>Bryoria capillaris</i> (Ach.) Brodo et D. Hawksw. (3)	14— 25 —40
<i>B. chalybeiformis</i> (L.) Brodo et D. Hawksw. (4)	9— 41 —100
<i>B. fremontii</i> (Tuck.) Brodo et D. Hawksw. (3)	6— 39 —98
<i>B. fuscescens</i> (Gyeln.) Brodo et D. Hawksw. (2)	25, 33
<i>B. implexa</i> (Hoffm.) Brodo et D. Hawksw. (4)	8— 13 —16
<i>B. nadvornikiana</i> (Gyeln.) Brodo et D. Hawksw. (1)	51
<i>B. simplicior</i> (Vain.) Brodo & D. Hawksw. (1)	130
<i>B. subcana</i> (Nyl. ex Stizenb.) Brodo et D. Hawksw. (1)	12
<i>Cetraria islandica</i> Ach.(6)	25— 350 —1200
<i>Evernia mesomorpha</i> Nyl. (6)	500— 3000 —6200
<i>E. prunastri</i> (L.) Ach. (5)	100— 150 —250
<i>Flavocetraria cucullata</i> (Bellardi) Kärnefelt et A. Thell (7)	7100— 12 600 —26000
<i>F. nivalis</i> (Bellardi) Kärnefelt et A. Thell (9)	7700— 10 600 —16500
<i>Hypogymnia farinacea</i> Zopf (1)	164
<i>H. physodes</i> (L.) Nyl. (9)	14— 27 —65
<i>Melanohalea exasperata</i> (DeNot.) O. Blanco et al. (2)	2, 5
<i>M. olivacea</i> (DeNot.) O. Blanco et al. (6)	4— 28 —64
<i>M. septentrionalis</i> (DeNot.) O. Blanco et al. (4)	18— 42 —90
<i>Parmelia saxatilis</i> (L.) Ach.(5)	9— 83 —250
<i>P. sulcata</i> Taylor (4)	10— 62 —138
<i>Platismatia glauca</i> (L.) W.L. Culb. et C.F. Culb. (3)	100— 350 —780
<i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf (2)	2, 3
<i>Usnea dasypoga</i> (Ach.) Nyl. (3)	580— 900 —1300
<i>U. hirta</i> (L.) Wigg. emend. Mot.(1)	316
<i>U. subfloridana</i> Stirt. (7)	130— 500 —1200
<i>Vulpicida pinastri</i> (Scop.) J.-E. Mattsson et M.J. Lai (5)	11 300— 16 300 —26600

нике УК может содержаться на уровне 0.1%, заслуживает внимания, поскольку некоторые фармацевтические компании на основе *C. islandica* выпускают лекарства от простуды [2]. С другой стороны, есть сообщение о том, что в этих лишайниках, собранных на территории Исландии, УК не смогли обнаружить даже в фоновом содержании [1]. Для *Arctoparmelia centrifuga* и *Platismatia glauca* характерны уровни накопления УК около 0.03%, а у представителей родов *Bryoria*, *Melanohalea*, *Parmelia*, *Hypogymnia* и вида *Pseudevernia furfuracea* они оказались еще ниже (табл. 3).

Низкое содержание УК было найдено в лишайниках из семейств Peltigeraceae и Umbilicariaceae, а также у 4 видов, представляющих другие семейства — *Thamnotia vermicularis*, *Lobaria scrobiculata*, *Nephroma arcticum* и *Xanthoria parietina* (табл. 4). У видов *Lobaria scrobiculata* и *Nephroma arcticum* количества УК в среднем составили 0.02%, а у всех остальных — ниже 0.01%. Наименьший уровень накопления 0.0002–0.0005% был найден в образцах *Melanohalea exasperata*, *Pseudevernia furfuracea* (Parmeliaceae) (табл. 3),

Таблица 4. Содержание усниновой кислоты в лишайниках других семейств

Семейство, вид лишайника (исследовано образцов)	УК, мкг/г мин.—среднее—макс.
Isomadophilaceae, <i>Thamnolia vermicularis</i> (Sw.) Ach. ex Schaerer (9)	13— 38 —100
Lobariaceae, <i>Lobaria scrobiculata</i> (Scop.) DC (7)	85— 240 —530
Nephromataceae, <i>Nephroma arcticum</i> (L.) Torss. (9)	80— 177 —320
Peltigeraceae, <i>Peltigera aphthosa</i> (L.) Willd. (10)	9— 49 —130
<i>P. canina</i> (L.) Willd. (2)	6, 18
<i>P. didactyla</i> (With.) J.R. Laundon (2)	11, 33
<i>P. horizontalis</i> (Huds.) Baumg. (4)	5— 12 —15
<i>P. leucophlebia</i> (Nyl.) Gyeln. (2)	8, 40
<i>P. rufescens</i> (Weiss) Humb. (3)	6— 9 —16
<i>P. scabrosa</i> Th.Fr. (2)	3, 32
Teloschistaceae, <i>Xanthoria parietina</i> (L.) Th. Fr. (7)	4— 15 —39
Umbilicariaceae, <i>Umbilicaria deusta</i> (L.) Baumg. (1)	42
<i>U. hyperborea</i> (Ach.) Hoffm. (1)	72
<i>U. proboscidea</i> (L.) Schrad. (2)	30, 132
<i>U. torrefacta</i> (Lightf.) Schrad. (4)	10— 67 —180

Peltigera horizontalis, *P. scabrosa* (Peltigeraceae) и *Xanthoria parietina* (табл. 4).

Таким образом, УК в количествах 0.0002–2.6% выявлена во всех 236 исследованных образцах лишайников, относящихся к 53 видам и 8 семействам. Указания на отсутствие или редкую встречаемость УК в некоторых видах лишайников (например, в *Pseudevernia furfuracea*, *Cetraria islandica*, *Thamnolia vermicularis*, *Xanthoria parietina*, р. *Peltigera*, *Evernia prunastri* и некоторых других) [23–25] обусловлены недостаточной чувствительностью использованного метода.

Применение ИФА, с помощью которого можно получать исчерпывающую информацию о содержании УК в составе экстрактивных веществ лишайников, позволит повысить безопасность и эффективность пищевых биодобавок и лечебных препаратов на их основе, а также расширить представления о биосинтетических возможностях этих симбионтных организмов. Этот метод можно использовать также в целях систематики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ingolfsdottir K. // Phytochemistry. 2002. V. 61. № 7. P. 729–736.
2. Muggia L., Schmitt I., Grube M. // SIM News. 2009. V. 59. № 3. P. 85–94.
3. Ji H., Khan I.A. // J. AOAC Intern. 2005. V. 88. № 5. P. 1265–1268.
4. Roach J.A.G., Musser S.M., Morehouse K., Woo J.Y.J. // J. Agric. Food Chem. 2006. V. 54. № 7. P. 2484–2490.
5. Dailey R., Siemion R., Raisbeck M., Jesse C. // J. AOAC Intern. 2010. V. 93. № 4. P. 1137–1142.
6. Smeds A.I., Kytoviita M.M. // Lichenologist. 2010. V. 42. № 6. P. 739–749.
7. Nakane P.K., Kawaoi A. // J. Histochem. Cytochem. 1974. V. 22. № 2. P. 1084–1091.
8. Кононенко Г.П., Буркин А.А., Толышева Т.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 1. С. 81–87.
9. Буркин А.А., Кононенко Г.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 1. С. 79–83.
10. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Буркин М.А. // Сельхоз. биол. 2010. № 4. С. 110–117.

11. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Буркин М.А. // Сельхоз. биол. 2011. № 4. С. 108–114.
12. Кононенко Г.П., Буркин А.А. // Микология и фитопатология. 2008. Т. 42. № 2. С. 178–184.
13. Кононенко Г.П., Буркин А.А. // Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62. № 7. С. 769–774.
14. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Соболева Н.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 3. С. 305–311.
15. Huovinen K., Ahti T. // Ann. Bot. Fennici. 1986. V. 23. № 3. P. 173–188.
16. Huovinen K., Ahti T. // Ann. Bot. Fennici. 1986. V. 23. № 2. P. 93–106.
17. Huovinen K., Ahti T., Stenroos S. // Ann. Bot. Fennici. 1989. V. 26. № 2. P. 133–148.
18. Huovinen K., Ahti T., Stenroos S. // Ann. Bot. Fennici. 1989. V. 26. № 3. P. 297–306.
19. Huovinen K., Ahti T. // Ann. Bot. Fennici. 1988. V. 25. № 4. P. 371–383.
20. Huovinen K., Ahti T., Stenroos S. // Contributions to Lichenology. In honour of A. Henssen. – Bibl. Lichenol. 1990. V. 38. P. 209–241.
21. Вайнштейн Е.А., Равинская А.П. // Бот. журн. 1984. Т. 69. № 10. С. 1347–1351.
22. Proksa B., Sturdikova M., Pronayova N., Liptaj T. // Pharmazie. 1996. V. 51. № 3. P. 195–196.
23. Thell A., Moberg R. Nordin Lichen Flora. V. 4. Parmeliaceae. Gotenborg: Zetterqvist tryckeri, 2011. 184 p.
24. Vitikanen O. Nordin Lichen Flora. V. 3. Peltigeraceae. Gotenborg: Zetterqvist tryckeri, 2007. P. 113–131.
25. Brodo I.M., Sharnoff S.D., Sharnoff S. Lichen of North America. New Haven and London: Yale University Press, 2001. 795 p.

Enzyme Immunoassay of Usnic Acid in Lichens

A. A. Burkin^a, G. P. Kononenko^a, and T. Yu. Tolpysheva^b

^a All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitary, Hygiene, and Ecology, Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, 123022 Russia

e-mail: kononenkogp@mail.ru

^b Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

Received May 11, 2012

Abstract—An enzyme immunoassay for usnic acid in lichens was developed, the sensitivity of which was 0.1 µg/g of air-dried material (0.00001%). Polyclonal rabbit antibodies against bovine serum albumin conjugated to (+)-usnic acid under the conditions of formaldehyde condensation made it possible to determine the analyzed substance in solutions at concentrations from 1 ng/mL when it interacts with an immobilized gelatin conjugate homologous in the binding mode. Usnic acid in 2–26 600 µg/g (0.0002–2.6%) amounts was found in all 236 studied samples of lichens belonging to 53 species and 8 families.

Сдано в набор 27.12.2012 г.	Подписано к печати 19.03.2013 г.	Дата выхода в свет 23 нечетн.	Формат 60 × 88 ¹ / ₈
Цифровая печать	Усл. печ. л. 13.0	Усл. кр.-отт. 1.5 тыс.	Уч.-изд. л. 13.0
	Тираж 113 экз.	Зак. 1225	Бум. л. 6.5
		Цена свободная	

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

Издатель: Российская академия наук. Издательство “Наука”, 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90
 Оригинал-макет подготовлен МАИК “Наука/Интерпериодика”
 Отпечатано в ППП “Типография “Наука”, 121099 Москва, Шубинский пер., 6