

	Название статьи	Страницы	Цит.
<input type="checkbox"/>	АНТИСТРЕССОВОЕ ПЕРЕКРЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ БАКТЕРИЙ, АРХЕЙ И ДРОЖЖЕЙ (ОБЗОР) Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Новикова Т.М., Чудинова Е.М.	333	2
<input type="checkbox"/>	ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ АКТИВАТОРОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АТФ-ЗАВИСИМОГО КАЛИЕВОГО КАНАЛА С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИНДИКАТОРА AMPLEX RED Мурзаева С.В., Белова С.П., Миронова Г.Д.	345	0
<input type="checkbox"/>	DIFFERENTIAL FUSION EXPRESSION AND PURIFICATION OF A CYSTATIN IN TWO DIFFERENT BACTERIAL STRAINS Gholizadeh A.	353	0
<input type="checkbox"/>	ТРАНСФОРМАЦИЯ 2- И 4-ЦИАНОПИРИДИНОВ СВОБОДНЫМИ И ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ Максимова Ю.Г., Васильев Д.М., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю., Демаков В.А.	358	0
<input type="checkbox"/>	ДЕЙСТВИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ACINETOBACTER CALCOACETICUS ИМВ В-7241, RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS ИМВ АС-5017 И NOCARDIA VACCINII К-8 НА ФИТОПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ Пирог Т.П., Конон А.Д., Софилканич А.П., Иутинская Г.А.	364	1
<input type="checkbox"/>	ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА MFS-ТРАНСПОРТЕРА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ CEFT В ACREMONIUM CHRYSOGENUM И SACCHAROMYCES CEREVISIAE Думина М.В., Жгун А.А., Керпичников И.В., Домрачева А.Г., Новак М.И., Валиахметов А.Я., Кнорре Д.А., Северин Ф.Ф., Эльдаров М.А., Бартошевич Ю.Э.	372	0
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ СТЕРОИДНОЙ МОЛЕКУЛЫ НА НАПРАВЛЕНИЕ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ГРИБОМ CURVULARIA LUNATA Андрюшина В.А., Ядерец В.В., Стыценко Т.С., Дружинина А.В., Войшвилло Н.Е.	382	0
<input type="checkbox"/>	INDUCING EFFECT OF SALICIN FOR EXTRACELLULAR ENDOGLUCANASE SYNTHESIS IN RHIZOPUS ORYZAE PR7 MTCC 9642 Karmakar M., Ray R.R.	391	0
<input type="checkbox"/>	PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PECTIN LYASE SECRETED BY ASPERGILLUS FLAVUS MTCC 10938 Yadav S., Dubey A.K., Anand G., Yadav D.	396	0
<input type="checkbox"/>	БИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ КСИЛОТРОФНЫМ БАЗИДИОМИЦЕТОМ LENTINULA EDODES Ветчинкина Е.П., Буров А.М., Агеева М.В., Дыкман Л.А., Никитина В.Е.	402	0
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ ROL НА СОДЕРЖАНИЕ, СТРОЕНИЕ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ И АКТИВНОСТЬ ГЛИКАНАЗ В КУЛЬТУРАХ ТРАНСГЕННЫХ КЛЕТОК RUBIA CORDIFOLIA Гюнтер Е.А., Попейко О.В., Шкрыль Ю.Н., Веремейчик Г.Н., Булгаков В.П., Оводов Ю.С.	409	0
<input type="checkbox"/>	ВЫДЕЛЕНИЕ D-ГЛЮКОЗАМИНА ИЗ ХИТИН-ГЛЮКАНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ Артамонова С.Д., Шарнина Ф.Ф.	417	0
<input type="checkbox"/>	ВЛИЯНИЕ ЭФИРНОГО МАСЛА ОРЕГАНО НА ПРИВИВАЕМОСТЬ И РАЗВИТИЕ КАРЦИНОМЫ ЛЬЮИС У МЫШЕЙ-ГИБРИДОВ F1 DBA C57 BL/6J Мишарина Т.А., Бурлакова Е.Б., Фаткуллина Л.Д., Алинкина Е.С., Воробьева А.К., Медведева И.Б., Ерохин В.Н., Семенов В.А., Наглер Л.Г., Козаченко А.И.	423	3
РЕЦЕНЗИИ			
<input type="checkbox"/>	С.В. ПРУДНИКОВА, Т.Г. ВОЛОВА "ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ АНАЛОГА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЛАСТМАСС: ЗАКОНОМЕРНОСТИ БИОРАЗРУШЕНИЯ В ПРИРОДНОЙ СРЕДЕ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МИКРООРГАНИЗМАМИ". КРАСНОЯРСК: КРАСНОЯРСКИЙ ПИСАТЕЛЬ. 2012. 184 С	429	0
<input type="checkbox"/>	ПОЗДРАВЛЯЕМ ТАТЬЯНУ АЛЕКСАНДРОВНУ ВАЛУЕВУ С ЮБИЛЕЕМ	431	0

УДК 577.112:579.861.043:535.31

АНТИСТРЕССОВОЕ ПЕРЕКРЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ БАКТЕРИЙ, АРХЕЙ И ДРОЖЖЕЙ (ОБЗОР)

© 2013 г. Л. И. Воробьева*, Е. Ю. Ходжаев*, Т. М. Новикова**, Е. М. Чудинова***

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Москва, 119899

**Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, 119899

***Институт белка РАН, г. Пущино, 142290

e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Поступила в редакцию 12.12.2012 г.

В обзоре рассмотрены примеры специфических и глобальных ответов микроорганизмов и особенности стрессовых ответов с участием внеклеточных метаболитов сигнального действия. Обобщена информация о защитном и реактивирующем действии активных экзометаболитов представителей доменов бактерий, архей и эукариот и показаны междоменные перекрестные стрессовые ответы.

DOI: 10.7868/S0555109913040144

Ответ микроорганизмов на стресс вызывает большой интерес, поскольку их устойчивость к стрессам создает серьезные проблемы в антимикробной терапии и биотехнологии. Изучение и понимание стрессовых ответов прокариот относится к важнейшим аспектам фундаментальной биологии. Стресс — это любые изменения в геноме, протеоме или в окружающей среде, которые приводят к снижению скорости роста или способности к выживанию организма.

Стресс испытывают все формы жизни, если условия, в которых они обычно существуют, резко изменяются. Стрессовые ответы имеют особое значение для микроорганизмов, которые живут в изменяющейся окружающей среде, где происходят такие флуктуации, как суточные и сезонные изменения температуры, pH, осмотического давления и другие факторы. Стресс для обитателей водной среды и почв вызывают отсутствие пищи и дефицит таких элементов, как азот, фосфор и (или) железо.

Микроорганизмы располагают рядом адаптивных механизмов, обеспечивающих их существование в изменяющихся и зачастую стрессорных условиях окружающей среды. Помимо “классических” стрессорных ответов, были описаны механизмы, обеспечивающие генотипическое и (или) фенотипическое разнообразие микробных популяций, увеличивая шансы на выживание последних. Механизмы, основанные на стресс-индуцированном (адаптивный) мутагенезе известны у про- и эукариот. Известен феномен “генетической буферности”, проявляющийся в том, что возникшие под действием стрессов изменения в геноме зачастую фенотипически не проявляются и, следова-

тельно, не попадают под действие естественного отбора. Однако, если стрессорное воздействие столь сильно, что преодолевает “буферные” возможности организма, то доселе скрытая генетическая вариабельность становится видимой и доступной для факторов отбора [1]. Природа бережлива и полезные приобретения сохраняет в эволюции. Реакция на стрессы у самых древних обитателей Земли и у высших эукариот имеет большое сходство в отношении индукции классического механизма через образование внутриклеточных сигнальных (сенсорных) молекул, часто в ответ на повреждения молекул ДНК. Но микроорганизмы, обитающие в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды, обладают дополнительными средствами антистрессовой защиты с использованием внеклеточных метаболитов, которые защищают организмы от “привычных” и “незапланированных” стрессов.

Специфические глобальные ответы на стресс. Одна стратегия стрессовых ответов направлена на нейтрализацию и (или) избежание стрессового удара. Такие ответы уникальны для каждого стресса. Так, белки, необходимые бактериям для спасения от окислительного стресса, иные, чем белки, требующиеся для нейтрализации стресса от голодания. Стрессовые ответы такого типа называют специфическими [2]. К ним относят голодовый, окислительный, кислотный стрессы. Специфический ответ возникает при слабых стрессорных воздействиях.

Если воздействия стресса не удастся избежать, то это может приводить к повреждениям макромолекул (ДНК, белки, клеточные покровы), поэтому существует вторая стратегия, направленная

на предотвращение и репарацию повреждений клетки, что делает ее устойчивой не только к данному стрессу, но и к другим. Она называется глобальным стрессовым ответом [1, 2]. Глобальные стрессовые ответы возникают при летальных воздействиях. В процессе репарации белков участвуют белки-шапероны, отвечающие за правильную укладку синтезирующихся полипептидов и восстановление нативной конформации денатурированных белков. Ряд ферментов, индуцируемых стрессами, участвуют в репарации ДНК.

Основной механизм репарации ДНК, SOS-ответ, активируется разнообразными стрессами: облучение, голодание, окисление, воздействие антибиотиков и некоторые другие.

Покровы клеток защищает фермент D-аланин-карбокси-peптидаза, действие которой направлено на увеличение числа поперечных мостиков в пептидогликане и на продукты *rexA*-генов, которые защищают клеточные мембраны, усиливая синтез трегалозы. При летальных стрессах реализуются глобальные стрессовые ответы, которые происходят с включением коровых *Rex*-белков независимо от природы стресса, поэтому столкновение с определенным стрессорным фактором придает организму устойчивость к другим воздействиям. При адаптивных дозах неродственных стрессов клетки становятся устойчивыми к летальным дозам, что было показано в убедительных экспериментах Р. Рубари и соавт. [3, 4].

Переключение экспрессии клеточных генов на синтез характерного для стрессовых ситуаций белкового профиля включает ряд факторов: 1) δ -факторы (маленькие белки, которые связываются с РНК-полимеразой, коровым ферментом, и определяют промотор, узнающий холофермент), 2) дополнительные регуляторные молекулы (сАМР, ppGpp), 3) химические изменения определенных белков. Важную роль в стрессовых ответах играют δ^{70} , δ^s , δ^{32} , δ^{54} . Их холоэнзимы узнают соответствующие промоторы. Например, $E\delta^s$ контролирует 140 коровых генов, индуцированных стрессами, под контролем $E\delta^{32}$ находятся гены теплового шока и “голодовые” гены, δ^{70} функционирует главным образом в экспоненциальной фазе роста и при специфических стрессах. Стрессовые гены, которые транскрибирует $E\delta^{70}$, имеют слабые промоторы [2]. Поэтому транскрипция этих генов зависит от доступности дополнительных транскрипционных факторов, а именно сАМР. Другие молекулы с регуляторной функцией, ppGpp, оказывают положительное влияние на транскрипцию стрессовых генов.

Существует общее представление о “стрессосомах”, которые служат трансдуцирующими узлами, интегрирующими множественные стрессорные сигналы. В частности, была реконструирована и изучена молекулярная структура стрессосом

Bacillus subtilis. Оказалось, что они состоят из вирусоподобного капсидного стержня, снабженного сенсорными тяжами [5]. Было высказано предположение, что отдельные тяжи отвечают на различные сигналы, которые аккумулируются высококонсервативными доменами стержня [5]. При этом, эффективность стрессорного ответа, по-видимому, зависит от мощности физико-химического удара, испытанного клеткой. Стрессосомы были обнаружены во многих микробных филогенетических таксонах (филах, греч. *phyle* – племя), включая представителей *Methanomicrobiales*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteriodes* и *Deinococcus*.

Механизмы стрессовых ответов связаны с химическим изменением белков при работе двухкомпонентной системы сигнальной трансдукции. Первый компонент – гистидинпротеинкиназа (ХПК), второй – респондирующий регулятор (РР). В ответ на специфический стимул стабилизируется фосфорилированная форма сенсорной киназы. Та, в свою очередь, фосфорилирует РР. Фосфорилированная форма РР активирует транскрипцию в месте мишени. ХПК из различных систем имеют на С-конце гомологичный участок, включающий около 100 аминокислотных остатков. Для РР характерна гомология домена примерно из 130 аминокислотных остатков на N-конце [6], что может обуславливать перекрестные реакции между разными организмами.

Стрессовые ответы с участием внеклеточных метаболитов. Классические работы Рубари [3, 4] с использованием штамма *Escherichia coli* 1829ColV положили начало изучению защиты бактерий от стрессорных воздействий при участии внеклеточных сигнальных соединений (сенсоры), главным образом, пептидной природы. В соответствии с представлениями автора [3], стресс распознается сенсорным экзометаболизмом (ВСК, внеклеточный сенсорный компонент), который под действием стрессорных воздействий превращается (“активируется”) в индуктор (ВИК, внеклеточный индуцирующий компонент) и, взаимодействуя с клеткой, приводит к индукции устойчивости клетки к стрессу [7]. Таким образом, по Рубари, ВСК служат первоначальной мишенью стрессового воздействия.

В отличие от классической индукции в индукции, опосредованной внеклеточными метаболитами, выделяемыми неповрежденными клетками, возможно его превентивное действие. Поэтому неудивительно, что большая часть стрессовых ответов микроорганизмов связана с участием внеклеточных факторов [7]. Их называют аутоиндукторами. У грамотрицательных бактерий аутоиндукторами кворум-сенсинга служат главным образом ацилированные лактоны гомосерина (АГЛ), но могут быть и другие соединения, как циклические

дипептиды, метиловый эфир 3-гидроксипальмитиновой кислоты или 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон. Грамположительные бактерии в качестве аутоиндукторов используют пептиды, небольшие белки, аминокислоты. АГЛ гидрофобны и покидают клетку при простой диффузии, пептидные индукторы – гидрофильны и для их экскреции требуются специальные системы экспорта.

Клетки *E. coli* выделяют внеклеточные факторы x_1 и x_{11} , образующиеся в условиях стресса под действием N-этилмалеимида (N-ЭМ) [8]. Первый из них – x_1 обеспечивает прямую коллективную защиту клеток от литического действия N-ЭМ; фактор x_{11} , представлен сигнальными молекулами, которые выделяются в среду в условиях сильного стресса, вызывающего резкое снижение роста культуры. Фактор x_1 неустойчив при нагревании и хранении, а фактор x_{11} стабилен в этих условиях и, возможно, является средством межклеточной коммуникации. Однако природа и механизмы действия этих факторов пока не ясны.

Напротив, хорошо изучены свойства и функции внеклеточных белков семейства Rpf, обнаруженные в культуральной жидкости активно растущими клетками *Micrococcus luteus*. Основной функцией этих белков является восстановление колониеобразующей способности у некультивируемых клеток (“оживление”). Ген *rpf* был выделен и полностью расшифрован у продуцента, а также ряда других бактерий. Предполагается, что Rpf является ферментом, обладающим лизоцим-подобной активностью, а механизм его действия связан с модификацией клеточной стенки [9].

В наших исследованиях впервые было показано, что белковые экзометаболиты бактерий и дрожжей участвуют в реактивации клеток, подверженных действию различных стрессорных факторов (УФ-облучение, нагревание, окислительный стресс) [10–12]. С использованием тестерных штаммов, сконструированных на основе *E. coli* С600, несущих векторы с гибридными оперонами *umuD-lacZ* показана сигнальная функция длинноцепочечных алкилоксибензолов (C₁₂-АОБ) как алармонов – сигналов тревоги, контролирующих включение защитных функций организма [13].

Олигопептиды связываются с мембранными рецепторами, и сигнал передается на молекулы ДНК путем аутофосфорилирования рецептора сенсорной киназы (ХПК) и последующим переносом остатка фосфорной кислоты на респондирующий регулятор (РР). Фосфорилирование последнего приводит к его димеризации [14]. Димеризация увеличивает сродство РР с оператором, после связывания с которым следует соответствующий стрессовый ответ. Результатом каскадных реакций является индукция устойчивости клеток к стрессорному фактору (защита) и восстановле-

ние процесса деления инактивированных клеток (реактивация).

Малые белковые молекулы, легко диффундируя в окружающую среду, служат не только защитой популяции продуцента, но и соседних популяций микроорганизмов (перекрестный эффект). Сенсор взаимодействует с организмом во время или даже до стресса и при этом сенсорная молекула действует как внеклеточный коммуникатор, предупреждающий соседние клетки о возможной угрозе жизни. Это имеет огромное значение для поддержания гомеостаза микробных сообществ в стрессовых ситуациях, поэтому внеклеточные (олиго)пептидные молекулы являются незаменимыми участниками стрессовых ответов организмов.

Стрессовые ответы всех живых существ – высоко законсервированные физиологические ответы, функционирующие на всех уровнях жизни. Было показано сходство механизма сигнальной трансдукции у бактерий и человека [6]. Как и в случае нервной сети, в прокариотной сигнальной трансдукции параллельно работает значительное число трансдуцирующих путей. У *E. coli* функционирует больше 50 различных двухкомпонентных путей [15]. Множество путей обнаружено у различных штаммов молочнокислых бактерий. Показано их участие в ответах на различные стрессы [16]. Фосфорилированные РР могут быть стабильны от нескольких секунд до нескольких часов. Это дает организму нечто вроде памяти, и, как следствие, ответ клетки на действие специфического стимула будет зависеть от истории данной клетки в отношении этого типа стимула [6].

При максимальном стимуле сигнального переноса число сигнальных трансдуцирующих компонентов в клетке может увеличиваться в 10 раз, т.е. возможна аутоамплификация сигнальной трансдукции [6]. ХПК может фосфорилировать несколько молекул РР, а, в свою очередь, молекула РР может быть фосфорилирована несколькими ХПК. При этом образуются взаимосвязанные разветвленные перекресты, сходные с нейросетью.

Сходство механизмов дистресса у бактерий и высших эукариот подтверждено фактом функционирования химерного белка, собранного *in vitro* из сенсорирующего домена аспаргатного сенсора и цитозольной части инсулинового рецептора человека. Такой химерный рецептор активировал инсулиновый путь в эукариотических клетках [6]. Ключевой регуляторный механизм передачи сигнальной информации эукариотических клеток, включающий обратимое фосфорилирование остатков серина, треонина или тирозина в молекулах протеинкиназных рецепторов, обнаружен у ряда бактерий и архей [14]. Показано, что рост культур *E. coli* и *Saccharomyces cerevisiae* стимулируется внесением в среду гормонов человека дофамина и норадреналина [17].

Имеющиеся данные литературы указывают на высокую степень консервации стрессовых сигнальных путей у бактерий, дрожжей и высших эукариот. Это позволяет использовать клетки микроорганизмов как удобную модель для характеристики ответов на стрессы у более сложноорганизованных организмов.

***Luteococcus japonicus* subsp. *casei* как продуцент внеклеточных (олиго)пептидов с реактивирующими и защитными свойствами.** *L. casei*, грамположительные плеоморфные кокки диаметром в 1.5–2.0 мкм, были выделены нами из сыра и описаны ранее [18]. На основании фенотипических и молекулярно-биологических исследований было показано, что эти бактерии относятся к семейству Propionibacteriaceae, которое включает роды *Propionibacterium*, *Propioniferax*, *Micrococcus* и *Luteococcus*. Семейство включено в класс Actinobacteria, порядок Actinomycetales, подкласс Actinobacteridae [19]. От других членов семейства лутеококки отличаются высоким содержанием (до 90% всех кислот) мононенасыщенных длинноцепочечных жирных кислот. Другие члены семейства содержат в значительных количествах изо- и антеизо-разветвленные жирные кислоты.

L. casei – факультативные анаэробы, каталазо- и СОД-положительные, солеустойчивые организмы (растут при содержании NaCl вплоть до 6.5%). В качестве продуктов брожения они образуют пропионовую, уксусную и муравьиную кислоты. На поверхности плотных сред вырастают в виде блестящих колоний оранжевого цвета. При культивировании в жидких средах оседают на дно ферментера, видимо, в связи с образованием больших агрегатов поделившихся, но не разошедшихся клеток, окруженных слизистой капсулой, что видно на снимках в электронном микроскопе [20]. Бактерии хранятся в Российской коллекции микроорганизмов под номером ВКМ-АС 1910.

Замечательным свойством *L. casei* служит выделение веществ пептидной природы, оказывающих защитное и реактивирующее действие как на клетки продуцента, так и на клетки других, далеких в филогенетическом отношении организмов. Вещества с реактивирующими свойствами, названные нами реактивирующим фактором (РФ) выделяют неповрежденные клетки в благоприятных условиях роста, в течение всего периода развития, при этом эффективность действия РФ находится в обратной зависимости от уровня выживаемости клеток, подвергаемых стрессорным воздействиям. При летальных интенсивностях стрессорных воздействий и выживаемости порядка 0.01–0.001% прединкубация суспензии клеток с РФ или бесклеточным фильтратом культуральной жидкости (КЖ) приводила к увеличению выживаемости в 3–10 раз [10–12, 21]. По-видимому, при стрессах летальной интенсивности происхо-

дит подавление синтеза как ферментов репарации ДНК, так и собственно РФ, поэтому клетки эффективно отвечают на РФ, внесенный извне.

Белковый РФ был выделен из КЖ путем ее пропускания через целлюлозный мембранный фильтр (“Millipore”, США, диаметр пор – 0.22 мкм) и последующего элюирования адсорбентов 3%-ным NaCl с последующим отделением клеток путем пропускания через фильтр с низким сродством к белку. Для стандартизации постановки экспериментов РФ выделяли из 100 мл КЖ и экстрагировали 2 мл раствора NaCl. Измерение содержания РФ было затруднено в силу его ничтожной концентрации.

Эффективность защитного или реактивирующего действия оценивали по соотношению титров КОЕ в суспензиях, инкубированных с КЖ (или РФ, см. далее) до или после стрессового воздействия, к титру КОЕ стрессированной культуры без пред- и постинкубации. Это соотношение обозначали как индекс деления (ИД). Учитывали также соотношение “живых” и “мертвых” клеток, определяемое после окрашивания препаратов флуоресцентным красителем Live/Dead (“Molecular Probes Inc.”, США). Оптимальное время реактивации составляло 10–15 мин при соотношении “суспензия клеток – КЖ” 1 : 1 (v/v) при 30°C. Защитное и реактивирующее действие РФ проявлялось при воздействии стрессорных факторов различной природы: нагревание, облучение УФ-светом, действие окислителей и активных форм кислорода [10–12]. При этом двухстадийный механизм действия в отношении стрессированных клеток продуцента был не характерен для РФ, в отличие от ВСК/ВИК-системы в *E. coli* [4, 21–23]. В работах Рубари и соавт. было показано, что для проявления индукционного действия, приводящего к возникновению устойчивости *E. coli* 1829 ColV к различного рода стрессам, белковый экзометаболит этого штамма должен быть обязательно активирован под действием нагревания или УФ-облучения. В случае РФ из *L. casei* активация не требовалась для проявления реактивирующего эффекта в отношении штамма-продуцента. Белковый метаболит *L. casei* проявлял широкую специфичность в отношении объектов его действия, клеток филогенетически далеких организмов. Перекрестный эффект был продемонстрирован на низших эукариотах, дрожжах [24] и грамтрицательных бактериях *E. coli* [21]. Причем в случае клеток *E. coli*, облученных УФ-светом, предварительная активация РФ в 3 раза увеличивала защитный эффект, но не оказывала заметного действия на реактивирующий эффект. На реактивацию облученных УФ-светом клеток дрожжей активация РФ влияния также не оказывала.

Параллельный учет “живых” и “мертвых” клеток прямыми микроскопическими методами по-

сле прокрашивания клеточных суспензий флуоресцентным красителем Live/Dead показал, что доля “живых”, “переходных” и “мертвых” клеток в исходной суспензии *S. cerevisiae* составляла 86, 10 и 4%, соответственно, а после облучения УФ-светом 53, 8 и 39%. После инкубации облученных УФ-светом суспензий с РФ *L. casei* в течение 15 мин при 28°C суммарная доля клеток, диагностируемых как “живые” (76%), была сопоставима с таковой в интактной суспензии при одновременном уменьшении доли “мертвых” клеток (8%).

В свою очередь *S. cerevisiae* образуют белковые экзометаболиты, выделенные из КЖ тем же методом, что и РФ *L. casei*. Показано, что при последовательном внесении вначале РФ дрожжей, а затем РФ лютеококков, эффективность реактивации УФ-облученных клеток *S. cerevisiae* (как объекта изучения перекрестного действия РФ) ниже, чем при внесении только РФ лютеококков, и проявляется так, как в присутствии только РФ дрожжей [12]. При обратной схеме внесения (РФ лютеококков, затем РФ дрожжей) в облученную суспензию клеток *S. cerevisiae* проявляется не суммарный эффект, а соответствующий РФ лютеококков. Иными словами, наблюдалась конкуренция РФ бактерий и дрожжей за мембранные рецепторы, что может иметь место при гомологичности белковых молекул или их доменов.

Препараты РФ лютеококков и *S. cerevisiae* имели сходные профили элюции при их очистке методом ВЭЖХ [24]. Спектры белков регистрировали на приборе Autoflex II (“Bruker”, Германия). Масс-спектральный анализ (MALDI-TOF) показал, что основной компонент РФ *S. cerevisiae* представлен белком с М.М. 5.8 кДа. Компонент с близкой массой присутствовал в препарате РФ *L. casei*. Не исключено, что наличие в составе РФ бактерий и дрожжей этого пептида может обуславливать перекрестные ответы у этих микроорганизмов.

Помимо указанного пептида, в составе РФ были обнаружены дополнительные пептидные факторы. В настоящее время проводится разделение белковой смеси в сочетании с тестированием биологической активности каждой фракции.

При изучении препаратов РФ были сделаны некоторые заключения о свойствах и механизмах их действия. РФ обладает типичными свойствами сигнальных молекул: синтезируется и аккумулируется в среде в ничтожных количествах, функционирует в очень низких концентрациях, проявляет дозозависимый эффект, достаточно термостабилен и устойчив при хранении [12]. РФ *L. casei* образуется конститутивно клетками, растущими в благоприятных условиях, и кривая зависимости защитного (реактивирующее) действия от количества вносимого РФ имеет S-образный характер [12], что предполагает кооперативный тип его

взаимодействия с клеткой и рецепторный способ передачи сигнала. В пользу мембранного механизма действия РФ свидетельствует быстрое (в течение нескольких минут) проявление стрессопротекторной активности РФ и влияние на его активность состояния цитоплазматической мембраны, меняющегося в зависимости от стадии развития микробных культур. При сравнительном анализе реактивирующего действия РФ на клетки лютеококков в логарифмической и стационарной фазе роста было показано, что РФ-опосредуемая реактивация клеток в первом случае в два раза выше, чем во втором.

При изучении механизма антистрессового действия РФ *L. casei* использовали изогенные штаммы *E. coli* с различными дефектами репарационных систем: Uvr A⁻, Rec A⁻, Pol A⁻ и штамм АВ 1157, клетки которых подвергали облучению УФ-светом высокой интенсивности [21]. У штамма Uvr A⁻ не функционирует эксцизионная репарация, имеющая первостепенное значение при репарации облученных УФ-светом клеток, но действует пострепликативная (рекомбинационная) и SOS-репарация. Штамм Pol A⁻ осуществляет эксцизионную репарацию, но более медленно, чем клетки “дикого” типа. Рекомбинационная и SOS-репарация функционируют у него эффективно. Штамм Rec A⁻ не осуществляет рекомбинационную и SOS-репарацию, сохраняя при этом активность эксцизионной системы репарации. У штамма АВ 1157 системы репарации ДНК не нарушены. Защитное действие РФ *L. casei* проявлялось в увеличении выживаемости облученных УФ-светом клеток Uvr A⁻, Pol A⁻ и Rec A⁻ соответственно в 15.7, 12.0 и 12.0 раз.

Предварительная активация РФ значительно увеличивала его защитный эффект только в отношении клеток “дикого” штамма АВ 1157. Выживаемость УФ-облученных, прединкубированных с РФ клеток была только в 2 раза выше, чем в контроле (необлученные клетки); напротив, после инкубации с РФ, предварительно облученного УФ-светом выживаемость штамма увеличивалась в 23 раза [21]. Различная реакция клеток “дикого” штамма и мутантов на “активированный” РФ, по-видимому, связана с различиями в структуре рецепторов цитоплазматической мембраны. Но у всех мутантов, независимо от типа используемой репарационной системы, под действием РФ происходит многократное увеличение числа КОЕ у защищаемых им клеток. Можно сделать вывод, что действие РФ не направлено на интенсификацию репарационных систем, функционирующих в клетках мутантных штаммов, поскольку, независимо от типа повреждения, наблюдалось сходное защитное действие РФ.

Схожесть протекторного эффекта РФ в отношении «дикого» штамма и репарационных му-

тантов позволяет связывать его действие с участием в общей для клеток функции — репликации. Деление клеток *E. coli* не начинается, пока не устранятся повреждения ДНК, а ингибитором клеточного деления служит белок Sul-A. Транскрипция гена *sul-A* индуцируется в условиях стресса при SOS-ответе. Продукт этого гена ингибирует образование Z-кольца до завершения репарации ДНК [25].

Приведенные выше факты, касающиеся условий и механизма действия РФ, были проверены и подтверждены на специально сконструированном штамме. Он был создан на основе *E. coli* C600 и содержал гибридный оперон *umuD-lac-Z* [26]. Ген *umuD* кодирует низкоточечную полимеразу PolV и участвует в осуществлении SOS-ответа. Реперный ген *lac-Z* это ген β -галактозидазы. При возрастании дозы облучения УФ-светом, приводящей к образованию однонитевых разрывов ДНК, в клетках штамма, несущего оперон *umuD-lac-Z* увеличивается количество фермента β -галактозидазы, что свидетельствует о реализации SOS-ответа. Активность оперона *umuD-lac-Z* подтвердила предположение о наличии протекторного дозозависимого действия РФ *L. casei* на облученные УФ-светом клетки *E. coli*. При пересчете активности β -галактозидазы на количество оставшихся жизнеспособными клеток оказалось, что уровень экспрессии гена *umuD* в них возрастал на 2–3 порядка. Однако в клетках, предварительно инкубированных с РФ, этот уровень был значительно ниже. Таким образом, РФ отчасти подавлял характерную для *umuD* SOS-зависимую регуляцию и не являлся индуктором SOS-ответа клетки.

Данные, полученные с использованием сконструированного штамма, подтвердили заключения, сделанные при работе со штаммами, лишенными различных систем репарации ДНК. Но механизм антистрессового действия РФ пока остается неясным и требует дальнейших исследований.

Реактивирующее перекрестное действие внеклеточных метаболитов грам-отрицательных бактерий, архей и эукариот. Использование внеклеточных метаболитов в качестве зондов окружающей среды, по-видимому, широко распространено среди микроорганизмов и является скорее нормой, чем исключением. Ниже приведены результаты исследований грамотрицательных бактерий (на примере *E. coli*), низших эукариот (на примере дрожжей), архей и клеток млекопитающих (на примере клеток *HeLa*) в качестве продуцентов и (или) акцепторов пептидных сигналов-сенсоров, участвующих в индукционной защите и (или) подготовке организмов к столкновению со стрессом.

Клетки *E. coli* в качестве сенсоров используют также пептиды или малые белки, в отличие от других грамотрицательных бактерий, использующих главным образом N-ацил-гомосеринлактоны [27]. Большой вклад в изучение защитного действия пептидных экзосметаболитов *E. coli* был внесен Р. Роубари [3, 4]. Автором была показана двухстадийность защитного действия, перекрестное действие стрессорных факторов, индукция устойчивости к стрессам в результате предварительного слабого воздействия последних на клетки. Он также подчеркивал важность коммуникативного значения внеклеточного защитного фактора и его практическое значение для биотехнологии и медицины, поскольку способность энтеробактерий приобретать устойчивость к различным химическим и физическим стрессорным воздействиям, сохраняя жизнеспособность (как в природных условиях, так и при приготовлении пищи и кормов), может быть причиной заболеваний животных и людей.

Однако выделение и идентификация активного соединения проведена не была, и все исследования на сегодня были выполнены с бесклеточным супернатантом *E. coli*. В нашей работе [28] впервые был продемонстрирован реактивирующий эффект супернатанта (КЖ) различных штаммов *E. coli*: выживаемость штаммов, облученных УФ-светом, увеличивалась более, чем в 4 раза. Было показано, что биологическая активность КЖ связана с термолабильным веществом (ами) белковой природы, с М.М. менее 10 кДа. Реактивирующее действие КЖ штамма К-12 лишь незначительно усиливалось после активации нагреванием по сравнению с контрольной, интактной КЖ.

Выше было показано, что белковый экзосметаболит (РФ) *L. casei* обладает перекрестным реактивирующим действием в отношении низших эукариот — дрожжей, подвергнутых различным стрессорным воздействиям.

Защитное и реактивирующее действие РФ *L. casei* было показано и в отношении *E. coli* К-12. Причем его активация УФ-облучением и нагреванием увеличивала защитный эффект в 3 раза, но не оказывала заметного действия на реактивирующий эффект, аналогично тому, что было показано для белкового экзосметаболита *E. coli*. Это наблюдение может быть обусловлено модификацией как самого РФ, так и мембранных рецепторов объекта, подвергаемого облучению и нагреванию. Экзосметаболит(ы) *E. coli* не индуцировал защитный перекрестный эффект *L. casei*.

Заметное реактивирующее действие РФ *L. casei* в отношении облученных клеток *E. coli* позволяло предположить способность последних синтезировать аналогичное соединение, однако аналог этого белкового фактора в КЖ *E. coli* обна-

ружен не был, а реактивирующая активность последней была связана с супернатантом, полученным после отделения предполагаемого белкового фактора (РФ) из КЖ. Следовательно, белковые сенсоры *E. coli* К-12 и *L. casei* различаются в отношении своей локализации и свойств.

Физико-химическая характеристика внеклеточных факторов адаптации *E. coli* разных штаммов пока не получена, но имеющиеся данные показывают, что клетки штаммов логарифмической фазы роста выделяют в среду белковые соединения, обеспечивающие жизнеспособность популяции в стрессовых ситуациях. Белковые факторы, участвующие в химической коммуникации, синтезируются клетками *E. coli* в ничтожных количествах, имеют небольшую молекулярную массу и, следовательно, их синтез не связан с большими энергетическими и конструктивными затратами.

Низшие эукариоты, дрожжи *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* и *Candida utilis*, в обычных условиях роста выделяют в среду вещества пептидной природы не только защитного, но и реактивирующего действия [29]. Этим свойством обладают также представители других семейств, обитатели различных экотопов, имеющие важное практическое применение [30].

Аскомицетные дрожжи *Debariomyces hansenii* выделены из муравейника. Это соле- и кислотоустойчивые дрожжи, встречаются в морской воде, вареньях, сиропах и джемах, играют отрицательную роль в рассолах. Активные продуценты липидов, протеаз и инулиназ, хорошо усваивают лактозу и образуют большую биомассу при росте на молочной сыворотке [31].

Arthroascus shoenii — аскомицетовые дрожжи семейства Saccharomycetaceae, обитают на листьях дуба [31]. *Rhodotorula glutinis* — аспорогенные красные дрожжи семейства Stryptosaccaceae, фитобииоты, обитающие на поверхности листьев различных растений. Служат источниками внеклеточных протеаз, L-аспарагиназы (противораковое средство) и каротиноидов [31]. С использованием этих дрожжей разработан способ получения фенилаланинаммиаклиазы [32].

Phaffia rhodozyma — базидиомицетовые красные дрожжи, эпифиты, выделяются только из сокоотечений деревьев, максимальная температура роста 22°C. Единственные дрожжи, способные синтезировать каротиноид астаксантин, широко используемый в медицине, косметике и как кормовая добавка при выращивании лососевых рыб.

Yarrowia lipolytica, также дрожжи аскомицетового аффинитета семейства Dipodascaceae, изолированы с поверхности выделяющих соль листьев пустынных растений Ближнего Востока. Осмо-, соле- и щелочеустойчивый штамм дрожжей, в отличие от других представителей этого вида, способен к быстрому росту при щелочных

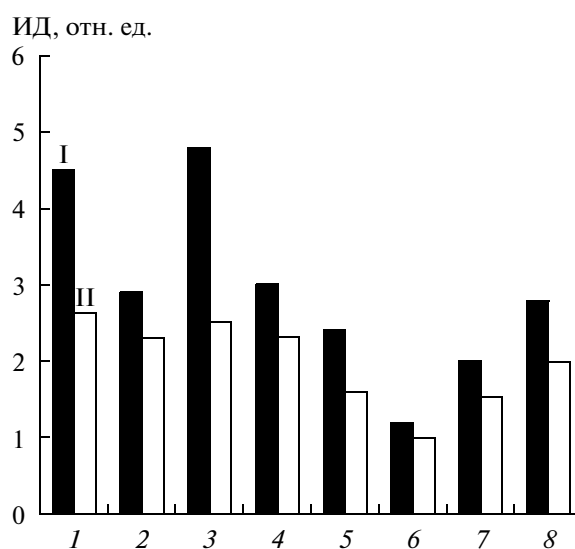


Рис. 1. Защитный (I) и реактивирующий (II) эффекты РФ, синтезированных различными штаммами дрожжей, на УФ-облученные клетки тех же культур (доза Дж/м²).

1 — *S. cerevisiae*; 2 — *C. utilis*; 3 — *K. lactis*; 4 — *D. hansenii*; 5 — *R. glutinis*; 6 — *A. shoenii*; 7 — *P. rhodozyma*; 8 — *Y. lipolytica*.

ИД — индекс деления, отн. ед.

значениях pH. Были предложены в качестве продуцентов лимонной кислоты из углеводов нефти, являются хорошим продуцентом липаз и протеаз [33].

Endomycopsis magnusii — аскомицеты, дрожжеподобные грибы, способные образовывать истинный мицелий, облигатные паразиты грибов.

Чувствительность клеток дрожжей к УФ-облучению снижалась в следующем порядке: *A. shoenii*, *D. hansenii*, *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *C. utilis*, *P. rhodozyma*, *E. magnusii*, *Y. lipolytica*, *R. glutinis*. Наибольшей устойчивостью обладали красные дрожжи *R. glutinis*, *P. rhodozyma* за счет высокого содержания каротиноидных пигментов и *Y. lipolytica*, выделенная из мест с высокой солнечной радиацией. К дрожжам, устойчивым к УФ-излучению, относятся также *E. magnusii*.

Из КЖ дрожжей выделяли антистрессовый белковый фактор по той же процедуре, что РФ лютеококков, как описано выше. Максимальный защитный и реактивирующий эффект дрожжевого РФ проявлялся при значениях выживаемости облученных дрожжей в интервале 0.01–0.05% [30]. Такой характер зависимости объясняется тем, что репарационные системы в клетках присутствуют в низких концентрациях, особенно ферменты репарации ДНК.

При слабом облучении (высокая выживаемость) индуцируются ферменты расщепления димеров тимина (главный продукт УФ-облуче-

ния) и активируются ферменты репарации. Летальные дозы облучения приводят к образованию такого количества димеров, при котором ферменты репарации подавлены, и именно такие клетки становятся наиболее восприимчивыми к внешним факторам реактивации. При более высокой выживаемости (20–50%) в качестве защитного механизма и повышения устойчивости клеток к стрессорным воздействиям могут использоваться алкилксибензолы (АОБ) [35], синтез которых связан с меньшими энергетическими и конструктивными затратами, чем синтез белков. АОБ синтезируют многие микроорганизмы, в том числе дрожжи *S. cerevisiae* и бактерии *L. casei*. Была показана индуцированная стрессом стимуляция синтеза С₇-АОБ [35]. С₇-АОБ – вещество фенольной природы, внесенное в суспензию *S. cerevisiae*, проявляло защитное, но не реактивирующее действие в условиях окислительного стресса и теплового шока [35].

На рис. 1 представлены данные по сравнительному защитному и реактивирующему действию РФ изученных дрожжей, откуда видно, что защитное действие превышало реактивирующее. Наибольшей эффективностью обладал РФ близких в систематическом отношении пищевых дрожжей *S. cerevisiae* и *K. lactis*. У дрожжей, выделенных из природных экотопов, особенно окрашенных штаммов *R. glutinis* и *P. rhodozyma*, действие РФ было менее выражено, по-видимому, в связи с наличием других природных защитных систем, например каротиноидов. Кроме того, в тех стрессовых условиях, в которых фактически обитают эти дрожжи в природе, в первую очередь, снижается синтез рРНК и рибосомных белков [36], поскольку синтез рибосом связан с большими энергетическими затратами. Более слабый рост дрожжей, выделенных из экстремальных экотопов, наблюдался и в наших исследованиях.

Ранее сообщалось о перекрестном действии РФ дрожжей *S. cerevisiae* и бактерий *L. casei*, а в составе РФ этих микроорганизмов были обнаружены пептиды с идентичной молекулярной массой [24]. В дальнейшем было показано перекрестное защитное и реактивирующее действие РФ разных дрожжей [29]. Причем перекрестная защита увеличивалась в 2–3 раза при активации (облучение) РФ, которая, впрочем, не влияла на реактивирующее действие. Наблюдение свидетельствует о нестрогой специфичности РФ, образованных *S. cerevisiae*, *K. lactis* и *C. utilis*, которая еще больше снижалась после их облучения. Возможно, при этом происходило изменение конформации пептида или каких-то его групп, что облегчало его узнавание и связывание с рецепторными белками цитоплазматической мембраны. В случае реактивации облученных клеток может происходить модификация не только сенсор-

ных молекул, но и рецепторов, что может снижать их средство.

РФ *S. cerevisiae* не проявлял киллерного или ингибирующего действия в отношении как дрожжей, так и грамположительных и грамотрицательных бактерий [29].

Использованные штаммы дрожжей имеют разнообразное биотехнологическое применение. В производстве (например, при получении этанола) дрожжи подвергаются воздействию ряда стрессорных факторов.

Использование природных протекторных факторов может увеличить выход полезных продуктов за счет снижения ингибирующего действия стрессоров на клетки продуцентов.

Археи. Археи впервые были использованы нами в качестве объектов, выделяющих метаболиты с антистрессовыми свойствами. Представителем домена архей были выбраны экстремальные галофилы *Haloarcula marismortui*, у которых обнаружен самозащитный фактор. Его прединкубация с суспензией клеток продуцента, подвергнутых кислотному стрессу, не только сокращала период их реабилитации, но и оказывала защитное действие на клетки дрожжей, инактивированных нагреванием.

Геном *H. marismortui* полностью расшифрован. В частности, было показано, что этот археон имеет хорошо развитый сенсорный аппарат и отвечает на различные изменения в окружающей среде [37]. Кроме сенсорно-рецепторных белков, в том числе гистидинкиназы, *H. marismortui* содержит большое число сенсорных трансдуцирующих белков и, по крайней мере, 43 индивидуальных белка входят в состав РР-домена, типичного для РР бактериальных двухкомпонентных систем. Спектр сенсоров сигнальных трансдукторов и транскрипционных регуляторов позволяет ощущать и подстраивать физиологию архей к резким изменениям в окружающей среде: высокому или низкому содержанию кислорода, жесткой радиации, возможному высыханию водоемов, снижению концентрации соли [38]. Из клеток *H. marismortui* выделен новый белок р45, который проявляет активность молекулярного шаперона только при низкой концентрации соли [37].

Суспензию клеток подвергали кислотному стрессу и в качестве стрессорного фактора использовали цитратный буфер, рН 2.6. Галоархеи не образуют жирных кислот, и при низких значениях рН их рост подавлен [39]. Использование традиционного метода количественного учета клеток по числу КОЕ в случае архей оказался неприемлемым. Из разведенных суспензий колонии на плотных средах не вырастали. Поэтому влияние протекторного фактора оценивали при сравнении скорости роста вариантов. В контрольном варианте рост культуры происходил без

лаг-фазы, и максимум накопления клеток наблюдали к исходу 48 ч. После этого наступала стационарная фаза, и к 72 ч часть клеток лизировалась. У культуры, выдержанной в течение 1 ч в цитратном буфере, pH 2.6, при последующем выращивании в питательной среде лаг-фаза продолжалась 48 ч с последующим едва заметным выходом культуры в рост (рис. 2). Прединкубация с бесклеточным фильтратом КЖ сокращала время лаг-фазы до 30 ч, после чего культура переходила к экспоненциальному росту, который продолжался и после 72 ч. Под действием кислотного стресса скорость роста культуры в экспоненциальной фазе (μ 0.013 ч⁻¹) снижалась в 3 раза по сравнению с контролем (μ 0.04 ч⁻¹), а прединкубация с КЖ сводила эту разницу до 2 раз (μ 0.03 ч⁻¹).

Таким образом, действие самозащитного фактора проявлялось в том, что период реабилитации у защищенных клеток наступал раньше, чем у стрессированных, но незащищенных, и можно предположить, что в культурах, инкубированных с КЖ перед кислотным стрессом, сохранялось больше жизнеспособных клеток, чем в незащищенных культурах.

Известно, что ряд фундаментальных молекулярных свойств архей сближают их с эукариотами, например, это касается аппарата репликации ДНК, транскрипции, трансляции, гомологии ряда белков теплового шока. У архей и эукариот присутствуют протеасомы, экзосомы, которых нет у бактерий [39]. Недавно у галоархей обнаружена каспазо-подобная активность фермента, участвующего в апоптозе эукариотных клеток [40].

Нами был обнаружен дополнительный факт, указывающий на родство архей и эукариот в отношении молекулярно-биологических свойств. Было показано, что активный фактор КЖ оказывает протекторное действие на клетки *S. cerevisiae*, подвергнутые нагреванию, увеличивая их выживаемость в 3 раза [41]. Инкубирование КЖ *H. marismortui* с протеиназой К не снимало ее протекторного действия, что служит косвенным указанием на небелковую природу протектора. В литературе описано несколько факторов, обладающих защитным действием, в том числе “химические шапероны” АОБ, обнаруженные в КЖ и клетках многих микроорганизмов, включая *S. cerevisiae* [42]. Эти стабильные соединения могут быть кандидатами на роль протектора и в случае архей.

Параллельный учет “живых” и “мертвых” клеток прямыми микроскопическими методами после прокрашивания клеточных суспензий дрожжей флуоресцентным красителем Live/Dead показал, что доля “живых” и “мертвых” клеток в исходной суспензии составила 88 и 12%, а доля после нагревания – 0.9 и 99% соответственно. Прединкубация суспензии дрожжей в течение 15 мин при 32°C с КЖ архей и последующего на-

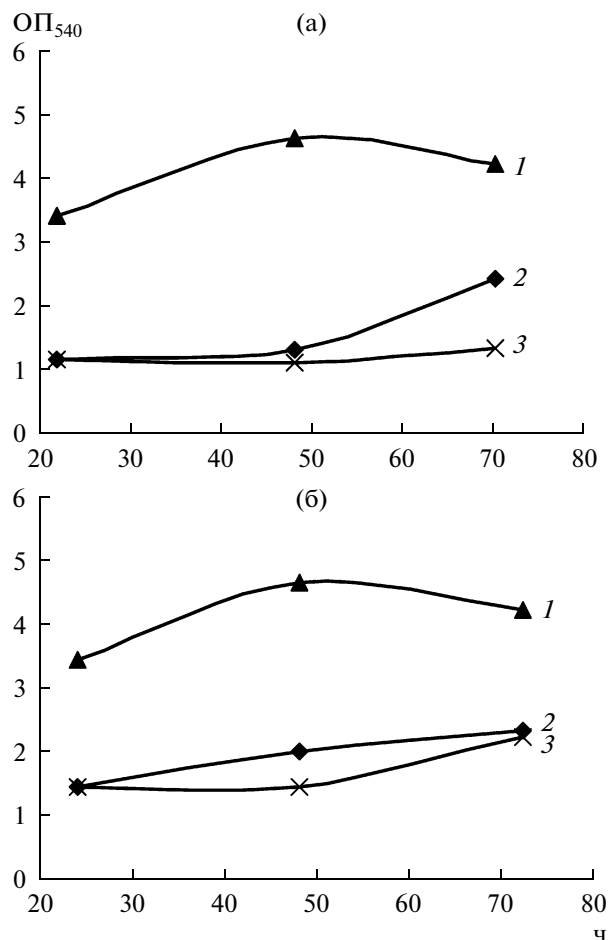


Рис. 2. Влияние pH на скорость роста культуры в контроле и в присутствии защитного фактора *H. marismortui*.

а – pH 2.6; б – pH 5.6. Контроль (1), обработка клеток цитратным буфером после прединкубации с защитным фактором (2) или 25% NaCl (3).

гревания приводила к увеличению доли “живых” клеток до 38% при одновременном снижении доли “мертвых” (55%); 5% составляли клетки с желтой флуоресценцией, состояние которых относят к переходному [41].

Низшие эукариоты, дрожжи *S. cerevisiae*, служат излюбленной моделью для изучения фундаментальных процессов молекулярной биологии. Существует множество примеров функционирования белков человека, экспрессированных в клетки дрожжей. Клеточный цикл дрожжей сходен с клеточными циклами всех соматических клеток, а половой процесс *S. cerevisiae* аналогичен репродукции человека [43]. В синтезе коротких нейропептидов эндорфинов принимает участие фермент, специфически расщепляющий предшественник гормона. Этот фермент был успешно замещен дрожжевым ферментом, расщепляющим предшественник дрожжевого пептидного гормо-

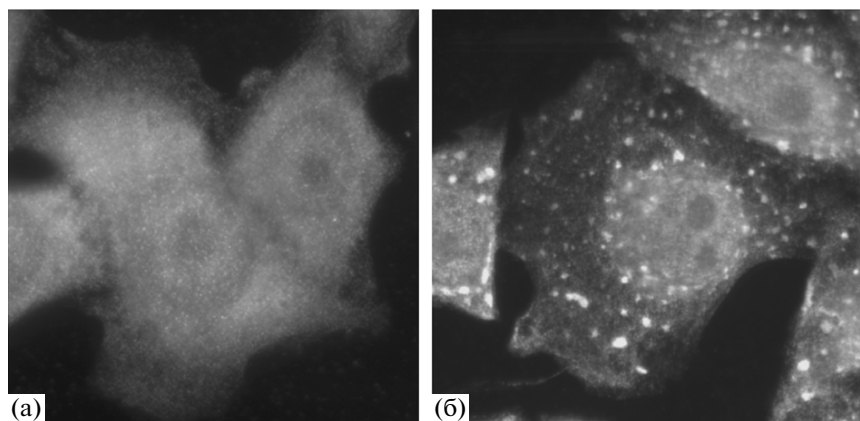


Рис. 3. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к фактору IF3а intactных клеток *HeLa* (а) и клеток *HeLa*, обработанных 150 мкМ арсенитом натрия (б).

на α -фактора [43]. Будут ли клетки млекопитающих узнавать защитные белки дрожжей? В качестве мишени были использованы клетки *HeLa*.

На воздействие стрессорных факторов клетки *HeLa* отвечают образованием стрессовых гранул (СГ, рис. 3), которые выявляли методом непрямой флуоресценции с помощью антител к белкам, специфичным для СГ [44, 45]. Влияние РФ дрожжей на число клеток *HeLa*, содержащих СГ, проводили при возрастающих концентрациях арсенита. Полученные результаты представлены на рис. 4, из которого видно, что РФ дрожжевого происхождения снижал образование СГ только при незначительном стрессовом воздействии (50 мкМ арсенита Na). С увеличенной стрессовой нагрузкой защитные пептидные факторы в испы-

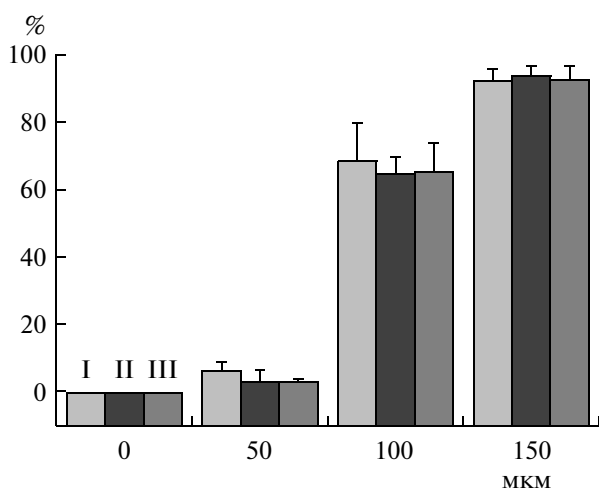


Рис. 4. Число клеток *HeLa* со стрессовыми гранулами (%) при инкубации с арсенитом натрия. I – intactные клетки, II – клетки, прединкубированные с РФ *L. casei*, III – клетки, прединкубированные с РФ дрожжей *S. cerevisiae*, выращенных в синтетической среде.

танных дозах не справлялись. РФ, полученный из дрожжевой культуры, выращенной на бедной среде, снижал образование гранул примерно на 30%. РФ, образованный культурой *S. cerevisiae*, выращенной на богатой среде, снижал образование гранул примерно на 20%. В дальнейшем планируется увеличение дозы защитного фактора и изучение его влияния на клетки высших эукариот, подвергаемых менее сильным стрессовым воздействиям.

В целом, полученные в работе результаты показывают широкие перекрестные стрессовые ответы среди представителей трех доменов жизни от бактерий до млекопитающих. Высокая степень эволюционной консервации стрессовых путей у бактерий, архей, дрожжей и высших эукариот означает, что прокариоты, и особенно низшие эукариоты, могут служить хорошей моделью для понимания стрессовых ответов у высших эукариот.

Впервые показано, что галоархеи, обладающие поразительной устойчивостью к экстремальным условиям за счет сильных репарационных систем и особенностей клеточной организации, также пользуются почти универсальным способом самозащиты и защиты других, отдаленных миллиардами лет от них живых организмов, путем образования внеклеточных метаболитов – зондов окружающей среды. Выделение и идентификация таких зондов – предмет наших дальнейших исследований.

Представленные в настоящей работе факты и наблюдения показывают, что реактивация и защита подвергнутых стрессу культур является распространенным явлением в мире про- и эукариот, а перекрестные реакции между стрессированными и нестрессированными популяциями – скорее норма, чем необычное событие, и ключевую роль в этих жизненно важных процессах выполняют олигопептиды.

Описаны разнообразные регуляторные функции олигопептидов в жизненно важных процес-

сах у высших организмов и в регуляции межвидовых взаимоотношений у прокариот [46].

При изготовлении продуктов, получаемых на основе жизнедеятельности дрожжей или смеси дрожжей и бактерий, возможна инактивация клеток микроорганизмов и повышение устойчивости к стрессорным воздействиям путем использования природных защитных факторов имеет важное практическое значение. Образование антистрессовых экзометаболитов клетками *L. casei* может способствовать увеличению жизнеспособности бактериальной закваски.

В свете имеющихся экспериментальных данных может быть поставлен вопрос о целесообразности включения *L. casei* в закваски для твердых и мягких сыров, созревающих с участием дрожжей, поскольку, как было показано, РФ *L. casei* оказывает перекрестное защитное и реактивирующее действие на стрессированные клетки дрожжей.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 13-04-00518).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aertsem A., Michiels C.W. // Crit. Rev. Microbiol. 2005. V. 31. № 1. P. 69–78.
2. Matin A. // Desk Encyclopedia of Microbiology. 2nd ed. / Ed. M. Schaechter. San Diego, CA: San Diego State Univ. 2009. P. 1075–1090.
3. Rowbury R.J. // Sci. Prog. 2003. V. 86. № 1–2. P. 139–156.
4. Rowbury R.J. // Sci. Prog. 2003. V. 86. № 4. P. 313–332.
5. Marles-Wright J., Grant T., Delumeau O., van Duinen G., Firbank S.J., Lewis P.J., Murray J.W., Newman J.A., Quin M.B., Race P.R., Rohou A., Tichelaar W., van Heel M., Lewis R.J. // Science. 2008. V. 322. № 5898. P. 92–96.
6. Hellingwert K.J., Postma P.W., Tommasen J., Westerhoff H.V. // FEMS Microbiol. Rev. 1995. V. 16. № 4. P. 309–322.
7. Rowbury R.J. // J. Appl. Microbiol. 2001. V. 90. № 4. P. 677–695.
8. Николаев Ю.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 4. С. 387–397.
9. Волошин С.А., Капельяниц А.С. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1555–1564.
10. Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu., Ponomareva G.M., Bryukhanov A.L. // Appl. Biochem. Microbiol. 2003. V. 39. № 2. P. 202–207.
11. Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu., Ponomareva G.M. // Microbiology. 2003. V. 72. № 4. P. 482–487.
12. Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu., Mulyukin A.L., Toropygin I.Yu. // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. V. 45. № 5. P. 489–493.
13. Golod N.A., Loyko N.G., Lobanov P.V., Mironov A.S., Voyeykova T.A., Galchenko V.F., Nikolayev Yu.A., El-Registan G.I. // Microbiology. 2009. V. 78. № 6. P. 731–741.
14. Galperin M.Yu. // Desk Encyclopedia of Microbiology. 2nd ed. / Ed. M. Schaechter. San Diego, CA: San Diego State University, 2009. P. 1005–1021.
15. Estruch F. // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 24. № 4. P. 469–486.
16. El-Sharoud W.M. // Sci. Prog. 2005. V. 88. № 4. P. 203–228.
17. Олескин А.В., Кировская Т.А. // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 440–445.
18. Воробьева Л.И., Турова Т.П., Краева Н.И., Алексеева А.А. // Микробиология. 1983. Т. 52. № 3. С. 465–471.
19. Bergey's Manual of Systematic Microbiology // D.R. Boone, R.W. Gastenholz, eds. Baltimore: Springer, 2000. P. 164.
20. Vorobjeva L.I. Propionibacteria. Dordrecht–Boston–London: Kluwer Acad. Publ., 1999. P. 26–29.
21. Vorobjeva L.I., Fedotova A.V., Khodjaev E.Yu. // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. # 6. P. 567–573.
22. Rowbury R.J. // Novartis Foundation Symp. 1999. V. 221. P. 93–111.
23. Rowbury R.J., Hussain N.H. // Lett. Appl. Microbiol. 1998. V. 27. P. 193–197.
24. Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu., Ponomareva G.M. // Appl. Biochem. Microbiol. 2005. V. 41. № 2. P. 150–153.
25. Margolin W. // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 24. № 4. P. 531–547.
26. Loyko N.G., Khodjaev E.Yu., Vorobjeva L.I., Kozlova A.N., El-Registan G.I. // Microbiology. 2013. V. 82. № 2. P. 139–146.
27. Rowbury R.J. // Sci. Prog. 1998. V. 81. № 3. P. 193–204.
28. Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu., Ponomareva G.M. // Appl. Biochem. Microbiol. 2008. V. 44. № 2. P. 158–161.
29. Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu. // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. № 2. P. 177–183.
30. Vorob'eva L.I., Khodzhaev E.Yu., Vustin M.M. // Appl. Biochem. Microbiol. 2011. V. 47. № 3. P. 264–269.
31. Квасников У.И., Щелокова И.Ф. Дрожжи. Биология, пути использования. Киев: Наукова Думка, 1991. 300 с.
32. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. 219 с.
33. Звягельская Р.А., Перссон Б.Л. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 11. С. 1607–1615.
34. Walker G.M. // Yeasts. Desk Encyclopedia of Microbiology / Ed. M. Schaechter. N.Y.: Acad. Press, 2009. P. 1174–1188.
35. Конаныхина И.А., Шаненко Е.Ф., Лойко Н.Г., Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 5. С. 571–575.
36. Gash A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G., Botstein D., Brown P.O. // Mol. Biol. Cell. 2000. V. 11. P. 4241–4257.
37. Franzetti B., Schoehn G., Ebel C., Gagnon J., Ruigrok R.W.H., Zaccari G. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 32. P. 29906–29914.

38. Baliga S., Bonneau R., Facciotti M.T., Min Pano, Glusman G., Deutsch E.U., Shannon P. // *Genome Research*. 2004. V. 14. P. 2221–2234.
39. Воробьева Л.И. Археи. М.: Академкнига, 2007. С. 103–170, 281–301.
40. Bidle K.A., Haramaty L., Baggett N., Nannen J., Bidle K.D. // *Environm. Microbiol.* 2010. V. 12. № 5. P. 1161–1172.
41. Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Новикова Т.М., Мулюкин А.Л., Чудинова Е.М., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И. // *Микробиология*. 2013. Т. 82. № 6.
42. Батраков С.Г., Эль-Регистан Г.И., Придачина Н.Н., Ненашева В.А., Козлова А.Н., Грязнова М.Н., Золотарева И.Н. // *Микробиология*. 1993. Т. 62. № 4. С. 633–638.
43. Rine J. // *Amer. Zool.* 1989. V. 29. P. 605–615.
44. Shanina N.A., Ivanov P.A., Chudinova E.M., Severin F.F., Nadezhdina E.S. // *Mol. Biol.* 2001. V. 35. № 4. P. 544–552.
45. Ivanov P.A., Nadezhdina E.S. // *Mol. Biol.* 2006. V. 40. № 6. P. 844–850.
46. Замятнин А.А. // *Биохимия*. 2004. Т. 69. № 11. С. 1565–1573.

Antistress Cross-Effects of Extracellular Metabolites of Bacteria, Archaea, and Yeasts: A Review

L. I. Vorob'eva^a, E. Yu. Khodzhaev^a, T. M. Novikova^b, and E. M. Chudinova^c

^a Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

^b Belozerskii Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

^c Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Received December 12, 2012

Abstract—This paper reviews examples of specific and global responses of microorganisms and the characteristics of stress responses involving extracellular signaling metabolites. Information regarding the protective and reactivating effects produced by active exometabolites of representatives of domains of bacteria, archaea, and eukaryotes is summarized, and interdomain cross-responses to stressors are demonstrated.

УДК 612.08

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ АКТИВАТОРОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АТФ-ЗАВИСИМОГО КАЛИЕВОГО КАНАЛА С ПОМОЩЬЮ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО ИНДИКАТОРА AMPLEX RED

© 2013 г. С. В. Мурзаева*, С. П. Белова**, Г. Д. Миронова**

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, 142290

**Пущинский государственный университет, Пущино, 142290

e-mail: svmurzaeva@rambler.ru

Поступила в редакцию 19.12.2012 г.

Проведено тестирование адаптогенов – антигипоксантов, участвующих в активировании митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала (миток_{АТФ}), на окисление флуорогенного индикатора Amplex Red (AR) в пероксидазной системе. Показано, что экстралайф, гипоксен, таурин и синтетический антиоксидант ионол по активности ингибирования флуоресценции располагаются в ряд: экстралайф > гипоксен > ионол > таурин и их действие зависит от концентрации. Расчетные показатели K_i флуоресценции показывают быструю и медленную фазы ингибирования окисления AR экстралайфом и гипоксеном. Быстрая фаза происходит в присутствии микродоз адаптогенов (0.05–3 мкг/мл) и связана с конкуренцией за H₂O₂, что согласуется с нашими предыдущими данными об активировании миток_{АТФ} такими дозами адаптогенов, связанными с расходом H₂O₂. Медленная фаза характерна высоким концентрациям адаптогенов и ионола и связана с конкуренцией за феноксил радикалы резорфуфина, образуемые при окислении AR. Полученные результаты дают основание использовать высокочувствительную модельную пероксидазную систему с AR для предварительной оценки веществ, обладающих свойствами активаторов миток_{АТФ} канала.

DOI: 10.7868/S0555109913040107

Митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал (миток_{АТФ}), имеющий белковую природу, осуществляет перенос ионов калия во внутреннюю мембрану митохондрий [1, 2]. В настоящее время установлено, что активация миток_{АТФ} способствует адаптации животных к гипоксии и защите сердца при ишемических повреждениях миокарда [3–6]. По данным ряда авторов, активация миток_{АТФ} каналов приводит к снижению продукции активных форм кислорода (АФК) в митохондриях, генерация которых существенно возрастает как при ишемии, так и при гипоксии [3, 7]. Предполагается, что открытие миток_{АТФ} каналов, активирует вход калия во внутреннюю мембрану митохондрий, поддерживая общий калиевый цикл, в результате стимулируется работа дыхательной цепи, восстанавливается нарушенный синтез АТФ, снижается накопление АФК и, в итоге, нормализуется гомеостаз клеток [3, 8].

Известен целый ряд фармацевтических препаратов, гормонов, редокс-агентов, которые могут активировать миток_{АТФ} каналы и являются потенциальными кардиопротекторами [9–11]. В нашей лаборатории систематически проводятся исследования по поиску природных и синтетических модуляторов митохондриальных энергозависимых калиевых каналов [6, 12, 13]. Перспективными в

этом направлении являются адаптогены – антигипоксанты, обладающие широким спектром физиологической активности. Ранее нами было показано, что адаптогены: гипоксен (полидигидрооксифенилентиосульфонат натрия, ГП), экстралайф (кверцитинсодержащий препарат, ЭЛФ) и таурин (β-аминоэтансульфоновая кислота) в микродозах активируют миток_{АТФ} [8, 14–16]. Активирование канала малыми концентрациями ЭЛФ и ГП (0.05–3.0 мкг/мл) сопровождается снижением скорости образования H₂O₂ в митохондриях, тогда как их повышенные концентрации (>5 мкг/мл) ингибируют активность миток_{АТФ} и увеличивают производство H₂O₂ [8, 15]. Дозозависимое действие ЭЛФ и ГП, связанное с уменьшением и усилением образования H₂O₂ в митохондриях, указывает на их участие в модулировании энергозависимых калиевых каналов. Одним из возможных механизмов модулирования миток_{АТФ} канала адаптогенами являются их антиоксидантные и прооксидантные свойства, зависящие от концентрации агентов, которые можно выявить в более простых пероксидазных модельных системах. Известно, что окисление веществ в пероксидазных системах осуществляется с участием H₂O₂ и свободных радикалов, указывающих на такие свойства [17–19].

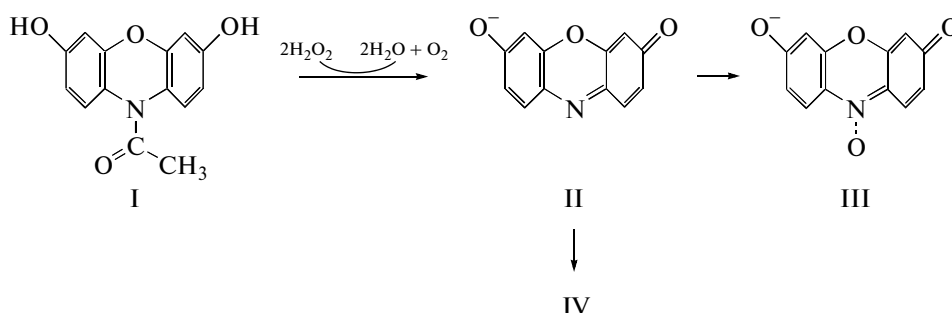


Рис. 1. Химические превращения AR в пероксидазной системе с пероксидом водорода [23].

I – Amplex Red (не флуоресцирует), II – резорурфин (флуоресцирует), III – резазурин (не флуоресцирует), IV – неизвестные продукты, полимеризованные из резорурфина, структура которых не известна.

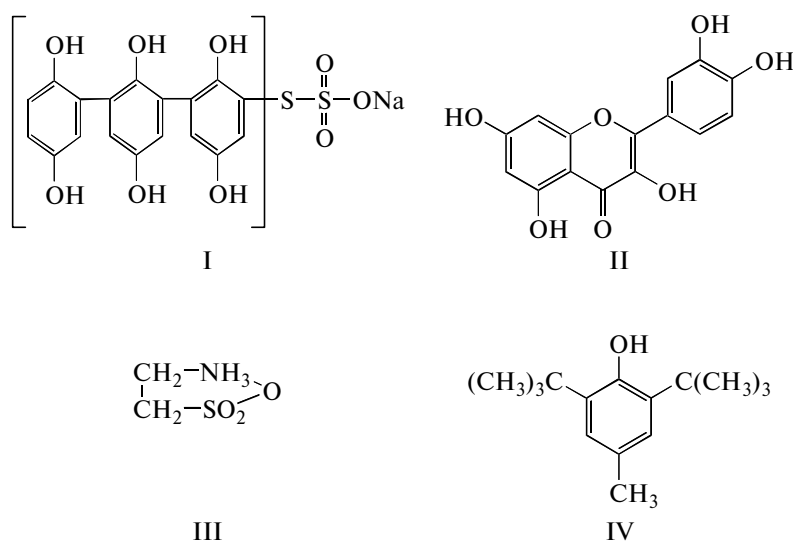


Рис. 2. Химическая структура адаптогенов – антиоксидантов.

I – гипоксен, II – кверцитин, III – таурин, IV – ионол.

В последнее время предпринята попытка применения высокочувствительной пероксидазной системы с флуорогенным индикатором Amplex Red (10-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазин, **AR**) для выявления антиоксидантных свойств биологически активных веществ и лекарственных препаратов [20–21]. **AR** при окислении пероксидазой из корней хрена (**ПХ**, **КФ** 1.11.1.7) с участием H_2O_2 превращается в интенсивно флуоресцирующий продукт резорурфин (рис. 1) [20–23]. Промежуточными продуктами пероксидазного окисления **AR** являются феноксил радикалы резорурфина [20]. Альтернативные субстраты пероксидазы могут ингибировать окисление красителя, конкурентно расходуя H_2O_2 , либо окисляться с участием феноксил радикалов резорурфина [20, 21, 24]. Показано, что реакция с участием свободных радикалов зависит от химической природы и концентрации пероксидазных субстратов и происходит по мере накопления AR^{\bullet} [20].

Исследуемые нами адаптогены **ЭЛФ**, **ГП** и таурин, активирующие мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ канал, различаются по химической структуре (рис. 2). **ГП** и **ЭЛФ** (содержащий кверцитин) способны окисляться в пероксидазной системе с участием H_2O_2 , поскольку несут в себе химическую структуру фенольных соединений и сульфидов, обладающих повышенным сродством к пероксидазе [17–19]. Таурин менее активен в окислительно-восстановительных реакциях, так как обладает устойчивыми ковалентными связями [25], он был менее активен при активировании мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ [16], поэтому следовало ожидать меньшую окислительную активность его в пероксидазной системе, по сравнению с фенольными соединениями. Для уточнения антирадикальных свойств в модельной пероксидазной системе в данной работе мы использовали ионол (2,6-дитрет-бутил-4-метилфенол) – один из основных представителей группы синтетических антиоксидантов, нейтрализующих свободные радикалы [26,

27]. В предварительных опытах, проведенных нами, ионол так же, как ЭЛФ, ГП и таурин, усиливал энергозависимое набухание митохондрий, связанное с активацией митоK_{АТФ} канала, но только при повышенных концентрациях — 50–100 мкг/мл (данные не опубликованы). Сравнение окисления AR в присутствии ионола и адаптогенов с помощью модельной пероксидазной системы предоставляет возможность оценить антиоксидантный механизм их действия, связанный с расходом H₂O₂ и нейтрализацией свободных радикалов, и понять возможный механизм адаптогенного действия при гипоксии в качестве модуляторов митоK_{АТФ} каналов.

Цель работы — проведение сравнительного анализа окисления флуорогенного индикатора Amplex Red в присутствии адаптогенов: экстралайфа, гипоксена, таурина и ионола, нейтрализующего свободные радикалы, для выявления антиоксидантных свойств указанных адаптогенов в пероксидазной модельной системе связанных с расходом пероксида водорода и антирадикальным действием.

МЕТОДИКА

Использовали реактивы: АТФ, НЕРЕС, трис, сахароза, KН₂РO₄, ЭГТА, Amplex Red (“Molecular Probes”, США), ионол (2,6-ди-трет-бутил-4-метил-фенол) производства (“Sigma”, США), KCl — (“Merck”, Германия), пероксидаза хрена — “НИЦ РОСБИО” (Россия), пероксид водорода — “Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга”, гипоксен, хроматографически очищенный, — “Корпорация Олифен” (Россия), Экстралайф (сухой экстракт курильского чая) и таурин — (Россия).

Окисление Amplex Red регистрировали по флуоресценции образующегося резорубина при возбуждении светом 563 нм (щель 2.5 нм) и эмиссии 587 нм (щель 2.5 нм) при термостатировании 36°C и постоянном перемешивании [22, 28]. Измерения проводили на флуориметре “Cary” (США). Кинетику флуоресценции регистрировали в течение 3 мин. Реакционная среда содержала (мМ): KCl — 120, KН₂РO₄ — 5, MgCl₂ — 2, НЕРЕС-КОН — 10, рН 7.3, ЭГТА-1, а также — 1 ед/мл пероксидазы хрена, 5–7 мкМ Amplex Red. Реакцию начинали добавлением 1–1.4 нмоль H₂O₂/2.4 мл. Количество расходуемого H₂O₂ рассчитывали по калибровочной кривой со стандартным раствором пероксида водорода, концентрацию которого определяли по поглощению E₂₄₀ = 43 М⁻¹ см⁻¹ [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работах с флуорогенным индикатором Amplex Red многие авторы отмечают его высокую специфичность в пероксидазной системе к пероксиду водорода, указывая на зависимость от рН, время проведения реакции, соотношения

концентраций красителя, фермента и H₂O₂ [20–23, 28]. В данной работе применены условия реакции, использованные нами в предыдущих исследованиях, при определении скорости образования H₂O₂ в митохондриях [8, 15], в соответствии с оптимальными условиями других авторов [22–23, 28]. На рис. 3 (а, б, в) показаны результаты обработки метода окисления Amplex Red в модельной пероксидазной системе. Видно, что необходимым условием линейной зависимости флуоресценции является повышенное отношение концентрации красителя к пероксиду водорода, не менее чем в 2–10 раз (рис. 3а), но очень высокие концентрации — в 20 и 40 раз (11–22 мкМ AR и 0.5 мкМ H₂O₂) снижали начальную скорость окисления AR (рис. 3б).

Оптимальными условиями пероксидазного окисления Amplex Red, в наших опытах, были концентрации красителя — 5–7 мкМ и пероксидазы — 1 ед. активности на 1 мл, при которых аликвоты пероксида водорода — 1–1.4 нмоль, добавленные 2–3 раза в реакционную среду, показывали стабильный и пропорциональный уровень начальной скорости возрастания флуоресценции в течение 3–4 мин. Последующие добавки H₂O₂ снижали флуоресценцию (рис. 3в), что могло быть связано с окислением самого резорубина в пероксидазной системе свободными радикалами, образуемыми в пероксидазной системе с течением времени [20–23].

Далее, исследовали концентрационные влияния ЭЛФ, ГП, таурина и ионола на окисление AR в пероксидазной модельной системе. Диапазон используемых концентраций адаптогенов применен в соответствии с нашими ранними работами по влиянию этих биологически активных веществ на активность митоK_{АТФ} канала [8, 14–16]. На рис. 4 (а, б) показано снижение флуоресценции резорубина в присутствии ЭЛФ и ГП, указывающее на ингибирование окисления AR. Следует отметить, что заметное ингибирование адаптогенами происходило в области малых концентраций 0.5–3.0 мкг/мл. Наибольшую активность в ингибировании флуоресценции проявлял ЭЛФ. Полностью подавить окисление AR в пероксидазной системе адаптогенами не удавалось. При повышенных концентрациях ЭЛФ окисление красителя оставалось на уровне 25–40, а с ГП — до 50%.

Одной из причин ингибирующего эффекта ЭЛФ и ГП на окисление AR могла быть конкуренция за H₂O₂ при взаимодействии этих веществ с активным пероксидазным комплексом I (ПХ–H₂O₂). Доказательством этому служат опыты с ЭЛФ и ГП, показывающие, что добавление этих агентов в систему после того, как H₂O₂ была израсходована на окисление AR, уровень флуоресценции не изменялся в течение 4–10 мин даже при многократном увеличении их концентраций (рис. 4в, 4г). В то же время новая добавка H₂O₂

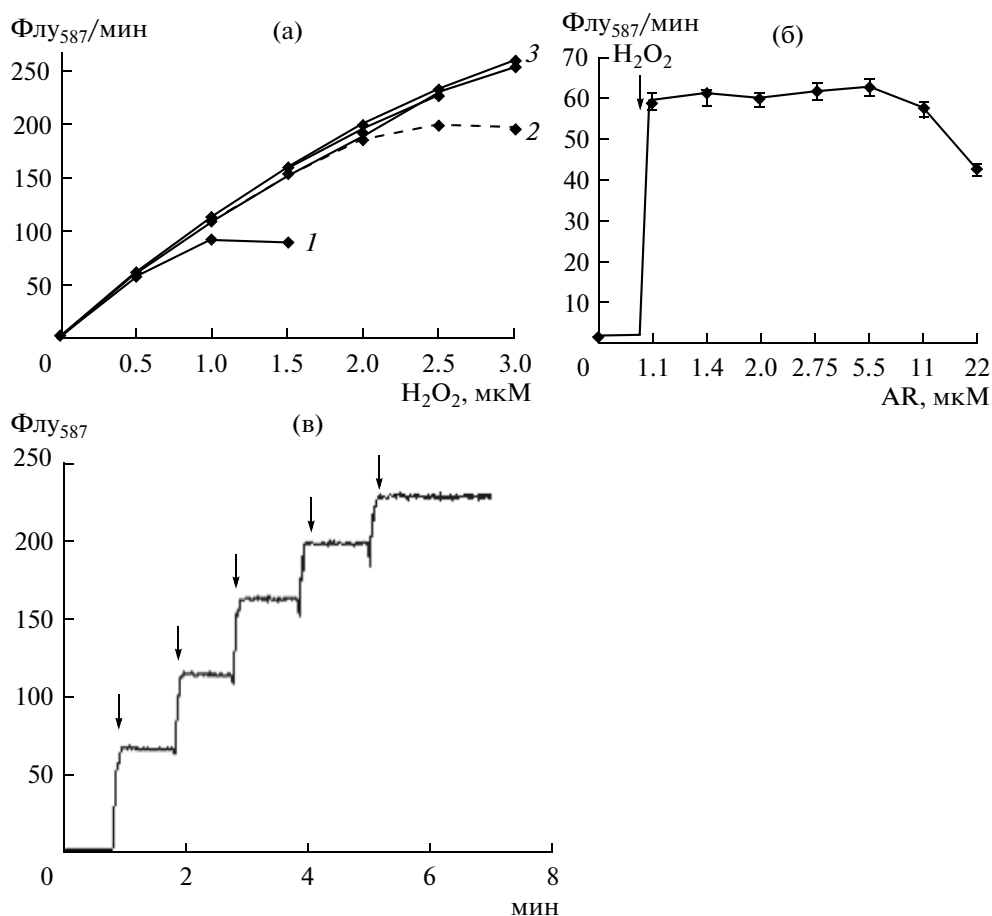


Рис. 3. Окисление AR в пероксидазной системе.

а – зависимость от концентрации H₂O₂ при разных концентрациях AR, мкМ (1 – 1, 2 – 2.75, 3 – 5.5, 7, 11); б – зависимость от концентрации AR при одной и той же добавке аликвоты H₂O₂ (1.4 нмоль/2.4 мл); в – изменение концентрации от H₂O₂ во времени при концентрации AR – 5 мкМ, стрелки – внесение H₂O₂ (1.4 нмоль).

увеличивала флуоресценцию, но на меньший уровень. Это говорит о том, что ГП и ЭЛФ, являясь субстратами ПХ, при своем окислении, с одной стороны, расходуют H₂O₂, выступая в роли конкурентных ингибиторов, а с другой, возможно, взаимодействуют с образующимися радикалами в системе, уменьшая концентрацию окисленного красителя. Оба типа реакций в пероксидазных системах с AR в присутствии разных субстратов пероксидазы убедительно доказаны в работах [20–21]. Методом ЭПР показано, что окисление альтернативных субстратов пероксидазы, добавленных в среду с феноксил радикалами резорфуина, характеризуются определенными периодами индукции, так как требуют накопления окисленного AR (резорфуин) [20].

Для выяснения характера свободнорадикального взаимодействия ЭЛФ и ГП в пероксидазной системе при окислении AR мы провели анализ кинетических параметров их ингибирующего действия. На рис. 5 представлены зависимости обратной начальной скорости флуоресценции от возрастающей концентрации ЭЛФ и ГП в коор-

динатах Диксона [29]. Как видим, линейные зависимости характеризуются изломом, отражающим разнородное связывание адаптогенов со свободными радикалами в пероксидазной системе [18–19, 27]. При концентрациях ЭЛФ – 0.005–1 и 1–8, ГП – 0.005–3 и 3–8 мкг/мл связывание субстратов-ингибиторов, до и после излома, характеризуются разной скоростью реакции ингибирования. При малых концентрациях оба ингибитора взаимодействуют конкурентно с красителем, так как кривые до излома пересекаются на оси ординат в одной точке. Из этого следует, что они взаимодействуют с комплексом ПХ–H₂O₂, что отражает конкуренцию за H₂O₂. С возрастанием концентраций адаптогенов кривые после излома пересекают ось ординат в разных точках. Такой тип кривой соответствует неконкурентному ингибированию [19, 29], связанному с взаимодействием свободных радикалов субстратов пероксидазы, образующихся с течением времени в пероксидазной системе [19–21].

В таблице представлены кинетические параметры ингибирования окисления AR пероксидом водорода с участием ГП и ЭЛФ. Так, для ГП до из-

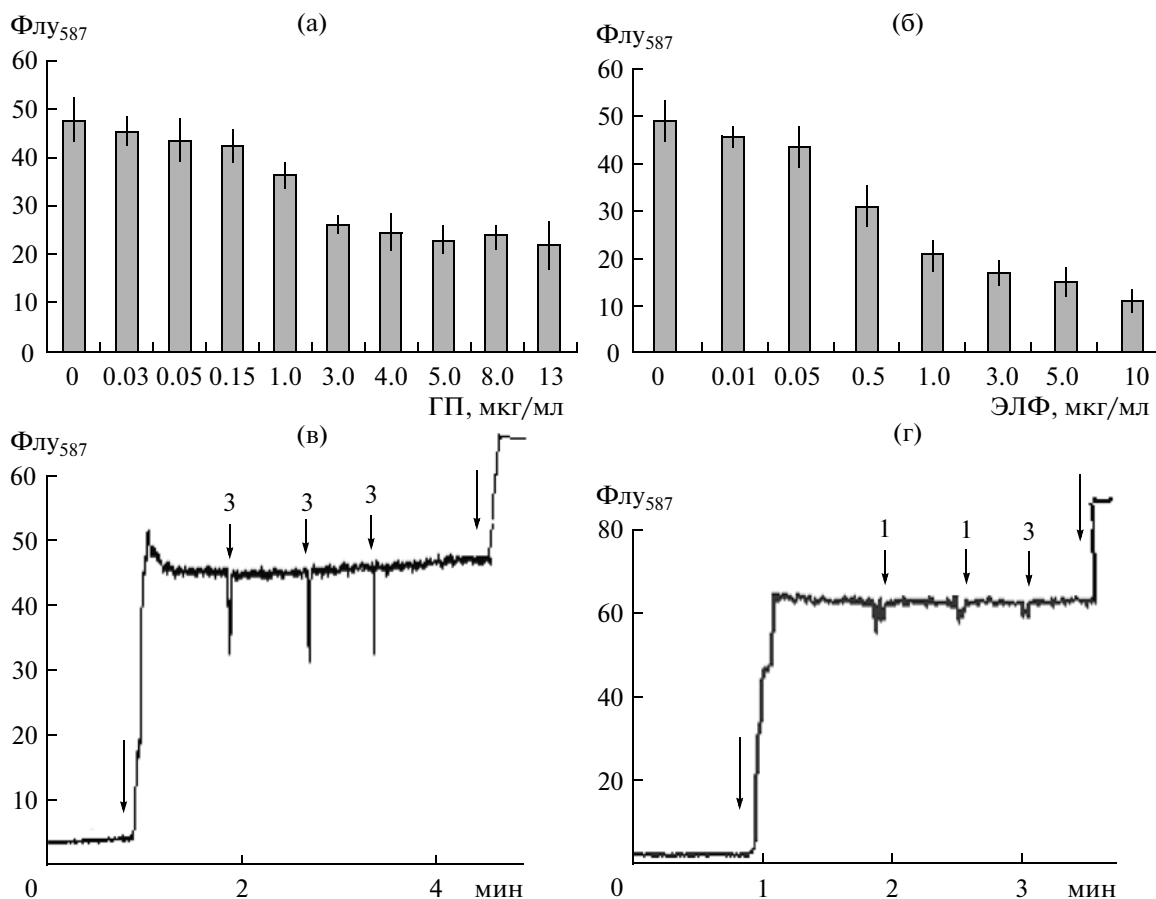


Рис. 4. Концентрационные зависимости влияния ГП (а) и ЭЛФ (б) на флуоресценцию окисленного АР (резорурфин) в пероксидазной системе (реакцию начинали добавлением H_2O_2 , 1,4 нмоль), в – ГП, г – ЭЛФ. Цифры над стрелками показывают концентрацию (мкг) добавленного адаптогена через 1–2 мин после расходования H_2O_2 , стрелки – внесение H_2O_2 . Даны средние значения опытов ($n = 4$) с каждым адаптогеном.

лома и после излома $K_i = 0.31$ и 15.16; для ЭЛФ – 0.099 и 1.39 соответственно. Следовательно, K_i для ГП по двум центрам связывания с радикалами в пероксидазной системе с АР в 3 и 11 раз был выше по сравнению с ЭЛФ. Таким образом, показатели K_i , до и после излома кривых, подтверждают большую эффективность ингибирования окисления АР ЭЛФ, по сравнению с ГП. Важно отметить, что процесс ингибирования окисления АР адаптогенами происходит в два этапа – быстрая и медленная фазы. Первая происходит при малых концентрациях адаптогенов и связана с конкуренцией за активный комплекс $PX-H_2O_2$, то есть за H_2O_2 . Вторая, медленная фаза, происходит при повышенных концентрациях ингибиторов и отражает конкуренцию за феноксил радикалы резорурфина.

Действие таурина и ионола на пероксидазное окисление АР отличалось по сравнению с ЭЛФ и ГП. Таурин, добавленный в инкубационную среду до и после расхода пероксида, практически не влиял на окисление АР (рис. 6а, 6в). Эти результаты свидетельствовали в пользу того, что таурин не окислялся пероксидазным комплексом I, по

крайней мере, не конкурировал с АР за H_2O_2 в течение первых минут реакции. Однако новые последующие добавки H_2O_2 в систему на фоне высоких концентраций таурина приводили к уменьшению возрастания флуоресценции (рис. 6в), так же, как в случае с ЭЛФ и ГП. Эти результаты показывают, что высокие концентрации таурина с течением времени тоже способствуют уменьше-

Количественные параметры ингибирования окисления АР (5 мкМ) пероксидом водорода в пероксидазной системе в присутствии ГП и ЭЛФ

Условие	[InH], мкг/мл	K_i , мкг/мл
ГП до излома	3.4	0.31
после излома	153.0	15.6
ЭЛФ до излома	1.0	0.099
после излома	14.0	1.39

Примечание: K_i , вычислены по уравнению: $[InH] = K_i ([S]/K_M + 1)$, где: [InH] – отрезок, отсекаемый на оси абсцисс и характеризующий эффективную концентрацию ингибитора [19, 29], [S] = [АР], K_M – константа Михаэлиса в отсутствие ингибитора.

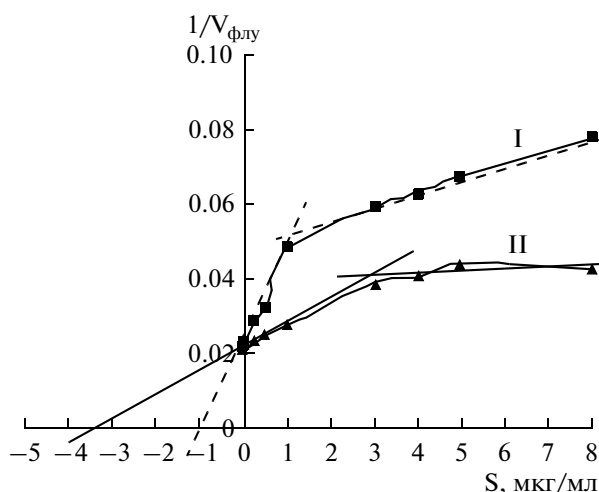


Рис. 5. Зависимость обратной начальной скорости флуоресценции резорурфина (окисление AR) от концентрации ЭЛФ (I) и ГП (II) в пероксидазной системе.

нию образованного резорурфина в пероксидазной системе, но слабее, по сравнению с фенольными структурами.

Известный синтетический антиоксидант — ионол, в отличие от ЭЛФ и ГП, ингибировал флуоресценцию AR особенно при повышенных концентрациях — 10–100 мкг на мл. Этот эффект наблюдали как при одновременном внесении ионола в реакционную среду с AR (когда реакцию начинали H_2O_2), так и при добавлении его в пероксидазную систему после расхода пероксида (рис. 6б, 6г). Новое добавление H_2O_2 в систему на фоне высоких концентраций ионола усиливало флуоресценцию на меньший уровень, чем в отсутствие ионола, что сходно по действию с повышенными концентрациями ЭЛФ, ГП и таурина.

Сравнение действия ионола и таурина с ЭЛФ и ГП указывает на разный механизм их окисления в пероксидазной системе, что отражается на скорости реакции ингибирования окисления AR. Как отмечалось выше, адаптогены ЭЛФ и ГП интенсивно используют H_2O_2 для своего окисления, конкурентно ингибируя окисление AR при малых концентрациях (0.05–3 мкг/мл). Этот путь осуществляется запуском системы пероксидом водорода в начальные минуты, затем происходит медленная фаза окисления образуемыми радикалами резорурфина при повышенных концентрациях адаптогенов. Расчетные показатели констант ингибирования подтверждают такой двухступенчатый путь (быстрая и медленная фазы) ингибирования окисления AR экстралайфом и гипоксеном, обладающими повышенным сродством к пероксидазе.

Что касается таурина и ионола, то для них, видимо, характерна медленная фаза окисления, происходящая при повышенных концентрациях агентов, связанная со свободными радика-

лами, которые появляются в системе с некоторым лаг-периодом [15, 19–20]. Основанием этому служит меньшая реакционная способность этих веществ по сравнению с активными фенольными соединениями, обладающими высоким окислительно-восстановительным потенциалом [30, 31]. Так, антиоксидант ионол является пространственнозатрудненным фенолом, в его структуре имеется лишь одна активная гидроксильная группа, остальные замещены метильными группировками (см. рис. 2). Ионол взаимодействует преимущественно со свободными радикалами, прерывая цепные радикальные реакции [26, 27].

Таурин также обладает устойчивыми ковалентными связями, мешающими ему проявлять окислительно-восстановительные свойства [30]. Этот природный метаболит приобретает реакционную способность только при присоединении к аминогруппе других химически активных веществ и группировок, которые могут быстро реагировать с тиольными и тиоэфирными группами атомов, а также с дисульфидными мостиками в молекулярных мишенях [25, 32]. Возможно, повышение реакционной способности молекул таурина происходит при взаимодействии с митохондриями, более сложными системами, чем пероксидазные, поэтому в митохондриях мы наблюдали незначительные эффекты активирования мито K_{ATP} канала микромолярными концентрациями таурина [16].

Исходя из полученных результатов, отметим, что пероксидазная система с высокочувствительным флуорогенным индикатором AR неоднозначно реагирует на добавление ЭЛФ, ГП, таурина и ионола. По активности ингибирования окисления AR в пероксидазной системе исследуемыми агентами их можно расположить в ряд: ЭЛФ > ГП > ионол > таурин и их действие в сильной степени зависит от концентрации. Ориентируясь на предыдущие наши работы, можно заметить прямую корреляцию действия малых концентраций (0.05–3 мкг/мл) ЭЛФ и ГП на активность мито K_{ATP} канала [8, 15–16] и ингибирование окисления AR в пероксидазной системе, связанного с конкуренцией за H_2O_2 с преимуществом ЭЛФ > ГП. Таурин и ионол более инертны при окислении красителя, их действие связано с высокими концентрациями (15–50–100 мкг/мл) и проявляется медленнее по времени, что указывает на взаимодействие с феноксил радикалами резорурфина, образуемыми в пероксидазной системе.

Таким образом, по скорости ингибирования окисления AR в пероксидазной системе при определенных концентрациях испытуемых агентов можно судить об их антиоксидантных свойствах как по пероксидазному типу — быстрая фаза, так и по свободнорадикальному — медленная фаза. Быстрая фаза связана с расходом H_2O_2 . Конкурентное ингибирование окисления красителя при малых концентрациях исследуемых

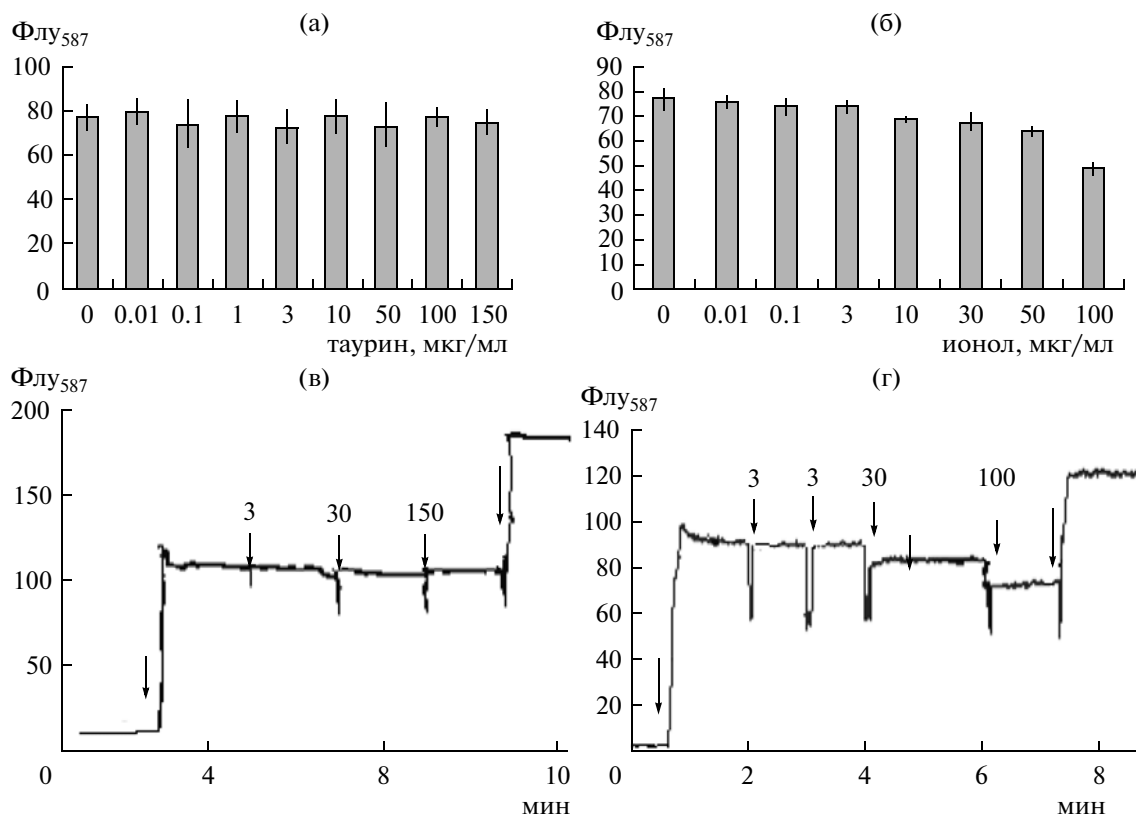


Рис. 6. Концентрационные зависимости влияния таурина (а) и инозола (б) на флуоресценцию окисленного АР (резорурфина) в пероксидазной системе (реакцию начинали добавлением H_2O_2 , 1,4 нмоль).

(в) — таурин, (г) — инозол. Цифры над стрелками показывают концентрацию (мкг) добавленного адаптогена через 1–2 мин после расходования H_2O_2 , стрелки — внесение H_2O_2 . Даны средние значения опытов ($n = 4$) с каждым адаптогеном.

агентов за H_2O_2 дает основание предположить активирование этими веществами мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ канала, принимающего участие в регулировании образования АФК в митохондриях.

Использование активаторов мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ канала является принципиально новым подходом к предупреждению и лечению инфаркта миокарда. Превентивное и лечебное антиишемическое действие исследуемых препаратов — активаторов мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$, связанное со снижением скорости образования АФК, накопление которых является патогенным фактором при многих сердечных заболеваниях, весьма актуально. Роль их в коррекции патологии трудно переоценить, поскольку сердечные заболевания являются одной из основных причин смертности в технически развитых странах. Однако применение больших доз лечебных препаратов часто приводит к побочным отрицательным эффектам. На примере исследуемых нами адаптогенов, ингибирующих окисление АР при повышенных дозах (15–100 мкг/мл) в модельной пероксидазной системе, можно видеть, что их действие связано с свободнорадикальным типом окисления. Несмотря на положительное антиоксидантное действие адаптогенов при таких концентрациях, они, безусловно, проигрывают с точки зрения применения в качестве

активаторов мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ канала, поскольку реакция их замедлена и опасна проявлением прооксидантного действия.

Полученные в работе данные позволяют сделать вывод о практическом использовании модельной пероксидазной системы с АР для предварительной оценки концентрационного действия веществ — адаптогенов, обладающих свойствами активаторов мито $\text{K}_{\text{АТФ}}$ канала. Метод высокочувствительный, прост в выполнении, позволяет провести тестирование большого числа изучаемых биологически активных веществ, минуя трудоемкую процедуру выделения митохондрий.

Работа выполнена при финансовой поддержке АВЦП “Развитие научного потенциала высшей школы (2012–2014)” № 4.3010.2011.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Inoue N., Nagase H., Kishi K., Higuti T. // Nature. 1991. V. 352. № 6332. P. 244–247.
2. Paucek P., Mironova G.D., Mandi F., Beavis A., Woldegregoris G. // J. Biochem. 1992. V. 267. № 36. P. 26062–26069.
3. Garlid K.D., Dos Santos P., Xie Z., Paucek P. // Biochem. Biophys. Acta. 2003. V. 1606. № 1–3. P. 1–21.

4. Vanden Hoek T.L., Becker L.B., Shao Z., Li C., Schumacker P.T. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 29. P. 18092–18098.
5. Grover G.J., Garlid K.D. // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2000. V. 32. № 4. P. 677–695.
6. Krylova I.B., Kachaeva E.V., Rodionova O.M., Negoda A.E., Evdokimova N.R., Balina M.I., Sapronov N.S., Mironova G.D. // *Exp. Gerontology.* 2006. V. 41. № 7. P. 697–703.
7. Ferranti R., da Silva M.M., Kowaltowski A.J. // *FEBS Lett.* 2003. V. 536. № 1–3. P. 51–55.
8. Mironova G.D., Shigaeva M.I., Gritsenko E.N., Murzaeva S.V., Gorbacheva O.S., Germanova E.L., Lukyanova L.D. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2010. V. 42. № 6. P. 492–503.
9. Liu Y., Sato T., O'Rourke B., Marban E. // *Circulation.* 1998. V. 97. № 24. P. 2463–2469.
10. Sato T., Sasaki N., O'Rourke B., Marban E. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000. V. 35. № 2. P. 514–518.
11. Tsai Ch., Su Sh., Chou T., Lee T. // *J. Pharmacol. and Experim. Therap.* 2002. V. 301. № 1. P. 234–440.
12. Grigoriev S.M., Skarga Y.Y., Mironova G.D., Marinov B.S. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1999. V. 1410. № 1. P. 91–96.
13. Mironova G.D., Negoda A.E., Marinov B.S., Pauczek P., Costa A.D.T., Grigoriev S.M., Skarga Y.Y., Garlid K.D. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 31. P. 32562–32568.
14. Миронова Г.Д., Шигаева М.И., Белослудцева Н.В., Гриценко Е.Н., Белослудцев К.Н., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. // *Бюл. экспер. биол.* 2008. Т. 146. № 8. С. 195–199.
15. Мурзаева С.В., Абрамова М.Б., Попова И.И., Гриценко Е.Н., Миронова Г.Д., Лежнев Э.И. // *Биофизика.* 2010. Т. 55. № 5. С. 814–822.
16. Мурзаева С.В., Белослудцева Н.В., Гавровская Л., Миронова Г.Д. // *Биофизика.* 2008. Т. 53. № 6. С. 962–966.
17. Метелица Д.И., Карасева Е.И. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2007. Т. 43. № 5. С. 537–564.
18. Еремин А.Н., Литвинчук А.В., Метелица Д.И. // *Биохимия.* 1996. Т. 61. № 4. С. 664–679.
19. Метелица Д.И., Еремин А.Н., Свиридов Д.О., Камышников В.С. // *Биохимия.* 2001. Т. 66. № 5. С. 628–639.
20. Reszka K.J., Wagner B.A., Burns C.B., Britigan B.E. // *Anal. Biochem.* 2005. V. 342. № 2. P. 327–337.
21. Rodrigues J.V., Gomes C.M. // *Free Radical Biology and Medicine.* 2010. V. 49. № 1. P. 61–66.
22. Zhou M., Diwu Z., Panchuk-Voloshina N., Haugland R. // *Anal. Biochem.* 1997. V. 253. № 2. P. 162–168.
23. Towne V., Will M., Oswald B., Zhao Q. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 334. № 2. P. 290–296.
24. Gorris H.H., Walt D.R. // *J. Amer. Chem. Soc.* 2009. V. 131. № 17. P. 6277–6282.
25. Рашупкин Д.И., Мурина М.А., Кравченко Н.Н., Сергиенко В.И. // *Биофизика.* 2007. Т. 52. № 3. С. 527–533.
26. Бурлакова Е.Б., Хохлов А.П. // *Биологические мембраны.* 1985. Т. 2. № 6. С. 557–565.
27. Миненкова Е.А., Барсель В.А., Пичугин В.В., Гагарина А.Б., Евтеева Н.М., Парамонова М.Ю., Майкова Г.Г. // *Изв. РАН. Сер. биол.* 1996. № 2. С. 147–152.
28. Votyakova T.V., Reynolds I.J. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2004. V. 431. № 1. P. 138–144.
29. Келети Т. *Основы ферментативной кинетики.* М.: Мир, 1990. С. 183–188.
30. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Лыско А.И. // *Вестник РАН.* 2007. № 2. С. 55–62.
31. Смирнов В.С., Кузьмич М.К. // *Гипоксен.* СПб. М.: ФАРМиндекс, 2001. 104 с.
32. Рашупкин Д.И., Мурина М.А. // *Биофизика.* 2011. Т. 56. № 5. С. 945–954.

Determination of the Antioxidant Properties of Activators of Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channels with the Amplex Red Fluorescent Indicator

S. V. Murzaeva^a, S. P. Belova^b, and G. D. Mironova^b

^a *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

^b *Pushchino State University, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

e-mail: svmurzaeva@rambler.ru

Received December 19, 2012

Abstract—The effect of adaptogens—antihypoxants that participate in the activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels (mitoK_{ATP}) at the oxidation of the Amplex Red (AR) fluorescent indicator in a peroxidase system was tested. It was shown that Extralife, Hypoxen, taurine, and synthetic antioxidant ionol can be arranged in the following row, according to the fluorescence inhibition activity: Extralife > Hypoxen > ionol > taurine; their effect was shown to be concentration-dependent. The calculated *K_i* value of fluorescence indicators demonstrate fast and slow phases of inhibition of the AR oxidation by Extralife and Hypoxen. The fast phase occurs in the presence of microdoses (0.05–3 μg/mL) of adaptogens and is related to the competition for H₂O₂, which is in agreement with our previous data on the mitoK_{ATP} activation by doses of adaptogens related to the H₂O₂ consumption. The slow phase is characteristic of high adaptogen and ionol concentrations and is related to the competition for phenoxyl radicals of resorufin formed during AR oxidation. The obtained results allow one to suggest the application of a highly sensitive model peroxidase system with AR for the preliminary testing of compounds activating mitoK_{ATP} channels.

UDC 577.156

DIFFERENTIAL FUSION EXPRESSION AND PURIFICATION OF A CYSTATIN IN TWO DIFFERENT BACTERIAL STRAINS

© 2013 A. Gholizadeh

Research Institute for Fundamental Sciences (RIFS), University of Tabriz, Tabriz, Iran

e-mail: aghz_bioch@yahoo.co.in

Received October 1, 2012

To date, the identification of the novel multifunctional properties of cysteine proteinase inhibitors “known as cystatins” is the great of interests for molecular biologists. The efficient production, purification and correctly folded form of these proteins are the most important requirements for their any basic research. To the best of our knowledge, maltose-binding protein (MBP) fusion tags are being used to overcome the impediment to their heterologous recombinant expression in *Escherichia coli* as insoluble and bio-inactive inclusion bodies. In the present work, to evaluate the expression efficiency of a cystatin molecule in *E. coli* cells by using MBP tags, the expression of *Celosia* cystatin was studied in two different strains of this bacterium. The quantitative analysis results based on the one-step purification yield of the fused product showed the excellency of the *E. coli* TB1 strain in comparison to *E. coli* DH5 α for the high-level production of active product.

DOI: 10.7868/S0555109913040053

Cysteine proteinase inhibitors (termed as cystatins) belong to a proteinaceous group of inhibitors that reversibly inhibit the enzymatic activity of cysteine proteinases [1]. They have been originally identified in mammals, later on a number of putative cystatin sequences have been characterized from different plants [2–10]. The plant cystatins are generally named as “phytocystatins”. Like all members of the cystatin superfamily, phytocystatins contain two conserved regions that interact with cysteine proteinase molecular structures. They include “G” residue at the N-terminus, “QxVxG” and “W” at the C-terminus. Moreover, phytocystatins differ from non-plant types due to the presence of a plant-specific sequence, [LVI]-[AGT]-[RKE]-[FY]-[AS]-[VI]-x-[EDQV]-[HYFQ]-N located in an N-terminal α -helix region [11, 12].

Various physiological and biological roles have been attributed for phytocystatins [13–18]. However, to increase the knowledge regarding the molecular structures and functions of these proteins, the efficient production and purification of their correctly folded three-dimensional structures are needed. These requirements are mostly achieved by the heterologous protein expression as recombinant or fusion products in bacterial cells. Among bacterial expression systems, *Escherichia coli* is the most popular one used for the production of foreign proteins in the form of recombinant products [19]. But, a major impediment to the production of recombinant proteins “included cystatins” in *E. coli* is their aggregation and formation of insoluble and biologically inactive inclusion bodies. Although, they can be converted into native forms, but this is a time consuming, labor-intensive, and so is a costly manner [20]. The best approach is the use of fu-

sion tags that considerably enhance the solubility of the expressed products in the recombinant cells. Among the fusion tags, maltose-binding protein (MBP) tags have been generally considered to be the best fusion partner that not only provide the high level of protein expression, but also efficiently enhance the solubility, folding and stability of the fused proteins. The other attention to MBP tags is given to its rapid expression procedure and its easy and efficient one-step purification method that is done by maltose-afinity chromatography [20–22].

To date, very limited information is available concerning the heterologous expression of phytocystatins either in the forms of recombinant or fusion partners. The use of MBP tags for the expression of plant cystatins was originally and frequently reported from our laboratory [8, 23–25]. These tags were found to minimally affect the fused cystatins inhibitory activity against papain *in vitro*. Among the studied cystatins by our research team, *Celosia cristata* cystatin is the most characterized one that has been shown to be involved in the inhibition of TMV (tobacco mosaic virus)-induced programmed cell death in the host plant [8].

According to the protocol of MBP-based expression systems (New England Biolabs, UK), TB1 strain of *E. coli* is being used for the transformation process [26, 27]. In the present work, as a part of our expression studies with regard to *Celosia* cystatin, we were interested to examine the expression as well as the bioactivity of the same cystatin molecule in two different types of *E. coli* strains (including DH5 α and TB1) at the same experimental conditions. The experiments were conducted to identify the *in vitro* activity of the MBP-fused product, the continuity of its expression

process in recombinant cells and the of growth patterns of the test bacterial cultures.

MATERIALS AND METHODS

Materials. DH5 α strain of *E. coli* was obtained from Genetic Engineering laboratory, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Tabriz (Iran). *E. coli* strain TB1 and pMALc2X vector for bacterial transformation, recombinant vector construction, and protein expression studies were supplied in the protein fusion and purification system kit (New England Biolabs, UK). RNXTM (-plus) kit (CinnaGen, Iran) was used for total RNA isolation. mRNA purification was done by mini prep mRNA purification kit (Qiagen, USA). RT-PCR reaction was carried out by AcessQuickTM RT-PCR System (Promega, USA). Plasmid vector pGEM-T easy used for polymerase chain reaction (PCR) product cloning was from our laboratory stock. DNA Extraction Kit (Fermentas, USA) was used for the purification of the restricted fragment from the agarose gel. Restriction enzymes *EcoRI* and *BamHI* used in the cloning procedure (CinnaGen, Iran). All the other chemicals used in this research were of molecular biology grade.

Cloning of cystatin cDNA. In order to clone cystatin cDNA from the leaf tissues of the *Celosia* plant, reverse transcriptase (RT)-PCR method was used (according to the protocol of RNXTM kit). For total RNA isolation, about 0.2 g leaf material was fine powdered using liquid N₂, and 2.0 mL of RNXTM reagent was added to homogenize the powder at room temperature (RT). Next, 200 μ L of chloroform was added to the mixture, mixed for 15 s, incubated on ice for 5 min, and centrifuged at 13000 g for 15 min. The upper phase was transferred to another tube, and RNA was precipitated using an equal volume of isopropanol. The pellet was washed by 1 mL of 75% ethanol, dried at RT, and dissolved in 30 μ L of RNase-free water. Poly (A⁺) RNA was purified from the total RNA by using oligo dT-column according to the manufacturer's protocol.

For RT-PCR reaction, the specific primers were designed based on the already reported cystatin cDNA from *Celosia* plant (accession number: AJ535712) using Primer3 software at http://www.primer3plus.com/web_0.4.0/input.htm. The nucleotide sequences of the synthetic primers were as follows:

right primer:

5'TTCCGAATTCGCAAAAATGAGTTCC3';

left primer:

5'TTCAGGGATCCTTAGTTAGCAACGGC3'

The RT-PCR reaction was performed using one-step AcessQuickTM RT-PCR System (Promega, USA). Approximately 0.5 μ g of each mRNA sample was mixed with 25 μ L of master mix (2 \times) and 1 of μ L primer set. The mixture was adjusted with nuclease-free water to a final volume of 50 μ L. The reaction mixture was incubated at 45°C for 45 min and subject-

ed to PCR cycling. Amplification was performed in Techneh type thermal cycler (Germany), with 25 cycles of 1 min denaturation at 93°C, 1.5 min annealing at 58°C, 2 min extension at 72°C, ending with 10 min of final extension at 72°C. The amplified products were then extracted from the agarose gel, and then cloned by using pGEM®-T Easy vector system [28]. The recombinant vector separately transformed to TB1 and DH5 α strains of *E. coli*. Transformants were then spread on LB plates containing 100 μ g/mL ampicillin, 0.3 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and 40 μ g/mL 5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) and incubated at 37°C.

A single recombinant colony was selected from the plate and processed for plasmid extraction using the alkaline lysis method [29]. The isolated plasmid was digested with *EcoRI* restriction enzyme and separated on 0.8% agarose gel. The cloned fragments were sequenced at the Microsynth DNA Sequencing Center (Switzerland).

The nucleotide sequence of the isolated cDNA was analyzed by using BLAST server at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>.

Expression of cystatin as fused product. The RT-PCR amplification product after agarose gel purification step was digested with *EcoRI* and *BamHI* restriction enzymes, run on 1% agarose gel, extracted and purified from the gel, and ligated into the pMALc2X expression vector, which had already been linearized at the *EcoRI* and *BamHI* sites within the multiple cloning region (Fig 1). The ligation mixture was separately transferred to competent *E. coli* TB1 and DH5 α cells. For the preparation of competent cells, bacterial cells were grown in Luria Bertani (LB) media. When the OD₆₀₀ reached 0.4, the cells were kept in ice for 15 min, centrifuged at 3500 g for 10 min at 4°C, and washed with 10 mL of 100 mM CaCl₂. Subsequently, they were centrifuged at 5000 g for 10 min, resuspended in 2 mL of chilled 50 mM CaCl₂, and kept in ice for 12 h. For the transformation of bacterial cells, the all ligation reaction product was added to 25 μ L of competent cells, incubated on ice for 5 min, heated to 42°C for 2 min, and incubated at 37°C for 20 min after addition of 0.1 mL LB medium. The transformed cells were plated on LB medium (supplemented with Amp and X-gal) at 37°C, and a recombinant clone was selected for gene expression studies.

Extraction and purification of the expressed fusion protein. In order to extract the fusion protein, transformed cells were grown in 500 mL of rich broth/glucose/ampicillin medium (g/L): tryptone – 10, yeast extract – 5, NaCl – 5, glucose – 2 and sterile ampicillin in concentration 100 μ g/mL. For the induction of fused protein expression, IPTG was added to a final concentration of 0.3 mM, and the mixture was incubated for 8 h at 37°C. The cells were harvested by centrifugation at 4000 g for 10 min, and the pellet was dissolved in 25 mL of protein extraction buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM sodium azide, and 10 mM β -mercaptoethanol.

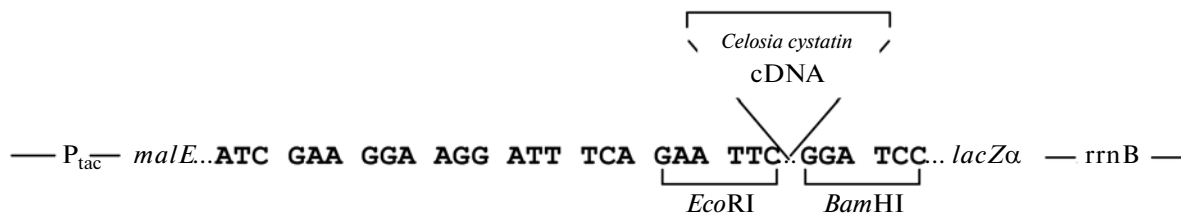


Fig. 1. The clone map of cystatin cDNA on pMALc2X expression vector. The coding region of the isolated cDNA was restricted with *EcoRI* and *BamHI* restriction enzymes and inserted, with its correct reading frame, downstream of *malE* gene of *E. coli* that resulted in a fusion gene.

The cells were frozen in the same buffer at -20°C overnight and then sonicated with 3 pulses of 15 s. The sample was centrifuged at 10000 g at 4°C for 20 min, and the supernatant was used as crude extract.

The fusion protein was purified from the crude extract by affinity column chromatography. A column packed with amylase resin specific for the maltose-binding protein (MBP), which was a part of fused protein, was used. The fusion protein was eluted out from the column by using the column buffer (extraction buffer containing 10 mM maltose). The eluted product was analyzed for its homogeneity by SDS-PAGE using 10% polyacrylamide gel [30].

In vitro inhibitory test of fused protein. The purified fusion proteins from two different *E. coli* strains were separately tested for their cysteine proteinase inhibitory activity using papain and β -N-benzoyl-DL-arginine β -naphthylamide hydrochloride (BANA) as substrates [31]. For each test, a solution containing 0.1 mL of assay buffer (0.5 M sodium phosphate and 10 mM EDTA, pH 6.0), 0.1 mL of 50 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mL of papain solution (25 μg) and 0.2 mL of test solution containing 10 μL purified protein were incubated at 37°C for 10 min. The reaction was started by the addition of 0.2 mL of 1 mM BANA, incubated at 37°C for 20 min and then stopped with the addition of 1 mL of 2% (v/v) HCl/ethanol and 1 mL of 0.06% p-dimethylaminocinnamaldehyde/ethanol. The absorbance of the reaction mixture was measured at 540 nm.

Assessment of recombinant bacterial growth. To determine the effects of the expressed fused products on the growth of the recombinant bacteria, the growth of bacteria was assessed by measuring the OD_{600} of the cultures for 1 h time intervals. Bacterial growth curves were plotted for each test culture and compared to each other.

RESULTS AND DISCUSSION

Priming of cystatin transcript. *Celosia* cystatin transcript had been previously isolated from the leaf tissues by using a degenerate primer set and through the screening of the leaf cDNA library constructed on viral vector system λ TriPLEX2 [8]. In the present study, this cDNA was amplified from the leaf mRNA population by AccessQuickTM RT-PCR System using a specific primer pair designed based on the previously reported sequence.

Separation of the RT-PCR end product on the agarose gel and the analysis of the nucleotide sequence of the amplified cDNA revealed that the size and the sequence of the primed cDNA consisted of an open reading frame that was completely identical to the previously probed cystatin (Fig. 2; agarose gel photograph and the sequence alignment result not presented). The nucleotide and the correct cystatin open reading frame between *EcoRI* and *BamHI* restriction sites are shown on the figure.

Differential expression and purification of cystatin.

For the expression of *Celosia* cystatin cDNA, its coding region (as presented in Fig. 2) was inserted between *EcoRI* and *BamHI* restriction sites of the expression vector pMALc2X, downstream of the maltose-binding protein sequence to yield fused *mbp*-celostatin. The recombinant vector was separately transformed into two different *E. coli* strains TB1 and DH5 α using the same experimental materials and methods. The expression of the fused product was induced by IPTG and analyzed in the soluble fraction of the both test cultures. SDS-

```

_____ ttgcgcaaaa
_____ N A K
atgagttcctcctaacaatcttgctggtggttgggttcccagttgat
M S S S N N L A G G W F P V D
cccaatagtccaaaaatccaaaagcttgctaggtgggctggtgac
P N S P K I Q K L A R W A V D
gaggagaacaaaaacctagtgcttataagttggagtacaaagga
E E N K K P S A Y K L E Y K G
actttcaagctgaagaacaaatagttgaagctaggaattcccgt
T F K A E E Q I V E A R N S R
attagtcctgaggcagttcgagttccttgcgagcaagtaataaaa
I S L E A V R V P F A A S N K
gaatggcacaagtatcaggcaatagtttatgaggattgaacaac
E W H K Y Q A I V Y E D L N N
aatttagagttgaaggagttcaagccttggttgcaagccaatgat
N L E L K E F K P L L Q A N D
gatgaatgtattgcccgttgctaactaaggatcc _____
D E C I A V A N *

```

Fig. 2. RT-PCR end product analysis of the primed cDNA. RT-PCR reaction was performed using one-step AccessQuickTM RT-PCR System using the specific primers designed based on the already reported sequence from *Celosia*. To confirm the amplification, the fragment was cloned and sequenced. The sequence result between *EcoRI* and *BamHI* sites and the position of the primers are shown.

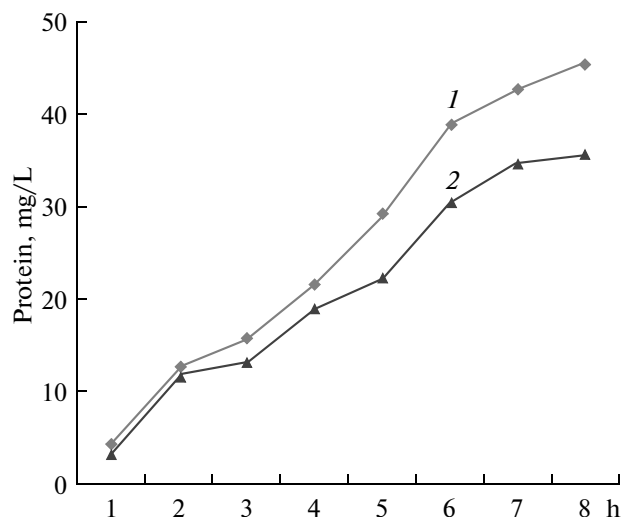


Fig. 3. Analysis of the fused protein expression. By using the same experimental procedures, the isolated cDNA was separately expressed in *E. coli* strains TB1 (1) and DH5 α (2) in the presence of IPTG. The protein expression data represent the means of three replicates.

PAGE analysis of the total soluble proteins confirmed the presence of the observable and detectable expressed product in both extracts (gel photograph not presented).

Purification of the fused cystatin by using single step MBP-affinity chromatography revealed the purification yields of about 46 and 37 mg/L of the *E. coli* TB1 and DH5 α cell cultures, respectively (Fig. 3). The difference between the expression levels of fused cystatin was estimated to be about 10 units between the two cell types, 8 h after incubation. To evaluate the expression process during the induction period in each test culture, a time course experiment was performed. The results showed that the expression of the fused cystatin was linearly correlated with the time of the induction. This experiment result confirmed that the expression of the fused product was continuously induced in each of the tested strains. A continuous and linear correlation was observed between the expression process and the time of the induction in both strains of *E. coli*. Data analysis also revealed that the distance between the two trend lines had an increasing pattern, reached to the maximum after 8hrs incubation time (Fig. 3). In agreement with these results, the continuous expression patterns of MBP-fused cystatin molecules been previously reported [23, 24]. However, the increasing differential expression levels in two different bacterial strains are more interested result and it remains to be identified in detailed examinations.

Based on the obtained results, TB1 strain of *E. coli* is suitable for the conducting of fusion expression and purification studies of *Celosia* cystatin molecule, as compared to DH5 α .

In vitro inhibitory activity of fused cystatin. To identify the inhibitory activities of the expressed cystatin in

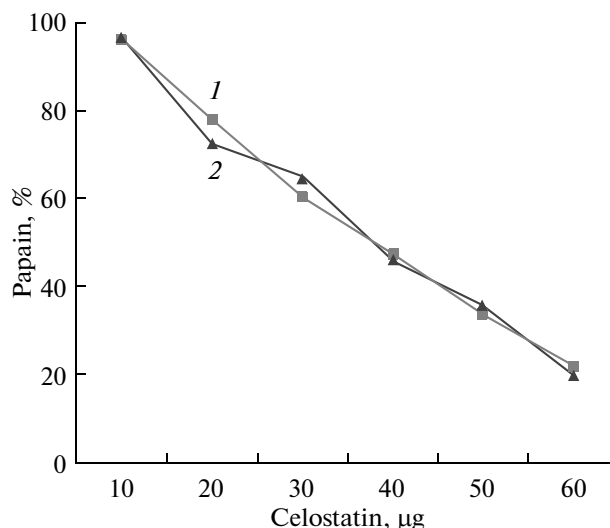


Fig. 4. Assessment of the inhibitory activities of fused protein. By using spectrophotometric method, the inhibitory activities of the purified MBP-fused celostatin were estimated from *E. coli* strains TB1 (1) and DH5 α (2).

both *E. coli* strains, the expressed product was separately purified from both strains and their inhibitory activities were examined. The results showed that papain activity decreases with the increasing concentrations of fused cystatin in both tested strains, sharing the same trend line (Fig. 4). These results confirmed that the inhibitory activity of the expressed cystatin not affected by its differential expression in two different cell types. On the other hand, MBP-fused product expresses in correct conformation in both strains.

The present results are consistent to our previous reports, in which it has been shown that MBP tags not affect the inhibitory activities of the fused cystatin molecules [8, 23–25].

Bacterial growth analysis. The growth rates of the both recombinant bacteria were evaluated by measuring OD₆₀₀ for 1 h time intervals, under induced conditions. Comparison of the growth curves of both the test strains indicated that there are no significant differences in their growth (Fig. 5). This result also confirmed that the expression of *Celosia* cystatin protein has no inhibitory effect on the growth rates of the tested strains.

In the present study for the first ever time, the expression of *Celosia* cystatin was analyzed and compared between the two different strains of *E. coli*, TB1 and DH5 α . The overall results showed that the expression levels of fused protein differ in tested strains. However, the expression patterns as well as the activities of the differentially expressed cystatin do not change during the expression period. A question rose as how the expression affected by DH5 α cells. The continuous expression and the similarity of the growth curves suggested that the expression not affected by the induction of the recombinant cells, but it is contin-

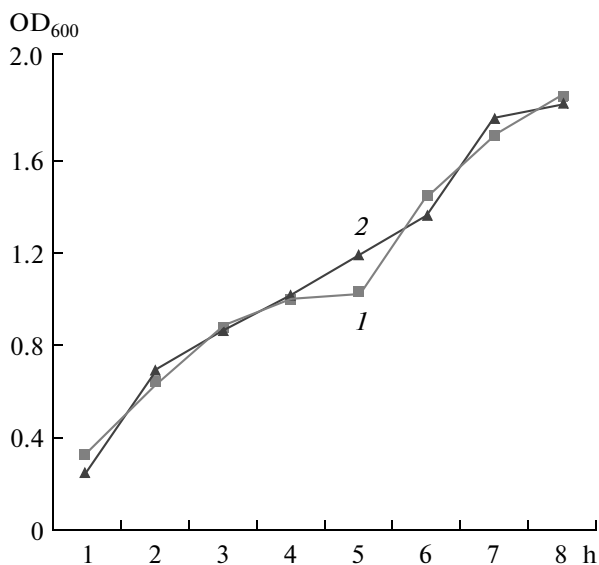


Fig. 5. Assessment of bacterial growth. Recombinant TB1 (1) and DH5 α (2) cells were separately under the same experimental conditions and the growth of bacteria was assessed by measuring OD₆₀₀. OD values represent the means of three replicates.

ously regulated during the growth of the bacteria. However, this continuous regulation might be different in two *E. coli* strains, resulting in the different expression levels. Therefore, further studies are warranted to determine how the expression levels of the same fusion protein are altered in two different strains of *E. coli* cells when the same expression vector system and the same experimental conditions are used.

ACKNOWLEDGMENTS

The author of this paper is thankful to the Research Institute for Fundamental Sciences (University of Tabriz, Tabriz, Iran) for financial support.

REFERENCES

- Otto, H.H. and Schirmeister, T., *Chem. Rev.*, 1997, vol. 97, no. 3, pp. 133–171.
- Abe, M., Abe, K., Kuroda, M., and Arai, S., *Eur. J. Biochem.*, 1992, vol. 209, no. 3, pp. 933–937.
- Botella, M.A., Xu, Y., Prabha, T.N., Zhao, Y., Narasimhan, M.L., Wilson, K.A., Nielsen, S.S., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M., *Plant. Physiol.*, 1996, vol. 112, no. 3, pp. 1201–1210.
- Arai, S., Matsumoto, I., Emori, Y., and Abe, K., *J. Agric. Food Chem.*, 2002, vol. 50, pp. 6612–6617.
- Annadana, S., Schipper, B., Beekwilder, J., Outchkourov, N., Udayakumar, M., and Jongasma, M.A., *J. Biosci. Bioeng.*, 2003, vol. 95, no. 2, pp. 118–123.
- Martinez, M., Abraham, Z., Carbonero, P., and Diaz, I., *Mol. Gen. Genom.*, 2005, vol. 273, pp. 423–432.
- Massonneau, A., Condamine, P., Wisniewski, J.-P., Zivy, M., and Rogowsky, P.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, vol. 1729, no. 3, pp. 186–199.
- Gholizadeh, A., Santha, I.M., Baghbankohnehrouz, B., Lodha, M.L., and Kapoor, H.C., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2005, vol. 42, pp. 197–204.
- Gianotti, A., Rios, M.W., Costa, A.S., Nogaroto, V., Carmona, A.K., Oliva, M.L.V., Andrade, S.S., and Silva, F.H., *Prot. Exp. Purif.*, 2006, vol. 47, pp. 483–489.
- Rivard, D., Girard, C., Anguenot, R., Vézina, L.-P., Trépanier, S., and Michaud, D., *Plant Physiol. Biochem.*, 2007, vol. 45, no. 6, pp. 508–514.
- Rawling, N.D. and Barrett, A.J., *J. Mol. Evol.*, 1990, vol. 30, no. 1, pp. 60–71.
- Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Burbin, R., Etwiller, L., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Howe, K.-L., Marsahall, M., and Sonnhammer, E.L., *Nucl. Acids Res.*, 2002, vol. 30, no. 1, pp. 276–280.
- Campos, R.G., Acosta, J.A.T., Arias, L.J.S., and Lim, M.A.G., *Nat. Biotechnol.*, 1999, vol. 17, pp. 1223–1226.
- Cipriani, G., Fuentes, S., Bello, V., Salazar, L.F., Ghislain, M., and Zhang, D.P., *CIP (Centro Internacional de la Papa Report)*, Lima, Peru, 2000, pp. 267–271.
- Corre-Menguy, F., Cejudo, F.J., Mazubert, C., Vidal, J., Lelandais-Brière, C., Torres, G., Rode, A., and Hartmann, C., *Plant Mol. Biol.*, 2002, vol. 50, no. 4, pp. 687–698.
- Diop, N.N., Kidric, M., Repellin, A., Gareil, M., d'Arcy-Lameta, A., Pham Thi, A.T., and Zuily-Fodil, Y., *FEBS Lett.*, 2004, vol. 577, no. 3, pp. 545–550.
- Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Mena-chem, E., and Levine, A., *Plant Cell*, 1999, vol. 11, no. 3, pp. 431–443.
- Belenghi, B., Acconcia, F., Trovato, M., Perazzolli, M., Bocedi, A., Polticelli, F., Ascenzi, P., and Delledonne, M., *Eur. J. Biochem.*, 2003, vol. 270, no. 12, pp. 2593–2604.
- Sahdev, S., Khattar S.K., and Kulvinder, S.S., *Mol. Cell Biochem.*, 2008, vol. 307, no. 1, pp. 249–264.
- Lilie, H., Schwarz, E., and Rudolph, R., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1998, vol. 9, pp. 497–501.
- Sachdev, D. and Chirgwin, J.M., *Prot. Expr. Purif.*, 1998, vol. 12, pp. 122–132.
- Riggs, P., *Mol. Biotechnol.*, 2000, vol. 15, no. 1, pp. 51–63.
- Gholizadeh, A. and Baghban Kohnehrouz, B., *Cereal Res. Commun.*, 2011, vol. 39, no. 3, pp. 325–333.
- Gholizadeh, A. and Baghban Kohnehrouz, B., *Ind. J. Biochem. Biophys.*, 2011, vol. 48, pp. 375–379.
- Gholizadeh, A., *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 2012, vol. 18, no. 3, pp. 237–244.
- Duplay, P., Bedouelle, H., Fowler, A., Zabin, I., Saurin, W., and Hofnung, M., *J. Biol. Chem.*, 1984, vol. 259, no. 16, pp. 10606–10613.
- Kapust, R.B. and Waugh, D.S., *Protein Sci.*, 1999, vol. 8, no. 8, pp. 1668–1674.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. *In: Molecular Cloning*, Eds. Sambrook, J. and Russell, D.W., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol. 3, 2001.
- Birnboim, H.C. and Doly, J.A., *Nucl. Acids Res.*, 1979, vol. 7, pp. 1513–1523.
- Laemmli, U.K., *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685.
- Misaka, T., Kuroda, M., Abe, K., and Arai, S., *Eur. J. Biochem.*, 1996, vol. 240, no. 3, pp. 609–612.

УДК 577.66:579.222

ТРАНСФОРМАЦИЯ 2- И 4-ЦИАНОПИРИДИНОВ СВОБОДНЫМИ И ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

© 2013 г. Ю. Г. Максимова*, Д. М. Васильев**, Г. В. Овечкина*,
А. Ю. Максимов*, **, В. А. Демаков*, **

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

**Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990

Поступила в редакцию 25.12.2012 г.

Изучена динамика трансформации 2- и 4-цианопиридина суспендированными и адсорбированными на неорганических носителях клетками штамма *Rhodococcus ruber* gt1, обладающего нитрилгидратазной активностью, и *Pseudomonas fluorescens* C2, содержащими нитрилазу. Определено, что и нитрилгидратазная, и нитрилазная активность по 2-цианопиридину у иммобилизованных клеток в 1.5–4 раза ниже, чем таковая по 4-цианопиридину, и в 1.6–2 раза ниже, чем активность свободных клеток по 2-цианопиридину. Показана возможность получения изоникотиновой кислоты при совместной конверсии 4-цианопиридина смешанной суспензией клеток штамма *R. ruber* gt1 с высокой нитрилгидратазной активностью и *R. erythropolis* 11-2 с выраженной амидазной активностью. Показано, что иммобилизация клеток родококков на угле-сырце и клеток псевдомонад на каолине позволяет получить гетерогенный биокатализатор для эффективной трансформации цианопиридинов в соответствующие амиды и карбоновые кислоты.

DOI: 10.7868/S0555109913040089

Пиридинзамещенные амиды и карбоновые кислоты – предшественники ряда фармацевтических препаратов и различных востребованных в народном хозяйстве химических соединений. Изоникотиновая кислота является промежуточным продуктом в синтезе ряда противотуберкулезных препаратов группы гидразида изоникотиновой кислоты (изониазид, фтивазид, метазид и др.), антидепрессантов – ингибиторов моноаминоксидазы, хинуклидиновых лекарственных средств (фенкарбол, оксалидин, ацеклидин). Некоторые производные пиколиновой кислоты, в частности 6-метилпиколиновая кислота, – промежуточные продукты в синтезе фармацевтических препаратов, например димеколина [1]. Высокоактивные гербициды лонтрел и пиклорам – хлор- и аминзамещенные производные пиколиновой кислоты [2].

Основным природным источником пиридиновых соединений являются продукты коксования каменного угля. В химико-фармацевтическом производстве β-пиколиновую фракцию (предшественник никотинамида и никотиновой кислоты), содержащуюся в коксовом газе, подвергают конденсации в жестких условиях под давлением с формалином. Присутствующую в ней γ-пиколиновую фракцию (предшественник изоникотиновой кислоты) отделяют формалином с последующей отгонкой и окислением азотной

кислотой [1]. Известен также химический гидролиз цианопиридинов, который инициируется повышенной температурой и характеризуется неконтролируемой экзотермичностью [3]. Так, никотиновую кислоту получают химическим синтезом, включающим стадию окисления 2-метил-5-этилпиридина, или гидролизом 3-цианопиридина при высоких температурах (330°C) и давлении (290 атм.) [4]. Биологический способ получения ароматических амидов и карбоновых кислот из соответствующих нитрилов, основанный на ферментативном гидролизе, выгодно отличается от химического мягкими условиями проведения процесса, экологической безопасностью и высокой степенью конверсии.

Ферментативный гидролиз цианопиридинов до соответствующих амидов и карбоновых кислот осуществляется ферментами нитрилгидратазно-амидазной и нитрилазной систем микроорганизмов. Способность к трансформации ароматических нитрилов встречается как у представителей родов бактерий *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Microbacterium*, *Alcaligenes*, *Comamonas*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* [4–7], так и среди грибов родов *Fusarium*, *Giberella*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* и др. [8]. Известны биотехнологические процессы, основанные на гидролизе алифатических нитрилов.

Так, компанией “Биоамид” (г. Саратов, Россия) был внедрен процесс, заключающийся в биокаталитическом производстве акрилата аммония из нитрила акриловой кислоты штаммом *Alcaligenes denitrificans* C-32 – продуцентом нитрилазы (КФ 3.5.5.1) [9]. Крупнотоннажное производство акриламида основано на гидратации акрилонитрила клетками штамма *R. rhodochrous* J1 (Япония) [10] и штамма *R. rhodochrous* M8 (Россия) [11], обладающими высокой нитрилгидратазной активностью. Промышленно значимый штамм *R. rhodochrous* J1 также применяется в биокаталитическом производстве никотинамида, причем в зависимости от культуральной среды он может продуцировать нитрилгидратазу (КФ 4.2.1.84) или нитрилазу. Известно, что нитрилаза этого штамма проявляет высокое родство к 4-цианопиридину, хотя неактивна по отношению к 2-цианопиридину [12, 13]. В отличие от процесса получения никотинамида и никотиновой кислоты ферментативным путем, в научной литературе недостаточно описано биокаталитическое получение изоникотиновой и пиколиновой кислот, а также нет сведений об их успешном синтезе с выходом на промышленный уровень. При трансформации 2- и 4-цианопиридинов представляет интерес получение пиридинзамещенных карбоновых кислот, а не амидов, что может быть осуществлено штаммом микроорганизмов, содержащим активную нитрилазу, либо нитрилгидратазно-амидазную ферментную систему с амидазой (КФ 3.5.1.4), сравнимой по активности с нитрилгидратазой. Одним из решений данной задачи может быть разработка биокатализатора в виде смешанных бактериальных культур.

Цель работы – поиск наиболее предпочтительных путей биокаталитического получения изоникотиновой и пиколиновой кислот из соответствующих цианопиридинов, а также разработка гетерогенного биокатализатора на основе адсорбционно-иммобилизованных нерастущих клеток нитрилгидролизующих бактерий.

МЕТОДИКА

Штаммы нитрилутилизирующих бактерий *R. ruber* gt1 [14], *P. fluorescens* C2, *R. erythropolis* 11-2, выделенные из образцов почв, выращивали в колбах объемом 1 л на шейкере со скоростью вращения 100 об/мин при 30°C на минимальной солевой среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 3.7, NaCl – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.005, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, pH 7.2–7.4. В качестве источника углерода использовали глюкозу в концентрации 0.1%. Источником азота для штамма *R. ruber* gt1 являлся хлористый аммоний в концентрации 10 мМ, для *P. fluorescens* C2 и *R. erythropolis* 11-2 – ацетонитрил в концентрации 0.5 и 0.05% соответственно.

Трансформацию 100–200 мМ растворов 2- и 4-цианопиридинов осуществляли в 10–20 мл калий-фосфатного буфера (pH 7.2 ± 0.2) при 30°C в течение 1–48 ч. В качестве катализатора вносили отмытые калий-фосфатным буфером клетки *R. ruber* gt1 (0.6 мг/мл) и *P. fluorescens* C2 (2.6 мг/мл), выращенные до стационарной фазы роста, в которой данный штамм родококков проявляет максимальную нитрилгидратазную, а штамм псевдомонад – максимальную нитрилазную активность. Культуру *R. erythropolis* 11-2 выращивали до поздней логарифмической фазы роста, в которой данная культура проявляет максимальную амидазную активность. Совместную трансформацию субстратов осуществляли отмытыми клетками *R. ruber* gt1 и *R. erythropolis* 11-2, вносимыми в реакционную среду в соотношении 11/13.5 мг по сухой массе. Реакцию проводили в 22 мл калий-фосфатного буфера в течение 3 ч: 1 ч при 30°C и 2 ч при 50°C.

Удельную активность нитрилгидратазы и нитрилазы выражали в ммольях амида (карбоновая кислота)/г сухих клеток · ч.

Адсорбционную иммобилизацию клеток штамма *P. fluorescens* C2 на каолине (“Merck”, Германия) и *R. ruber* gt1 на измельченном до порошкообразного состояния угле-сырце с размером частиц 50–300 мкм (Россия) проводили в течение 1 ч при 30°C при перемешивании на шейкере при 140 об/мин, носитель отделяли на фильтре (“синяя лента”), отмывали калий-фосфатным буфером и учитывали количество несвязавшихся клеток. Трансформацию цианопиридинов иммобилизованными клетками проводили в тех же условиях, как и реакции, катализируемую суспендированными клетками. Концентрация иммобилизованных и суспендированных (в пересчете на сухую массу) клеток в реакционной среде была одинакова.

Концентрацию изоникотиновой и пиколиновой кислот определяли методом ВЭЖХ на хроматографе LC-10 (“Shimadzu”, Япония) с колонкой Luna 5u C 18(2) 100A (250 × 4.6 мм). В качестве подвижной фазы использовали 10 мМ KH_2PO_4 и 25% ацетонитрила, скорость потока составляла 0.5 мл/мин при 25°C, детекцию проводили при длине волны 200 нм.

Адсорбцию 100 мМ растворов 2-, 4-цианопиридинов, пиколинамида и пиколиновой кислоты, изоникотинамида и изоникотиновой кислоты на угле-сырце и каолине определяли по разнице концентрации этих веществ в надосадочной жидкости после 2 ч инкубации с 500 мг носителя при 30°C.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ Microsoft Excel 2003 с использованием *t* критерия Стьюдента, результаты представлены средними величинами по трем независимым опытам. Уровень значимости α принимали равным 0.05.

Активность суспендированных и иммобилизованных нитрилутилизующих бактерий по отношению к 2- и 4-цианопиридину, ммоль/г·ч

Образец	2-цианопиридин	4-цианопиридин
<i>R. ruber</i> gt1, нитрилгидратазная активность		
Суспензия	887.70 ± 106.43	803.70 ± 53.51
Иммобилизованные клетки	460.20 ± 84.74	702.40 ± 25.49
<i>P. fluorescens</i> C2, нитрилазная активность		
Суспензия	8.81 ± 1.18	19.63 ± 1.65
Иммобилизованные клетки	5.35 ± 1.37	21.53 ± 3.32

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Трансформация 2- и 4-цианопиридина суспендированными и иммобилизованными клетками штамма *R. ruber* gt1, содержащими нитрилгидратазу. Суспензия клеток *R. ruber* gt1 и адсорбированные на угле-сырце клетки трансформировали 2- и 4-цианопиридин до пиколинамида и изоникотинамида соответственно. Нитрилгидратазная активность суспендированных клеток по этим субстратам достоверно не различалась, а при иммобилизации наблюдалось незначительное снижение активности по 4-цианопиридину (таблица). В то же время активность по 2-цианопиридину у иммобилизованных клеток была ниже, чем у свободных в 1.4–2.6 раза и в 1.2–2 раза ниже, чем по 4-цианопиридину у иммобилизованных клеток. Ранее нами было установлено повышение нитрилгидратазной и нитрилазной активностей при трансформации акрилонитрила адсорбированными на углеродсодержащих носителях клетками родококков и псевдомонад в сравнении с ферментативными активностями суспендированных клеток [15]. Следует отметить, что эффективность гетерогенного биокатализа во многом зависит от того, приводит иммобилизация клеток к ограничениям массопереноса или нет. Определенную роль в диффузионных затруднениях могут играть не только физико-химические характеристики носителя, но и химическая природа субстратов и продуктов ферментативной реакции. Можно предположить, что ароматические нитрилы, амиды и карбоновые кислоты в большей степени подвержены этим диффузионным затруднениям, чем алифатические. Для данного процесса были подобраны носители, которые позволили получить иммобилизованный биокатализатор, активность которого сохранялась либо незначительно снижалась по сравнению с суспендированными клетками. Динамика трансформации 2- и 4-цианопиридина иммобилизованными и свободными клетками показана на рис. 1.

Чтобы определить, происходит ли накопление субстрата и продукта в клетке, после полной конверсии клетки родококков разрушали ультразвуком и определяли концентрацию продукта и субстрата в цитоплазме. Было показано, что 4-цианопиридин в клетке отсутствовал, 2-цианопиридин обнаруживался в следовых количествах, а накопление изоникотинамида и пиколинамида в цитоплазме составило 7.3 и 4.8 мкмоль/мг сухих клеток соответственно.

Трансформация 2- и 4-цианопиридина суспендированными и иммобилизованными клетками штамма *P. fluorescens* C2, содержащими нитрилазу. Суспендированные и адсорбированные на каолине клетки штамма *P. fluorescens* C2 катализировали гидролиз 2- и 4-цианопиридина в пиколиновую и изоникотиновую кислоту соответственно. Показано, что нитрилазная активность суспендированных клеток по отношению к 4-цианопиридину в 2.2 раза выше, чем по отношению к 2-цианопиридину (таблица). Активность иммобилизованных на каолине и свободных клеток псевдомонад при трансформации 4-цианопиридина достоверно не различается. Адсорбированные клетки трансформируют 2-цианопиридин с незначительно меньшей скоростью, чем свободные. Динамика трансформации этих гетероциклических нитрилов свободными и иммобилизованными клетками *P. fluorescens* C2 показана на рис. 2. Сравнивая трансформацию этих субстратов клетками штаммов нитрилутилизующих бактерий, можно заключить, что 2-цианопиридин является более сложным субстратом как для нитрилгидратазы, так и для нитрилазы, т.к. образует в водной среде эмульсию. Диспергированные частицы 2-цианопиридина, по-видимому, сначала адсорбируются клеточной стенкой бактерий и затем проникают в клетку, т.к. после смешивания суспензии бактерий с эмульсией дисперсная фаза не визуализируется.

Совместная трансформация 4-цианопиридина штаммами *R. ruber* gt1 и *R. erythropolis* 11-2. Изоникотиновая кислота может быть получена при совместной трансформации 4-цианопиридина суспензией клеток штамма *R. ruber* gt1, обладающего высокой нитрилгидратазной активностью, и *R. erythropolis* 11-2 с выраженной амидазной активностью. Показано, что цианопиридин полностью трансформируется в амид за 30 мин реакции нитрилгидратазой штамма *R. ruber* gt1, а образующийся амид конвертируется в изоникотиновую кислоту амидазой штамма *R. erythropolis* 11-2 (рис. 3). Скорость конверсии ограничена активностью амидазы, которая не превышала 10 ммоль/г·ч, что более чем на порядок ниже нитрилгидратазной. При сравнении двух способов получения изоникотиновой кислоты было показано, что гидролиз цианопиридина нитрилазой штамма *P. fluorescens* C2 более эффективен, т.к. его актив-

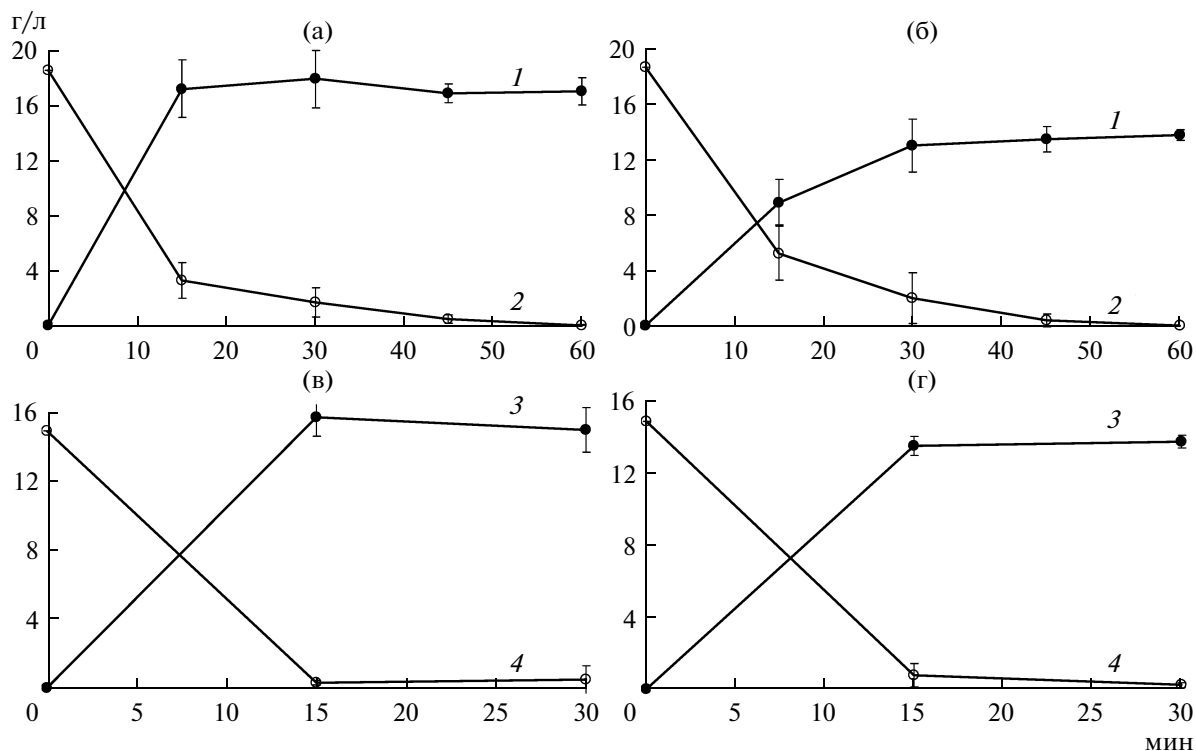


Рис. 1. Динамика трансформации 2-цианопиридина (а, б) и 4-цианопиридина (в, г) суспензией клеток *R. ruber* gt1 (а, в) и клетками, адгезированными на угле-сырце (б, г): 1 – пиколинамид, 2 – 2-цианопиридин; 3 – изоникотинамид, 4 – 4-цианопиридин.

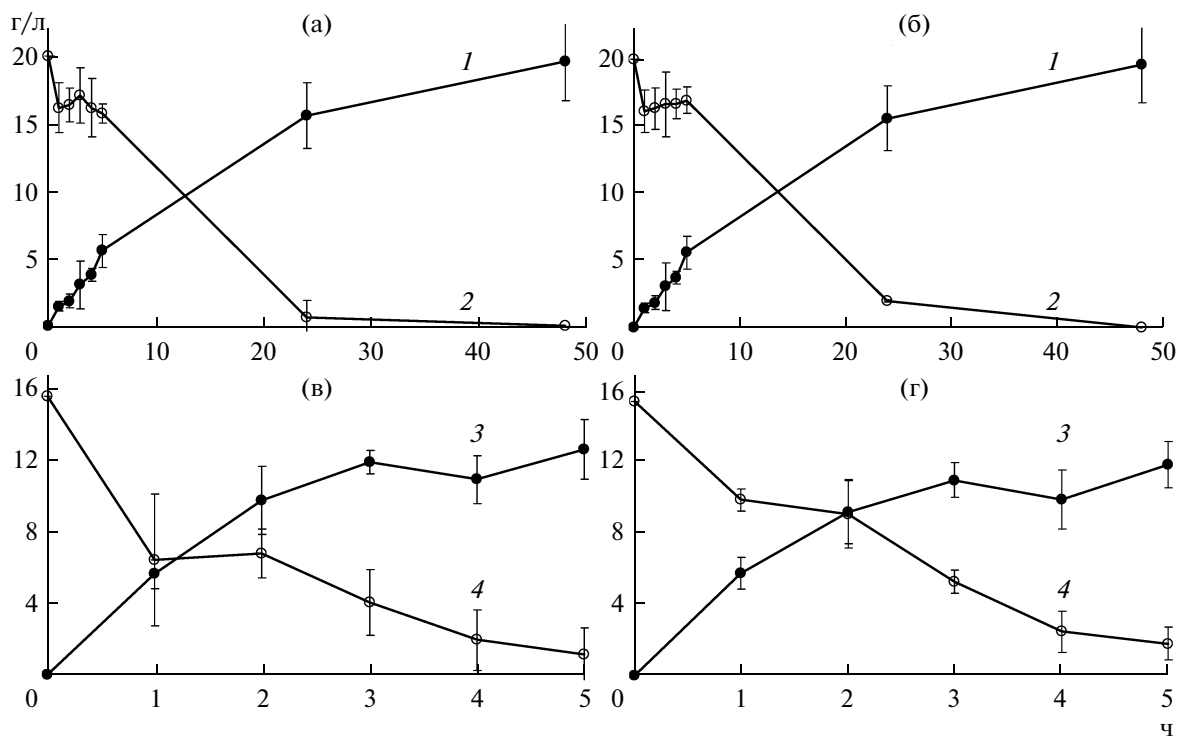


Рис. 2. Динамика трансформации 2-цианопиридина (а, б) и 4-цианопиридина (в, г) суспензией клеток *P. fluorescens* C2 (а, в) и клетками, адгезированными на каолине (б, г): 1 – пиколиновая кислота, 2 – 2-цианопиридин; 3 – изоникотиновая кислота, 4 – 4-цианопиридин.

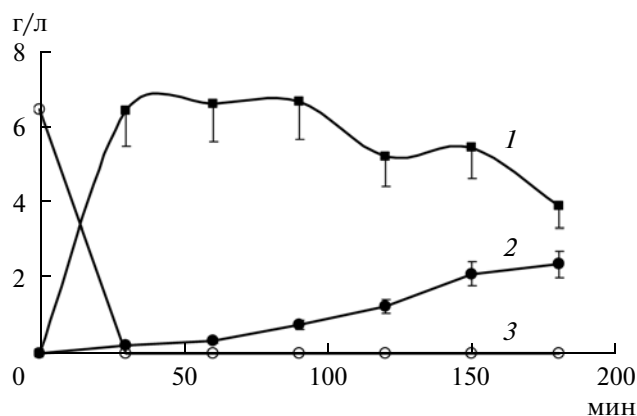


Рис. 3. Совместная трансформация 4-цианопиридина штаммами *R. ruber* gt1 и *R. erythropolis* 11-2: 1 – изоникотинамид; 2 – изоникотиновая кислота; 3 – 4-цианопиридин.

ность по данному субстрату превышает таковую амидазы штамма *R. erythropolis* 11-2 в два раза.

Таким образом, пиколиновая и изоникотиновые кислоты могут быть получены при гидролизе соответствующих цианопиридинов как суспендированными клетками штаммов *P. fluorescens* C2, содержащими нитрилазу, так и совместной конверсией смешанной суспензией клеток штаммов *R. ruber* gt1 и *R. erythropolis* 11-2, обладающими высокой нитрилгидратазной и амидазной активностями соответственно. Следует отметить, что в данном случае конверсия нитрилазой была предпочтительнее в результате ее более высокой активности по сравнению с амидазой. Адгезия клеток родококков и псевдомонад на неорганических носителях позволяет получить активный гетерогенный биокатализатор гидролиза ароматических нитрилов. В научной литературе содержится недостаточно сведений о трансформации цианопиридинов иммобилизованными клетками бактерий. По данным литературы, иммобилизованные методом включения в структуру геля альгината кальция клетки *Bacillus pallidus* Dac521 сохраняли 98% своей первоначальной активности при трансформации 3-цианопиридина, при этом нитрилазная активность составляла лишь 37 нмоль/мг · мин при 50°C. В сравнении со штаммом *B. pallidus* Dac521, содержащим термофильную нитрилазу, клетки *Nocardia rhodochrous* (*R. rhodochrous*) LL100-21, нитрилаза которых мезофильна, сохраняли только 38% активности при иммобилизации в структуре геля альгината кальция, хотя при этом активность составляла 61 нмоль/мг · мин при 30°C [4]. Адсорбционная иммобилизация по сравнению с включением клеток в структуру геля не приводит к ограничениям массопереноса и позволяет проводить ферментативную трансформацию без повышения температуры, которое необходимо для преодоления диф-

фузионных затруднений в гелевой матрице. Ранее нами было установлено, что использование активированных углеродных носителей для иммобилизации клеток нитрилутилизующих бактерий предпочтительно для процесса трансформации алифатических субстратов [16]. Наоборот, при конверсии ароматических субстратов предпочтительно отдавать неактивированным носителям (по нашим данным, это уголь-сырец для родококков, обладающих гидрофобной клеточной стенкой, и каолин для псевдомонад с гидрофильной поверхностью), т.к. неактивированные носители не адсорбировали ароматические субстраты и продукты реакции. Таким образом, было выявлено, что выбор носителя для иммобилизации биокатализатора зависит не только от свойств биологического агента (в данном случае гидрофобности/гидрофильности поверхности бактериальных клеток), но и от самого биокаталитического процесса, используемых в нем субстратов и получаемых продуктов.

При периодической загрузке реакторов прекращение конверсии по достижении определенной концентрации продукта в реакционной среде может быть обусловлено различными факторами: ингибированием самой ферментной системы субстратом или накапливающимся продуктом, прекращением процессов транспорта продукта из клетки в результате возрастания его концентрации в реакторе, общим снижением ферментативной активности. Это может быть в определенной мере преодолено при переходе на непрерывный способ конверсии, представленный колоночным реактором, заполненным гетерогенным биокатализатором в виде иммобилизованных клеток.

Работа поддержана Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яхонтов Л.М., Глушков Р.Г. Синтетические лекарственные средства / Ред. А.Г. Натрадзе. М.: Медицина, 1983. 272 с.
2. Мельников Н.Н. Пестициды. Химия, технология и применение. М.: Химия, 1987. 712 с.
3. Патент РФ. 2001. № 2175968.
4. Almatawah Q.A., Covan D.A. // Enzyme Microb. Technol. 1999. V. 25. P. 718–724.
5. Kamble A., Banerjee U.C. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2008. V. 151. P. 143–150.
6. Cantarella L., Gallifuoco A., Malandra A., Martínková L., Pasquarelli F., Spera A., Cantarella M. // Enzyme Microb. Technol. 2010. V. 47. P. 64–70.
7. Забазная Е.В., Козулин С.В., Воронин С.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 1998. Т. 34. № 4. С. 337–381.
8. Kaplan O., Nikolaou K., Pišvejcová A., Martínková L. // Enzyme Microb. Technol. 2006. V. 38. P. 260–264.

9. Глинский С.А., Козулин С.В., Козулина Т.Н., Полтавская С.В., Яненко А.С., Леонова Т.Е. // Биотехнология. 2010. № 1. С. 17–24.
10. Asano Y. // J. Biotechnol. 2002. V. 94. P. 65–72.
11. Астаурова О.Б., Ларикина Г.А., Полякова И.Н., Яненко А.С. // Биотехнология. 1993. № 11–12. С. 6–8.
12. Nagasawa T., Mathew C.D., Mauger J., Yamada H. // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. № 7. P. 1766–1769.
13. Mathew C.D., Nagasawa T., Kobayashi M., Yamada H. // Appl. Environ. Microbiol. 1988. V. 54. № 4. P. 1030–1032.
14. Патент РФ. 2004. № 2223316.
15. Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю., Демаков В.А., Козлов С.В., Овечкина Г.В., Олонцев В.Ф. // Биотехнология. 2010. № 4. С. 51–58.
16. Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г., Кузнецова М.В., Олонцев В.Ф., Демаков В.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 2. С. 193–198.

Transformation of 2- and 4-Cyanopyridines by Free and Immobilized Cells of Nitrile-Hydrolyzing Bacteria

Yu. G. Maksimova^a, D. M. Vasilyev^b, G. V. Ovechkina^a, A. Yu. Maksimov^{a, b}, and V. A. Demakov^{a, b}

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia
e-mail: maks@iegm.ru

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

Received December 25, 2012

Abstract—The transformation dynamics of 2- and 4-cyanopyridines by cells suspended and adsorbed on inorganic carriers has been studied in the *Rhodococcus ruber* gt1 strain possessing nitrile hydratase activity and the *Pseudomonas fluorescens* C2 strain containing nitrilase. It was shown that both nitrile hydratase and nitrilase activities of immobilized cells against 2-cyanopyridine were 1.5–4 times lower compared to 4-cyanopyridine and 1.6–2 times lower than the activities of free cells against 2-cyanopyridine. The possibility of obtaining isonicotinic acid during the combined conversion of 4-cyanopyridine by a mixed suspension of *R. ruber* gt1 cells with a high level of nitrile hydratase activity and *R. erythropolis* 11-2 cells with a pronounced activity of amidase has been shown. Immobilization of *Rhodococcus* cells on raw coal and *Pseudomonas* cells on china clay was shown to yield a heterogeneous biocatalyst for the efficient transformation of cyanopyridines into respective amides and carbonic acids.

УДК 759.873.088.5:661.185

ДЕЙСТВИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 И *Nocardia vaccinii* К-8 НА ФИТОПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ

© 2013 г. Т. П. Пирог*, **, А. Д. Конон**, А. П. Софилканич**, Г. А. Иутинская*

*Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, 03680

**Национальный университет пищевых технологий, Киев, 01601

e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Поступила в редакцию 5.07.2012 г.

Исследовано влияние поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Nocardia vaccinii* К-8 на фитопатогенные бактерии.

Показано, что после обработки в течение 2 ч препаратами ПАВ (0.15–0.4 мг/мл) штаммов ИМВ Ас-5017 и ИМВ В-7241 выживаемость клеток (10^5 – 10^7 в мл) фитопатогенных бактерий родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas* составляла 0–33%. В присутствии препаратов ПАВ (0.085–0.85 мг/мл) *N. vaccinii* К-8 количество клеток большинства исследуемых фитопатогенных бактерий снижалось на 95–100%.

Полученные данные показывают перспективность использования микробных ПАВ для разработки экологически безопасных препаратов для контроля численности фитопатогенных бактерий.

DOI: 10.7868/S0555109913040119

Необходимость разработки современных препаратов с антимикробными свойствами обусловлена увеличением патогенных микроорганизмов, резистентных к известным биоцидам. Микробные поверхностно-активные вещества (ПАВ) рассматриваются многими исследователями, как альтернатива синтетическим антимикробным агентам [1–5]. Кроме того, актуальной проблемой на сегодняшний день остается борьба с бактериозами сельскохозяйственных растений [6].

Ранее из загрязненных нефтью образцов почвы нами были выделены нефтеокисляющие бактерии, идентифицированные, как *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 (ИМВ В-7241), *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 (ИМВ Ас-5017), *Nocardia vaccinii* К-8 и установлена способность штаммов синтезировать метаболиты с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами на различных гидрофобных и гидрофильных субстратах [7–10]. Изучены оптимальные условия культивирования продуцентов, обеспечивающие максимальное образование ПАВ [8–10], показана возможность интенсификации синтеза поверхностно-активных веществ на основе исследования особенностей метаболизма используемого субстрата и внесения в среду экзогенных предшественников биосинтеза [10–12], использовании смешанных субстратов [13], а также осуществлено масштабирование процесса биосинтеза ПАВ на ферментационном оборудовании [14].

В предыдущих исследованиях было установлено антимикробное действие препаратов ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 по отношению к некоторым бактериям и дрожжам [15]. Отметим, что в работе [15] использовали неочищенные препараты ПАВ (в виде стерильного супернатанта культуральной жидкости), после обработки которыми наблюдали увеличение количества живых клеток некоторых тест-культур, что можно объяснить наличием в супернатанте, кроме ПАВ, и других биологически активных веществ.

Из литературы известно, что антимикробные свойства микробных ПАВ зависят от способа их выделения и степени очистки [16]. Так, комплекс синтезируемых *Bacillus circulans* ПАВ липопептидной природы состоит из шести фракций. Исследование антимикробных свойств одной из фракций показало, что ее действие значительно эффективнее, чем комплекс ПАВ, выделенный экстракцией органическими растворителями [16].

Цель работы – исследование антимикробных свойств ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *N. vaccinii* К-8 различной степени очистки по отношению к некоторым фитопатогенным бактериям.

МЕТОДИКА

Объекты исследований. Основными объектами исследований являлись штаммы *Rhodococcus*

erythropolis ЭК-1 и *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, зарегистрированные в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины под номерами ИМВ Ас-5017 и ИМВ В-7241 соответственно, а также *Nocardia vaccinii* К-8.

По химической природе ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 являются комплексом глико- (трегалозомоно- и димиколаты), нейтральных (цетиловый спирт, пальмитиновая кислота, метиловый эфир *n*-пентадекановой кислоты, миколовые кислоты) и фосфолипидов (фосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин) [8]. В составе ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 выявлены глико- (трегалозомоно- и димиколаты, трегалозомоно- и диацелаты) и аминоклипыды [9]. *N. vaccinii* К-8 синтезирует комплекс нейтральных, глико- и аминоклипыдов [10]. Нейтральные липиды представлены миколовыми и *n*-алкановыми кислотами, гликолипыды – трегалозодиацелатами и трегалозомиколатами.

В работе использовали фитопатогенные бактерии из Украинской коллекции микроорганизмов (УКМ): *Pectobacterium carotovorum* УКМ В-1095, *Pseudomonas syringae* УКМ В-1027, *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1015, *P. syringae* pv. *coronafaciens* – УКМ В-1154, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049.

Объектами исследования также были фитопатогенные бактерии из коллекции отдела фитопатогенных бактерий Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины: *P. corrugate* 9070, *P. savastanoi* pv. *glycinea* 8571, *X. translucens* pv. *translucens* 7696, *X. vesicatoria* 7790.

Штаммы фитопатогенных бактерий были любезно предоставлены сотрудниками отдела фитопатогенных бактерий Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины.

Состав сред и условия культивирования. *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 выращивали на жидкой минеральной среде (г/л): NaNO_3 – 1.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, NaCl – 1.0, Na_2HPO_4 – 0.6, KH_2PO_4 – 0.14, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, pH 6.8–7.0. В качестве субстрата использовали пережаренное подсолнечное масло в концентрации 2 об. %.

Для культивирования *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 использовали питательную среду следующего состава (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0.35, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, NaCl – 1.0, Na_2HPO_4 – 0.6, KH_2PO_4 – 0.14, pH 6.8–7.0. В среду дополнительно вносили дрожжевой автолизат – 0.5 об. % и раствор микрореземтов – 0.1 об. % [9]. Источник углерода – этанол в концентрации 2 об. %.

Штамм *N. vaccinii* К-8 выращивали на синтетической питательной среде (г/л): NaNO_3 – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, KH_2PO_4 – 0.1,

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1, дрожжевой автолизат – 0.5 об. % (по объему). Источник углерода и энергии – глицерин в концентрации 1.5 об. %.

В качестве инокулята использовали культуры из экспоненциальной фазы роста, выращенные на соответствующих жидких средах, содержащих 0.5–1 об. % субстрата. Количество посевного материала (10^4 – 10^5 кл./мл) составляло 5–10% от объема питательной среды. Культивирование бактерий осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 28–30°C в течение 120 ч.

Определение показателей синтеза ПАВ. Синтез ПАВ оценивали по следующим показателям: поверхностное натяжение (σ_s) супернатанта культуральной жидкости, условная концентрация ПАВ (ПАВ*, безразмерная величина), концентрация внеклеточных ПАВ (г/л), которые определяли, как было описано ранее [7–14].

Выделение поверхностно-активных веществ. Из супернатанта культуральной жидкости, содержащего ПАВ (препарат 1), экстракцией смесью хлороформа и метанола в соотношении 2 : 1 (смесь Фолча) выделяли ПАВ (препарат 2). Оставшаяся после экстракции ПАВ водная фаза условно названа нами препарат 3.

Выросшие клетки отделяли центрифугированием (5000 г) в течение 45 мин, супернатант (препарат 1) подвергали дальнейшей обработке. Для этого 50 мл супернатанта помещали в цилиндрическую делительную воронку объемом 200 мл, добавляли 50 мл смеси Фолча, воронку закрывали шлифованной пробкой и встряхивали (экстрагировали липиды) в течение 5 мин. Полученную после экстракции смесь оставляли в делительной воронке для разделения фаз, после чего нижнюю фракцию сливали (органический экстракт 1), а водную фазу подвергали повторной экстракции, как описано выше. После разделения фаз сливали нижнюю фракцию, получая органический экстракт 2. На третьем этапе к водной фазе добавляли 50 мл смеси Фолча, осуществляли экстракцию, получая органический экстракт 3. Экстракты 1–3 объединяли и упаривали на ротационном испарителе ИР-1М2 (Россия) при 50°C и абсолютном давлении 0.4 атм до постоянной массы. Сухой остаток растворяли в стерильной водопроводной воде до первоначального объема. Все препараты стерилизовали при 112°C в течение 30 мин.

Концентрацию ПАВ в препаратах 1 и 2 устанавливали весовым методом после экстракции смесью Фолча.

Исследование антимикробных свойств препаратов. В исходной суспензии 1 сут фитопатогенных тест-культур, выращенных на агаризованной среде (сусло-агар и мясо-пептонный агар в соотношении 1 : 1) при 30°C, определяли количество живых клеток по методу Коха (колониеобразую-

шие единицы, КОЕ/мл). Затем по 1.5 мл суспензии тест-культуры помещали в пробирки, добавляли по 1.5 мл препаратов 1–3 и выдерживали в течение 1 и 2 ч при температуре, оптимальной для роста тест-культуры, после чего определяли количество живых клеток.

Выживание фитопатогенных бактерий определяли, как отношение количества клеток в вариантах, обработанных препаратами 1–3, к количеству клеток в исходной суспензии и выражали в процентах.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по Лакину [17]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Антимикробные свойства препаратов *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241. В табл. 1 представлены данные по антимикробным свойствам препаратов 1 (супернатант культуральной жидкости, содержащий ПАВ), и 2 (раствор ПАВ после экстракции из препарата 1 смесью Фолча) штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017. Концентрация поверхностно-активных веществ в препаратах 1 и 2 *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 составляла 0.8 мг/мл, *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 – 0.3 мг/мл. Установлено, что после экстракции ПАВ из супернатанта культуральной жидкости исследуемых штаммов последний не обладал поверхностно-активными свойствами, что позволяет утверждать об отсутствии ПАВ в препаратах 3.

Учитывая, что при определении антимикробных свойств препаратов объемное соотношение их растворов и суспензии тест-культур составляет 1 : 1 (см. раздел “Методика”), реально исследуемая концентрация ПАВ в препаратах 1 и 2 *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 составляла 0.4 и 0.15 мг/мл соответственно. В дальнейшем при изложении материала в тексте указана реальная концентрация ПАВ.

Так как препараты 2 штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 различаются по содержанию ПАВ, в некоторых вариантах исследовали антимикробные свойства препарата 2 *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 более низкой концентрации (0.2 и 0.1 мг/мл).

Эксперименты показали, что как для штамма ИМВ Ас-5017, так и ИМВ В-7241 наибольшее ингибирующее действие на фитопатогенные бактерии оказывал препарат 2 – раствор ПАВ (табл. 1). Практически во всех случаях эффективность этих препаратов по отношению к фитопатогенным бактериям родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas* усиливалась с увеличением времени экспозиции.

Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют, что препарат ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 с концентрацией 0.15 мг/мл обладал более сильным антимикробным действием по отношению к некоторым исследуемым фитопатогенам, чем препарат *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 более высокой концентрации (0.4 мг/мл). Такое явление можно объяснить различным химическим составом исследованных ПАВ. Так, в составе ПАВ штамма ИМВ В-7241 обнаружены аминоклипыды [9], которые, как известно, характеризуются достаточно сильным антимикробным действием [5, 16, 18].

Отметим, что после обработки *X. vesicatoria* ИМВ 7790 и *P. syringae* УКМ В-1027 препаратами 2 штамма ИМВ Ас-5017 более низкой концентрации (0.2 и 0.1 мг/мл) наблюдали увеличение количества живых клеток фитопатогенных бактерий, которое коррелировало со снижением концентрации ПАВ в препаратах (табл. 1).

Препарат 1 штамма ИМВ В-7241, представляющий собой супернатант после отделения клеток, проявлял эффективное антимикробное действие только по отношению к *X. vesicatoria* 7790 и *P. syringae* УКМ В-1027 (табл. 1). Препарат 1 штамма ИМВ Ас-5017 оказался не таким эффективным и в лучшем случае в его присутствии наблюдали гибель 20% клеток *P. corrugate* 9070. Отметим, что обработка препаратом 1 тест-культур сопровождалась даже стимулированием роста некоторых фитопатогенных бактерий (табл. 1).

На следующем этапе исследовали влияние на фитопатогенные бактерии препаратов 3 (водная фаза, оставшаяся после экстракции ПАВ из супернатанта культуральной жидкости) штаммов ИМВ В-7241 и Ас-5017 (рис. 1).

Отметим, что после обработки суспензии тест-культур *X. vesicatoria* 7790, *P. corrugate* 9070 и *P. syringae* рв. *coronafaciens* УКМ В-1154 препаратом 3 *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 наблюдали существенное увеличение количества клеток (рис. 1а). В некоторых случаях препарат 3 *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 проявлял слабую антимикробную активность (например, против *X. campestris* рв. *campestris* УКМ В-1049 и *P. carotovorum* УКМ В-1095, рис. 1а).

Препарат 3 *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 практически не влиял на *P. corrugate* 9070 и незначительно стимулировал рост *P. carotovorum* УКМ В-1095 через 2 ч экспозиции (рис. 1б). В то же время обработка в течение 1 ч препаратом 3 штамма ИМВ Ас-5017 суспензии тест-культур *X. campestris* рв. *campestris* УКМ В-1049 и *P. syringae* УКМ В-1027 сопровождалась более существенным стимулированием роста этих фитопатогенных бактерий (численность 150–165%, рис. 1б).

Таким образом, препарат 3 как штамма *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, так и *R. erythropolis* ИМВ

Таблица 1. Влияние ПАВ штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 на фитопатогенные бактерии родов *Xanthomonas* и *Pseudomonas*

Тест-культура	Продуцент метаболита	Препарат	Выживаемость клеток, % через		
			1 ч	2 ч	
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> УКМ В-1049	ИМВ В-7241	1	20.0 ± 1.0	140.0 ± 7.0	
		2	17.7 ± 0.9	Н.о.	
	ИМВ Ас-5017	1	115.0 ± 5.8	148.0 ± 7.4	
		2	40.0 ± 2.0	14.0 ± 0.7	
<i>X. vesicatoria</i> 7790	ИМВ В-7241	1	2.0 ± 0.1	0	
		2	0	0	
	ИМВ Ас-5017	1	77.0 ± 2.6	81.0 ± 2.6	
		2	23.0 ± 1.1	11.0 ± 0.9	
		2*	58.0 ± 2.9	Н.о.	
		2**	98.1 ± 1.9	Н.о.	
<i>P. syringae</i> УКМ В-1027	ИМВ В-7241	1	26.9 ± 1.3	18.4 ± 0.9	
		2	34.9 ± 1.7	9.2 ± 0.5	
	ИМВ Ас-5017	1	124.0 ± 2.7	156.0 ± 3.1	
		2	42.0 ± 1.2	12.0 ± 0.9	
		2*	61.5 ± 3.1	Н.о.	
		2**	93.3 ± 4.7	Н.о.	
	<i>P. corrugate</i> 9070	ИМВ В-7241	1	96.5 ± 4.8	92.9 ± 4.6
			2	74.7 ± 3.7	25.7 ± 1.2
ИМВ Ас-5017		1	87.0 ± 2.3	81.0 ± 2.2	
		2	31.0 ± 1.0	29.0 ± 1.0	
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> УКМ В-1154	ИМВ В-7241	1	99.7 ± 5.0	35.2 ± 1.8	
		2	34.4 ± 1.7	32.8 ± 1.6	
	ИМВ Ас-5017	1	96.0 ± 4.8	98.0 ± 4.9	
		2	27.0 ± 1.4	10.0 ± 0.5	
<i>P. carotovorum</i> УКМ В-1095	ИМВ В-7241	1	94.0 ± 4.7	57.0 ± 2.9	
		2	95.0 ± 5.0	33.0 ± 1.7	
	ИМВ Ас-5017	1	91.0 ± 2.1	89.0 ± 2.0	
		2	79 ± 1.8	70 ± 1.6	

Примечание. Получение препаратов описано в разделе "Методика". Концентрация ПАВ в препаратах 1 и 2 (мг/мл): *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 – 0.4; *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 – 0.15. Количество клеток до внесения препаратов (КОЕ/мл): *X. campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049 – 4×10^6 , *X. vesicatoria* 7790 – 1×10^5 , *P. syringae* УКМ В-1027 – 3×10^6 , *P. corrugate* 9070 – 2×10^7 , *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 – 4×10^5 , *P. carotovorum* УКМ В-1095 – 2×10^7 ; количество клеток в контрольных (не обработанных препаратами) вариантах не изменялось в течении 2 ч экспозиции.

"*" и "**" – концентрация ПАВ в препарате 2 штамма ИМВ Ас-5017 0.2 и 0.1 мг/мл соответственно. Н.о. – не определяли.

Ас-5017 проявлял стимулирующее действие на большинство исследованных фитопатогенных бактерий. Подобный эффект супернатанта культуральной жидкости *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017, только на эукариотические клетки (*C. tropicalis* ПБТ-5, *C. albicans* Д-6 и *C. guilliermondii* МБ-4) был описан нами ранее [15].

Наблюдаемое увеличение количества клеток после обработки препаратами 1 и 3 (см. табл. 1 и

рис. 1) может быть объяснено тем, что штаммы ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017, кроме ПАВ, синтезируют ряд других биологически активных веществ, в том числе стимулирующих рост микроорганизмов. Выяснению этого вопроса будут посвящены наши будущие исследования.

Препараты ПАВ *N. vaccinii* К-8 как антимикробные агенты. Несколько другие закономерности наблюдали при действии ПАВ *N. vaccinii* К-8 (концен-

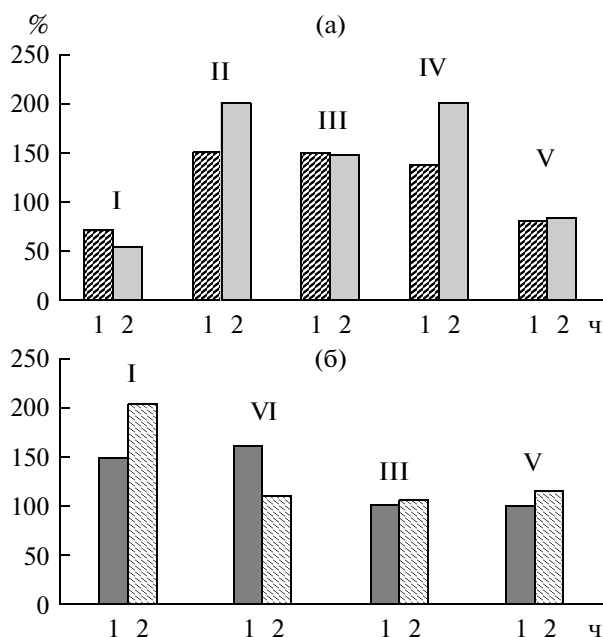


Рис. 1. Влияние препарата 3 *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 (а) и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 (б) на фитопатогенные бактерии.

Время экспозиции 1 и 2 ч. Фитопатогенные бактерии: I – *X. campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049, II – *X. vesicatoria* 7790, III – *P. corrugate* 9070, IV – *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154, V – *P. carotovorum* УКМ В-1095, VI – *P. syringae* УКМ В-1027.

Контроль (100%) – количество клеток до внесения препарата 3.

трация ПАВ в препаратах 1 и 2 – 0.85 мг/мл) на представителей родов *Xanthomonas* и *Pseudomonas* (табл. 2). Во-первых, антимикробное действие установлено для обоих исследуемых препаратов. Во-вторых, обработка препаратами штамма К-8 сопровождалась гибелью значительного количества клеток (80% и выше). В-третьих, антимикробное действие обоих препаратов оказалось практически одинаковым, а в некоторых случаях препарат 1 оказался более эффективным. В-четвертых, из исследованных препаратов ПАВ всех штаммов препараты *N. vaccinii* К-8 проявляли наиболее сильное антимикробное действие (табл. 1 и 2), что может быть объяснено более высокой концентрацией содержащихся в них ПАВ по сравнению с аналогичными препаратами *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017.

На следующем этапе исследовали влияние на *X. vesicatoria* 7790 и *P. corrugate* 9070 препарата ПАВ (препарат 2) *N. vaccinii* К-8 более низкой концентрации. Выбор именно этих фитопатогенных бактерий для проведения исследований обусловлен высокой выживаемостью (до 20–22%) клеток штаммов 7790 и 9070 после обработки препаратом 2 *N. vaccinii* К-8, что на порядок выше,

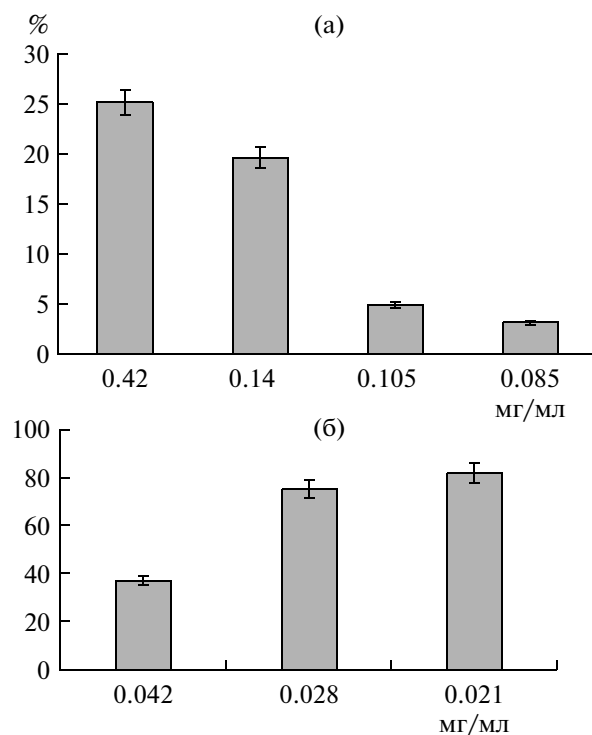


Рис. 2. Зависимость выживаемости (%) *X. vesicatoria* 7790 (а) и *P. corrugate* 9070 (б) от концентрации ПАВ (мг/мл) в препарате 2 *N. vaccinii* К-8.

Время экспозиции 2 ч. Количество клеток фитопатогенных бактерий до внесения препарата 2 *N. vaccinii* К-8 – 10^5 – 10^6 КОЕ/мл.

чем других исследованных фитопатогенных бактерий (см. табл. 2). Кроме того, количество живых клеток *X. vesicatoria* 7790 и *P. corrugate* 9070 практически не зависело от времени обработки препаратом 2 штамма К-8 (см. табл. 2). Эти данные позволили предположить, что для ингибирования клеток штаммов 7790 и 9070 необходима более низкая концентрация ПАВ *N. vaccinii* К-8.

Дальнейшие эксперименты показали, что снижение концентрации ПАВ в препарате 2 штамма К-8 до 0.42 и 0.21 мг/мл (разбавление исходного препарата ПАВ в 2 и 4 раза соответственно) практически не влияло на выживаемость клеток *X. vesicatoria* 7790, которое составляло 20–25% и было таким же, как и после обработки препаратом 2 с более высокой концентрацией ПАВ (рис. 2а; табл. 2). Однако при концентрации препарата ПАВ 0.085–0.105 мг/мл (разбавление препарата 2 в 8 и 10 раз) наблюдали снижение количества живых клеток до 2–5% (рис. 2а).

Обработка суспензии клеток *P. corrugate* 9070 как исходным, так и разбавленным препаратом 2 *N. vaccinii* К-8 (концентрация ПАВ до 0.085 мг/мл) не сопровождалась существенным изменением количества живых клеток, которое для всех исследованных в диапазоне 0.085–0.85 мг/мл концентраций

Таблица 2. Выживаемость фитопатогенных бактерий при действии препаратов ПАВ *N. vaccinii* К-8

Тест-культура	Препарат	Выживаемость клеток, % через	
		1 ч	2 ч
<i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i> 7696	1	1.17 ± 0.05	1.76 ± 0.08
	2	1.7 ± 0.08	2.5 ± 0.12
<i>X. vesicatoria</i> 7790	1	0.37 ± 0.02	2.08 ± 0.10
	2	22.2 ± 1.11	20.8 ± 1.04
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> УКМ В-1049	1	0.1 ± 0.01	0.6 ± 0.03
	2	8.8 ± 0.44	4.5 ± 0.23
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 8571	1	1.86 ± 0.09	0.7 ± 0.03
	2	2.8 ± 0.14	1.25 ± 0.06
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1015	1	0.42 ± 0.02	0.14 ± 0.01
	2	1.14 ± 0.06	0.35 ± 0.02
<i>P. corrugate</i> 9070	1	22.4 ± 1.12	0
	2	18.8 ± 0.94	12.2 ± 0.61
<i>P. syringae</i> УКМ В-1027	1	51.1 ± 2.55	28.2 ± 1.14
	2	24.7 ± 1.23	4.7 ± 0.23
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> УКМ В-1154	1	3.8 ± 0.19	3.5 ± 0.18
	2	0.22 ± 0.01	0

Примечание. Количество клеток фитопатогенных бактерий до внесения препаратов *N. vaccinii* К-8 составляло 10^5 – 10^6 КОЕ/мл. Концентрация ПАВ в препаратах 1 и 2 – 0.85 мг/мл.

ПАВ составляло от 12 до 20%. При дальнейшем снижении концентрации ПАВ в препарате 2 до 0.042–0.021 мг/мл (разбавление исходного препарата в 20–40 раз) выживание клеток постепенно увеличивалось до 80% (рис. 2б).

Таким образом, ингибирующее действие препарата 2 штамма К-8 с концентрацией ПАВ 0.042–0.085 мг/мл на *X. vesicatoria* 7790 и *P. corrugate* 9070 сравнимо с таковым препаратом 2 *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017, содержащим 0.15 и 0.4 мг/мл ПАВ соответственно (см. рис. 2 и табл. 1), что может быть объяснено различным химическим составом исследуемых ПАВ.

Учитывая достаточно сильное антимикробное действие препарата ПАВ штамма К-8 в виде супернатанта культуральной жидкости (препарат 1), которое не уступало таковому препарату 2 (раствор очищенных ПАВ), мы предположили, что *N. vaccinii* К-8 синтезирует и другие, отличные от ПАВ, антимикробные метаболиты. В пользу этого предположения свидетельствовали и данные по влиянию препарата 3 штамма К-8 (водная фаза после экстракции ПАВ из супернатанта) на фитопатогенные бактерии, выживание которых после обработки таким препаратом составляло всего 0.2–1%. Отметим, что как и для штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017, после экстракции ПАВ из

супернатанта культуральной жидкости *N. vaccinii* К-8 последний не обладал поверхностно-активными свойствами, что позволяло утверждать об отсутствии ПАВ в препарате 3 штамма К-8.

В литературе нам не удалось обнаружить сведений о синтезе представителями рода *Nocardia* поверхностно-активных веществ с антимикробными свойствами. В то же время известно, что бактерии рода *Nocardia* синтезируют различные антимикробные метаболиты, не снижающие поверхностное натяжение [18–24]. Это Цефамицин С (цефалоспориин II поколения, продуцент *Nocardia lactamdurans* NRRL 3802) [18], бис-(2-этилгексил) фталат, бис-(5-этилгептил) фталат (*Nocardia levis* МК-VL 113) [19], Амицилин (1,1-дихлоро-4-этил-5-(4-нитро-фенил)-гексан-2-он, продуцент *Nocardia* sp. ALAA 2000) [20], Трансвалецин А (хелатный комплекс цинка и органических кислот с замещенными фенольными и тиазолидиновыми группами, *Nocardia transvalensis* IFM 10065), Нокобактин NA (липидорастворимый хелатный Fe-содержащий комплекс, *Nocardia asteroides* ATCC 3318) [21], Нокатиоцин (гликотииогексидная структура, *Nocardia* sp. ATCC 202099) [22], Бразилибактин А (*Nocardia brasiliensis* IFM 0995) [23], которые эффективны как против грамположительных и грамотрицательных бактерий, так и не-

которых грибов. Нокарацин и Бразилихинон D, синтезируемые *N. brasiliensis* IFM 0667 [23], а также Нокардитиацин (тиопептид) *Nocardia pseudobrasiliensis* IFM 0757 [24] в основном действуют на кислотоустойчивые бактерии. Кроме того, Бразилибактин А и Бразилихинон D проявляют цитотоксическую активность против лейкемии мышей L1210 и клеток KB карциномы человека, а Нокарацин — по отношению к HL-60 клеткам лейкемии человека [23]. Мы предполагаем, что подобные антимикробные вещества может синтезировать и штамм *N. vaccinii* К-8, что будет предметом наших дальнейших исследований.

Перспективы практического использования препаратов *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *N. vaccinii* К-8. Имеющиеся в литературе сведения об антимикробных по отношению к фитопатогенным микроорганизмам свойствах ПАВ касаются в основном их действия на микромицеты [3, 25–27], в то же время исследованию антибактериальной активности таких препаратов уделяется значительно меньше внимания.

Так, известно, что итурин и сурфактин (липopeптиды *B. subtilis* OG) в концентрации 5 мг/мл проявляли антимикробное действие по отношению к *X. campestris* и *X. axonopodis* [28]. Установлено, что механизм действия данных ПАВ состоит в повреждении бактериальной клеточной стенки. Отметим, что исследованные нами препараты ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *N. vaccinii* К-8 были эффективны против фитопатогенных бактерий в концентрациях на один-два порядка ниже (0.085–0.85 мг/мл).

В работе [29] показана возможность использования клеток *B. subtilis* 6051, а также их метаболитов (сурфактин) в борьбе с фитопатогенными бактериями *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, поражающими корни арабидопсиса. Минимальная ингибирующая концентрация сурфактина составляла 25 мкг/мл. Результаты, приведенные в настоящей работе, свидетельствуют, что препарат ПАВ (препарат 2) *N. vaccinii* К-8 (42 мкг/мл) вызывал гибель 60% клеток *P. corrugate* 9070 (рис. 26). Определению минимальной ингибирующей концентрации препаратов ПАВ штаммов ИМВ В-7241, ИМВ Ас-5017 и К-8 будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Наши данные показывают возможность применения в качестве антимикробного по отношению к фитопатогенным бактериям препарата супернатанта культуральной жидкости *N. vaccinii* К-8 (без дополнительного выделения ПАВ и других веществ), что значительно удешевляет технологию получения. Отметим, что одним из факторов, сдерживающих промышленное производство микробных ПАВ, является дорогостоящая процедура выделения и очистки целевого продук-

та, представляющая в большинстве случаев экстракцию органическими растворителями [30]. Однако в последнее время разработаны и другие, более дешевые и безопасные методы выделения ПАВ: осаждение сульфатом аммония, экстракция нетоксичным метил-трет-бутиловым эфиром, кристаллизация, ультрафильтрация, сорбция на полистирольных матрицах и активированном угле, ионообменная хроматография [30].

Результаты, представленные в настоящей работе, могут быть использованы для разработки безотходной биотехнологии на основе *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 с целью получения микробных препаратов различного биологического действия. Так, при получении препаратов ПАВ штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 осажденные клетки могут быть использованы для очистки воды от нефти [6]; полученный супернатант культуральной жидкости — для дальнейшего выделения ПАВ с антимикробными (в том числе, и по отношению к фитопатогенным бактериям) свойствами. Учитывая, что водная фаза, оставшаяся после экстракции ПАВ, активизировала рост клеток, необходимо в дальнейшем изучить перспективность ее использования для стимулирования роста микроорганизмов и растений.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что препараты ПАВ *N. vaccinii* К-8, *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 обладают антимикробными свойствами по отношению к ряду фитопатогенных бактерий. Эффективность исследуемых препаратов зависит от степени их очистки, времени экспозиции и концентрации ПАВ. Полученные результаты являются перспективными для разработки экологически безопасных биопрепаратов для контроля численности фитопатогенных бактерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kalyani R., Bishwambhar M., Suneetha V. // Int. Res. J. Pharm. 2011. V. 2. № 8. P. 11–15.
2. Kulakovskaya T.V., Golubev W.I., Tomashevskaya M.A., Kulakovskaya E.V., Shashkov A.S., Grachev A.A., Chizhov A.S., Nifantiev N.E. // Mycopathologia. 2010. V. 169. № 2. P. 117–123.
3. Varnier A.L., Sanchez L., Vatsa P., Boudesocque L., Garcia-Brugger A., Rabenoelina F., Sorokin A., Renault J.H., Kauffmann S., Pugin A., Clement C., Bailleul F., Dorey S. // Plant Cell Environ. 2009. V. 32. № 2. P. 178–193.
4. Grover M., Nain L., Singh S.B., Saxena A.K. // Curr. Microbiol. 2010. V. 60. № 2. P. 99–106.
5. Velho R.V., Medina L.F.C., Segalin J., Brandelli A. // Folia Microbiol. (Praha). 2011. V. 56. № 4. P. 297–303.
6. Гвоздяк Р.И., Пасичник Л.А., Яковлева Л.М., Мороз С.М., Литвинчук О.О., Житкевич Н.В., Ходос С.Ф., Буценко Л.М., Данкевич Л.П., Гриник И.В.,

- Патыка В.Ф. Фитопатогенные бактерии. Бактериальные заболевания растений. Киев: НВП "Интерсервис", 2011. 444 с.
7. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 1. С. 58–63.
 8. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 5. С. 544–550.
 9. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 3. С. 304–310.
 10. Пирог Т.П., Гриценко Н.А., Хомяк Д.И., Конон А.Д., Антонюк С.И. // Микробиол. журн. 2011. Т. 73. № 4. С. 15–24.
 11. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.А. // Микробиология. 2008. Т. 77. № 6. С. 749–757.
 12. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 651–658.
 13. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Иутинская Г.А. // Микробиол. журн. 2012. Т. 74. № 1. С. 20–27.
 14. Пирог Т.П., Игнатенко С.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 4. С. 436–442.
 15. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софилканич А.П., Скочко А.Б. // Микробиол. журн. 2011. Т. 73. № 3. С. 14–20.
 16. Das P., Mukherjee S., Sen R. // J. Appl. Microbiol. 2008. V. 104. № 6. P. 1675–1684.
 17. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
 18. Kaglival L.D., Survase S.A., Singhal R.S. // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. № 9. P. 2600–2606.
 19. Kavitha A., Prabhakar P., Vijayalakshmi M., Venkateswarlu Y. // Lett. Appl. Microbiol. 2009. V. 49. № 4. P. 484–490.
 20. El-Gendy M.M.A., Hawas U.W., Jaspars M. // J. Antibiot. (Tokyo). 2008. V. 61. № 6. P. 379–386.
 21. Hoshino Y., Chiba K., Ishino K., Fukai T., Igarashi Y., Yazawa K., Mikami Y., Ishikawa J. // J. Bacteriol. 2011. V. 193. № 2. P. 441–448.
 22. Leet J.E., Li W., Ax H.A., Matson J.A., Huang S., Huang R., Cantone J.L., Drexler D., Dalterio R.A., Lam K.S. // J. Antibiot. (Tokyo). 2003. V. 56. № 3. P. 232–242.
 23. Tsuda M., Yamakawa M., Oka S., Hoshino Y., Mikami Y., Sato A., Fujiwara H., Ohizumi Y., Kobayashi J. // J. Nat. Prod. 2005. V. 68. № 3. P. 462–464.
 24. Mukai A., Fukai T., Hoshino Y., Yazawa K., Harada K., Mikami Y. // J. Antibiot. (Tokyo). 2009. V. 62. № 11. P. 613–619.
 25. Jadhav M., Kagalkar A., Jadhav S., Govindwar S. // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2011. V. 133. № 11. P. 1347–1356.
 26. Petatán-Sagahón I., Anducho-Reyes M.A., Silva-Rojas H.V., Arana-Cuenca A., Tellez-Jurado A., Cárdenas-Álvarez I.O., Mercado-Flores Y. // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. № 9. P. 5522–5537.
 27. Raaijmakers J.M., De Bruijn I., Nybroe O., Ongena M. // FEMS Microbiol. Rev. 2010. V. 34. № 6. P. 1037–1062.
 28. Etcheagaray A., de Castro Bueno C., de Melo I.S., Tsai S.M., Fiore M.F., Silva-Stenico M.E., de Moraes L.A., Teschke O. // Arch. Microbiol. 2008. V. 190. № 6. P. 611–622.
 29. Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M. // Plant. Physiol. 2004. V. 134. № 1. P. 307–319.
 30. Mukherjee S., Das P., Sen R. // Trends Biotechnol. 2006. V. 24. № 11. P. 509–515.

Effect of Surface-Active Substances of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* K-8 on Phytopathogenic Bacteria

T. P. Pirog^{a, b}, A. D. Konov^b, A. P. Sofilkanich^c, and G. A. Iutinskaya^a

^a Zabolotnyi Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Zabolotnoho 154, Kiev, 03680 Ukraine

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

e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Received July 5, 2012

Abstract—The effect of surface-active substances (SAS's) of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* K-8 on phytopathogenic bacteria has been studied. It was shown that the survival of cells (10^5 – 10^7 in a milliliter) of the *Pseudomonas* and *Xanthomonas* phytopathogenic bacteria was found to be 0–33% after treatment with SAS preparations of the IMV Ac-5017 and IMV B-7241 strains for 2 h (0.15–0.4 mg/mL). In the presence of *N. vaccinii* K-8 SAS preparations (0.085–0.85 mg/mL), the number of cells of the majority of the studied phytopathogenic bacteria decreased by 95–100%. These data show prospects for using microbial SAS's for the construction of ecologically friendly drugs for regulating the number of phytopathogenic bacteria.

УДК 541.123:546.21'831'832

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА MFS-ТРАНСПОРТЕРА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ CefT В *Acremonium chrysogenum* И *Saccharomyces cerevisiae*

© 2013 г. М. В. Думина*, А. А. Жгун*, И. В. Керпичников*, А. Г. Домрачева*, М. И. Новак*,
А. Я. Валиахметов**, Д. А. Кнорре***, Ф. Ф. Северин***, М. А. Эльдаров*, Ю. Э. Бартошевич*

*Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312;
e-mail: DuminaMaria@gmail.com

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

***Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, 119899

Поступила в редакцию 26.12.2012 г.

Созданы вектора для экспрессии MFS транспортера CefT в *Acremonium chrysogenum*, продуценте бета-лактамного антибиотика цефалоспорина С, в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* в виде гибридного белка, слитого с синим флуоресцентным белком СФР. Исследован характер субклеточной локализации CefT-СФР гибрида в клетках дрожжей. Показано, что гибридный белок CefT-СФР способен комплементировать функции генов *qdr3*, *tro1*, *tro3*, кодирующих ортологичные MFS-транспортеры сахаромицетов, обеспечивая устойчивость соответствующих штаммов к спермидину, бромистому этидию, гигромицину В. Методом агробактериального переноса получены трансформанты высокопродуктивного штамма *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D, экспрессирующие ген *cefT-cfp*. Показано, что конститутивная экспрессия CefT в *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D приводит к изменению профиля биосинтеза цефалоспорина С и его предшественников: снижению содержания конечного продукта в культуральной жидкости на 25–35% при одновременном росте содержания его интермедиатов.

DOI: 10.7868/S0555109913040041

Цефалоспорины – обширный класс антибиотиков с мощным бактерицидным действием, низкой токсичностью, широким терапевтическим диапазоном [1]. Исходным субстратом для получения более 50 наименований полусинтетических цефалоспоринов 5 поколений является природный бета-лактамный антибиотик цефалоспорин С (цефС), продуцируемый аскомицетом *A. chrysogenum* [2].

На протяжении последних тридцати лет был достигнут значительный прогресс в селекции промышленных штаммов *A. chrysogenum* – суперпродуцентов цефС, изучении биохимических путей биосинтеза пенициллинов и цефалоспоринов у *Penicillium chrysogenum* и *A. chrysogenum*, соответственно, идентификации генов, контролирующих биосинтез этих бета-лактамов и характера их регуляции [3].

В то же время, несмотря на многолетние исследования *A. chrysogenum*, биохимические, физиологические и молекулярно-генетические отличия промышленных штаммов *A. chrysogenum*, приводящие к усилению продукции цефС, остаются во многом неизученными.

Известно, что на внутриклеточном уровне биосинтез цефС строго компартиментализован [4].

Эффективность процессов транспорта интермедиатов биосинтеза цефС между этими компартаментами и экспорта собственно цефС наружу из клетки вносит существенный вклад в общий уровень продукции цефС, соотношение выхода конечного продукта и промежуточных форм в процессе ферментации [3].

В результате последних исследований были идентифицированы гены *cefT*, *cefM* *cefP* *A. chrysogenum*, кодирующие мембранные транспортеры, отвечающие за внутриклеточный транспорт цефС, его интермедиатов и экспорт цефС из клетки в среду культивирования [5, 6].

Таким образом, данные гены являются перспективными мишенями для создания рекомбинантных штаммов *A. chrysogenum* с улучшенными производственными характеристиками. Одним из таких генов является *cefT* *A. chrysogenum*, кодирующий белок, относящийся к обширному семейству MFS транспортеров. В работе, посвященной открытию этого белка и выяснению его роли в регуляции продукции цефС [5], было показано, что дополнительная экспрессия двух-четырёх копий гена приводит к 100% повышению уровня биосинтеза цефС либо смеси β-лактамов (цефалоспорины, изопенициллин N (IPN), пенициллин N (PenN)) в штамме *A. chrysogenum* C10.

Таблица 1. Штаммы микроорганизмов, использованные в работе

Штамм	Генотип	Источник
<i>A. chrysogenum</i> ATCC 11550	штамм дикого типа, продуцент цефалоспорины С	АТСС, США, [10]
<i>A. chrysogenum</i> ВКМ F-4081D	штамм-суперпродуцент цефалоспорины С	Лабораторная коллекция, [11]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL0	ЕНА101 рTiBo542ΔТ-region Mop ⁺	[12]
<i>S. cerevisiae</i> YPH857	МАТ α , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>cyh2R</i>	[13]
<i>S. cerevisiae</i> AD1-8u ⁻	МАТa <i>pdr1-3 his1 ura3 Δyor1::hisG Δsnq2::hisG Δpdr5::hisG Δpdr10::hisG Δpdr11::hisG Δycf1::hisG Δpdr3::hisG Δpdr15::hisG</i>	[14]
<i>S. cerevisiae</i> BY4741 Δybr043c	BY4741; Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YBR043c::kanMX4	Euroscarf collection, acc.no.Y03180
<i>S. cerevisiae</i> BY4741 Δypr156c	BY4741; Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YPR156c::kanMX4	Euroscarf collection, acc.no.Y05571
<i>S. cerevisiae</i> BY4741 Δyil028w	BY4741; Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YLL028w::kanMX4	Euroscarf collection, acc.no.Y01516

Но при этом инактивация гена не оказывает значительного влияния на уровень антибиотикообразования в анализируемом штамме *A. chrysogenum*, указывая на существование альтернативных транспортеров β-лактамов соединений [7]. В более поздних исследованиях, выполненных на штамме *A. chrysogenum* 84-3-87, было показано, что повышение экспрессии *cefT* оказывает незначительный либо слабый отрицательный эффект на выход цефС [8]. В работе, посвященной характеристике нового гена-регулятора *cefR* [9] показано, что *cefR* регулирует транскрипцию *cefT*, снижение уровня экспрессии *cefT* сопровождается повышением секреции цефС в культуральную жидкость.

Таким образом, данные о функциональной активности CefT и роли белка в биосинтезе цефС в *A. chrysogenum* на настоящий момент остаются во многом неясными и противоречивыми.

Проблема изучения внутриклеточной компартиментализации и функционирования таких белков, как CefT, непосредственно на клетках *A. chrysogenum* осложняется рядом методических проблем (гетерогенность мицелия, сложность получения мембранных фракций и т.д.) и неизученностью самого генома *A. chrysogenum*. Перспективной альтернативой в этом плане является использование дрожжей-сахаромицетов как гетерологичного модельного объекта. Дрожжи-сахаромицеты – один из наиболее изученных и популярных объектов современной молекулярной генетики, генетической инженерии и биотехнологии. Дрожжи являются низшими эукариотами и их клеточная организация во многом сходна с клеточной организацией других представителей аскомицетов, к которым принадле-

жит и *A. chrysogenum*. Сахаромицеты широко используются для отработки современных постгеномных подходов к анализу основных процессов, протекающих в эукариотической клетке, в том числе для структурно-функционального анализа мембранных белков и транспортных систем других организмов.

Цель исследования – разработка модельной системы на основе *S. cerevisiae* для более подробного изучения функций CefT, а также изучение эффекта повышенной экспрессии *cefT* на уровень продукции цефС и интермедиатов его синтеза в трансформантах высокопродуктивного штамма *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D, конститутивно экспрессирующего ген *cefT-cfp* гибрида.

МЕТОДИКА

Штаммы, используемые в работе. Использовали *A. chrysogenum* ATCC 11550 (дикий тип) и полученный мутагенезом и селекцией высокоактивный штамм ВКМ F-4081D; штаммы *S. cerevisiae* YPH857, AD1-8u⁻, BY4741 Δybr043c (ΔQdr3), BY4741 Δypr156c (ΔTro3), BY4741 Δyil028w (ΔTro1) – модельный реципиент для проверки работы экспрессионных кассет, характеристики функциональной активности CefT-CFP; *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 – донор для переноса экспрессионных кассет в клетки *A. chrysogenum*. Генотип штаммов, использованных в работе, приведен в табл. 1.

Создание кассет экспрессии CefT-CFP. Данные о последовательности *cefT* использовали из Genbank AJ487683. Для выделения кодирующей последовательности *cefT* (два экзона, разделенных интроном размером 61 п.н.) проводили ПЦР-амплификацию с праймерами CEFTEX1F/CEFTTEX2R (табл. 2),

Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе

Олигонуклеотид	Последовательность (5' → 3')
CEFTEx1F	GATCGAATTCATGGCGAACAATTCTGGAACAACA
CEFTEx2R	GATCAGATCTGCAGGGTTGCTCACGTAGCTGATAGC
Hyg1	GTTACATGTAGATCTGATATTGAAGGAGCATTTTTTGGGCTTGGC
Hyg2	CTGATTAATACTAG TTAAGTGGTTCCCGGTTCGGCATCTAC
TDH_F_SAL	GTTTCGTGCACCTATTTTCGAGGACCTTGTCACCTT
TDH_R_R1	GGTGAATTCGTTTGTATTATGTGTGTTTATTC
gpdA_F	CCCGGTGTATGAAACCGGAA
AcrCefTEx1R	GGAAGAGACATACTAGATGATCCTGCGC
GKR1_N	GCAACATCCTGGGCCACAAG
GKF1_N	CGGTACAGCTCGTCCATGCCGT
Npt3F	GCTTAGCCGAATTGGC
Npt3R	TCCCAATCAGGCTTGA
Vir1	GGCTACATCGAAGATCGTATGAATG
Vir2	GACTATAGCGATGGTTACGATGTTGAC
cefTq3	TGTTGTTCGGATTCGGTGTTCGG
cefTq4	TTCCACATATCGGCAAGGGTGC
cefTq5	GACGACCTCAGGAGGGCTATCA
cefTq6	GATCTCCAGCTTGCCGTAGTCCG
actq1	CCGGTTTTCGCCGGTGATGATGCT
actq2	TGCTCAATGGGGTAGCGCAG

на матрице геномных ДНК *A. chrysogenum* (ATCC 11550 и ВКМ F-4081D). Полученный 1747 п.н. фрагмент гидролизовали по сайтам *EcoRI/BglII*, клонировали в *EcoRI/BamHI* вектор pZEN14, являющийся производным конструкции pTagCFP-N. Полученную плазмиду обозначили pZEN31. Кассету экспрессии *cefT* из pZEN31 в виде *SpeI*-фрагмента клонировали в *XbaI*-вектор pCambia1300. Результирующий вектор pZEN33 получили путем замены 35S-промотора промежуточной конструкции pZEN32 на *trpC*-промотор, амплифицированный с матрицы pZEN14 с праймерами Hyg1/Hyg2 (табл. 2) и клонированный по сайтам *BglII/RsrII*.

Для *S. cerevisiae*: кассету экспрессии со сплайсированной формой *cefT* *cefT*spl-*cfp*-PGKterm получали путем последовательного клонирования фрагментов *cefTEx1*, *cefTEx2*-CFP-PGKterm, амплифицированных с матрицы pZEN31, по сайтам *KpnI/HindIII*, *KpnI/SacI*. В результирующем векторе pZEN35 гибридный *cefT*-*cfp* экспрессировался под контролем индуцибельного 2HSE промотора из *S. cerevisiae*. Аналогичные векторы были получены на основе плазмид: 1) pRS423 (*his3*), pRS424 (*trp1*), где *cefT*spl-*cfp*-PGKterm был поставлен под контроль конститутивного *gpdA* промотора (pZEN37a, pZEN37b); 2) pRS425 (*leu2*), pRS426 (*ura3*) – *cefT*spl-*cfp*-PGKterm под контролем термоиндуцибельного 2HSE промотора (pZEN35c, pZEN35d); а также pZEN35e, где

2HSE в pZEN35d заменен на конститутивный TDH3 промотор. Последовательность промотора была получена методом ПЦР на матрице геномной ДНК *S. cerevisiae* BY4741 с праймерами TDH_F_SAL/TDH_R_R1 (табл. 2). Полученный 1000 п.н. фрагмент гидролизовали и встраивали в *SalI/EcoRI* вектор pZEN35d.

Флуоресцентная микроскопия. Микрофотографии клеток *S. cerevisiae*_CefT-CFP и *S. cerevisiae* PMA1-YFP были получены с помощью микроскопа Olympus BX2 (“Olympus”, Япония). В работе мы использовали наборы флуоресцентных фильтров U-N31044v2 (возбуждение 416–456 нм; дихроическое зеркало 455 нм, эмиссия 440–520 нм) и U-MN1BA3 (возбуждение 470–495 нм; дихроическое зеркало 505 нм, эмиссия 510–550 нм). Цветные фотографии получали путем искусственного наложения черно-белых изображений одного и того же участка, сфотографированного с разными наборами флуоресцентных фильтров в соответствующий цветовой канал: зеленый для CefT-CFP и красный для PMA1-YFP. Клетки для анализа выращивали на среде YNB до оптической плотности 0.8–1.0 D_{600} .

Анализ функциональной активности CefT-CFP. Чувствительность клеток *S. cerevisiae*_CefT-CFP к цитотоксичным агентам была проверена “спот-анализом” [20, 21]. Штаммы высевали на селек-

тивную YNB среду без урацила. Диапазон тестируемых концентраций соединений: циклогексимид D – 2–500 нг/мл, канамицин – 300 нМ, этидий бромистый – 5 мкг/мл, спермидин – 0.4 мМ, гигромицин В – 100 мкг/мл, этопозид – 100 мкг/мл, доксорубин – 20–100 мкМ.

Трансформация *A. chrysogenum* методом агробактериального переноса. Трансформацию *A. tumefaciens* AGL0 бинарным вектором pZEN33, кокультивирование *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D и *A. tumefaciens* AGL0_pZEN33 проводили в соответствии с протоколами [15, 16] с небольшими модификациями. Трансформационную смесь высевали на нитроцеллюлозные фильтры Hybond N на СМ-чашки, инкубировали 2 сут при 25°C в темноте. Селекцию проводили путем переноса фильтров на ПЦ-среду (г/л): бакто-пептон – 10, мальт-экстракт – 24, мальтоза – 40, агар – 25, рН 7.2), содержащую гигромицин В – 100 мкг/мл, цефатоксин – 200 мкг/мл, карбенициллин – 200 мкг/мл.

Молекулярный анализ клонов. ПЦР-скрининг колоний *A. chrysogenum*, выросших на селективной среде, проводили на наличие кассеты экспрессии с праймерами Hyg1/Hyg2, gpdA_F/AcrCefTEx1R, GKR1_N/GKF1_N, отсутствие плазмидной Npt3F/Npt3R и агробактериальной Vir1/Vir2 контаминации (последовательности праймеров приведены в табл. 2). Выделение геномной ДНК осуществляли в соответствии с протоколом <http://www.fgsc.net/Aspergillus/protocols/LgScaleDNAprep.pdf>, рестрицировали AgeI и переносили на мембрану Amersham Hybond-XL (“GE Healthcare”, США) методом щелочного переноса с предварительной обработкой HCl [17]. В качестве зондов использовали меченый альфа-P³²dATP с помощью набора DecaLabel DNA Labeling Kit (“Fermentas”, Литва) ПЦР-фрагмент, соответствующий TagCFP и амплифицированный с праймерами GKR1_N/GKF1_N (табл. 2). Визуализацию осуществляли с применением системы фосфоимиджер – Typhoon Trio+ (“PerkinElmer”, США), параметры: фильтр 390 BP, лазер 633 нм.

Ферментация *A. chrysogenum*. Отобранные клоны выращивали в пробирках со скошенной агаровой LPE средой в течение 14 сут при 28°C, переносили в 250 мл колбы Эрленмейера с 25 мл посевной среды (г/л): дрожжевой экстракт – 28.0, пептон – 10.0, мальт-экстракт – 9.2, мел – 4.0, соевое масло – 2.0, рН 7.3. 10% 48-часовой посевной культуры вносили в ферментационную среду (г/л): кукурузный экстракт – 100.0, декстрин 90%-ный раств. белый – 60.0, кукурузный крахмал – 25.0, КН₂РО₄ – 5.0, глюкоза – 5.0, MgSO₄ – 3.5, (NH₄)₂SO₄ – 14.0, мел – 10.0, соевое масло – 20.0, микроэлементы (мг/л): CuSO₄ · 5H₂O – 18, ZnSO₄ · 7H₂O – 150, MnSO₄ · 7H₂O – 30, FeSO₄ · 7H₂O – 70, рН 6.2–6.4. Ферментацию проводили в колбах Эрленмейера при 240 об/мин 120 ч, температура ферментации в первые 24 ч – 28°C, далее до кон-

ца процесса – 24°C. Образцы мицелия отбирали в начале ферментации 0, 48, 120 ч, фильтровали, промывали PBS, лиофилизировали и хранили при –70°C.

ВЭЖХ-анализ. Содержание цефС и его интермедиатов в культуральной жидкости определяли в подвижной фазе СТАВ–ацетонитрил–ортофосфорная кислота–вода на хроматографической колонке YMC-Pack ODS-A с диаметром частиц 5 мкм при расходе подвижной фазы 1.0 мл/мин, детекция при 254 нм.

Получение препаратов мРНК, кДНК. Тотальную РНК получали в соответствии с протоколом [18], образцы обрабатывали ДНКазой I (“Promega”, США). мРНК выделяли с использованием олиго (dT)30 магнитных частиц (“Силекс”, Россия). Синтез кДНК проводили с помощью обратной транскриптазы вируса лейкоза мышей Монони (“Силекс”, Россия) с олиго (dT)15 праймерами.

ПЦР-анализ в реальном времени. Праймеры для анализа экспрессии рассчитывали в среде Vector NTI 6 software [19]: cefTq3/cefTq4, cefTq5/cefTq6 (табл. 2), результаты нормализовали на ген “домашнего хозяйства” гамма-актин [20] (Actq1/Actq2 (табл. 2)). РТ-ПЦР реакции проводили с использованием SYBR Green I реакционной смеси (“Синтол”, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя на приборе CFX96 (“Bio-Rad”, США) при последовательном выполнении циклов: 1) 95°C 3 мин, 2) 95°C 10 с, 3) 60°C 50 с, 4) 40 циклов, 5) кривая плавления от 65.0 до 95.0°C, шаг 0.5°C 5 с. Результаты обрабатывали в среде Bio-Rad CFX Manager (“Bio-Rad”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гетерологичная экспрессия гибридного белка CefT-CFP в модельной системе *S. cerevisiae*. Для изучения возможности экспрессии в дрожжевой клетке функционально-активного гибрида CefT, слитого с флуоресцентным белком CFP, исследования характера его субклеточной локализации в клетке сахаромикетов была сконструирована панель эписомных и центромерных челночных векторов *S. cerevisiae*, несущих сплайсированную кДНК копию гена *cefT-cfp* под контролем термоиндуцибельного 2HSE или конститутивного промотора гена TDH3 (“Методика”, рис. 1).

В трансформантах штамма *S. cerevisiae* YPH857, полученных с помощью центромерного вектора pZEN35, содержащего ген *cefT-cfp* под контролем термоиндуцибельного промотора, по данным флуоресцентной микроскопии, присутствовал сигнал CFP, локализованный в плазматической мембране. Мембранная локализация исследуемого белка была подтверждена и в опытах по коэкспрессии CefT-CFP и гибридного белка PMA1-YFP, пред-

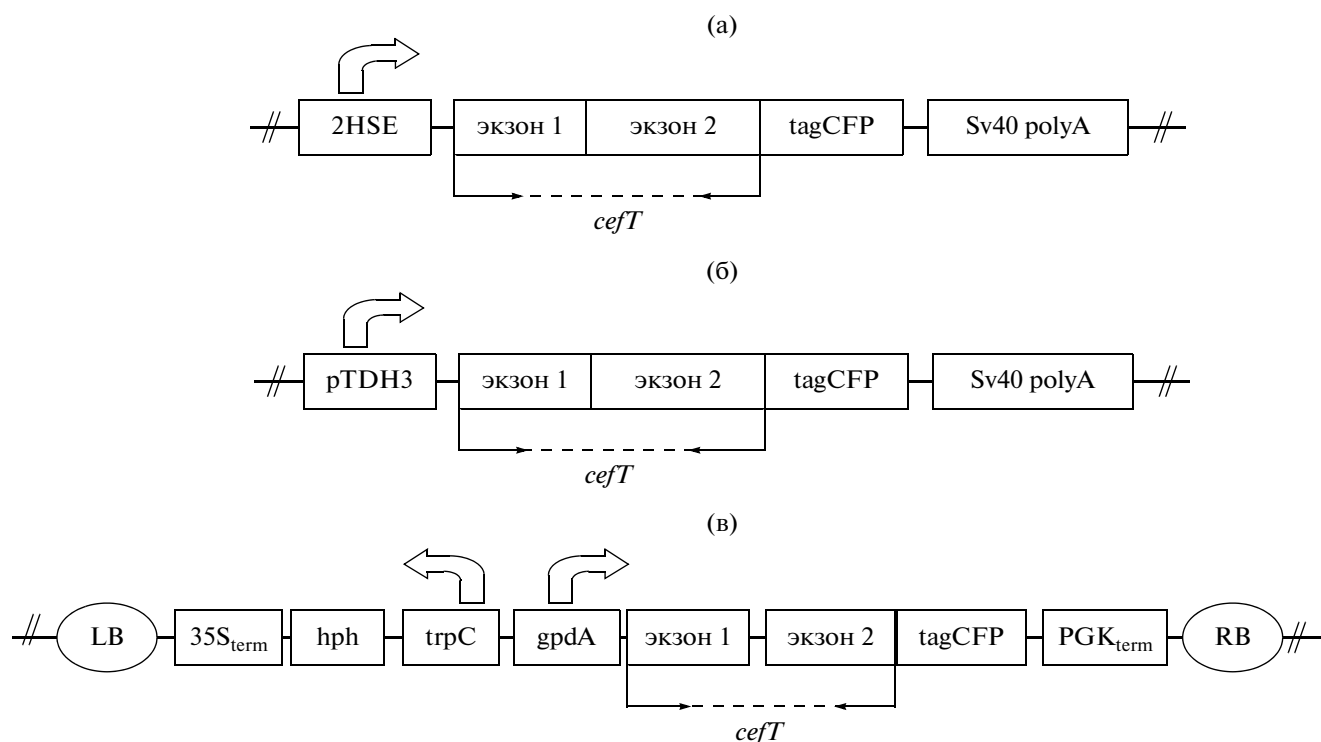


Рис. 1. Схемы кассет экспрессии гена *cefT-сfp*.
а – pZEN35, pZEN35d; б – pZEN35e; в – pZEN33.

ставляющего собой гибрид H^+ -АТФазы плазмалеммы дрожжевой клетки, слитый с последовательно желтого флуоресцентного белка YFP. Полученные данные (рис. 2а–2е) наглядно демонстрируют колокализацию двух белков в мембранных областях (200–1000 нм), по размерам значительно превышающим рафты “типа Р” (40–70 нм), характерные для локализации PMA1 в *S. cerevisiae* (рис. 2). В отличие от CefT-CFP, значительная часть PMA1-YFP также локализована и в рафтах “типа Р”.

По данным литературы, одной из функций CefT является также участие в детоксикации за счет транспорта изовалериановой и фенилуксусной кислот (ФУК) из клеток *A. chrysogenum* [5]. Но анализ степени устойчивости штамма *S. cerevisiae* YPH857_CefT-CFP к ФУК не выявил существенных отличий в параметрах роста относительно контрольного штамма *S. cerevisiae* YPH857, трансформированного “пустым вектором”, в широком диапазоне концентраций (300–1000 мкг/мл). Наблюдаемый эффект может быть объяснен низким уровнем экспрессии CefT в клетках *S. cerevisiae* либо относительно высоким базальным уровнем устойчивости контрольного штамма за счет функционирования эндогенных белков множественной лекарственной устойчивости дрожжевой клетки.

Для повышения чувствительности разрабатываемой модельной системы использовали два

подхода: 1) повышение уровня биосинтеза CefT-CFP за счет замены термоиндуцибельного 2HSE на сильный конститутивный TDH3 промотор в векторах экспрессии; 2) использование реципиентных штаммов дрожжей, дефектных по генам белков-транспортеров системы множественной лекарственной устойчивости (MDR), принадлежащих к классу ABC или MFS-белков.

Геном *S. cerevisiae* содержит 28 генов MFS белков [21], наиболее высокой степенью гомологии (50–56%) с CefT *A. chrysogenum* обладают белки TPO1, 2, 3, QDR2, 3. Штаммы, мутантные по этим генам, отличаются повышенной чувствительностью к ряду токсичных соединений [22–24]. Соответственно, для изучения возможного эффекта комплементации CefT в дальнейшей работе мы использовали полученные из коллекции European *Saccharomyces cerevisiae* archive for functional analysis нокаутные штаммы *S. cerevisiae* BY4741 Dyrb043c, Dyrp156c, Dyll028w (“Методика”, табл. 1), а также штамм AD1-8u⁻, несущий делеции по 8 PDR-генам, которые трансформировали векторами конститутивной или регулируемой экспрессии гибридного CefT-CFP.

Для анализа функциональной активности CefT-CFP в штамме *S. cerevisiae* AD1-8u⁻_pZen35d (2HSE промотор) применяли метод диффузии дисков в агар, которые обрабатывали бромистым этидием в концентрации 200–400 мкг/мл. Трансформанты

S. cerevisiae AD1-8u⁻_pZen35d обладали повышенной чувствительностью к агенту по сравнению с контрольным штаммом, трансформированным вектором без целевой последовательности. Возможная причина такой сенсбилизации штамма за счет экспрессии *cefT-cfp* может заключаться в формировании нерастворимых агрегатов данного белка при его сверхэкспрессии в клетках сахаромицетов, что в свою очередь может приводить к нарушению сборки и функционирования эндогенных MDR транспортеров дрожжей, снижая устойчивость трансформированных штаммов к анализируемому соединению. В пользу возможного формирования агрегатов CefT-CFP при его сверхэкспрессии свидетельствуют и данные анализа клеток дрожжей с помощью флуоресцентной микроскопии (рис. 2ж).

При определении степени чувствительности трансформантов серии BY4741 к ряду предполагаемых субстратов MFS транспортеров была выявлена способность гетерологично-экспрессированного CefT-CFP к частичной комплементации функций генов Qdr3, Tro3 (рис. 3). Трансформанты, полученные с использованием конструкции pZEN35d (промотор 2HSE), проявляли устойчивость к повышенным концентрациям спермидина (0.4 мМ), бромистого этидия (5 мкг/мл) по сравнению с реципиентными штаммами. Необходимо отметить, что при этом экспрессия *cefT* с сильным конститутивного промотора TDH3 была токсична для клетки и не обеспечивала формирования фенотипа устойчивости, видимо, в силу проблем с фолдингом и транспортом *cefT-cfp* гибрида.

Совокупность полученных данных свидетельствует в пользу того, что сконструированный на-

ми гибридный белок CefT-CFP проявляет свойства MFS MDR транспортера в дрожжевой клетке и сохраняет специфическую мембранную локализацию при гетерологичной экспрессии в клетке дрожжей.

Гомологичная экспрессия гибридного белка CefT-CFP в *A. chrysogenum*. Для экспрессии CefT-CFP гибрида в клетках *A. chrysogenum* была сконструирована плазмида pZen33, содержащая ген *cefT-cfp* под контролем конститутивного *gpdA* промотора *Aspergillus nidulans* (рис. 1). Трансформацию штамма *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D осуществляли методом агробактериального переноса (“Методика”), полученные гигромицин-устойчивые трансформанты анализировали с помощью ПЦР на наличие вставки переносимой кассеты экспрессии, отсутствие плазмидного гена *Npt*, агробактериальных *Vir*-генов. Хромосомная интеграция кассеты экспрессии для 6 из отобранных таким образом клонов была доказана методом Саузерн-гибридизации (рис. 4).

Для анализа экспрессии гена *cefT-cfp* в полученных трансформантах использовали метод ПЦР в реальном времени.

В предварительных экспериментах был исследован профиль экспрессии гена *cefT* в 2 штаммах: штамме дикого типа *A. chrysogenum* ATCC 11550 и высокопродуктивном штамме ВКМ F-4081D. Образцы культур отбирали в трех временных точках, соответствующих стадии начала ферментации – нулевая точка (окончание подготовки посевной культуры), 48 и 120 ч ферментации. Динамика экспрессии *cefT* в двух штаммах оказалась весьма различной: в штамме ATCC 11550 она закономерно возрастала к концу культивирования,

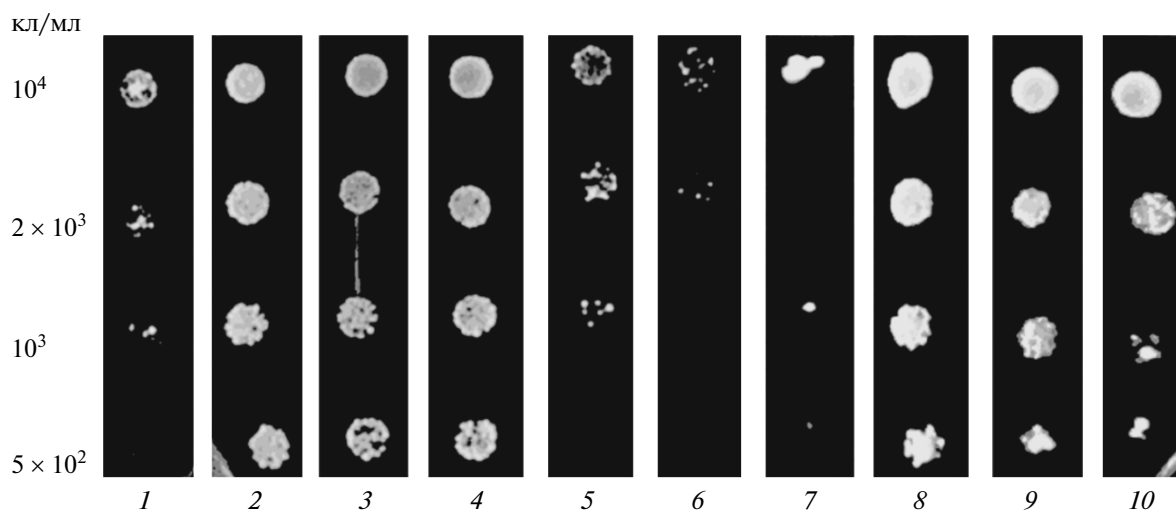


Рис. 3. Анализ устойчивости штаммов *S. cerevisiae*, экспрессирующих *cefT-cfp*, к бромистому этидию.

1 – *S. cerevisiae* BY4741 Δybr043c_pRS424 (К-); 2–4 – *S. cerevisiae* BY4741 Δybr043c_2HSE-CefT-CFP (индуцибельный промотор); 5–6 – *S. cerevisiae* BY4741 Δybr043c_TDH-CefT-CFP (конститутивный промотор); 7 – *S. cerevisiae* Δypr156c_pRS424 (К-); 8–10 – *S. cerevisiae* Δypr156c_2HSE-CefT-CFP (индуцибельный промотор).

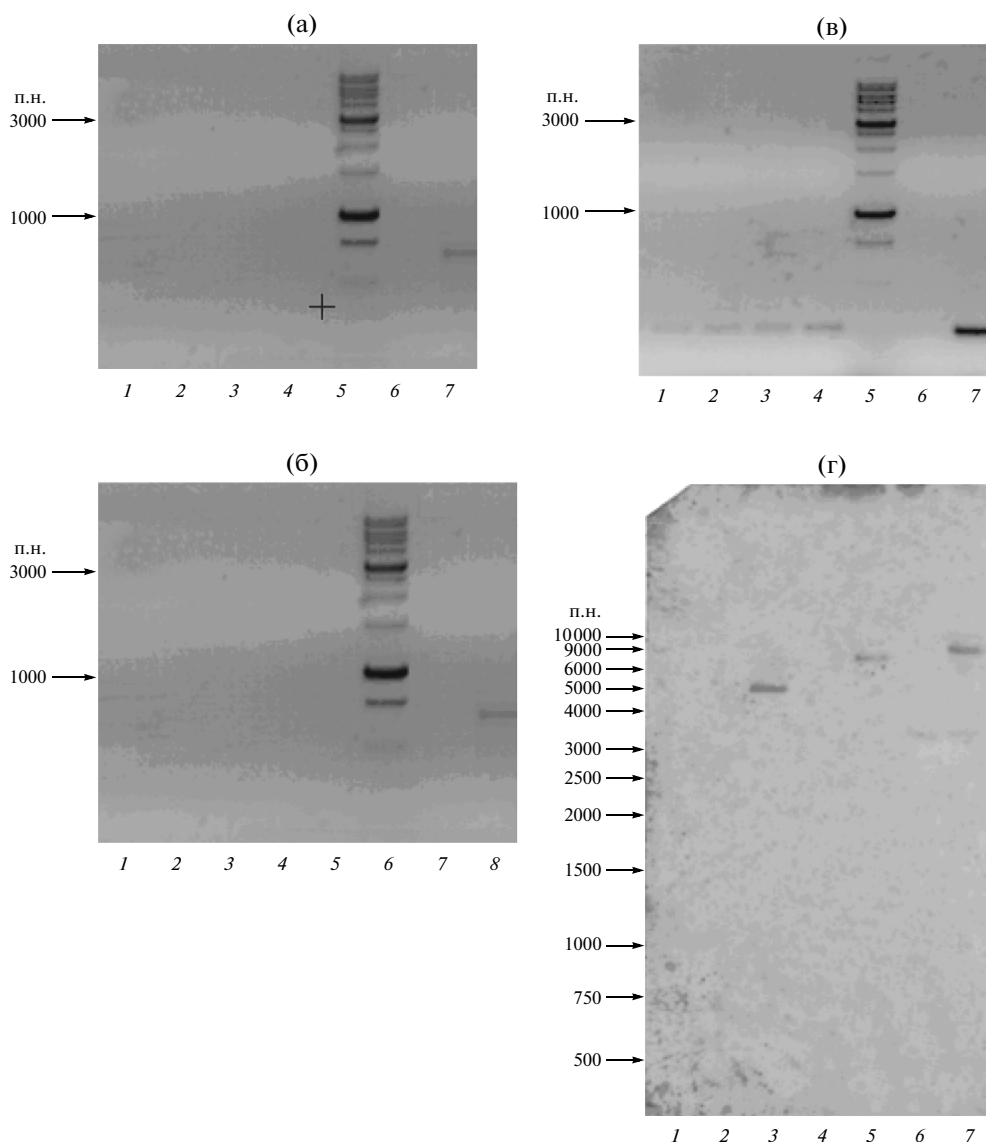


Рис. 4. Молекулярный анализ рекомбинантных клонов *A. chrysogenum*.

а – ПЦР-анализ, исключающий контаминацию последовательностями *vir*-генов *A. tumefaciens*: 1–4 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D_CefT-CFP, 5 – Mr (1 kb DNA ladder), 6 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D, 7 – *A. tumefaciens* AGL0.

б – ПЦР-анализ, исключающий контаминацию последовательностями *npt*-гена вектора pZen33: 1–4 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D_CefT-CFP, 5 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D, 6 – Mr (1 kb DNA ladder), 7 – *A. tumefaciens* AGL0, 8 – pZEN33.

в – ПЦР-анализ, подтверждающий присутствие последовательности гена *cfp*: 1–4 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D_CefT-CFP, 5 – Mr (1 kb DNA ladder), 6 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D, 7 – pZEN33.

г – Саузерн-блот анализ клонов *A. chrysogenum* VKM F-4081D_CefT-CFP: 1 – 1 kb DNA ladder, 2–7 рестрикция ДНК – *Age*I: 2 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D; 3 – pZEN33; 4 – *A. chrysogenum* 11550, 5–7 – *A. chrysogenum* VKM F-4081D_CefT-CFP.

в то время как для штамма VKM F-4081D наблюдалось ее снижение (рис. 5).

В отобранных клонах *A. chrysogenum* VKM F-4081D_pZen33 уровень экспрессии *cefT* был повышен в 2–9 раз по сравнению с контрольным штаммом VKM F-4081D (рис. 5).

ВЭЖХ-анализ супернатантов культуральной жидкости полученных штаммов показал, что уро-

вень синтеза целевого метаболита цефС в рекомбинантных штаммах снижен на 25–35% по сравнению с исходным штаммом при одновременном увеличении выхода его предшественников – дезацетил- (DAC), дезацетоксицефалоспорина С (DAOC, рис. 6, табл. 3).

Полученные данные соответствуют современным моделям регуляции биосинтеза и транспорта

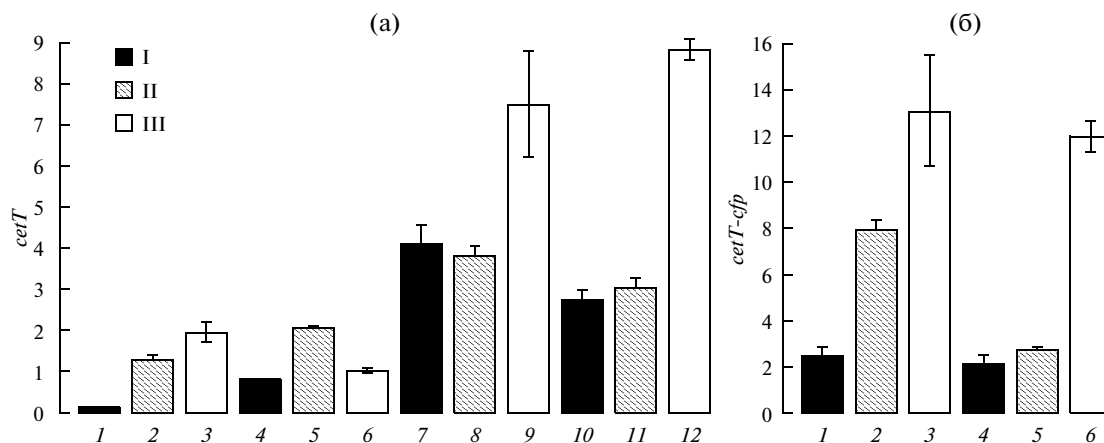


Рис. 5. Экспрессия *ceiT*, *ceiT-cfp* в штаммах *A. chrysogenum*. а – нормализованная экспрессия *ceiT* в *A. chrysogenum* 0 (I), 48 (II), 120 ч (III): 1–3 – ATCC 11550, 4–6 – ВКМ F-4081D, 7–9 – ВКМ F-4081D_CefT-CFP(6T2), 10–12 – ВКМ F-4081D_CefT-CFP(6T1). б – нормализованная экспрессия *ceiT-cfp* в *A. chrysogenum* 0 (I), 48 (II), 120 ч (III): 1–3 – ВКМ F-4081D_CefT-CFP(6T2); 4–6 – ВКМ F-4081D_CefT-CFP(6T1).

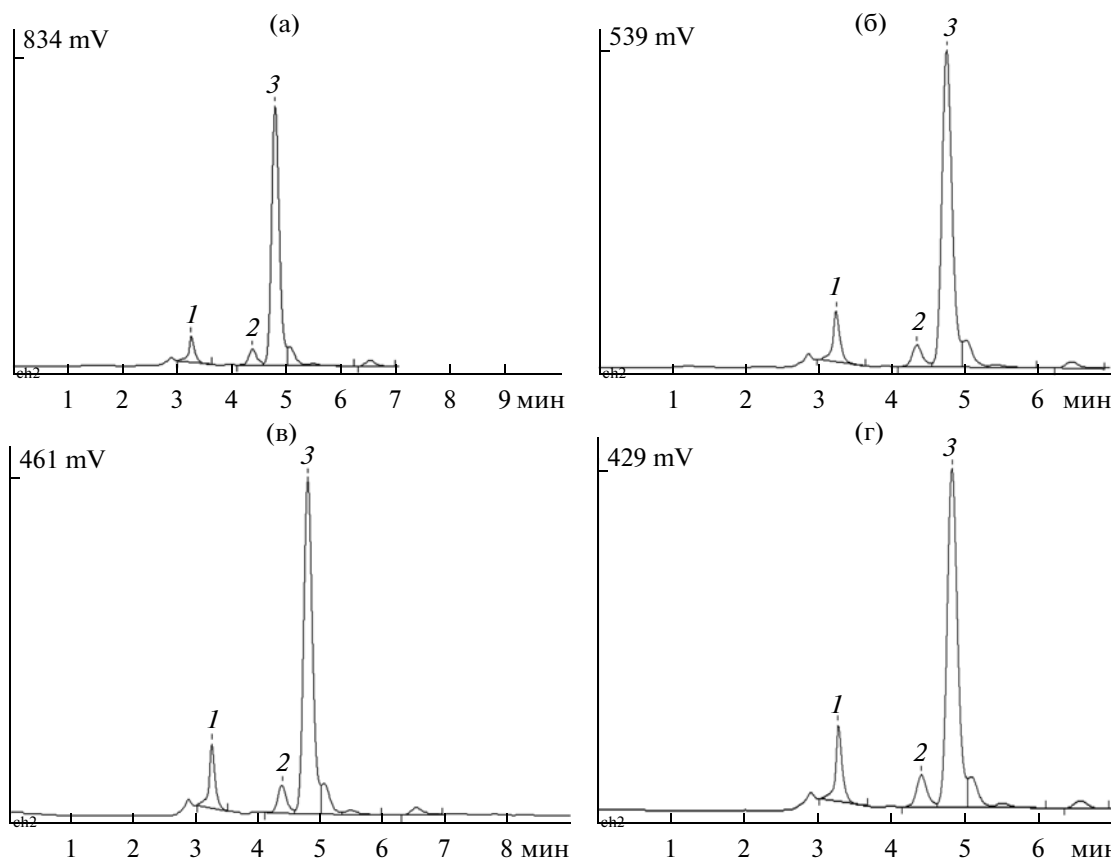


Рис. 6. ВЭЖХ-анализ супернатантов культуральной жидкости штаммов *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D_CefT-CFP. 1 – дезацетилцефалоспориин С, 2 – дезацетоксцефалоспориин С, 3 – цефалоспориин С. *A. chrysogenum*: а – ВКМ F-4081D, б–г – D – ВКМ F-4081D_CefT-CFP.

цефС с участием недавно открытого фактора CefR [9]. Согласно этой модели, снижение экспрессии *ceiT* к концу культивирования штаммов

A. chrysogenum должно коррелировать с низким содержанием промежуточных форм биосинтеза цефС, что подтверждается сравнением ВЭЖХ

Таблица 3. ВЭЖХ-анализ супернатантов культуральной жидкости штаммов *A. chrysogenum* ВКМ F-4081D_CefT-CFP

Образец	Активность в пробе, мкг/мл	Среднее содержание цеф С, мкг/мл; (отношение к контролю, %)	(DAC+DAOC)/цефС, %
<i>A. chrysogenum</i> ВКМ F-4081D	8811	9015.25 (100.0%)	13.5
	8755		
	9117		
	9378		
<i>A. chrysogenum</i> ВКМ F-4081D_CefT-CFP_6	7106	6756.50 (–25.1%)	18.7
	6789		
	6580		
	6551		
<i>A. chrysogenum</i> ВКМ F-4081D_CefT-CFP_9	6153	5980.67 (–33.7%)	21.3
	6136		
	5653		
<i>A. chrysogenum</i> ВКМ F-4081D_CefT-CFP_20	6016	6538.00 (–27.5%)	28.4
	6491		
	7107		

профилей супернатантов штаммов ATCC 11550 и ВКМ F-4081D. Повышение экспрессии *cefT* под контролем конститутивного промотора *gpdA* в трансформантах штамма ВКМ F-4081D должно приводить к обратному эффекту, что и демонстрируют данные ВЭЖХ-анализа (рис. 6, табл. 3).

Надежды на использование гена *cefT* как перспективной мишени генетических манипуляций для создания рекомбинантных штаммов *A. chrysogenum* с повышенным уровнем продукции цефС связаны с ранними работами по изучению функций этого гена, проведенными на штамме *A. chrysogenum* C10 – “умеренном продуценте” с уровнем биосинтеза цефС порядка 1–2 мг/мл [5]. Способность CefT к транспорту производных цефС была показана и в исследованиях по метаболической инженерии *P. chrysogenum*, посвященных созданию рекомбинантных штаммов–продуцентов *ad7-ACSSA* (адилоил-7-амино-3-карбамоилоксиметил-3-цефем-4-карбоновой кислоты) [7]. На основании результатов этих работ было высказано предположение, что CefT является специфическим транспортером цефС, недостаток функции CefT должен приводить к накоплению цефС внутри клеток *A. chrysogenum*, приводя также к ингибированию активности CefEF – одного из белков, осуществляющих “поздние” реакции биосинтеза цефС. Таким образом, усиление экспрессии *cefT* должно обладать двояким позитивным эффектом – повышением “пропускной” способности системы транспорта цефС и эффективности биосинтеза цефС [7].

Полученные нами данные для штамма ВКМ F-4081D противоречат этой гипотезе. Конститутивная экспрессия *cefT-cfp* приводила к накоплению в культуральной среде рекомбинантных штаммов *A. chrysogenum* смеси пенамов (пенициллин N, изопенициллин N) и цефемов (дезацетил-, дезацетоксицефалоспорин, цефалоспорин С) – интермеди-

атов биосинтеза цефС. При этом выход конечного продукта цефС был снижен. Сходные результаты по снижению уровня продукции цефС при попытке сверхэкспрессии *cefT* в высокопродуктивном штамме *A. chrysogenum* были получены и другими авторами [8].

Эти данные, а также результаты исследования активности CefT в гетерологичной системе дрожжей-сахаромицетов свидетельствуют в пользу широкой субстратной специфичности изучаемого белка, способного осуществлять экспорт структурно-родственных β-лактамов, а также полиаминов, бромистого этидия, гигромицина В и, видимо, целого ряда других соединений. Различия в эффектах повышенной экспрессии *cefT* на штаммах “дикого типа”, умеренных продуцентах и высокоактивных штаммах не противоречат этой гипотезе и соответствуют современным представлениям о характере регуляции процессов биосинтеза и транспорта цефС в ходе антибиотикообразования у *A. chrysogenum* [9].

Таким образом, вопрос о существовании специфического транспортера цефС остается открытым. Отметим, что попытки обнаружения белков-транспортеров пенициллинов у *P. chrysogenum* также пока не увенчались успехом [25].

Очевидно, что идентификация, клонирование, разработка систем гетерологичной экспрессии новых белков-транспортеров бета-лактамовых антибиотиков должна иметь весьма существенное фундаментальное и прикладное значение. Немаловажную роль в этих исследованиях могут сыграть модельные системы структурно-функционального анализа мембранных транспортеров с использованием клеток сахаромицетов, эксперименты по созданию рекомбинантных промышленных штаммов грибов-продуцентов бета-лактамов подобные описанным в настоящей работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Программа “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 годы, соглашение № 8778).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Demain A.L., Elander R.P. // Antonie Van Leeuwenhoek. 1999. V. 75. № 1–2. P. 5–19.
2. Elander R.P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 61. № 5–6. P. 385–392.
3. Martín J.F., Ullán R.V., García-Estrada C. // Microbial. Biotechnol. 2010. V. 3. № 3. P. 285–299.
4. Van de Kamp M., Driessen A.J., Konings W.N. // Antonie Van Leeuwenhoek. 1999. V. 75. № 1–2. P. 41–78.
5. Ullán R.V., Liu G., Casqueiro J., Gutierrez S., Banuelos O., Martín J.F. // Mol. Gen. Genomics. 2002. V. 267. № 5. P. 673–683.
6. Teijeira F., Ullán R.V., Guerra S.M., García-Estrada C., Vaca I., Martín J.F. // Biochem. J. 2009. V. 418. № 1. P. 113–124.
7. Nijland J.G., Kovalchuk A., van den Berg M.A., Bovenberg R.A.L., Driessen A.J. // Fungal Genet. Biol. 2008. V. 45. № 10. P. 1415–1421.
8. Liu Y., Gong G., Xie L., Yuan N., Zhu C., Zhu B., Hu Y. // Mol. Biotechnol. 2010. V. 44. № 2. P. 101–109.
9. Teijeira F., Ullán R.V., Fernández-Aguado M., Martín J.F. // Metab. Eng. 2011. V. 13. № 5. P. 532–543.
10. Newton G.G., Abraham E.P. // Biochem. J. 1956. V. 62. № 4. P. 651–658.
11. Патент РФ. 2011. № 2426793.
12. Lazo G.R., Stein P.A., Ludwig R.A. // Biotechnology (NY). 1991. V. 9. № 10. P. 963–967.
13. Spencer F., Hugerat Y., Simchen G., Hurko O., Connelly C., Hieter P. // Genomics. 1994. V. 22. № 1. P. 118–126.
14. Decottignies A., Grant A.M., Nichols J.W., de Wet H., McIntosh D.B., Goffeau A. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 20. P. 12612–12622.
15. Khang C.H., Park S.Y., Rho H.S., Lee Y.H., Kang S. // Methods Mol. Biol. 2006. V. 344. № 2. P. 403–420.
16. Жгун А.А., Иванова М.А., Домрачева А.Г., Новак М.И., Эльдаров М.А., Скрябин К.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 6. С. 663–670.
17. Kouprina N., Eldarov M., Moyzis R. // Genomics. 1994. V. 21. № 1. P. 7–17.
18. Felipe M.S.S., Rogelin R., Azevedo M.O., Astolfi-Filho S. // Biotechnol. Techniq. 1993. V. 7. № 9. P. 639–644.
19. Lu G., Moriyama E.N. // Brief Bioinform. 2004. V. 5. № 4. P. 378–88.
20. Díez B., Velasco J., Marcos A.T., Rodríguez M., de la Fuente J.L., Barredo J.L. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2000. V. 54. № 6. P. 786–791.
21. Nelissen B., De Wachter R., Goffeau A. // FEMS Microbiol. Rev. 1997. V. 21. № 2. P. 113–134.
22. Tomitori H., Kashiwagi K., Asakawa T., Kakinuma Y., Michael A.J., Igarashi K. // Biochem. J. 2001. V. 353. № 3. P. 681–688.
23. Tenreiro S., Vargas R.C., Teixeira M.C., Magnani C., Sá-Correia I. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 327. № 3. P. 952–959.
24. Uemura T., Tachihara K., Tomitori H., Kashiwagi K., Igarashi K. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 10. P. 9646–9652.
25. Fernández-Aguado M., Teijeira F., Martín J.F., Ullán R.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 97. № 2. P. 795–808.

Functional Characteristic of the CefT Transporter of the MFS Family Involved in the Transportation of beta-lactam Antibiotics in *Acremonium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae*

M. V. Dumina^a, A. A. Zhgun^a, I. V. Kerpichnikov^a, A. G. Domracheva^a, M. I. Novak^a, A. Ya. Valiachmetov^b, D. A. Knorre^c, F. F. Severin^c, M. A. Eldarov^a, and Yu. E. Bartoshevich^a

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

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

^c Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119899 Russia

e-mail: DuminaMaria@gmail.com

Received December, 26, 2012

Abstract—Vectors for the expression of the CefT transporter of the MFS family in *Acremonium chrysogenum*—a producer of beta-lactam antibiotic cephalosporin C—and in *Saccharomyces cerevisiae* as a fusion with the cyan fluorescent protein (CFP) have been created. The subcellular localization of the CefT-CFP hybrid protein in yeast cells has been investigated. It was shown that the CefT-CFP hybrid protein is capable of complementation of the *qdr3*, *tpo1*, and *tpo3* genes encoding for orthologous MFS transporters of *Saccharomycetes*, making the corresponding strains resistant to spermidine, ethidium bromide, and hygromycin B. High-yield strain VKM F-4081D of *A. chrysogenum*, expressing the *cefT-cfp* fusion, was obtained by an agrobacteria conjugated transfer. It was also shown that the constitutive expression of *cefT* in *A. chrysogenum* VKM F-4081D led to a change in the biosynthetic profiles of cephalosporin C and its precursors. This resulted in a 25–35% decrease in the finite product accumulated in the cultural liquid with a simultaneous increase in the concentration of its intermediators.

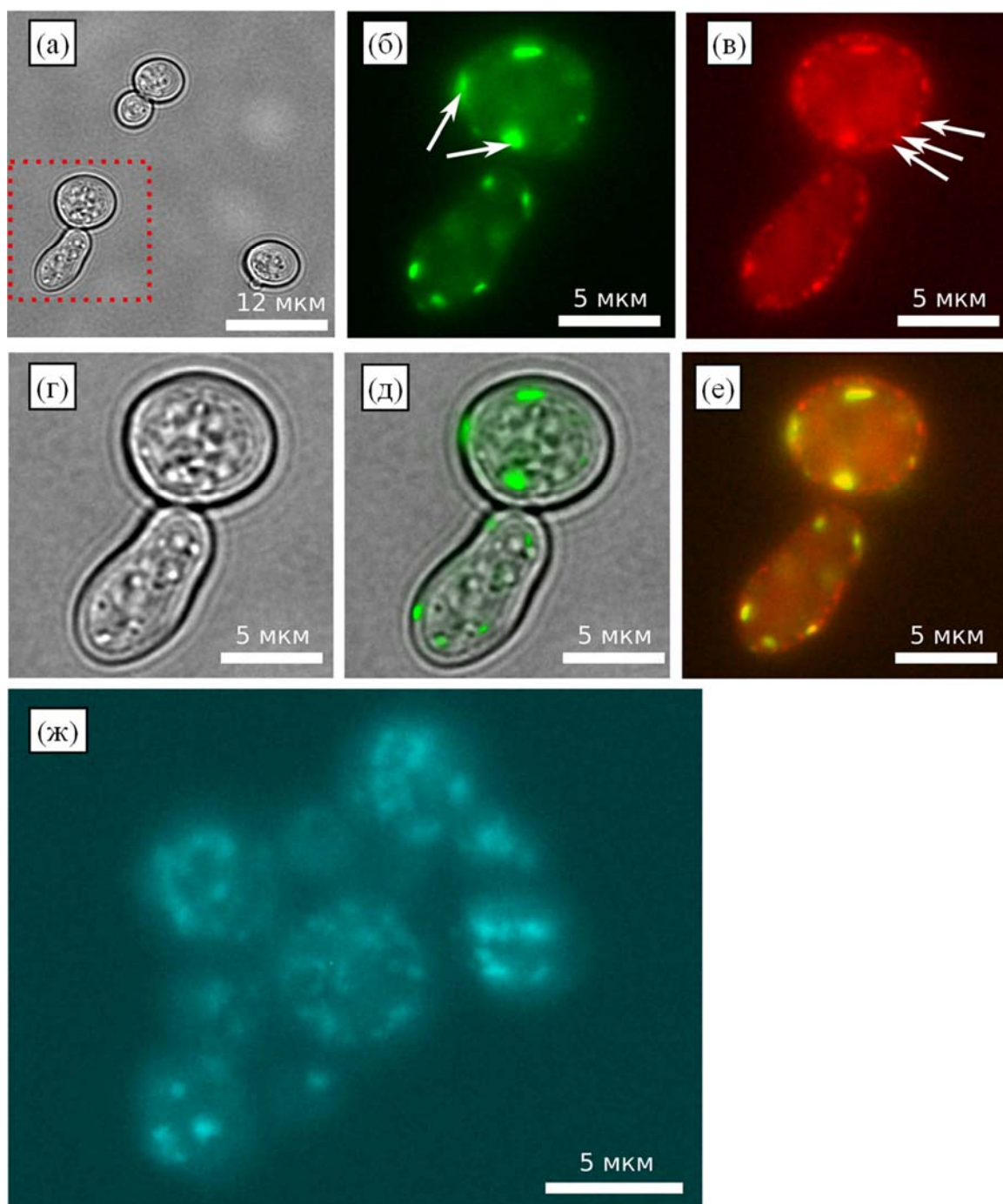


Рис. 2. Флуоресцентный анализ образцов *S. cerevisiae* YPH857_CefT-CFP/PMA1-YFP и AD1-8u⁺_CefT-CFP. Набор фильтров U-N31044v2 и U-MNIBA3 (см. “Методика”):

а - е – коэкспрессия CefT-CFP (из *A. chrysogenum*) и PMA1-YFP (из *S. cerevisiae*) в *S. cerevisiae* YPH857. а – фотография в проходящем свете (выделена зона дальнейших исследований); б, в – флуоресцентный анализ *S. cerevisiae* YPH857_CefT-CFP (зеленый) /PMA1-YFP (красный), стрелками указаны зоны свечения; г – фазовый контраст исследуемой области; д – наложение структуры клетки в проходящем свете (г) и флуоресценции CefT-CFP (б); е – наложение флуоресценций (оранжевый) CefT-CFP (б) и PMA1-YFP (в);

ж – флуоресценция CefT-CFP в клетках *S. cerevisiae* AD1-8u⁺_pZEN35d.

УДК 547.92

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ СТЕРОИДНОЙ МОЛЕКУЛЫ НА НАПРАВЛЕНИЕ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ ГРИБОМ *Curvularia lunata*

© 2013 г. В. А. Андрияшина, В. В. Ядерец, Т. С. Стыщенко, А. В. Дружинина, Н. Е. Войшвилло

Центр “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312

e-mail: andryushina@rambler.ru

Поступила в редакцию 08.11.2012 г.

Идентифицированы с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии, а также сравнением со стандартными образцами, основные и побочные продукты гидроксилирования мицелием *C. lunata* ВКПМ F-981 четырнадцати Δ^4 -3-кетостероидов рядов эстрана, андростана и прегнана и шести их Δ^5 -3 β -гидроксиданалогов. Полученные экспериментальные данные рассмотрены с точки зрения триангулярной модели субстрат-ферментного взаимодействия.

Выявлена зависимость направления гидроксилирования стероидной молекулы и ориентации гидроксигрупп от структуры исходного субстрата.

DOI: 10.7868/S055510991304003X

За период, прошедший после сообщения [1] в 1952 г. Петерсоном и Мюрреем о наличии у плесневого гриба *Rhizopus arrhizus* способности осуществлять 11α -гидроксилирование стероидов, была осуществлена микробная трансформация соединений ряда эстрана, андростана и прегнана. Было установлено, что микроскопические грибы всех классов могут вводить гидроксигруппы почти во все положения стероидной молекулы, причем более 300 штаммов проявляют способность к 7α - и 11α -гидроксилированию. Около 100 видов образуют смесь 11α - и 11β -гидроксисоединений, однако только единицы способны селективно вводить гидроксигруппы в 8β - и 11β -положения, доступ к которым, возможно, затруднен 18β - и 19β -метильными группами [2–8].

Вводить в стероиды 11β -гидроксигруппу способны штаммы рода *Curvularia*, в частности вид *C. lunata*, с помощью которого получен большой набор 11β -гидроксистероидов ряда андростана, прегнана и эстрана [3–6, 9–15]. Особенность гриба *C. lunata* заключается в осуществлении, главным образом, аксиального гидроксилирования. В зависимости от структуры Δ^4 -3-кетостероидов *C. lunata* преимущественно вводит гидроксигруппы в 11β - или 14α -, а также в 9α -положения молекулы. Побочные гидроксисоединения могут появляться вследствие 6β - и 7α -гидроксилирования, а также восстановления 17- и 20-кетогрупп [2–6].

Несмотря на большое количество данных по трансформации различных стероидов микроорганизмами, зависимость между строением стероидной молекулы и направлением ее гидроксилирования еще недостаточно изучена. Группой ученых

Оксфордского университета под руководством проф. Джонса на примере 5α -андростанов была разработана триангулярная модель субстрат-ферментного взаимодействия [16], основанная на предположении о том, что гидроксилирование стероидного субстрата в различные положения осуществляется одним и тем же ферментом [17].

Согласно этой модели, кислородные группы стероида при C3 и C17 (или C20) выполняют функцию связывания стероидного субстрата с ферментом, а направление вводимой в молекулу гидроксигруппы зависит от ориентации стероида по отношению к ферменту. Рассматриваются 4 теоретически возможные ориентации: **A** – нормальная (normal), **B** – нормальная перевернутая (normal inverted), **C** – альтернативная (reverse), **D** – альтернативная перевернутая (reverse inverted) (рис. 1). Ориентации **A** и **C** могут быть получены друг из друга вращением молекулы вокруг оси, перпендикулярной плоскости ее колец, а ориентации **B** и **D** вращением молекулы вокруг оси C3-C17 на 180° .

Модель Джонса учитывает, что замена водорода на гидроксильную группу в любой ориентации происходит с сохранением конфигурации. Гидроксилирование стероидов в 11α -положение в этой модели рассматривается как трансформация в ориентации **A** [16, 18]. На рис. 1 видно, что в альтернативной ориентации **C** наиболее вероятно гидроксилирование в 7α -положение, что было подтверждено экспериментально на 5α -Н-андростанах. При трансформации 16β -гидрокси-3-кетандростана (в ориентации **A**) и его 3β -гидроксиданалога (в ориентации **C**) соответствующие

11 α - и 7 α -гидроксипроизводные были получены с выходом 98 и 90% с помощью культуры *Rhizopus nigricans* [19] (рис. 2). С этой гипотезой согласуются также результаты ряда работ по гидроксильрованию микроскопическими грибами Δ^4 -3-кето-стероидов [4–6, 8, 9, 18].

Цель работы – трансформация с помощью штамма *Curvularia lunata* ВКПМ F-981 стероидов Δ^4 -3-кето- и Δ^5 -3 β -гидроксириядов с различными заместителями в кольце D и интерпретация экспериментальных данных с точки зрения триангулярной модели субстрат-ферментного взаимодействия, разработанной для 5 α -Н-стероидов.

МЕТОДИКА

Стероиды. Субстратами для микробиологической трансформации служили: эстр-4-ен-17 β -ол-3-он (нортестостерон – **1**), андрост-4-ен-17 β -ол-3-он (тестостерон – **2**), андрост-4-ен-3,17-дион (андростендион – **3**), андроста-1,4-диен-3,17-дион (андростадиендион – **4**), андрост-4-ен-9 α -ол-3,17-дион (9 α -гидроксиандростендион – **5**), 17 α -метил-андрост-4-ен-17 β -ол-3-он (17 α -метилтестостерон – **6**), андроста-4,6-диен-17 β -ол-3-он-17 α -кислоты пропионовой γ -лактон (спиродиен – **7**), прегн-4-ен-3,20-дион (прогестерон – **8**), прегн-4-ен-17 α -ол-3,20-дион (17 α -гидроксипрогестерон – **9**), 16 α ,17 α -оксидо-прегн-4-ен-3,20-дион (оксидо-прогестерон – **10**), прегн-4-ен-17 α ,21-диол-3,20-дион (кортексолон – **11**), 6 α -метил-прегн-4-ен-17 α ,21-диол-3,20-дион (6 α -метилкортексолон – **12**), 16 α -метил-прегн-4-ен-17 α ,21-диол-3,20-дион (16 α -метилкортексолон – **13**), 20 α -метил-прегна-1,4-диен-21 α -ол-3-он (**14**) и 3 β -гидроксианалоги **2**, **3**, **6**, **8**, **10**, **11** – андрост-5-ен-3 β ,17 β -диол (андростендиол – **2a**), андрост-5-ен-3 β -ол-17-он (андростенолон – **3a**), 17 α -метил-андрост-5-ен-17 β -ол-3-он (**6a**), прегн-5-ен-3 β -ол-20-он (прегненолон – **8a**), 16 α ,17 α -оксидо-прегн-5-ен-3 β -ол-20-он (оксидопрегненолон – **10a**), прегн-5-ен-3 β ,17 α ,21-триол-20-он (вещество “R” – **11a**) (рис. 2 и 3).

Микроорганизм и его культивирование. Культуру *Curvularia lunata* ВКПМ F-981 хранили на скошенной агаровой среде, содержащей (г/л): дрожжевой экстракт – 4.0, солодовый экстракт – 10.0, глюкозу – 10.0, агар – 25.0, pH 6.2–6.8. Выращивание гриба и трансформацию соединений проводили на качалке при скорости перемешивания 220 об/мин и температуре $29 \pm 1^\circ\text{C}$. Мицелий, предназначенный для трансформации, выращивали в 2 стадии. Споры гриба в возрасте 14–20 сут смывали со скошенного агара и переносили в 100 мл жидкой среды в конических колбах объемом 750 мл, содержащей (г/л): пептон – 5.0, дрожжевой экстракт – 5.0, соевая мука – 10.0, глюкоза – 20.0, KH_2PO_4 – 2.0, pH 5.4–5.6. Через

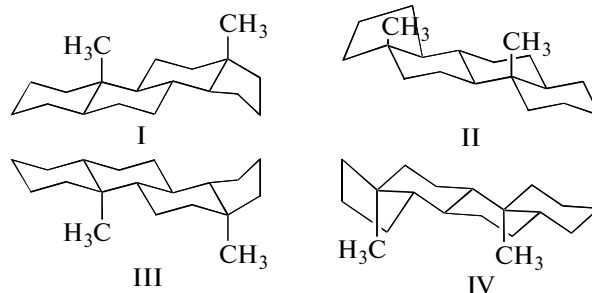


Рис. 1. Ориентации стероидной молекулы. I – нормальная, II – альтернативная, III – нормальная перевернутая, IV – альтернативная перевернутая.

3 сут полученную биомассу в количестве 10 об. % переносили в среду, содержащую (г/л): сахара – 30.0, дрожжевой экстракт – 5.0, NaNO_3 – 2.0, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 3.0, K_2HPO_4 – 1.0, KCl – 0.5, MgSO_4 – 0.5, рост в которой продолжался 20–24 ч. Мицелий отделяли от среды, промывали 0.7 М фосфатным буфером и использовали для трансформации.

Трансформация. Трансформация стероидов осуществлялась в 70 мл 0.7 М фосфатного буфера (pH 6.0–6.3), содержащего стероид, который вносили в буфер в зависимости от гидрофобности в количестве 1–15 г/л в виде мелкодисперсного порошка либо в виде водорастворимого комплекса с метил- или гидроксипропил- β -циклодекстрином. Отмытую от питательной среды биомассу вносили в буфер в количестве 10 г/л (сухой массы).

Через определенные интервалы времени инкубации отбирали пробы реакционной смеси. При наличии в пробах остаточного субстрата инкубацию продлевали до 48 ч. Стероиды извлекали этилацетатом, качественную оценку содержания продуктов трансформации в пробах проводили методом ТСХ. В конце трансформации мицелий отделяли от реакционной жидкости и экстрагировали отдельно биомассу и жидкую фазу. В случае присутствия стероидов в мицелии экстракты объединяли. Выделение основных гидроксистероидов осуществляли аналогично [14]. Побочные продукты трансформации, образовавшиеся в количестве менее 5%, не выделяли.

Для оценки количественного содержания стероидов в экстракте использовали методы препаративной ТСХ, ВЭЖХ и ^1H ПМР. Для ТСХ использовали стеклянные пластинки фирмы “Merck” (Германия). Структура полученных соединений установлена с помощью ^1H ПМР-спектроскопии и сравнением с известными образцами. Данные представлены в табл. 1 и 2.

Приборы. Спектры ПМР снимали на спектрометре АС200-31 (“Bruker”, Германия), масс-спектры – на масс-спектрометре MS-30 (“Kratos”, Великобритания).

Таблица 1. ¹H ПМР-спектры продуктов гидроксирования Δ⁴-3-кетостероидов (CDCl₃, δ)

Стероиды	18-Н	19-Н	4-Н	СНОН	Другие сигналы
14α-гидрокси-3*	0.91 с	1.15 с	5.63 с	4.30 с (14α-ОН)	
14α-гидрокси-4	1.06 с	1.25 с	6.077 т		6.23 кд J = 12 Гц, J = 1.8 Гц (2-Н) 7.033 д J = 10 Гц (1-Н)
9α, 14α-дигидрокси-3*	1.05 с	1.37 с	5.85 д	3.12 с (9α-ОН) 4.08 с (14α-ОН)	
11β, 14α-дигидрокси-3*	0.91 с	1.144 с	5.72 д J = 1.4 Гц	4.69 с (14α-ОН) 5.59 с (11β-ОН)	4.24 с (11α-Н)
11β-гидрокси-1	0.82 с	—	5.78 с	—	3.62 м (17-Н), 4.27 м (11α-Н)
11β-гидрокси-2	1.01 с	1.43 с	5.65 с		3.58 кд J = 8.8 Гц, J = 7.5 Гц (17α-Н) 4.36 м ΣJ = 9.4 Гц (11α-Н)
11β-гидрокси-6	0.89 с	1.13 с	5.65 с		1.238 с (17-Н), 4.09 кд (11α-Н)
7α-гидрокси-6	0.89 с	1.225 с	5.79 с		1.196 с (17-CH ₃) 3.95 кд (7β-Н)
7β-гидрокси-6	0.91 с	1.22 с	5.71 с		1.312 с (17-CH ₃) 4.04 кд (7α-Н)
11β, 17α-дигидрокси-8	1.01 с	1.41 с	5.66 с	2.72 уш. с (17-ОН)	2.27 с (21-Н), 4.45 м J = 3.1 Гц (11α-Н)
11β-гидрокси-8	0.99 с	1.43 с	5.66 с		2.1 с (21-Н) 3.16 м ΣJ = 12 Гц (17-Н)
7α-гидрокси-8	0.73 с	1.19 с	5.79 с		4.27 кд J = 3 Гц (11α-Н)
11β-гидрокси-7*	1.25 с	1.35 с	6.05 с	4.55 с (11β-ОН)	2.1 с (21-Н) 3.16 м (17-Н) 4.39 м (7β-Н)
11β-гидрокси-10	1.32 с	1.43 с	5.65 д J = 1.5 Гц		3.43 кд (7β-Н), 3.6 д (6α-Н) J _{6,7} = 3.54 Гц 4.4 кд ΣJ = 9.1 Гц (11α-Н)
11β-гидрокси-14	0.86 с	1.35 с	5.8 с		2.05 с (21-Н), 3.77 с (16-Н) 4.40 кд ΣJ = 8.2 Гц (11α-Н)
7β-гидрокси-14	1.02 с	1.24 с	6.1 д		4.15 кд (11α-Н), 6.03 д(2-Н), 7.24 д(1-Н)
14α-гидрокси-11*	0.71 с	1.02 с	5.81 с	4.01 м (14α-ОН)	4.2т J = 15.5 Гц (7-Н), 6.2д (2-Н), 7.05м (1-Н) 4.35 м (21-Н)
14α-гидрокси-13	0.75 с	1.15 с	5.73 с		1.18 с (3-Н), 4.45 м (21-Н)

* ПМР-спектры сняты в ДМСО, остальные – в CDCl₃.

Таблица 2. ^1H ПМР-спектры продуктов гидроксирования Δ^5 - 3β -гидрокси-стероидов (CDCl_3 , δ)

Δ^5 - 3β -гидроксистероид	18-Н	19-Н	3-Н β	6-Н	7-Н β	Другие сигналы
7 α -гидрокси- 2a *	0.61 с	0.89 с	3.27 т	5.4 кд	3.57 т	3.42с (17 α -Н)
7 α -гидрокси- 3a	0.86 с	0.99 с	3.55 т	5.6 кд J = 5.3	3.94 т	1.65 т (8-Н)
7 α -гидрокси- 6a	0.81 с	1.05 с	3.52 т	5.61 д	4.15 т	1.2 с (17-CH ₃)
11 β -гидрокси- 8a **	0.73 с	1.14 с	3.38 т	5.44 кд	—	4.03 д (11 α -Н), 2.02 с (21-Н)
7 α ,11 β -дигидрокси- 8a	0.87 с	1.25 с	3.55 т	5.5 д	3.96 т	4.45 т (11 α -Н), 2.3 (4-Н), 2.12 с (21-Н)
7 α -гидрокси- 10a **	0.88 с	0.92 с	3.38 т	5.43 кв	3.61 т	1.92 с (21-Н)
7 α -гидрокси- 11a	0.47 с	0.87 с	3.35 т	4.41 д	3.59 т	4.35 м (21-Н) 5.14 с (17-ОН)
11 β -гидрокси- 11a *	0.71 с	1.17 с	3.25 т	5.12 уш. с	—	4.27 т (11 α -Н) 4.15 м (21-Н) 5.15 с (17-ОН)

* ДМСО, ** ДМСО + CDCl_3 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 3 приведены результаты гидроксирования мицелием *C. lunata* ВКПМ F-981 14 Δ^4 -3-кетостероидов рядов эстрана, андростана и прегнана (**1–14**), структуры которых представлены на рис. 2. В табл. 4 представлены результаты трансформации 6 Δ^5 - 3β -гидроксианалогов соединений **2**, **3**, **6**, **8**, **10**, **11** (рис. 3).

Для того чтобы избежать влияния компонентов ростовой среды на ход трансформации всех указанных соединений, использован мицелий, выращенный в отсутствие стероидных индукторов и отмытый от среды в конце фазы логарифмического роста. Длительность инкубации стероидов с мицелием составляла не более 48 ч, в основном 20–24 ч. При более длительном процессе накапливались продукты деструкции субстрата. В табл. 3 и 4 показано, что большинство стероидов трансформировали в солюбилизованном виде с помощью метил- либо гидроксипропил-циклодекстрина.

В предыдущей работе [14] нами было установлено отсутствие влияния используемых циклодекстринов на направление основных и побочных реакций гидроксирования. Не оказывая влияния на направление гидроксирования, циклодекстрины ускоряли процесс введения основной гидроксигруппы, и тем самым препятствовали образованию побочных продуктов из соединений **2–4**, **9**, **8a**. Например, конверсия солюбилизованного тестостерона **2** в 11 β -гидрокси-**2** при нагрузке субстрата 4 г/л заканчивалась с выходом продукта 70% без образования побочных соединений (табл. 3). Но трансформация **2** в виде микрокристаллов при нагрузке 2 г/л заканчивалась

образованием не более 30% 11 β -гидрокси-**2** и с примесью 10% побочного 6 β ,11 β -гидрокси-**2** [14]. Также в присутствии модифицированных циклодекстринов с высокой скоростью и практически без образования побочных гидроксипродуктов протекала трансформация Δ^5 - 3β -гидроксистероидов **2a** и **3a** (табл. 4).

В табл. 3 показано, что гидроксирование Δ^4 -3-кетостероидов происходило преимущественно в 11 β -положение за исключением 3,17-дикетоандростанов **3**, **4**, **5**, трансформация которых завершилась образованием 14 α -гидроксипроизводных и в небольшом количестве побочных продуктов. В работах Доновой с соавт. сообщается, что при трансформации **3**, **4**, **5** с помощью грибов *C. lunata* ВКМ F-644 или *Gongronella butleri* ВКМ F-1033 образуется до 7% побочных 6 α -, 6 β -, 7 α - и 7 β -гидроксистероидов [13, 20]. Отсутствие 19-метильной группы в **1** не влияло на результат его гидроксирования. Конверсия нортестостерона **1** и тестостерона **2** в 11 β -гидрокси-**1** и 11 β -гидрокси-**2** с помощью *C. lunata* ВКПМ F-681 составила более 80%. Эти продукты выделены с выходом 65 и 62% соответственно. В работе с *C. lunata* NRRL 2380 [9] показано, что наличие $\Delta^{9,10}$ -двойной связи в **1** также не отражается на способности штамма к 11 β -гидроксированию.

Данные трансформаций **1–14** (табл. 3, 5) свидетельствуют о значительном влиянии кислородсодержащих заместителей в кольцах А и Д на состав продуктов гидроксирования. Наличие в **6**, **7** и **14** при С17 заместителей не природного происхождения способствовало нехарактерному для *C. lunata* экваториальному гидроксированию в 6 α - и 7 β -положения и образованию в случае **6** по-

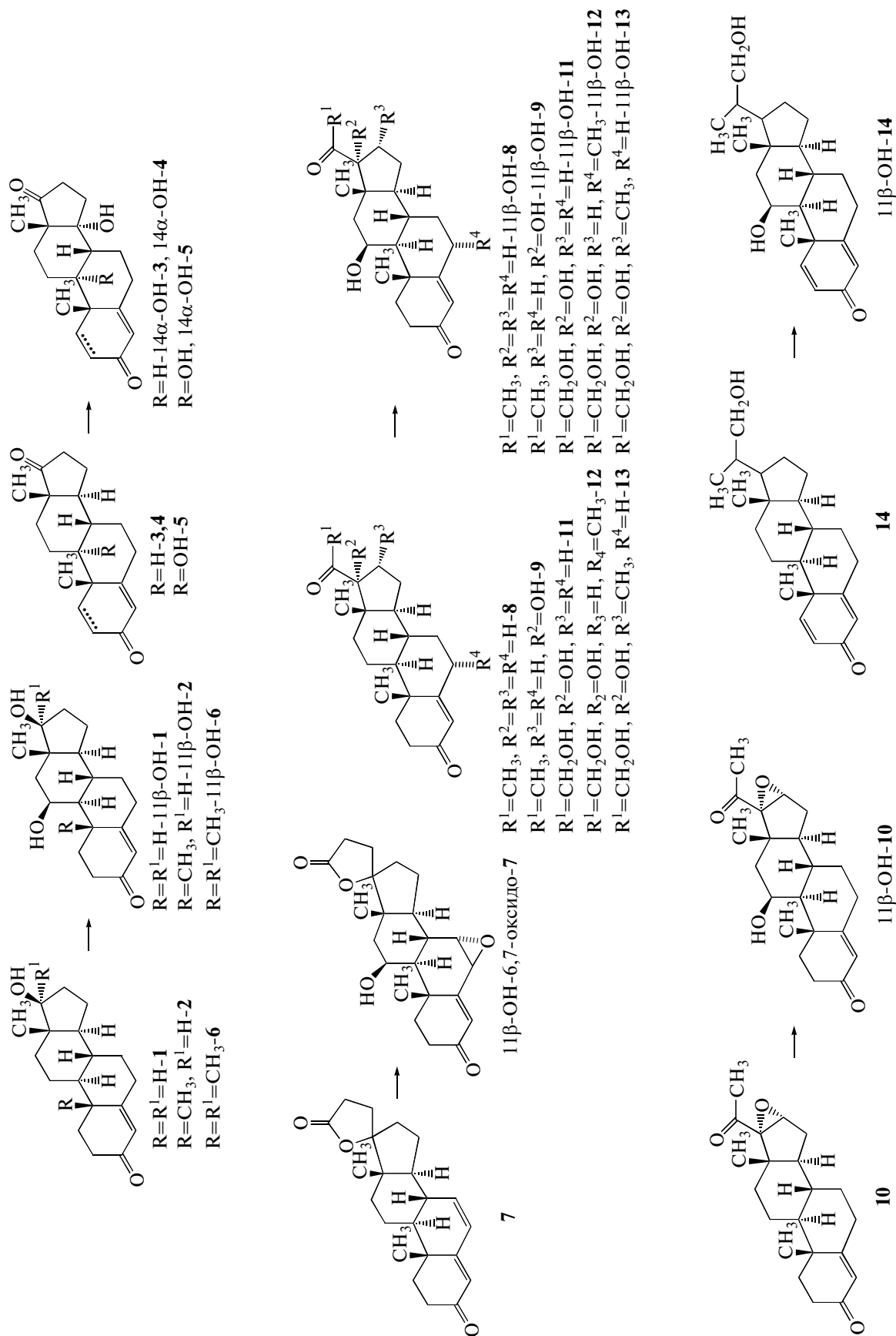


Рис. 2. Гидроксилирование Δ^4-3 -кетостероидов мицелием *Sarvalaria lanata* ВКПМ F-981 (номер соединения см. в методике).

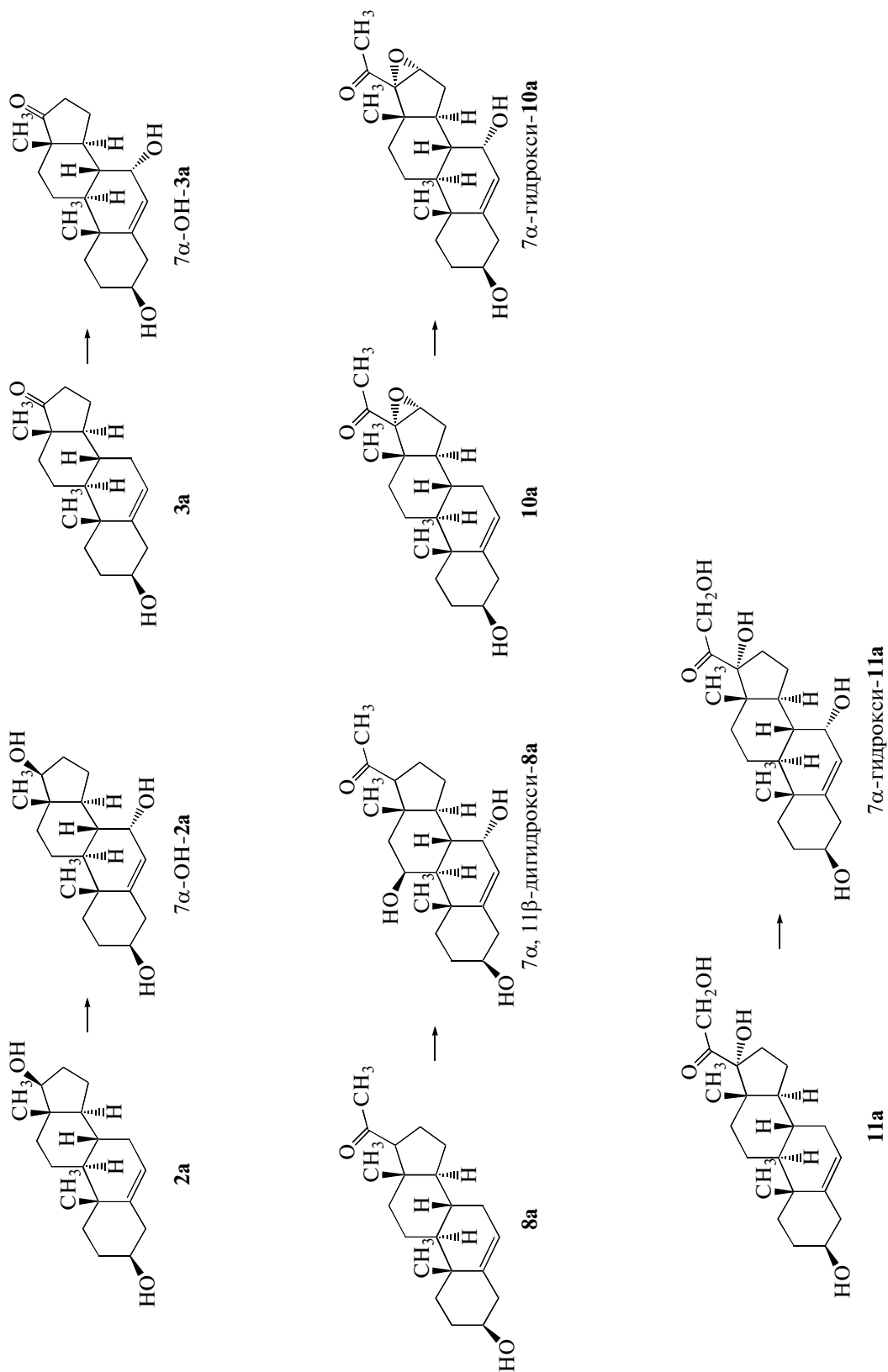


Рис. 3. Гидроксилирование Δ^5 -3 β -гидроксистероидов *S. litata* ВКПМ F-981 (номер соединения см. в методике).

Таблица 3. Гидроксилирование Δ^4 -3-кетостероидов мицелием *C. lunata* ВКПМ F-981 (структуру см. рис. 3)

Стероид			Продукт трансформации			
брутто формула	№	Нагрузка, г/л	основной	выход, %	побочный	выход, %
Андростаны						
$C_{18}H_{26}O_2$	1	2.0	11 β -гидрокси- 1	65	Не идентифицирован	—
$C_{19}H_{28}O_2$	2	4.0*	11 β -гидрокси- 2	62	—	—
$C_{19}H_{26}O_2$	3	6.0*	14 α -гидрокси- 3	58	11 β -гидрокси- 2	10
$C_{19}H_{24}O_2$	4	3.0*	14 α -гидрокси- 4	69	17-CO \rightarrow 17 β -ОН	5
$C_{19}H_{26}O_3$	5	2.0	9 α ,14 α -дигидрокси- 3	85	—	—
$C_{20}H_{30}O_2$	6	2.0*	11 β -гидрокси- 6	25	7 β -гидрокси- 6	20
			7 α -гидрокси- 6	30		
$C_{22}H_{28}O_3$	7	1.0*	11 β -гидрокси-6,7 α -эпоксид- 7	30	6 α ,7-эпоксид- 7	25
Прегнаны						
$C_{21}H_{30}O_2$	8	2.0*	11 β -гидрокси- 8	40	6 β -гидрокси- 8	10
			7 α -гидрокси- 8	40		
$C_{21}H_{30}O_3$	9	5.0*	11 β ,17 α -дигидрокси- 8	78	Не идентифицирован	<5%
$C_{21}H_{28}O_3$	10	1.0	11 β -гидрокси- 10	49	11 β ,14 α -дигидрокси- 10	10
$C_{21}H_{30}O_4$	11	10.0*	11 β -гидрокси- 11	56	14 α -гидрокси- 11	22
$C_{22}H_{32}O_4$	12	2.5	11 β -гидрокси- 12	50	14 α -гидрокси- 12	<5%
$C_{22}H_{32}O_4$	13	10.0*	11 β -гидрокси- 13	50	14 α -гидрокси- 13	12
$C_{22}H_{32}O_2$	14	2.0*	11 β -гидрокси- 14	43	7 β -гидрокси- 14	25
					7 β ,11 β -дигидрокси- 14 ГМПД	15

* Внесение стероида с использованием метил- или гидроксипропил- β -циклодекстрина.**Таблица 4.** Гидроксилирование Δ^5 -3 β -гидроксианалогов **2, 3, 6, 8, 10, 11** мицелием *C. lunata* ВКПМ F-981 (структуры см. рис. 3)

Стероид*			Продукт трансформации, выход			
брутто-формула	№, (см. табл. 1)	нагрузка, г/л	основной, %	побочный, %		
Андростаны						
$C_{19}H_{27}O_2$	3a	5.0	7 α -гидрокси- 3a	75–80	17-CO \rightarrow 17 β -ОН	<5%
$C_{19}H_{29}O_2$	2a	5.0	7 α -гидрокси- 2a	70–80	Не идентифицирован	—
$C_{20}H_{32}O_2$	6a	2.0	7 α -гидрокси- 6a	40–45	Не идентифицирован	—
Прегнаны						
$C_{21}H_{33}O_2$	8a	2.0	7 α ,11 β -дигидрокси- 8a	69	Не идентифицирован	—
$C_{21}H_{31}O_3$	10a	2.0	7 α -гидрокси- 10a	75	Не идентифицирован	—
$C_{21}H_{33}O_4$	11a	2.0	7 α -гидрокси- 11a	30	11 β -гидрокси- 11a	25

* Внесение стероида с использованием метил- β -циклодекстрина.

бочных соединений в количестве, превышающем количество 11 β -гидрокси-**6**.

Введение гидроксила в 11 β -положение Δ^4 -3-кетостероидов ряда прегнана происходило в первую очередь как основная реакция, которая протекала, согласно модели Джонса, в ориентации **D**. Как побочная реакция наблюдалось гидроксилирование в 6 β -, 7 α -, 7 β - и 14 α -положения, причем побочные продукты накапливались при

высоких нагрузках субстратов, для полной конверсии которых требовалось не менее 48 ч инкубации. Исключение составил прогестерон **8**, трансформация которого протекала с одновременным образованием моно-11 β - и 7 α -гидроксипроизводных в равном количестве — 40% (табл. 3). В отличие от 3,17-дикетоандростанов **3–5**, гидроксилирование которых происходило в ориентации **C** и основными продуктами трансформации были 14 α -гидроксипроизводные, у 3-кетопрегнанов **10–13** эта

Таблица 5. Изменение направления гидроксирования в зависимости от характера заместителей в кольцах А и Д стероидов, трансформируемых с помощью *C. lunata*

Шифр стероида, ссылка	Кислородсодержащий заместитель в кольцах А и Д		Положения вводимой гидроксигруппы,	
	при С3	при С17	основное	побочное
1	=O	–ОН	11β	14α
Δ ^{9,10} - 1 [3, 9]	=O	–ОН	11β	Н.д.
2	=O	–ОН	11β	6β, 11β
3	=O	=O	14α	11β, 17β
4	=O	=O	14α	Сл.
5	=	=O	14α	Н.д.
6	=O	–ОН	11β	7α + 7β
7	=O	–ОСО(СН) ₂	11β	6α
8	=O	–СОСН ₃	11β + 7α	6β
19-нор- 8 [3]	=O	–СОСН ₃	11β	Н.д.
Δ ^{8,9} - 8 [9]	=O	–СОСН ₃	9α, 14α	11β
9	=O	–ОН, –СОСН ₃	11β	Сл.
19-нор- 9 [3]	=O	–ОН, –СОСН ₃	11β	Н.д.
10	=O	=O, –СОСН ₃	11β	11β, 14α
11	=O	–ОН, –СОСН ₂ ОН	11β	14α
Δ ^{9,11} - 11 [20]	=O	–ОН, –СОСН ₂ ОН	14α	11β
12	=O	–ОН, –СОСН ₂ ОН	11β	14α
Δ ^{1,2} - 12 [15]	=O	–ОН, –СОСН ₂ ОН	11β	Н.д.
13	=O	–ОН, –СОСН ₂ ОН	11β	14α
14	=O	–СН(СН ₃)СН ₂ ОН	11β	7β + 7β, 11β
2a	–ОН	–ОН	7α	Сл.
3a	–ОН	=O	7α	Сл.
6a	–ОН	–ОН	7α	Н.д.
8a	–ОН	–СОСН ₃	7α, 11β	Н.д.
10a	–ОН	=O, –СОСН ₃	7α	Н.д.
11a	–ОН	–ОН, –СОСН ₂ ОН	7α	11β

Н.д. – данные отсутствуют, Сл. – следы неидентифицированных продуктов.

реакция протекала как побочная, и отсутствовала у 3-гидроксисоединений (табл. 3, 4).

При переходе от Δ⁴-3-кетостероидов к Δ⁵-3β-гидроксистероидам вместо основного 11β-гидроксирования (табл. 5) протекало 7α-гидроксирование в ориентации С с образованием из Δ⁵-3β-гидроксианалогов **2a**, **3a**, **6a**, **10a**, **11a** моно-7α-гидроксипроизводных с выходом до 80%. Исключением оказались соединения **8a** и **11a**. Из прегненолона **8a** был получен 7α, 11β-дигидрокси-**8a**, а при инкубации **11a** накопление 7α-гидрокси-**7a** происходило одновременно с образованием 11β-гидрокси-**11a** (табл. 4).

Результаты трансформации Δ⁴-3-кетостероидов **6** и **8**, а также Δ⁵-3β-гидроксистероидов **8a** и **11a**, 7α- и 11β-гидроксирование которых про-

исходило практически с равной интенсивностью и одинаковым выходом гидроксипродуктов, противоречат гипотезе, согласно которой введение 11β-гидроксила в молекулу стероида затруднено вследствие экранирования 11β-водорода углеродными группами при С10 и С13. Они также свидетельствуют о том, что существенную роль в изменении направления гидроксирования с 11α/β- на 7α- играет не изменение места двойной связи, а замена 3-СО-группы на 3-ОН-группу, что наблюдалось и в работе с 5α-Н-стероидами [19].

Возможно, что выбор ориентации определяется относительным сродством 3-17(20)-функций стероида к соответствующим участкам фермента и их ролью в процессе трансформации. Карбонил функционирует как акцептор для водородных свя-

зей, гидроксил – и как донор и как акцептор. Наличие и характер заместителей при C17 определяет доступность функций C17(20) для фермента. Это предположение подтверждают данные трансформации андростанов **2**, **3** и прегнанов **8–11** культурой *Corynespora cassicola* [8], проявляющей способность к 8β -гидроксилированию. Гриб вводил 8β -гидроксигруппу в соединения **3**, **9**, **10**, **11**, однако из **2** и **8** образовал 9α -гидроксипроизводные и не трансформировал 17-ацетокси-**8**.

Авторы указанной работы также предполагают, что выбор места гидроксилирования в одной и той же ориентации (например, в случае с *C. lunata*, это – 7α -, 9α - или 14-гидроксилирование в ориентации C), может определяться различием в характере фиксации с ферментом заместителей при C3 и C17. В определенной ориентации заместитель при C17 имеет жесткую фиксацию, и молекула как бы “раскачивается” с небольшой амплитудой, позволяя C3-заместителю зафиксировать молекулу в оптимальной для гидроксилирования позиции.

Сравнивая данные, полученные при трансформации стероидов мицелием *C. lunata* ВКПМ F-981, с литературными, можно сделать вывод о том, что направление реакции определяется не только структурой молекулы, но и таксономическим положением микроорганизма-трансформатора. Вероятно, что не только структура, но и ряд других, пока не установленных нами факторов, также являются существенными в определении основной и побочных реакций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Murray H.C., Peterson D.H. Patent US. 1952. № 2602769.
- Capek A., Hanc O., Tadra M. // Microbial Transformation of Steroids. Prague: Academia Publishing House of Czechoslovak Academy of Science, 1966. 250 p.
- Charney W., Herzog H.L. // Microbial Transformation of Steroids. New York: Academic Press, 1967. 728 p.
- Axrem A.A., Turov Yu.A. // Стероиды и микроорганизмы. М.: Наука, 1970. 526 с.
- Smith L.L. // Terpenoids and Steroids / Ed. K.H. Overton. New York: Acad. Press, 1974. V. 4. P. 394–530.
- Mahato S.B., Garai S. // Steroids. 1997. V. 62. № 4. P. 332–345.
- Lobastova T.G., Gulevskaya A.S., Sukhodolskaya G.V., Turchin K.F., Donova M.V. // Biocatal. Biotransform. 2007. V. 25. № 6. P. 434–442.
- Hunter A.C., Rymer S.-J., Dedi C., Dodd H.T., Nwozor Q.C., Moghimi S.M. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1811. № 12. P. 1054–1061.
- Holland H.L., Riemland E. // Can. J. Chem. 1985. V. 63. № 5. P. 1121–1126.
- Турута А.М., Камерницкий А.В., Богданов В.С., Комарова Г.В., Коцеев К.А. // Хим.-фарм. ж. 1990. Т. 24. № 6. С. 52–55.
- Умнова Э.Ф., Рыжкова В.М., Воробьева Л.И. // Хим.-фарм. ж. 1990. Т. 24. С. 56–58.
- Chosson H., Vidal H., Aumelas A., Couderc F. // FEMS Microbiol. Lett. 1991. V. 83. № 1. P. 17–22.
- Колеров В.В., Шутов А.А., Фокина В.В., Суходольская Г.В., Гулевская С.А., Донова М.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 2. С. 212–220.
- Андрюшина В.А., Дружинина А.В., Ядерец В.В., Стыценок Т.С., Войшвилло Н.Е. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 1. С. 50–57.
- Perlman B.A., White M.J., Gilbert G. US Patent. 2004. № 6. P. 828 120.
- Jones E.R.H. // Pure Appl. Chem. 1973. V. 33. № 1. P. 39–52.
- Brannon D.R., Parrish F.W., Wiley B.J., Long L. // J. Org. Chem. 1967. V. 32. № 5. P. 1521.
- Holland H.L. // Steroids. 1999. V. 64. № 2. P. 178–186.
- Chambers V.E.M., Denny W.A., Evans J.M., Jones E.R.H., Kasal A., Meakins G.D., Pragnell J. // J. Chem Soc. Perkin I. 1973. № 14. P. 1500–1511.
- Kollerov V.V., Shutov A.A., Fokina V.V., Sukhodolskaya G.V., Donova M.V. // J. Mol. Catal. B: Enz. 2008. V. 55. № 1. P. 61–68.

Effect of the Steroid Molecule Structure on the Direction of Its Hydroxylation by the Fungus *Curvularia lunata*

V. A. Andryushina, V. V. Yaderets, T. S. Stytsenko, A. V. Druzhinina, and N. E. Voishvillo

Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

e-mail: andryushina@rambler.ru

Received November 8, 2012

Abstract—The main and side products of hydroxylation by the *C. lunata* VKPM F-981 mycelium of fourteen Δ^4 -3-ketosteroids of the estrane, androstane, and pregnane series and six of their Δ^5 -3 β -hydroxy analogues were identified by ^1H PMR spectroscopy and comparison with standard samples. The obtained experimental data are considered in terms of the triangular model of the enzyme–substrate interaction. The dependence of the direction of hydroxylation of steroid molecules and the orientation of hydroxy groups on the structure of the initial substrate was revealed.

UDC 577.154

INDUCING EFFECT OF SALICIN FOR EXTRACELLULAR ENDOGLUCANASE SYNTHESIS IN *Rhizopus oryzae* PR7 MTCC 9642

© 2013 M. Karmakar and R. R. Ray

Microbiology Research Laboratory, Department of Zoology, Molecular Biology & Genetics,
Presidency University, Kolkata, 1700 073, India

e-mail: rina_ray64@yahoo.co.in

Received September 20, 2012

The induction of endoglucanase of *Rhizopus oryzae* PR7 MTCC 9642 has been observed in cultivation medium using a batch-fermentation technique. The effect of various experimental parameters such as use various carbon sources as inducers, concentration of inducer and effect of different additives were investigated. Salicin at concentrations from 0.25 to 0.75% (w/v) was found to bring about a remarkable increase in endoglucanase synthesis when used as a sole carbon source and thought to act as a gratuitous inducer of the enzyme. Endoglucanase activity increased within 24 h after the addition of salicin, reached maximum after 48 h and maintained high level even after 120 h of fungal growth. Repression of enzyme synthesis by glucose could partially be restored by addition of salicin at an early phase of growth. The carboxymethyl cellulose induced enzyme was inhibited by cyclohexamide and ethidium bromide and partially recovered by the salicin which indicated that salicin might act at the transcriptional but not translational level.

DOI: 10.7868/S0555109913040077

Cellulose is the most abundant compound that contains only α -1,4-linkages [1]. An important feature of cellulose, relatively unusual in the polysaccharide world, is its crystalline structure [2] and the insoluble, recalcitrant nature of cellulose represents a challenge for cellulase systems. Cellulase enzymes, which can hydrolyze cellulose forming glucose and other cello-oligosaccharides, can be divided into 3 types: endoglucanase (endo-1,4- α -D-glucanase, EC 3.2.1.4); cellobiohydrolase or exoglucanase (exo-1,4- α -D-glucanase, EC 3.2.1.91) and β -glucosidase (1,4- β -D-glucosidase, EC 3.2.1.21) [3]. Cellulase systems are not merely an agglomeration of enzymes representing these enzyme groups but rather act in a coordinated manner to efficiently hydrolyze cellulose [2].

Microorganisms have adapted different approaches to effectively hydrolyze cellulose, naturally occurring in insoluble particles or imbedded within hemicellulose and lignin polymers [4]. Cellulases from aerobic fungi have received more study than any other physiological group, and fungal cellulases currently dominate the industrial applications of cellulases [5–7]. Cellulases are induced in most of fungi only when cellulose or an inducer exists [8]. Cellulolytic filamentous fungi (and actinomycete bacteria) have the ability to penetrate cellulosic substrates through hyphal extensions, thus often presenting their cellulase systems in confined cavities within cellulosic particles [9].

Cellulolytic capability is well represented among the various subdivisions of aerobic fungi of which Ascomycetes, Basidiomycetes, and Deuteromycetes

contain large numbers of cellulolytic species and the genus *Mucor* of Zygomycetes was found to possess significant activity of this enzyme [2], however very little is known about the induction of cellulase system in *Rhizopus*.

Since the natural inducer cellulose is insoluble, several studies were performed to determine how an insoluble polymer, which cannot transfer into the cell, would initiate cellulase production [10]. It was postulated [11–13] that low basal level of cellulases is formed, which can start the degradation of cellulose and thereby release small amounts of oligosaccharides, which can induce further cellulase biosynthesis. After the degradation of cellulose, the liberated end product causes catabolite repression which prevents the fungus from synthesizing an excess amount of cellulose [2] through a negative regulation at the transcriptional level. Although a number of inducers were reported for fungal cellulase synthesis, effect of non cellulosic substance in uninduced or in catabolically repressed fungus was not investigated. The aim of the study was the induction and catabolite repression of endoglucanase synthesis in *Rhizopus oryzae* highlighting the role of salicin as inducer with its plausible mechanism of action.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism. *Rhizopus oryzae* PR7 MTCC 9642, an endoglucanase producing strain was isolated from the decaying vegetation enriched soil of India.

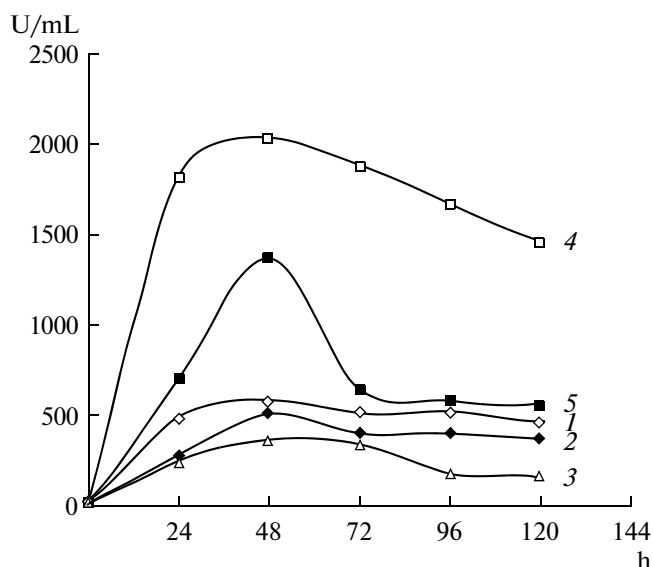


Fig. 1. Production of the *R. oryzae* PR7 MTCC 9642 endoglucanase in presence of various carbon sources: CMC (1), cellobiose (2), glucose (3), salicin (4), and CMC+salicin (5) in the cultivation medium.

The strain was identified by Institute of Microbial Technology (IMTECH), Chandigarh, India and deposited in Microbial Type Culture Collection as *Rhizopus oryzae* MTCC 9642.

Chemicals. All chemicals used were of analytical grade.

Cultivation of the fungus. The strain *R. oryzae* PR7 MTCC 9642 was cultivated in 100 mL Erlenmeyer flasks each containing 20 mL of basal medium (BM) composed of (g/L): peptone – 0.9; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0.1; KCl – 0.1; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.1 and carboxymethyl cellulose (CMC) – 0.5 (pH 6.0).

Preparation of inocula. The fungus was grown in 1% PDA plates, for 48 h at 28–30°C. The inocula were prepared by making hyphal discs (0.5 cm diameter). Each disc was used to inoculate 20 mL of medium [14].

Effect of various factors. The culture flasks (100 mL) with 20 mL medium were cultivated at various temperatures (4°C–40°C) for 0–144 h. To determine the effect of carbon sources, CMC was replaced by various polysaccharides and simple sugars. BM was supplemented with various additives (at concentration 10 mM). Antifungal agents (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added in the culture flask to test the susceptibility of the fungus.

Enzyme assay. The culture broth of filamentous form of fungus was filtered through filter paper (Whatman No. 1, USA) and filtrate was used as crude enzyme whereas the culture broth of the yeast form was centrifuged at 10000 rpm for 5 min and the supernatant was used as the crude enzyme. To measure the activity of endoglucanase, the assay mixture (1 mL) containing an equal volume of properly diluted enzyme and 1.0% (w/v) CMC in 50 mM phosphate buffer

(pH 7.0) was incubated at 37°C for 10 min. The reducing sugar released was measured by the dinitrosalicylic acid method [15] taking glucose as standard. Blanks were prepared with inactivated enzymes treated by exposing at 60°C for 15 min. One unit of endoglucanase was defined as that amount of enzyme that liberated 1 μmole of glucose per mL per min of reaction.

Protein estimation. The extracellular protein was estimated by the Lowry method. The supernatant of yeast form was scanned spectrophotometrically at 250–300 nm range.

Each experiment was performed in triplicate and their values were averaged.

RESULTS AND DISCUSSION

R. oryzae was found to produce all components of enzyme complex hydrolyzing cellulose, namely endoglucanase [16], exoglucanase [17] and β -glucosidase [18], of which endoglucanase was the most pronounced. The regulation of endoglucanase synthesis by induction and catabolite repression in *R. oryzae* PR7 MTCC 9642 studied in batch fermentations indicated that a basal level of endoglucanase was synthesized by the fungus even in absence of any carbohydrate source. The observation was similar to that of Hulme and Stranks [19], who working with several cellulolytic fungi, came to the conclusion that cellulase is not formed as a response to any inducing substance. According to Carle-Urioste with coworkers [13] and Suto and Tomita [8], a basal level of constitutive cellulase might degrade cellulose into cello-oligosaccharides, and they trigger the induction after entry into the cell.

It has been proposed that a low constitutive level of cellulase expression in *R. oryzae* PR7 MTCC 9642 is responsible for the formation of an inducer from cellulose. In this fungus, low constitutive level of endoglucanase expression could be induced by CMC followed by gentiobiose, similar to that reported earlier for microorganisms like *Hypocrea jecorina*, *Penicillium purpurogenum* and *Chaetomium erraticum* [8, 20]. It was revealed that salicin caused about a 3.5 times increase in this level.

On the other hand, although CMC acted as the inducer, it was thought that it could not trigger the induction directly because of its insolubility [8] and could not lead to that degree of endoglucanase synthesis like that of salicin (Fig. 1). The level of induction was much higher in the salicin-supplemented culture medium than that of the medium supplemented with salicin along with CMC, which indicated CMC or its derivative must have some repressive effect that actually controlled the enzyme synthesis.

The concentration of salicin played an important role in inducing the *R. oryzae* endoglucanase. The best concentration of salicin was found to be 0.75% (w/v), after which it gradually declined (Fig. 2) indicating

that above a certain saturation level it failed to operate the induction mechanism of the enzyme.

The maximum induction of endoglucanase of *R. oryzae* PR7 MTCC 9642 in presence of different types of carbon sources was revealed after 48 h of cultivation, although salicin could brought about an abrupt increase in enzyme production (Fig. 1). Salicin ($C_{13}H_{18}O_7$) being an alcoholic β -glucoside containing D-glucose could maintain the enzyme synthesis at a high level even after 120 h of growth. This fact indicated that it must have acted as a non-metabolizable trigger that could not be degraded and hydrolyzed by the cellulase system of the fungus.

Cultivation of the fungal cell in presence of only glucose or cellobiose, failed to enhance the endoglucanase synthesis from (Fig. 1), but these compounds could not be regarded as the end product inhibitors, rather as catabolite repressors that act at transcription level. Addition of glucose in CMC-induced culture sharply decreased the enzyme activity from 570 U/mL to 390 U/mL probably through carbon catabolite repression and the repressive action of glucose could be overcome at least partially by the addition of salicin (870 U/mL).

The addition of salicin in an already glucose repressed culture could bring about an increase of the endoglucanase activity probably by bringing about a repression of the cellulase gene expression [21, 11].

Failure of saligenin and salicylic acid, the major breakdown product of salicin to individually enhance endoglucanase synthesis (data not shown), indicated that probably salicin by its molecular configuration could induce the endoglucanase synthesis or acted on some other enzyme system related to increase the β -linked disaccharide permease activity of the cells [22].

As cellobiose failed to boost up endoglucanase synthesis, it could be concluded that the breakdown product of salicin i.e., β -glucosides were not responsible for enzyme induction. This was against the suggested model of induction through the enhanced transcription of the gene encoding the permease [23]. Therefore, the probability of the effect of salicin on permease biosynthesis [24] might be ruled out.

As no other carbon source could induce the endoglucanase at the same level as that by the salicin itself, it could be easily concluded that probably salicin acted as the gratuitous inducer for endoglucanase synthesis in *R. oryzae* PR7 MTCC 9642 by directly regulating the transcription of the related gene.

Griseofulvin, a fungal mitotic inhibitor, at a concentration of 0.5% added at 0 h of growth, did not affect the enzyme synthesis even after 48 h of growth, which indicated that endoglucanase was formed as a proenzyme and later modified. Addition at 0 h of growth of 0.5% ethidium bromide and 0.5% cyclohexamide, affecting transcription and protein synthesis in the fungus, respectively, resulted in the serious reduction in endoglucanase synthesis. Addition of salicin

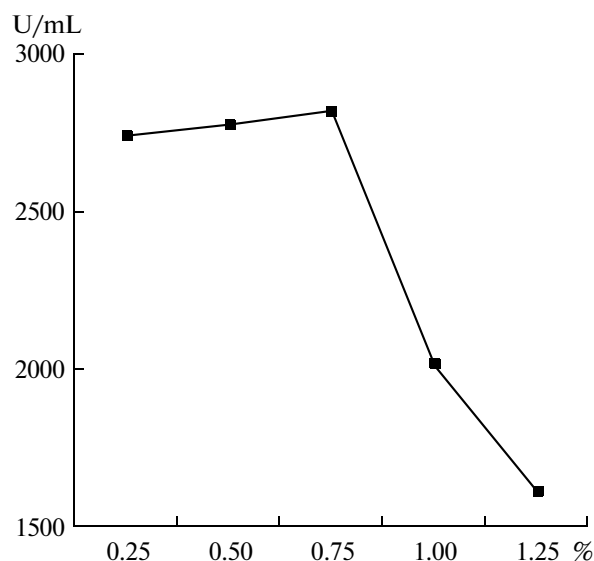


Fig. 2. Effect of the salicin (%) concentration on the production of the *R. oryzae* PR7 MTCC 9642 extracellular endoglucanase.

could recover the inhibition if added with ethidium bromide but failed to do so if protein synthesis was blocked by cyclohexamide. This indicated that salicin might have exerted its role at transcription level, not at translational level.

Therefore, it can be presumed that in the present system, salicin (a lower molecular weight compound than cellulose) after entering the cell triggers full scale transcription of the endoglucanase gene mediated by activator protein or activating element, totally following a scheme proposed by Suto and Tamita [8].

The amount of extracellular protein detected from salicin supplemented culture (Fig. 3) was found to be at least 10 times more than that of only CMC-supplemented culture. It might be presumed that salicin or other inducers regulate *cbh* gene transcription which was correlated with the change of enzyme activities [25].

Although, salicin utilization in the *E. coli* bglB strain was found to require a two-step activation process of definite operons [26] the existence of this operon like regulatory system was not proved for filamentous fungi. Although Somers with coworkers [27] proposed a model for the assimilation of salicin in *A. irakense* and Faure *et al.* [28] presumed the presence of the specific receptor "OMR SalC" *Azospirillum irakense* the specific cytoplasmic protein that could allow this type of signal transmission is still unknown. The glucose repression was found to be mediated by the Cys₂His₂ type transcription factor CreA/CREI in numerous filamentous fungi [10], a salicin-specific phosphotransferase enzyme IIB component and either the structural gene for the β -glucoside-permease or a regulatory gene. The glucose permease PtsG is known to transport sucrose and salicin

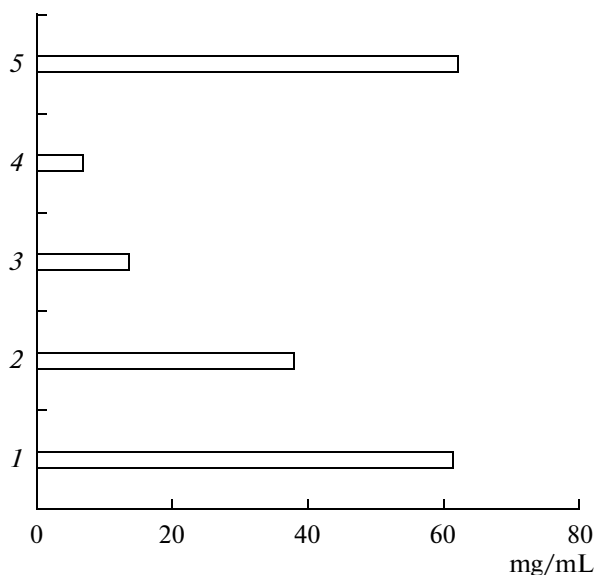


Fig. 3. Extracellular protein (mg/mL) concentration of *R. oryzae* PR7 MTCC 9642 induced by various carbon sources: salicin (1), glucose + salicin (2), glucose (3), CMC (4), and CMC + salicin (5).

in addition to glucose [29, 30] but if glucose was added after 24 h of growth of *R. oryzae* PR7 MTCC 9642 to the medium, it could not be totally taken up by the strain possibly due to a nutrient saturation (Table).

However, salicin was proved to be the most effective inducer for endoglucanase synthesis and could be used as the sole carbon source for bulk production of the enzyme by *R. oryzae* PR7 MTCC 9642.

Effect of the salicin and glucose addition in induced and repressed cultures of *R. oryzae* PR7 MTCC 9642 at different cultivation points

Carbon source	After 48 h of cultivation	
	Endoglucanase activity, U/mL	Unused sugar in the medium, mg/mL
0.5% salicin-supplemented medium	2010	—
+1% glucose at 0 h	900	—
+1% glucose at 5 h	1206	—
+1% glucose at 24 h	1552	6.72
+1% glucose at 30 h	1206	8.10
1% glucose-supplemented medium	360	—
+1% salicin at 0 h	900	—
+1% salicin at 5 h	750	—
+1% salicin at 24 h	450	—
+1% salicin at 30 h	375	—

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Department of Science and technology, West Bengal (India) for financial assistance.

REFERENCES

- Takii, Y., Ikeda, K., Sato, C., Yano, M., Sato, T., and Konno, H., *J. Biol. Macromol.*, 2005, vol. 5, no. 1, pp. 11–16.
- Lee, R.L., Paul, J.W., Willem, H.V.Z., and Isak, S., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2002, vol. 66, no. 3, pp. 506–577.
- Aslam, N., Shiekh, M.A., Muhammad, A., and Jamil, A., *Pak. J. Bot.*, 2010, vol. 42, no. 4, pp. 2895–2902.
- Tomme, P., Warren, R.A.J., and Gilkes, N.R., *Adv. Microb. Physiol.* 1995, vol. 37, pp. 1–81.
- Gusakov, A.V., Sinitsyn, A.P., Manenkova, J.A., and Protas, O.V., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1992, vol. 34, no. 1, pp. 625–637.
- Nieves, R.A., Ehrman, C.I., Adney, W.S., Elander, R.T., and Himmel, M.E., *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1998, vol. 14, no. 2, pp. 301–304.
- Sheehan, J. and Himmel, M., *Biotechnol. Prog.*, 1999, vol. 15, pp. 817–827.
- Suto, M. and Tomita, F., *J. Biosci. Bioeng.* 2001, vol. 92, no. 5, pp. 305–311.
- Eriksson, K.E.L., Blanchette, R.A., and Ander, P., *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*. New York, Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, 1990.
- Kubicek, C.P., Mikus, M., Schuster, A., Schmoll, M., and Seiboth, B., *Biotechnol. Biofuels*, 2009, vol. 2, p. 19.
- El-Gogary, S., Leite, A., Crivellaro, O., Eveleigh, D.E., and Eldorriy, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, pp. 6138–6141.
- Kubicek, C.P., *J. Gen. Microbiol.*, 1987, vol. 133, no. 6, pp. 1481–1487.
- Carle-Urioste J.C., Escobar-Vera, J., El-Gogary, S., Henrique-Silva, F., Torigoi, E., Crivellaro, O., Herrera-Estrella, A., and El-Dorriy, H.E., *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, no. 15, pp. 10169–10174.
- Ray, R.R., Chakraverty, R., *Mycol. Res. (U.K.)*, 1998, vol. 102, no. 12, pp. 1563–1567.
- Bernfeld, P., *Methods Enzymol.*, 1955, vol. 1, pp. 149–150.
- Karmakar, M., and Ray, R.R., *World J. Sci. Technol.* 2011, vol. 1, no. 6, pp. 26–32.
- Mukherjee, S., Karmakar, M., and Ray, R.R., *Recent Res. Sci. Technol.*, 2011, vol. 3, no. 3, pp. 69–75.
- Karmakar, M. and Ray, R.R., *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, 2011, vol. 2, no. 2, pp. 299–308.
- Hulme, M.A. and Stranks, D.W., *J. Gen. Microbiol.*, 1971, vol. 69, no. 2, pp. 145–155.
- Soni, S.K. and Soni, R., *Bioresources*, 2010, vol. 5, pp. 81–98.
- Lmén, M., Saloheimo, A., Onnela, M.L., and Penttilä, M.E., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, vol. 63, no. 4, pp. 1298–1306.
- Aro, N., Pakula, T., and Penttilä, M., *FEMS Microbiol. Rev.*, 2005, vol. 29, no. 4, pp. 719–739.

23. Kubicek, C.P., Messner, R., Gruber, F., Mandels, M., and Kubicek-Pranz, E.M., *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, no. 26, pp. 19364–19368.
24. Schaefer, S. and Maas, W.K., *J. Bacteriol.*, 1967, vol. 93, no. 1, pp. 264–272.
25. Ling, M., Chen, G., Lin, Y., and Liang, Z., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, vol. 5, no. 8, pp. 1485–1489.
26. Desai, S.K., Nandimath, K., and Mahadevan, S., *Arch. Microbiol.*, 2010, vol. 192, no. 10, pp. 821–833.
27. Somers, E., Keijers, V., Ptacek, Halvorsen Ottoy, D.M., Srinivasan, M., Vanderleyden, J., and Faure, D., *Mol. General Genet.*, 2000, vol. 263, no. 6, pp. 1038–1046.
28. Faure, D., Saier, Jr. M.H., and Vanderleyden, J., *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, vol. 3, no. 3, pp. 467–470.
29. Raguz, S., Yague, E., Wood, D.A., and Thurston, C.F., *Gene*, 1992, vol. 119, no. 2, pp. 183–190.
30. Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyssönen, E., Bhatia, A., Ward, M., and Penttilä, M., *Eur. J. Biochem.*, 2002, vol. 269, no. 17, pp. 4202–4211.

UDC 577.154

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PECTIN LYASE SECRETED BY *Aspergillus flavus* MTCC 10938

© 2013 S. Yadav, A. K. Dubey, G. Anand, and D. Yadav

Department of Biotechnology, D.D.U. Gorakhpur University, Gorakhpur, 273009, India

e-mail: sangeeta_rahul@rediffmail.com

Received October 29, 2012

An indigenously isolated fungal strain *Aspergillus flavus* MTCC 10938 was subjected to pectin lyase (PNL) production under submerged fermentation conditions. The enzyme was purified to homogeneity from the culture filtrate of the fungus involving concentration by ultrafiltration, anion exchange chromatography on DEAE cellulose and gel filtration chromatography on Sephadex G-100. The purified PNL gave a single protein band in SDS-PAGE analysis with a relative molecular mass corresponding to 50 kDa. Using citrus pectin as the substrate the K_m and k_{cat} values of the enzyme lyase were obtained as 1.7 mg/mL and 66 s^{-1} , respectively. The optimum pH of the purified PNL from *A. flavus* MTCC 10938 was 8.0 and up to 90% of its activity retained in the pH range from 3.0 to 11.0 after 24 h incubation. The optimum temperature of the purified enzyme was revealed at 55°C and it was completely stable up to 40°C when exposed for 30 min. The purified *A. flavus* MTCC 10938 PNL showed efficient retting of *Crotalaria juncea* fibres.

DOI: 10.7868/S0555109913040156

Pectic substances are ubiquitous in the plant kingdom representing the major component of middle lamella of a plant cell wall conferring firmness and structure to the plant cells [1]. They are mainly degraded by a group of enzymes referred as pectinases which have been classified according to their modes of action and substrates used *viz.* pectinesterases (EC 3.1.1.11); polygalacturonases (EC 3.2.1.15); pectate lyases (EC 4.2.2.2) and pectin lyases (EC 4.2.2.10). Based on the potential industrial applications of pectinases in clarification of fruit juices, retting of fibers, treatment of pectic waste water, coffee and tea leaf fermentation, oil extraction, virus purifications, these enzymes have been extensively studied [2–5].

Pectin lyases (PNL) are of particular interest as they degrade pectin polymers directly by β -elimination mechanism resulting in the formation of 4,5-unsaturated oligogalacturonides while other pectinases act sequentially to degrade pectin molecule totally. Further, PNL have biotechnological potential in fruit juice industries due to the fact that they degrade pectin without disturbing the ester group which is responsible for specific aroma of the juice and also do not form methanol which is highly toxic [6]. The production, purification, biochemical characterization, molecular biology and applications of PNL have recently been reviewed [7]. These enzymes are relatively less explored enzyme as compared to other pectinases. PNL with different properties were used for different applications, e.g enzymes with pH optima in the acidic range were suitable for clarification of fruit juice [8],

while PNL with pH optima in alkaline range were effective in retting of natural fibres [9]. Thus, there is a scientific need to search new PNL source with properties suitable for different applications.

The aim of the study was to purify and characterize an alkaline PNL from a new fungal isolate *Aspergillus flavus* MTCC 10938 showing efficient retting of sunn hemp (*Crotalaria juncea*) fibres.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Citrus pectin, DEAE cellulose and Sephadex G-100 were purchased from Sigma (USA). Rests of the chemicals were procured either from Merck (Germany), Navi Mumbai (India) or S.D. Fine Chem. Ltd. (India) and were used without further purification.

PNL assay. Activity of PNL was detected by the method of Albersheim [10]. Assay was performed by monitoring the increase in optical density at 235 nm due to formation of unsaturated uronide product using spectrophotometer Hitachi (Japan) model U-2000. Enzyme solution (0.2 mL) was added to the reaction mixture containing 0.8 mL citrus pectin (1% w/v) and 2.0 mL of the 100 mM phosphate buffer (pH 8.0) maintained at 37°C. Optical density was measured at zero time and after 20 min of incubation and the steady state velocity was calculated as absorbance change per min. PNL activity was defined as μmole of unsaturated product released per min, based on the molar extinction coefficient value of $5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Protein estimation. Protein was determined by the Lowry's method taking bovine serum albumin as the standard.

Organism and growth conditions. The fungal strain was isolated from the contaminated tissue culture media in the Plant Tissue Culture laboratory of the Department of Biotechnology, DDU Gorakhpur University (India), using a standard serial dilution technique [11]. The isolated and purified fungal strain was screened for the secretion of pectinases by plate assay method [12]. The PNL producing fungal strain was identified and deposited as *Aspergillus flavus* MTCC 10938 by Microbial Type Culture Collection Centre and Gene Bank, Chandigarh (India). The culture was maintained by cultivation on Czapek-Dox agar slants at 25°C fortnightly. Based on prominent halo zone formation the culture was further screened for the PNL secretion in liquid culture medium containing 0.3% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2% L-Asp and 0.5% pectin. The initial pH of the medium was adjusted to 4.5. Once the culture conditions for maximum secretion of the pectin lyase were optimized, the fungal strain *Aspergillus flavus* MTCC10938 was grown for purification of extracellular PNL in submerged fermentation medium in 25 × 100 mL culture flasks. One mL of spore suspension (spore density 5×10^6 spores/mL) from agar slant was inoculated aseptically into 25 mL of sterilized liquid culture medium, contained in 100 mL culture flasks. The flasks were incubated at 25°C in BOD incubator and cultures were allowed to grow under stationary conditions. On the seventh day (day for maximum production) culture was filtered through Whatman no 41 filter paper, this cell free filtrate (CFF) was used as crude for further purification.

Purification of the enzyme. *Ultrafiltration by Amicon.* The clear culture filtrate was centrifuged at $14000 \times g$ for 10 min and 400 mL supernatant was concentrated to 2.0 mL with the help of Amicon Concentration Cell (USA) using PM 10 ultrafiltration membrane having 10 kDa molecular mass cut off value.

DEAE cellulose column chromatography. The concentrated crude PNL was dialyzed against 2.0 L of 10 mM citrate phosphate buffer (pH 7.0) with 3 changes at the intervals of 8 h. The sample was then centrifuged for 10 min at $14000 \times g$ and the supernatant was loaded on DEAE cellulose column (6.5×2.0 cm) equilibrated with 10 mM citrate phosphate buffer (pH 4.0). The adsorbed protein was then washed twice by bed volume of the same buffer. The protein was eluted stepwise using 10 mL of NaCl (0.2–1.0 M) in the same buffer at the flow rate of 18 mL/h. Fractions of 3.0 mL were collected and analyzed for activity for the PNL and protein.

Sephadex G-100. The pooled fractions from DEAE cellulose showing maximum activity were concentrated with sucrose and dialyzed against 2.0 l of 100 mM citrate phosphate (pH 7.0) buffer. The dialysed PNL was centrifuged at $14000 \times g$ and the supernatant was

loaded on a Sephadex G-100 column (1.0×30.0 cm), pre-equilibrated with the same buffer. The flow rate was maintained at 9.0 mL/h and fractions of 1.5 mL were collected and analyzed for protein and PNL activity. All the active fractions were pooled, concentrated and tested for homogeneity by electrophoresis.

SDS-PAGE. The enzyme purity and the molecular mass were estimated by the 10% SDS-PAGE method, using phosphorylase B (97.4 kDa), BSA (66.0 kDa), ovalbumin (43.0 kDa), carbonic anhydrase (29.0 kDa), soyabean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and lysozyme (14.3 kDa) as standard protein markers [13]. Silver staining was done for locating the protein bands [14].

Characterization of the *A. flavus* MTCC 10938 PNL. The K_m and k_{cat} values of the purified *A. flavus* MTCC 10938 PNL were determined by measuring steady state velocities of the enzyme catalyzed reaction at different concentrations of citrus pectin and drawing double reciprocal plots [15]. Calculations were made using linear regression analysis of the data points of double reciprocal plot. The pH optimum was determined by measuring steady state velocity in the buffered reaction solution using different 100 mM buffers at in the pH range 1.0–12.0. The buffers used were: HCl-KCl (1.0–2.0), citrate-phosphate (3.0–7.0), sodium-phosphate (8.0), glycine-NaOH (9.0–10.0) and sodium phosphate–NaOH (11.0–12.0).

Steady state velocity of the PNL reaction against pH of the reaction medium was plotted. The pH stability of the enzyme was studied by exposing the enzyme to buffers of different pH for 24 h at 4°C. The residual activities were assayed and plotted in the form of percent residual activity versus pH. The optimum temperature for the *A. flavus* MTCC 10938 enzyme activity was determined by assaying the activity of the enzyme at different temperatures in the range 5–100°C and plotting a graph of the enzyme activity versus temperature of the reaction. Thermal stability of the enzyme was tested by incubating an enzyme aliquot at a particular temperature (10–100°C) for 30 min, assaying its residual activity and plotting the percent residual activity against temperature.

Effect of metal ions and protein inhibitors on the *A. flavus* MTCC 10938 PNL activity. The effect of metal ions like Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Co^{++} , Zn^{++} , Hg^{++} , K^+ , Na^+ , Ag^+ and protein inhibitors like sodium azide, potassium permanganate, potassium ferrocyanide and EDTA were studied by measuring the steady state velocity in the reaction solutions containing 1mM of the metal ions or protein inhibitors and comparing it with the value in the absence of these ions or inhibitors.

Retting of fiber by purified *A. flavus* MTCC 10938 PNL. The retting of natural fiber *Crotalaria juncea* was carried out by Zhang et al. [16] with minor modifications. Approximately 10 cm long sunn hemp sticks were put in 3 different tubes labeled as control (C) without enzyme, experimental (E1) containing en-

Purification of PNL produced by *A. flavus* MTCC 10938

Fraction	Total activity, IU	Total protein, mg	Specific activity, IU/mg	Purification, -fold	Yield, %
Crude extract	16.0	200.00	0.08	1.0	100
Amicon concentration	6.5	16.40	0.39	4.8	40.6
DEAE cellulose	2.8	4.60	0.60	7.5	17.5
Sephadex G-100	0.4	0.05	8.00	100.0	2.5

zyme without EDTA and experimental (E2) containing enzyme with 1.0 mM EDTA. All the test tubes were incubated in a water bath at 37°C for 24 h. Then the sticks were shaken vigorously each with 10 mL hot water for 1 min and photographed.

RESULTS AND DISCUSSION

Purification of the *A. flavus* MTCC 10938 PNL.

The extracellular PNL produced by *A. flavus* MTCC 10938 was purified by the steps shown in Table. The elution profiles from the anion exchange on DEAE cellulose column and gel filtration Sephadex G-100 column are shown in Fig. 1 and Fig. 2, respectively. A hundred-fold purification with specific activity 8 U/mg protein and 2.5% yield have been achieved. The electrophoretic homogeneity was confirmed on SDS-PAGE revealing a single band corresponding to a relative molecular mass of approximately 50 kDa (Fig. 3). The literature survey has indicated that the relative molecular mass of PNLs varied from 22 to 90 kDa [7]. It was revealed that PNL produced by *Aspergillus japonicus* and *Bacillus* PN-33 had relative molecular mass of 50 and 52 kDa, respectively [17, 18].

Characterization of *A. flavus* MTCC 10938 PNL.

The variation in activity of the purified *A. flavus* MTCC 10938 PNL with pH of the reaction solution as well as stability when the enzyme was exposed to various pH buffers for 24 h at 4°C is shown in Fig. 4. The pH optimum was revealed at 8.0 and the enzyme retained up to 90% of its activity in pH range 3.0–11.0. The pH optima of the previously reported PNL have been found to be acidic for *Penicillium canescens* (5.5) [19] neutral for *Penicillium expansum* (7.0) [20] and basic for *Fusarium oxysporum* (9.5) [21].

The activity of the purified *A. flavus* MTCC 10938 PNL with variation in the temperature of the reaction solution is demonstrated in Fig. 5a and the temperature optimum of the enzyme was 55°C. Similar value for optimum temperature has been reported for PNL produced by *Aspergillus japonicus* [22] while an optimum temperature of 50°C has been reported for most of the fungal sources, *Penicillium italicum* [23] and *Fusarium oxysporum* [21] etc. The results of the thermal stability of the purified *A. flavus* MTCC 10938 PNL are presented in Fig. 5b. The enzyme was fully stable at temperatures up to 40°C after which it started losing activity. The k_m and k_{cat} values determined were 1.7 mg/mL and 66 s⁻¹, respectively. The PNL from *A. fla-*

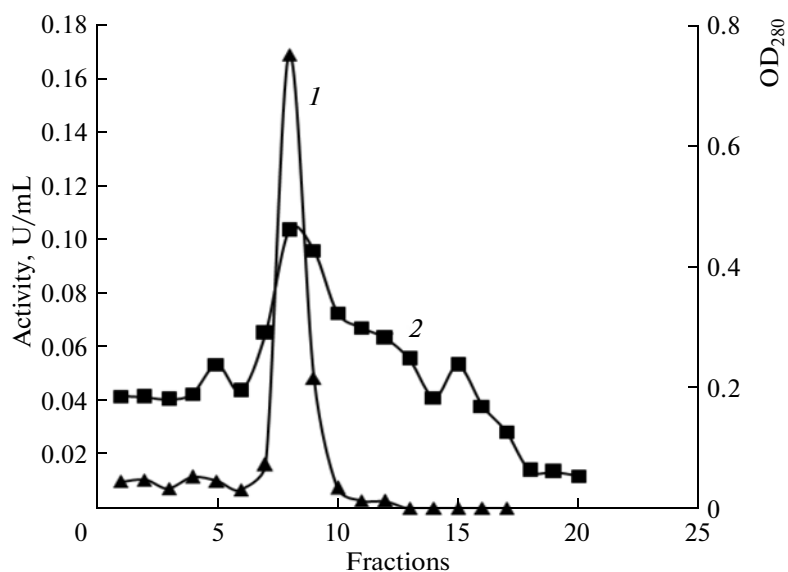


Fig. 1. Anion exchange chromatography on DEAE cellulose column of PNL by *A. flavus* MTCC 10938: 1 – protein; 2 – PNL activity.

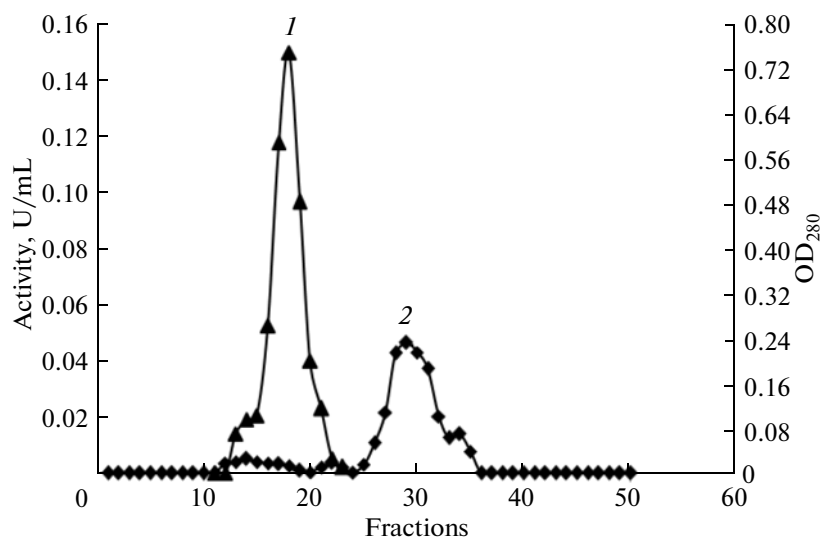


Fig. 2. Gel filtration chromatography of PNL produced by *A. flavus* MTCC 10938: 1 – protein; 2 – PNL activity.

us MTCC 7589 had lower k_{cat} value of $52.2 s^{-1}$ and a low molecular weight of 38 kDa [24] as compared to enzyme secreted from *A. flavus* MTCC 10938. Km values of 3.87 and 4.6 mg/mL have been reported for PNL from, *Rizopus oryzae* [25], isolate F-7-4 [26], respectively, while k_{cat} values of $86 s^{-1}$ and $133 s^{-1}$ have been calculated for PNL of *Aspergillus japonicus* and *Penicillium canescens* [17, 19] respectively.

Effects of metal ions and protein inhibitors. It has been observed that 1 mM Zn^{++} , Ag^{+} , Hg^{++} ions totally inhibited enzyme activity while Ca^{++} and Mn^{++} stimulated it to some extent (data not shown). Though

PNLs are generally not stimulated by presence of Ca^{2+} ions unlike pectate lyases, it can have an effect on enzyme activity [27, 19]. Calcium-dependent PNL from one species of *Aspergillus* and *Pythium splendens* have been found [28, 29]. Among protein inhibitors, potassium ferrocyanide and potassium permanganate showed total inhibition of enzyme activity from *A. flavus* MTCC 10938 while EDTA and sodium azide did not cause significant inhibition. Total inhibition of *Aspergillus terricola* PNL activity in the presence of potassium ferrocyanide and potassium permanganate has been previously described [30].

Retting of *Crotolaria juncea* fiber using purified *A. flavus* MTCC 10938 PNL. As the purified PNL had a pH optimum in alkaline range, its application in retting of locally available natural fiber *Crotolaria juncea*

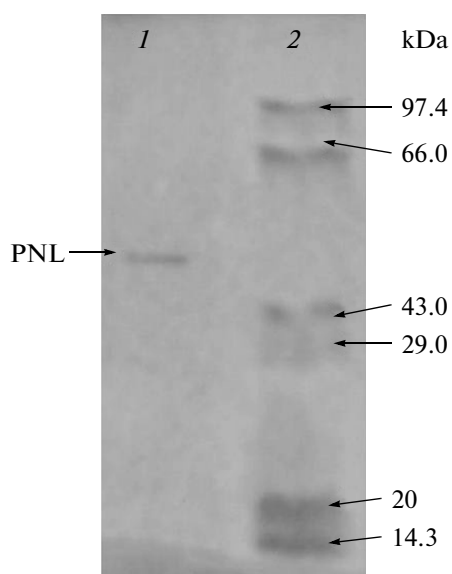


Fig. 3. SDS-PAGE of purified PNL produced by *A. flavus* MTCC 10938. Lane 1 – purified PNL, lane 2 – protein markers.

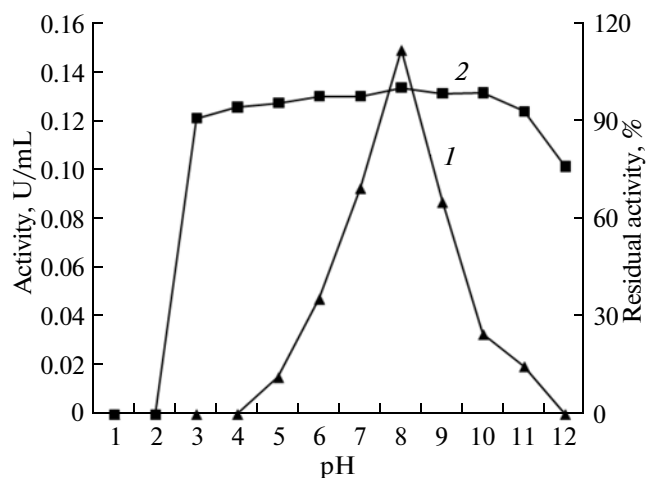


Fig. 4. pH optimum (1) and pH stability (2) of the purified PNL produced by *A. flavus* MTCC 10938.

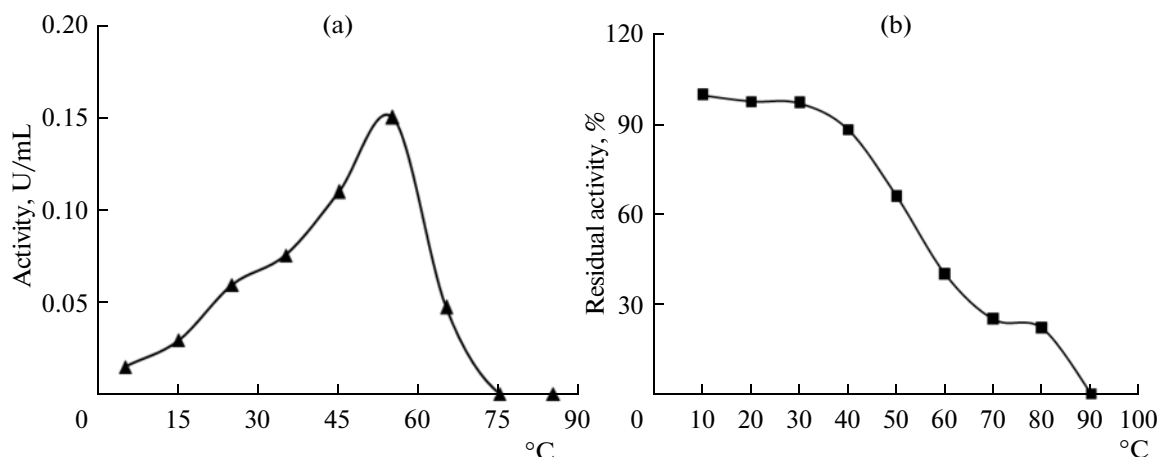


Fig. 5. Temperature optimum (a) and stability (b) of purified PNL produced by *A. flavus* MTCC 10938.

was attempted. Similar to methods reported earlier [16], sticks of fiber were subjected to purified PNL taken in variable concentrations with suitable control and in presence and absence of EDTA.

The purified 0.04 IU of pectin lyase of *Aspergillus flavus* MTCC 10938 gave efficient retting of *Crotolaria juncea* in absence of EDTA. It is an interesting observation that even though EDTA was not inhibiting the PNL activity showing 126% activity (data not shown), it caused an inhibition of retting at 1.0 mM concentration. Retting of natural fibers by PNL produced by *A. flavus* MTCC7589, *A. terricola* MTCC7588 and *P. citrinum* MTCC8897 has been reported [24, 30, 31]. Recent research has indicated that acidic pectins and Ca^{2+} are located preferentially in the epidermal regions of *Linum usitatissimum* (flax) [32], contributing to the structural integrity of the stem and bast fibers. Therefore, chelators, such as EDTA have ability to remove Ca^{2+} and enhance retting of flax [33–35]. The variability in the pectin content along with Ca^{2+} in different fibers might influence the retting efficiency in the presence or absence of EDTA.

ACKNOWLEDGMENTS

The financial support by Department of Science and Technology, Government of India (New Delhi) in the form of Fast Track Young Scientist Fellowship (SR/FT-LS/2008) to S. Yadav is thankfully acknowledged. D. Yadav acknowledges the financial support of UGC (India) in the form of UGC-Major project (F. No. 37-133/2009-SR). The authors acknowledge the infrastructural support of the Head Department of Biotechnology and also Head Department of Chemistry, D.D.U Gorakhpur University (India).

REFERENCES

- O'Neill, M., Albersheim, P., and Dravill, A., *Methods in Plant Biochemistry*, Dey, D.M., Ed., London: Academic Press, 1990, pp. 415–441.
- Alkorta, I., Garbisu, G., Llama, M.J., and Serra, J.L., *Process Biochem.*, 1998, vol. 33, pp. 21–28.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., and Tewari, R., *Biores. Technol.*, 2001, vol. 77, pp. 215–227.
- Gummadi, S.N. and Panda, T., *Process Biochem.*, 2003, vol. 38, pp. 987–996.
- Jayani, R.S., Saxena, S., and Gupta, R., *Process Biochem.*, 2005, vol. 40, pp. 2931–2944.
- Taragano, V.M. and Pelosof, A.M.R., *Enz. Microbiol. Technol.*, 1999, vol. 25, pp. 411–419.
- Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., and Yadav, K.D.S., *Process Biochem.*, 2009, vol. 44, pp. 1–10.
- Montovani, C.F., Geimba, M.P., and Brandelli, A., *Food Biotechnol.*, vol. 19, pp. 173–181.
- Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N., and Beg, Q.K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, vol. 59, pp. 409–418.
- Albersheim, P., *Methods Enzymol.*, 1966, vol. 8, pp. 628–631.
- Cappuccino, J.G. and Sherman, N., *Microbiology: A Laboratory Manual*. California: Benjamin/Cumming, 1998.
- Molina, S.M.G., Pelissari, F.A., and Vitorello, C.B.M., *Braz. J. Microbiol.*, 2001, vol. 32, pp. 320–326.
- Laemmli, U.K., *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685.
- Switzer, R.C., Merrill, C.R., and Shiprin, S., 1979, *Anal. Biochem.*, vol. 98, p. 231.
- Engel, P.C., *Enzyme Kinetics – A Steady State Approach*, London: Chapman and Hall, 1977.
- Zhang, J., Henriksson, H., Szabo, I.J., Henriksson, G., and Johansson, G., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, vol. 32, pp. 431–438.
- Semenova, M.V., Grishutin, S.G., Gusakov, A.V., Okunev, O.N., and Sinitsyna, A.P., *Biochemistry (Moscow)*, 2003, vol. 68, no. 5, pp. 559–569.

18. Jong-Chon, K., Kim, H.Y., and Choi, Y., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, vol. 8, pp. 353–360.
19. Sinitsyna, O.A., Fedorova, E.A., Semenova, M.V., Gusakov, A.V., Sokolova, L.M., Bubnova, T.M., Okunev, O.N., Chulkin, A.M., Vavilova, E.A., Venetsky, Y.P., and Sinitsyn, A.P., *Biochemistry (Moscow)*, 2007, vol. 72, no. 5, pp. 565–571.
20. Silva, D.O., Attwod, M.M., and Tempest, D.W., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1993, vol. 9, pp. 574–578.
21. Guevara, M.A., Gonzalez-Jaen, M.T., and Estevez, P., *Prog. Biotechnol.*, 1996, vol. 14, pp. 747–760.
22. Ishii, S. and Yokotsuka, T., *Agric. Biol. Chem.*, 1975, vol. 39, pp. 313–321.
23. Alana, A., Llama, M.J., and Serra, J.L., *FEBS Letters*, 1991, vol. 280, no. 2, pp. 335–340.
24. Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., and Yadav, K.D.S., *Process Biochem.*, 2008, vol. 43, pp. 547–552.
25. Hamdy H.S., *Annals Microbiol.*, 2005, vol. 55, no. 3, pp. 205–211.
26. Sakiyama, C.C.H., Paula, E.M., Pereira, P.C., Borges, A.C., and Silva, D.O., *Lett. Appl. Microbiol.*, 2001, vol. 33, pp. 117–121.
27. Linhardt, R.J., Galliher, P.M., and Cooney, C.L., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1986, vol. 12, pp. 35–176.
28. Mayans, O., Scott, M., Connerton, I., Gravesen, T., Benen, J., and Visser, J., *Structure*, 1997, vol. 5, pp. 677–689.
29. Chen, W.C., Hsieh, H.J., and Tseng, T.C. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 1998, vol. 38, pp. 181–186.
30. Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., and Yadav, K.D.S., *Applied Biochem. Biotechnol.*, 2009, vol. 159, pp. 270–283.
31. Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., and Yadav, K.D.S., *Biochemistry (Moscow)*, 2009, vol. 74, no. 7, pp. 800–806.
32. Rihouey, C., Jauneau, A., Cabin-Flaman, A., Dermarty, M., Lefevre, F., and Morvan, C., *Plant Physiol. Biochem.*, 1995, vol. 33, pp. 497–508.
33. Bratt, R.P., Brown, A.E., and Black, D.L. R., *Rec. Agric Res.*, 1986, vol. 34, pp. 9–15.
34. Henriksson, G., Akin, D.E., Slomczynski, D., and Eriksson, K.E.L., *J. Biotechnol.*, 1999, vol. 68, pp. 115–123.
35. Akin, D.E., Dodd, R.B., Perkins, W., Henriksson, G., and Eriksson, K.E.L., *Text. Res. J.*, 2000, vol. 70, pp. 486–494.

УДК 579.66

БИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ КСИЛОТРОФНЫМ БАЗИДИОМИЦЕТОМ *Lentinula edodes*

© 2013 г. Е. П. Ветчинкина*, А. М. Буров*, М. В. Агеева**, Л. А. Дыкман*, В. Е. Никитина*

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, 410049

**Казанский институт биохимии и биофизики РАН, Казань, 420111

e-mail: elenavetrus@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.07.2012 г.

Показано, что лекарственный базидиомицет *Lentinula edodes* восстанавливал ионы золота из тетра-хлороаурат (III) водорода (тетрахлорозолотая кислота) — HAuCl_4 до элементного состояния с образованием сферических наночастиц. При глубинном выращивании культуры в присутствии золото-хлористоводородной кислоты было зафиксировано появление интенсивного сиренево-красного окрашивания мицелиальных гиф *L. edodes*, что может говорить о восстановлении ионов золота до золотых наночастиц. С использованием методов просвечивающей электронной микроскопии и рентгеновской флуоресценции наблюдали накопление коллоидного золота грибным мицелием в виде электронно-плотных сферических наночастиц диаметром от 5 до 50 нм как на поверхности, так и внутри грибных клеток.

DOI: 10.7868/S0555109913040132

Наночастицы в настоящее время находят широкое применение в медицине (синтез, доставка и утилизация лекарств, лечение рака), биологии (иммунные исследования, использование в качестве биомаркеров при изучении внутриклеточных процессов *in vivo*) и технологии (электроника, информационные технологии, получение новых материалов с улучшенными свойствами) [1]. Для синтеза наночастиц необходимой формы и размера было разработано множество физико-химических методов, однако несмотря на их успешное применение, они зачастую остаются дорогостоящими и требуют использования опасных химических соединений. Поэтому существует потребность в развитии безопасных для окружающей среды и человека эффективных методов синтеза различных наночастиц с применением, в частности, микробных биотехнологий [2]. О биологическом (“зеленом”, green) синтезе наночастиц золота, серебра, селена, платины, кварца и других соединений бактериями, актиномицетами, грибами, дрожжами и вирусами существует достаточно много сообщений, так как в настоящее время проводится активный поиск эффективных биообъектов для получения наночастиц различной химической природы [3–6]. Однако несмотря на стабильность, полученные биологически наночастицы не однородны, а синтез идет достаточно медленно. Чтобы преодолеть эти проблемы, необходимо всестороннее изучение всех факторов, влияющих на данный процесс, таких, как микробиологические методы культивирования, экстракции, ста-

билизации, расшифровка клеточных, биохимических и молекулярных механизмов для увеличения скорости синтеза и улучшения свойств наночастиц.

Кроме того, ввиду очень широкого разнообразия микроорганизмов необходимо вести исследования в направлении выявления новых перспективных объектов и изучения их потенциала как биологического материала для синтеза наночастиц. Исследователи отмечают способность к синтезу наночастиц золота и серебра у ряда низших грибов [7, 8]; сообщается также о синтезе наночастиц базидиомицетами *Volvariella volvacea* [9] и *Coriolus versicolor* [10], однако данные культуры высших грибов восстанавливали соединения в культуральной жидкости и не были способны к накоплению элементарных частиц внутри клеток. Данные литературы о получении наночастиц золота с помощью высших культивируемых базидиомицетов в настоящее время весьма немногочисленны.

Цель работы — изучение способности высшего целебного базидиомицета *Lentinula edodes* к синтезу золотых наночастиц и их накопление в мицелии.

МЕТОДИКА

Объект исследования и условия культивирования. Объектом исследования послужил штамм ксилотрофного лекарственного базидиомицета *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] (шиитакэ) F-249 из коллекции высших

грибов кафедры микологии и альгологии Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Культуру поддерживали на 4%-ном пивном сусло-агаре при 4°C.

В условиях глубинного культивирования грибную культуру выращивали на синтетической среде состава (г/л): D-глюкоза – 1, L-аспарагин – 0.1, KH_2PO_4 – 2, K_2HPO_4 – 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.03, pH – 5.8. Культивирование проводили в колбах объемом 100 мл с 50 мл среды при 26°C, как оптимальной температуре роста мицелия для этого вида. В качестве инокулята брали 14-суточную культуру *L. edodes*, выращенную на агаризованной синтетической среде при 26°C.

При исследовании влияния на рост базидиомицета *L. edodes* золотосодержащего соединения и определении способности ксилотрофа к его восстановлению в жидкую синтетическую среду вносили в виде водного раствора золотохлористоводородную кислоту HAuCl_4 (“Sigma-Aldrich”, США) в диапазоне концентраций от 10 до 500 мкМ. Растворы, используемые в качестве добавки к среде выращивания, были внесены в стерильных условиях непосредственно перед посевом отдельно в каждую из колб культивирования.

Определение ростовых характеристик грибной культуры. При глубинном культивировании рост шиитаке характеризовали по накоплению сухой биомассы. Мицелий фильтровали через предварительно взвешенные на аналитических весах фильтры, высушивали до постоянной массы и вновь взвешивали. Сравнивали прирост биомассы (по сравнению с 3-часовыми образцами культуры на данной среде) в контрольном и опытных вариантах.

Опыты по измерению ростовых характеристик и накоплению грибной биомассы проводили в 5–10 повторностях.

Рентгеновская флуоресценция. Для детектирования элементного золота и (или) соединений золота, содержащихся в мицелии гриба и культуральной жидкости, проводили рентгенофлуоресцентное исследование образцов мицелия и осадка среды культивирования. Для этого культура шиитаке была выращена на синтетической среде (контроль), вышеописанного состава, а также с добавлением 50 мкМ HAuCl_4 (опыт) при 26°C в течение 14 сут. Далее выращенные образцы мицелия были отмыты от среды культивирования, собраны центрифугированием и высушены при комнатной температуре. Культуральная жидкость была подвергнута лиофилизации. Для обнаружения наночастиц внутри гиф грибной мицелий выращивали вышеописанным способом в присутствии 50 мкМ HAuCl_4 14 сут, после чего отмывали от среды культивирования дистиллированной водой, собирали центрифугированием и подвергали лиофилизации,

затем грибные гифы механически разрушали и отделяли от элементарных частиц через фильтр Millipore (“Millipore Corp.”, США), с диаметром пор 0.22 мкм. Далее наночастицы ресуспендировали в минимальном объеме дистиллированной воды и высушивали на воздухе при 20°C. Анализ содержания золота в сухой биомассе, сухой культуральной жидкости и отфильтрованном материале проводили с помощью энергодисперсионного спектрометра модели ED 2000 (“Oxford Instruments”, Великобритания). Условия измерения были следующими: диапазон определяемых элементов от Na до U, рентгеновская трубка с серебряным анодом, напряжение на трубке 35 кВ, фильтр первичного рентгеновского излучения – тонкий серебряный, экспозиция 600 с, среда – воздух. Содержание определяемых элементов оценивали при помощи метода “фундаментальных параметров”, заложенных в программном обеспечении прибора.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Образцы культур исследовали при помощи метода негативного контрастирования. Мицелий двукратно отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ): (г/л): NaCl – 8.5, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 1.34, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.39, pH – 7.4, затем дистиллированной водой, предварительно пропущенной через фильтр Millipore (диаметр пор 0.22 мкм). Далее мицелиальные гифы ресуспендировали в минимальном объеме дистиллированной воды и наносили на никелевые сеточки с подложкой (1%-ный раствор формвара в дихлорэтаноле). После высыхания образца клетки контрастировали 1%-ным водным раствором уранилацетата [11].

Фиксацию грибных гиф для последующего получения ультратонких срезов проводили следующим образом. Мицелиальные гифы *L. edodes* собирали центрифугированием при 13000 g в течение 20 мин при комнатной температуре. Материал переносили в полипропиленовые пробирки объемом 2 мл и фиксировали в 0.5%-ном глутаровом альдегиде в течение 3 ч. Дальнейшую фиксацию проводили в растворе 2.5%-ного глутарового альдегида, приготовленного на фосфатном буфере (0.1 М, pH – 7.2), в течение 12 ч. Затем материал выдерживали в 1%-ном растворе OsO_4 , приготовленном на том же буфере, с добавлением 34 мг/мл сахарозы.

Дегидратацию образцов проводили в серии спиртов возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне. Затем препараты выдерживали в окиси пропилена 45 мин, пропитывали эпоксидной смолой ЭПОН и окисью пропилена по 24 ч в следующих соотношениях: 1) 1 : 2, 2) 1 : 1, 3) 2 : 1, и материал помещали в чистую смолу. Полимеризацию проводили при температурах 37°, 45° и 57°C по 24 ч. Ультратонкие срезы получали на микротоме (“LKB-III”, Швеция), монтировали на ни-



Рис. 1. Фотографии колб с культурой базидиомицета *L. edodes* штамм F-249, выращенной на синтетической среде в отсутствие (а – контроль) и присутствии 50 мкМ HAuCl_4 (б) в течение 14 сут при 26°C.

келевые сеточки, окрашивали водным раствором уранилацетата [11] и цитратом свинца [12].

Для изучения наночастиц грибной мицелий выращивали вышеописанным способом в присутствии 50 мкМ золотохлористоводородной кислоты 14 сут, отмывали от среды культивирования дистиллированной водой, собирали центрифугированием и подвергали лиофилизации, затем грибные гифы механически разрушали и отделяли от элементарных частиц через фильтр Millipore (диаметр пор 0.22 мкм). Далее наночастицы ресуспендировали в минимальном объеме дистиллированной воды и наносили на никелевые сеточки с подложкой (1%-ный раствор формара в дихлорэтаноле).

Микрофотографии были получены на электронном микроскопе Libra 120 (“Carl Zeiss”, Германия) при 120 кэВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние золотосодержащего соединения (HAuCl_4) в среде культивирования на рост *L. edodes* F-249. Первоначально была протестирована чувствительность базидиомицета *L. edodes* к золотохлористоводородной кислоте HAuCl_4 и влияние данного соединения на ростовые характеристики и накопление биомассы грибного мицелия при глубинном

культивировании. Были определены концентрации, характеризующие токсичность золотосодержащего соединения для шиитаке – ингибирующая рост культуры концентрация (минимальная концентрация, при которой было зафиксировано достоверное снижение прироста биомассы при выращивании в присутствии данного соединения) и летальная концентрация (минимальная концентрация, при которой наблюдалось полное отсутствие роста). Ингибирующая концентрация варьировала и составляла от 60 до 80 мкМ. При 300–500 мкМ рост полностью отсутствовал, а при 10 мкМ рост фактически не изменялся по сравнению с контролем.

Было отмечено, что в присутствии HAuCl_4 в диапазоне концентраций 10–80 мкМ при культивировании *L. edodes* на жидкой синтетической среде уже на 3 сут мицелий начинал приобретать красновато-сиреневое окрашивание (рис. 1б), интенсивность которого зависела от концентрации золотосодержащего соединения: чем выше была его концентрация, тем сильнее окрашивался мицелий. Контрольная культура базидиомицета, которая выращивалась при аналогичных условиях, но без добавления в среду культивирования HAuCl_4 , имела кремово-белый цвет на протяжении всего времени выращивания (рис. 1а). Именно изменение цвета колоний микроорганизмов, растущих в присутствии золотохлористоводородной кислоты от различных оттенков сиреневого до красного является первым признаком восстановления этого соединения до элементарного золота. Согласно данным литературы, такое окрашивание характерно для бактерий, водорослей и грибов, растущих на золотосодержащих средах, и указывает на накопление культурой элементарных наночастиц золота [9].

При концентрации 50 мкМ HAuCl_4 наблюдался достаточно хороший рост культуры и интенсивное сиренево-красное окрашивание мицелиальных колоний, поэтому для всех последующих экспериментов мы выбрали именно эту концентрацию.

Условия восстановления золотосодержащего соединения HAuCl_4 культурой базидиомицета до элементарного состояния и локализация золотых наночастиц. Культивирование в присутствии золотосодержащего соединения приводило к изменению как цвета грибных гиф, так и среды выращивания. Перед нами встал вопрос, с чем связано восстановление соединения до элементарного состояния – с грибной культурой или с химическим восстановлением под действием компонентов среды выращивания, а может с культуральной жидкостью, содержащей различные низко- и высокомолекулярные соединения жизнедеятельности гриба, в том числе и экстраклеточных ферментов. Для выяснения данного вопроса был проведен следующий экс-

перимент. Были взяты четыре типа колб: первые содержали синтетическую среду с золотохлористоводородной кислотой; вторые — дистиллированную воду с тем же соединением, третьи — культуральную жидкость, отфильтрованную от грибной культуры, полученную в результате выращивания шиитаке на синтетической среде в стандартных условиях без добавления HAuCl_4 , четвертые содержали дистиллированную воду и 14-суточный контрольный мицелий *L. edodes*, выращенный на синтетической среде в стандартных условиях без добавления HAuCl_4 и затем несколько раз отмытый от среды культивирования дистиллированной водой. К третьему и четвертому типам колб была добавлена золотохлористоводородная кислота в концентрации 50 мкМ. Все колбы были помещены в одинаковые условия на 14 сут, по истечении которых мы получили следующие результаты. Ни в первом случае, ни во втором случае восстановления золото содержащего соединения до элементного золота, изменения цвета и выпадения осадка не происходило, что говорит о непричастности дистиллированной воды или синтетической среды к процессу восстановления. В третьем случае — культуральная жидкость приобретала небольшое сиреневато-красное окрашивание, что свидетельствовало о присутствии в ней продуктов жизнедеятельности гриба, способных восстанавливать соединения золота до элементного состояния. В четвертом варианте эксперимента происходило, с нашей точки зрения, самое интересное: дистиллированная вода, в которой находился мицелий, оставалась прозрачной, а грибные гифы имели интенсивную сиренево-красную окраску, подтверждая, таким образом, предположение, что восстановление связано непосредственно с мицелием шиитаке. После интенсивного встряхивания и центрифугирования вода оставалась прозрачной, что позволило предположить внутриклеточную локализацию восстановленных частичек золота или, по крайней мере, очень сильное сцепление с поверхностью грибных гиф. Итак, можно сделать предварительный вывод о восстановлении и последующем накоплении частиц элементного золота либо на поверхности, либо внутри мицелиальных гиф *L. edodes*.

Определение золота в мицелии с помощью рентгеновской флуоресценции. Для данного анализа культура шиитаке была выращена в условиях глубокого культивирования на синтетической среде при 26°C в течение 14 сут в присутствии 50 мкМ HAuCl_4 . Затем мицелий был высушен на воздухе при 20°C, а культуральная жидкость была подвергнута лиофилизации. Анализ грибных клеток и сухой культуральной среды методом рентгеновской флуоресценции показал значительное накопление золота в мицелии, растущем в присутствии золотохлористоводородной кислоты и содержание золота в культуральной жидкости

шиитаке, что характеризовалось появлением интенсивных эмиссионных линий, соответствующих золоту (рис. 2б, 2в). При этом спектры, снятые для контрольных культур, показали отсутствие золота (рис. 2а). Причем осадок культуральной жидкости шиитаке содержал большое количество цинка.

Для подтверждения того, что внутри гиф содержится именно золото, грибной мицелий выращивали вышеописанным способом в присутствии 50 мкМ HAuCl_4 14 сут, подвергали механическому разрушению и отделяли от элементных частиц. Далее наночастицы были исследованы методом рентгеновской флуоресценции, наличие золота было определено по линиям при $L\alpha_1$ — 9.713, $L\beta_1$ — 11.443, $L\beta_2$ — 11.585, $L\gamma_1$ — 13.382 кэВ (рис. 2г).

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Было проведено исследование грибных гиф *L. edodes*, выращенных в присутствии 50 мкМ HAuCl_4 в течение 14 сут методом негативного контрастирования. Не отмытый от культуральной среды мицелий шиитаке был нанесен на никелевые сеточки. Как видно на представленном рисунке (рис. 3), на поверхности мицелиальных гиф, а также около них наблюдали электронно-плотные образования сферической формы, отсутствующие в контроле. При этом размер данных частиц варьировал от 10 до 50 нм с преимущественным содержанием частиц диаметром около 20 нм.

Для подтверждения внутриклеточной локализации и накопления элементного золота внутри мицелия базидиомицета грибные гифы заливали в эпоксидную смолу для последующего получения поперечных ультратонких срезов. Результаты, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии, подтвердили наличие в цитоплазме гиф шиитаке электронно-плотных образований преимущественно сферической формы (рис. 4). Основная масса наночастиц имела размер от 10 до 15 нм, однако встречалось небольшое количество частиц 30–40 нм. Мы практически не обнаружили частиц на поверхности или внутри клеточной стенки, что может говорить о том, что частицы не проникали через клеточную стенку, а образовывались непосредственно в цитоплазме. Ранее наблюдавшиеся сцепленные частицы с поверхностью мицелиальных гиф, по-видимому, были удалены в процессе пробоподготовки, так как условия данного процесса довольно жесткие.

Для изучения наночастиц грибной мицелий, содержащий восстановленное золото, механически разрушали и отделяли от частиц, далее наночастицы ресуспендировали в дистиллированной воде и наносили на никелевые сеточки с подложкой. Отделенные фильтрованием и отмытые ча-

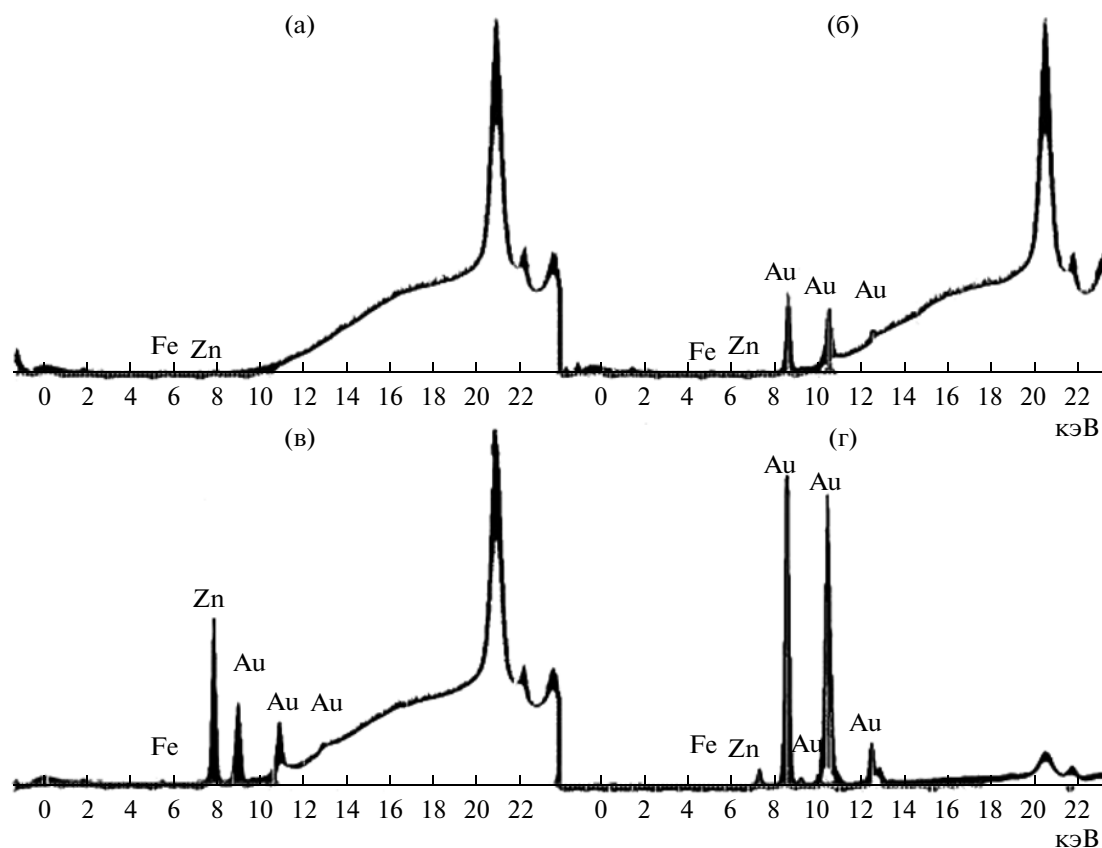


Рис. 2. Рентгеновский флуоресцентный анализ сухой биомассы мицелия *L. edodes* штамм F-249, выращенного на жидкой синтетической среде в отсутствие (а – контроль) и присутствии 50 мкМ HAuCl_4 (б) в течение 14 сут при 26°C; анализ лиофилизованной культуральной жидкости шиитаке (в); результаты анализа чистых наночастиц (г). Золоту Au^0 соответствуют эмиссионные линии при 9.713, 11.443, 11.585, 10.308 и 13.382 кэВ ($L\alpha_1$, $L\beta_1$, $L\beta_2$, $L\gamma_1$, $L\gamma_2$ соответственно).

стицы золота представляли собой довольно большое количество наносфер правильной формы, близких по размеру ~20 нм (рис. 5).

В последнее время актуальной областью исследований является синтез золотых наночастиц вследствие все более расширяющейся области их применения. Традиционно их синтезируют химическим способом с применением неорганических и органических соединений, использование которых экологически небезопасно. Поэтому перед исследователями встает вопрос поиска альтернативных путей синтеза наночастиц, ответом на который является биологический синтез с помощью микроорганизмов. В недавнем обзоре, посвященном синтезу наночастиц микроорганизмами, собрана последняя информация по данному вопросу [2]. Сведения о биотрансформации базидиальными грибами соединений золота с выделением его в элементной форме единичны. Однако высшие грибы могут быть благоприятным объектом в связи с их способностью накапливать высокие концентрации наночастиц. Установлено, что способностью к синтезу наночастиц золота обладают ряд низших грибов [7, 8]; а также некоторые бази-

диомицеты *Volvariella volvacea* [9] и *Coriolus versicolor* [10], но данные культуры высших грибов восстанавливали соединения в культуральной жидкости и не были способны к накоплению элементных частиц внутри клеток. На сегодняшний день мы не обнаружили информации о наночастицах золота, полученных путем биологического восстановления с помощью культуры базидиомицета *L. edodes*; мы не нашли ни фотографий этих частиц, ни описания их размеров, ни доказательств, что данные частицы способны накапливаться внутри грибного мицелия. В ходе нашей работы с применением методов рентгеновской флуоресценции и просвечивающей электронной микроскопии мы впервые получили данную информацию.

Известно, что различные микроорганизмы способны восстанавливать золото как внутриклеточно, так и внеклеточно [2]. Культивирование в присутствии золотосодержащего соединения приводило к изменению как цвета грибной культуры, так и среды выращивания. Мы выяснили, что компоненты синтетической среды к процессу восстановления не причастны. А культуральная жидкость и содер-

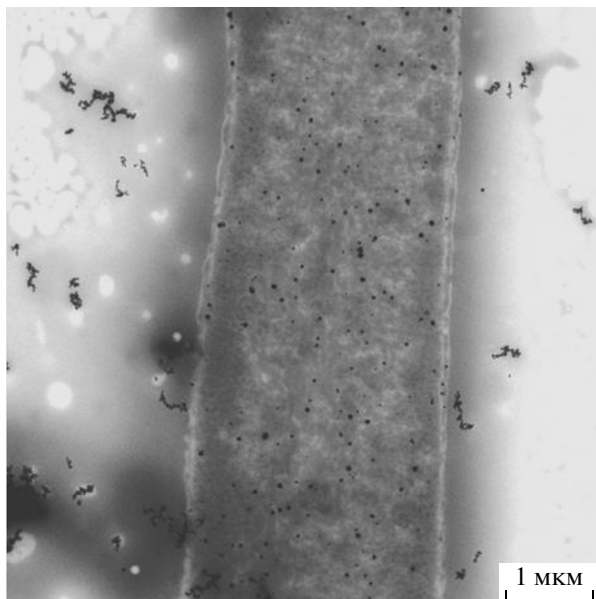


Рис. 3. Негативное контрастирование (ПЭМ) гиф мицелия базидиомицета *L. edodes* штамм F-249, выращенного на жидкой синтетической среде в присутствии 50 мкМ HAuCl_4 в течение 14 сут при 26°C. Масштабная линейка – 1 мкм.

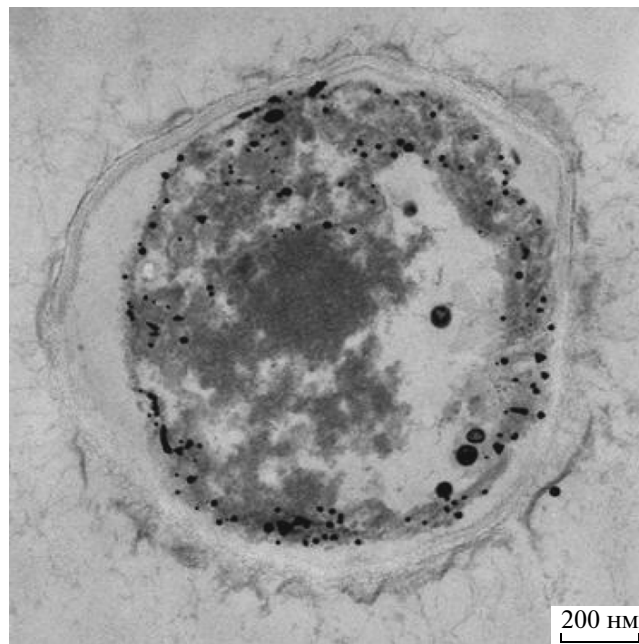


Рис. 4. Просвечивающая электронная микроскопия поперечного среза клетки базидиомицета *L. edodes* штамм F-249, залитой в эпоксидную смолу, после восстановления золота. Масштабная линейка – 200 нм.

жащиеся в ней различные соединения жизнедеятельности гриба, в том числе и экстраклеточные белки, способны восстанавливать соединения золота до элементного состояния. Также мы подтвердили наше предположение, что синтез золотых наночастиц связан непосредственно с мицелием *L. edodes*, наносферы Au^0 были локализованы не только внеклеточно, но и в большом количестве накапливались внутри грибных клеток. В таком случае, опираясь на вышесказанное, можно говорить о том, что происходит биохимическое восстановление, напрямую связанное с метаболизмом высшего базидиомицета, не зависящее от химического восстановления под действием определенных компонентов среды. Поскольку накопление элементного золота в мицелии коррелирует с повышением концентрации HAuCl_4 в среде культивирования, можно предположить, что разрушение этого соединения с образованием Au^0 необходимо *L. edodes* для снижения его токсического действия, что характерно для многих микроорганизмов [13].

Таким образом, при культивировании лекарственного базидиомицета *L. edodes* в присутствии HAuCl_4 при начальных концентрациях в синтетической среде выше 10 мкМ наблюдается сиреново-красное окрашивание мицелия, интенсивность и период возникновения которого зависят от концентрации золотосодержащего соединения. Методами рентгеновской флуоресценции и просвечивающей электронной микроскопии за-

регистрирована способность глубинной культуры шиитаке к восстановлению HAuCl_4 с образованием элементного золота. Данные электронной микроскопии показывают наличие на поверхности и внутри гиф гриба золотых наночастиц золо-

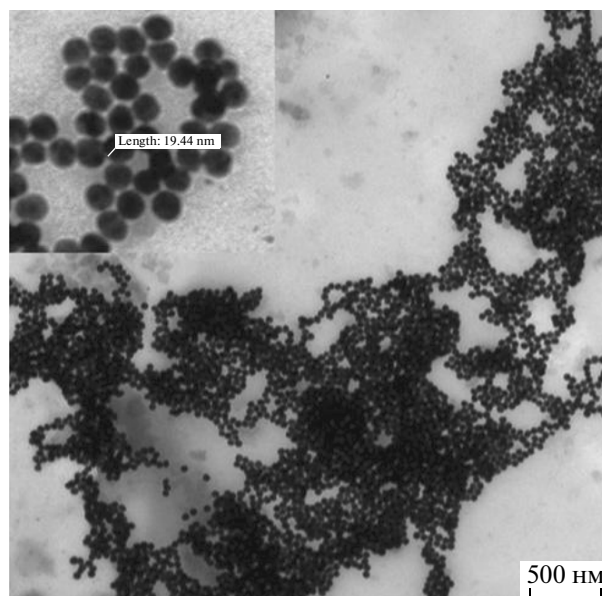


Рис. 5. Просвечивающая электронная микроскопия сферических наночастиц золота, полученных после разрушения мицелия *L. edodes* штамм F-249. Масштабная линейка – 500 нм.

та диаметром 5–50 нм. Накопление сферических золотых наночастиц внутри мицелиальных клеток высших базидиомицетов выявлено впервые. Биосинтез наносфер при помощи лекарственно-го высшего гриба шиитаке имеет особую актуальность в связи с простотой, доступностью и экологической безопасностью этого метода.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта корпорации “Сибирское здоровье”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krumov N., Perner-Nochta I., Oder S., Gotcheva V., Angelov A., Posten C. // Chem. Eng. Technol. 2009. V. 32. № 7. P. 1026–1035.
2. Narayanan K.B., Sakthivel N. // Adv. Colloid Interface Sci. 2010. V. 156. № 1. P. 1–13.
3. Durán N., Marcato P.D., De Souza G.I.H., Alves O.L., Esposito E. // J. Biomed. Nanotech. 2007. V. 3. № 4. P. 203–208.
4. Popescu M., Velea A., Lörcinczi A. // J. Nanomaterials Biostruct. 2010. V. 5. № 4. P. 1035–1040.
5. Metal Nanoparticles in Microbiology / Eds. M. Rai, N. Duran. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. 303 p.
6. Musarrat J., Dwivedi S., Singh B.R., Saquib Q., Al-Khedhairi A.A. // Microbes and Microbial Technol.: Agricultural and Environmental Applications / Eds. I. Ahmad, F. Ahmad, J. Pichtel. N.Y.: Springer Science+Business Media, LLC, 2011. P. 101–126.
7. Sastry M., Ahmad A., Khan M.I., Kumar R. // Curr. Sci. 2003. V. 85. № 2. P. 162–170.
8. Mourato A., Gadanho M., Lino A.R., Tenreiro R. // Bioinorg. Chem. Appl. 2011. V. 1. № 3. P. 241–248.
9. Philip D. // Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc. 2009. V. 73. № 2. P. 374–381.
10. Sanghi R., Verma P. // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. № 5. P. 501–504.
11. Tandler B. // J. Electron. Microsc. Technol. 1990. V. 16. № 6. P. 1505–1517.
12. Reynolds E.S. // J. Cell. Biol. 1963. V. 17. № 1. P. 208–212.
13. Garbisu C., Ishii T., Leighton T., Buchanan B.B. // Chem. Geology. 1996. V. 132. № 4. P. 199–204.

Biological Synthesis of Gold Nanoparticles by the Xylotrophic Basidiomycete *Lentinula edodes*

E. P. Vetchinkina^a, A. M. Burov^a, M. V. Ageeva^b, L. A. Dykman^a, and V. E. Nikitina^a

^a Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia
e-mail: elenavetrus@yandex.ru

^b Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111 Russia

Received July 5, 2012

Abstract—This is the first study to demonstrate that the medicinal basidiomycete *Lentinula edodes* can reduce gold (III) ions from hydrogen tetrachloraurate (chloroauric acid) H[AuCl₄] to the elementary state with the formation of spherical nanoparticles (nanospheres). When a culture was grown under submerged conditions in the presence of chloroauric acid, the appearance of an intense purple-red color of *L. edodes* filamentous hyphae was recorded, which indicates that gold ions were reduced to gold nanoparticles. Using transmission electron microscopy and X-ray fluorescence, we observed accumulation of colloidal gold by the fungal mycelium in the form of electron-dense nanospheres of 5 to 50 nm in diameter on the surface and inside fungal cells.

УДК 577.114:581.143

ВЛИЯНИЕ АГРОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ *rol* НА СОДЕРЖАНИЕ, СТРОЕНИЕ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ И АКТИВНОСТЬ ГЛИКАНАЗ В КУЛЬТУРАХ ТРАНСГЕННЫХ КЛЕТОК *Rubia cordifolia*

© 2013 г. Е. А. Пунтер*, О. В. Попейко*, Ю. Н. Шкрыль**, Г. Н. Веремейчик**, В. П. Булгаков**,**, Ю. С. Оводов*

*Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, 167982
e-mail: gunter@physiol.komisc.ru

**Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток, 690022
e-mail: yn80@mail.ru

***Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690950
e-mail: bulgakov@ibss.dvo.ru

Поступила в редакцию 08.10.2012 г.

Экспрессия гена *rolB* приводила к увеличению содержания пектинов в клетках марены сердцелистной (*Rubia cordifolia* L.), тогда как включение гена *rolC* вызывало снижение синтеза пектинов, которое зависело от уровня его экспрессии. В результате экспрессии генов *rolA*, *rolB* и *rolC* происходило увеличение содержания арабиногалактана (АГ) в клетках. С увеличением уровня экспрессии генов *rolB* и *rolC* происходило более существенное снижение содержания остатков арабинозы в пектине, что сопровождалось ростом активности α -L-арабинофуранозидазы в клетках. Кроме того, с увеличением уровня экспрессии гена *rolB* увеличивалось количество остатков галактозы в пектине, которое было обусловлено снижением активности β -галактозидазы в клетках. Снижение содержания остатков галактуроновой кислоты в пектине усиливалось в ряду от *rolC* к *rolB* и *rolA* трансгенов. Независимо от типа гена снижалось содержание остатков арабинозы в АГ. С увеличением уровня экспрессии гена *rolB* происходило более существенное снижение содержания остатков арабинозы в АГ.

DOI: 10.7868/S0555109913040065

Пектиновые вещества включают пектиновые полисахариды (гомогалактуронан, рамногалактуронаны I и II, ксилогалактуронан и апиогалактуронан) и сопутствующие арабинаны, галактаны и арабиногалактаны [1]. Эти полисахариды входят в состав клеточных стенок практически всех высших наземных и водных растений и выполняют важные биологические функции [1, 2]. Интерес к ним обусловлен также их высокой физиологической активностью и ценными техническими свойствами. Известно, что биологические функции и физиологическая активность растительных полисахаридов определяется особенностями их строения [3–5]. В связи с этим актуален поиск эффективных источников сырья и методов модификации полисахаридов с целью получения полимеров с заданными структурой и свойствами.

Разработка способов направленного изменения активности ферментов клеточной стенки открывает возможность получения полисахаридов с конкретными ценными свойствами и определенной структурой [6]. Модификация структуры пектиновых веществ в культурах клеток растений под действием агробактериальных генов может

служить одним из подходов для получения полисахаридов с заданным строением и свойствами.

Различные методические приемы клеточной и генетической инженерии стали составной частью современной молекулярной и клеточной биологии, биохимии и биотехнологии, благодаря которым стало возможным получение модифицированных полисахаридов. Для изучения функции пектинов в растениях и взаимосвязи структуры и функции пектиновых веществ применяют два подхода: 1) получение мутантных форм растений с измененной морфологией и строением пектина; 2) экспрессия в растениях чужеродных генов, кодирующих активность гликаназ (гликозидгидролаз) [7–10].

Перспективным направлением является использование для модификации пектиновых веществ регуляторных генов *rol*. Гены *rolA*, *rolB* и *rolC*, выделенные из T-ДНК Ri плазмид почвенных бактерий *Agrobacterium rhizogenes* штамма А4, участвуют в индукции образования “волосатых корней” (hairy roots) в трансформированных растениях, оказывают влияние на рост и развитие растений, а также являются активаторами вто-

ричного метаболизма растений [11, 12]. Известно, что трансформация генами *rolB* и *rolC* различных видов растений вызывала морфологические аномалии, такие, как уменьшение веса растений и длины междоузлий, увеличение разветвленности, уменьшение размера цветков и листьев. Кроме того, трансформация индуцировала образование корней, указывая на ауксинподобный эффект этих генов [13, 14].

Изменение продукции первичных метаболитов растения, в частности полисахаридов и ферментов, при трансформации генами *rol* не изучено. Было только показано, что в культурах клеток женьшеня *Panax ginseng*, трансформированных агробактериальными генами *rolC*, происходило увеличение активности карбогидраз, таких, как α - и β -D-галактозидазы [15] и 1,3- β -D-глюканазы [16]. Данные ферменты действуют на полисахариды растительной клеточной стенки, в частности на структуру боковых цепей пектинов и арабиногалактанов. До настоящего времени не проводились исследования по выяснению роли генов *rol* в регуляции активности гликаназ, особенностей строения и биосинтеза растительных полисахаридов.

В качестве модельной системы были выбраны трансгенные каллусные культуры лекарственного растения марены сердцелистной *Rubia cordifolia* L., экспрессия генов *rol* в которых активировала биосинтез антрахинонов [17].

Цель работы – выяснение роли агробактериальных генов *rol* в регуляции биосинтеза полисахаридов и активности гликаназ растительных клеток.

МЕТОДИКА

Контрольная и трансформированные культуры *Rubia cordifolia* L. Каллусные культуры получены из листьев трехнедельного стерильного микро-растения *Rubia cordifolia* L. [17]. Нетрансформированную культуру, которую использовали в качестве контроля, обозначали R. Все трансгенные культуры марены сердцелистной были получены из листьев того же растения путем агробактериальной трансформации с помощью штамма *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, содержащего гены *rol* в составе бинарного вектора pPCV002 [18], как описано ранее [19]. Трансгенные культуры с низким, средним и высоким уровнем экспрессии генов *rolB* и *rolC* были обозначены RBL, RBM, RBH и RCL, RCM, RCH соответственно. Корнеобразующие каллусная и суспензионная культуры с высокой экспрессией гена *rolC* обозначены RCH-RC (RCH-roots callus) и RCH-RS (RCH-roots suspension) соответственно. *rolA*-трансгенная культура обозначена RA. Трансгенная культура RA4 с совместной экспрессией генов *rol* была получена пу-

тем трансформации диким штаммом *Agrobacterium rhizogenes* A4 [20]. Как контрольная, так и трансгенные культуры обладали стабильными ростовыми характеристиками и были подробно описаны ранее [21]. Условия культивирования и составы сред были идентичны для контрольной и трансгенных культур: каллусы выращивали в колбах Эрленмейера объемом 100 мл при 25°C в темноте на среде W_{B/A} [17], содержащей 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина и 2.0 мг/л α -нафтилуксусной кислоты. Каллусы субкультивировали с интервалом 30 сут.

Выделение полисахаридов. Сухую биомассу ищерапывающе экстрагировали в аппарате Сокслета органическими растворителями (метанолом и хлороформом) для удаления низкомолекулярных примесей. Полисахариды из воздушно-сухого остатка биомассы выделяли как описано в работе [22]. В результате получали две фракции полисахаридов: пектин и арабиногалактан (АГ). Содержание полисахаридных фракций представляли в процентах от сухой биомассы, предварительно обработанной метанолом и хлороформом. Эксперименты проводили 3 раза.

Общие аналитические методы. Во фракциях полисахаридов определяли содержание гликуроновых кислот по реакции с 3,5-диметилфенолом в присутствии концентрированной серной кислоты [23], содержание белка определяли методом Лоури. Общее содержание углеводов устанавливали по реакции с фенолом в присутствии серной кислоты [24]. Спектрофотометрические измерения проводили на приборе Ultrospec 3000 (“Pharmacia Biotech”, Великобритания). ГЖХ выполняли на приборе Hewlett-Packard 4890A (“Hewlett-Packard”, США) с пламенно-ионизационным детектором и интегратором HP 3395A на капиллярной колонке RTX-1 (0.25 мм × 30 м) (“Restek”, США), газ-носитель – аргон. Средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу полисахаридов определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, которую проводили, как описано ранее [25]. Образец (2–3 мг) растворяли в 1.0 мл 0.15 М раствора NaCl в бидистиллированной воде и фильтровали. Для анализа использовали хроматографическую систему: насос SD-200 (“Dynamax”, США), колонку Shodex Asahipak GS-620HQ (7.6 мм × 30 см) (“Shimadzu”, Япония) и предколонку Shodex GS-26 7B (7.6 мм × 5 см) (“Shimadzu”, Япония), термостат CTO-10AS (“Shimadzu”, Япония), детектор-рефрактометр RID G136A (“Shimadzu”, Япония). Элюирование проводили 0.15 М NaCl при 40°C со скоростью потока 0.5 мл/мин. Для калибровки колонки использовали декстрансульфаты с молекулярными массами 36–50, 400–600 и 1400 кДа (“Sigma”, США).

Полный кислотный гидролиз. Полисахаридные фракции (по 2.0–2.5 мг) гидролизовали 2.0 М трифторуксусной кислотой (1.0 мл) при 100°C в течение 3–4 ч. Затем гидролизаты упаривали в вакууме с метиловым спиртом до полного удаления трифторуксусной кислоты. В качестве внутреннего стандарта использовали миоинозит (0.5 мг/мл). Моносахариды идентифицировали с помощью ГЖХ в виде соответствующих ацетатов полиолов [26].

Анализ активности гликаназ. Биомассу гомогенизировали в 0.05 М натрий-ацетатном буфере, pH 5.0, соотношение биомасса–буфер 1 : 10, центрифугировали при 10000 g 20 мин. Затем супернатант диализовали 3 сут против 0.05 М натрий-ацетатного буфера, pH 5.0, при 4°C и центрифугировали. В супернатанте определяли активность внутриклеточных ферментов. Агаризованную культуральную среду центрифугировали при 10000 g 20 мин, супернатант диализовали 3 сут против 0.05 М натрий-ацетатного буфера, pH 5.0, при 4°C и снова центрифугировали. В супернатанте определяли активность внеклеточных ферментов.

Активность полигалактуроназы определяли по накоплению редуцирующих сахаров после 10 мин инкубации раствора фермента при 50°C с 1%-ной полигалактуроновой кислотой (“ICN”, США) в 0.05 М натрий-ацетатном буфере, pH 4.6. Образовавшиеся восстанавливающие сахара определяли методом Нельсона–Сомоджи [27]. Калибровочный график строили по D-галактуроновой кислоте. За единицу активности пектиназы принимали такое количество фермента, которое при данных условиях освобождает из полигалактуроновой кислоты 1 мкмоль D-галактуроновой кислоты за 1 мин.

Активность пектинэстеразы (КФ 3.1.1.11) устанавливали титрометрическим определением освобожденных карбоксильных групп в результате гидролиза яблочного пектина (“Sigma”). За единицу активности пектинэстеразы принимали такое количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 мкэкв сложноэфирных связей в молекуле пектина за 1 мин при 30°C [28].

Активность α -L-арабинофуранозидазы (КФ 3.2.1.55) и β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23) определяли спектрофотометрическим способом при 400 нм с использованием 4-нитрофенил- α -L-арабинофуранозида и 2-нитрофенил- β -D-галактопиранозида (“Sigma”) как субстратов соответственно. Калибровочный график строили по *n*-нитрофенолу. За единицу α -L-арабинофуранозидазной и β -галактозидазной активности принимали такое количество фермента, которое расщепляет 1 мкмоль субстрата за 1 мин при pH 4.2 и 30°C [29].

Удельную активность ферментов выражали как отношение единиц активности фермента к 1 мг белка (ед./мг). Эксперименты проводили 3–5 раз.

Таблица 1. Содержание полисахаридов в клеточных культурах *R. cordifolia*, трансформированных генами *rol*

Линия	Выход пектина, %	Выход арабиногалактана, %
R (контроль)	3.4 ± 0.3	1.1 ± 0.1
RA	2.8 ± 0.3	1.1 ± 0.1
RBL	4.3 ± 0.3* ^a	2.2 ± 0.2* ^a
RBM	4.9 ± 0.8* ^a	1.9 ± 0.1*
RBH	2.4 ± 0.7	1.5 ± 0.2*
RCL	3.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1*
RCM	2.8 ± 0.3	1.7 ± 0.7
RCH	2.0 ± 0.2*	1.3 ± 0.1
RCH-RS	4.3 ± 0.3*	0.9 ± 0.2
RCH-RC	5.4 ± 0.4*	0.6 ± 0.03*
RA4	4.7 ± 0.8	1.8 ± 0.3*

Примечание. В табл. 1–3 R – нетрансформированная культура – контроль; RA – культура, трансформированная геном *rolA*; RBL, RBM и RBH – культуры трансформированные геном *rolB* с низким, средним и высоким уровнем экспрессии трансгена соответственно; RCL, RCM и RCH – культуры, трансформированные геном *rolC* с низким, средним и высоким уровнем экспрессии трансгена соответственно; RA4 – культура, трансформированная диким штаммом *A. rhizogenes* A4.

* Различия достоверны при сравнении контроля со всеми линиями ($p < 0.05$). ^a Различия достоверны при сравнении *rolB* и *rolC* трансгенов ($p < 0.05$).

Статистический анализ. При статистической обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение и среднеквадратичное отклонение. Достоверность оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание пектиновых веществ в трансгенных культурах. Из каллусных культур марены сердцелистной *Rubia cordifolia*, нетрансформированной (контроль) и трансформированных генами *rolA*, *rolB* и *rolC*, а также культуры, трансформированной диким штаммом *A. rhizogenes* A4, экстракцией водой и раствором оксалата аммония были выделены АГ и пектин соответственно. Выход пектина в контрольной линии марены и линии, трансформированной геном *rolA*, составил 3.4 и 2.8% соответственно (табл. 1). Процентное содержание пектина в линиях, трансформированных генами *rolB* и *rolC*, варьировало от 2.4 до 4.9% и от 2.0 до 5.4% соответственно. Содержание пектина в линии, трансформированной диким штаммом *A. rhizogenes* A4, составляло 4.7%. Выход АГ в контрольной линии и линии, трансформированной геном *rolA*, был одинаковым и составлял 1.1%. Процентное содержание АГ в линиях, трансформированных генами *rolB* и *rolC*, варьировало от 1.5 до 2.2% и от 0.6 до 1.7% соответственно, в линии,

трансформированной диким штаммом *A. rhizogenes* A4, составило 1.8%.

Установлено, что выход пектина в трансгенных культурах изменялся в зависимости от типа гена следующим образом: выход был выше в *rolB*, по сравнению с *rolC* трансгенами для линий с низкой (RBL и RCL) и средней (RBM и RCM) экспрессией в 1.2 и 1.7 раза соответственно, в линиях с высокой экспрессией (RBH и RCH) выход не изменялся, в *rolA* трансгене и в культуре RA4, с совместной экспрессией генов *rol*, выход также не изменялся по сравнению с контролем (табл. 1).

Показано, что выход пектина в трансгенных каллусах по сравнению с контролем изменялся в зависимости от уровня экспрессии гена (низкий, средний или высокий) следующим образом: увеличивался в 1.4 раза в *rolB* трансгенах с низкой и средней экспрессией (линии RBL и RBM), снижался в 1.7 раза в *rolC* трансгенах с высокой экспрессией (линия RCH). В корнеобразующих линиях, экспрессирующих ген *rolC* (RCH-RC и RCH-RS), выход пектина увеличивался в 1.3–1.6 раза.

Данные свидетельствуют о том, что экспрессия гена *rolB* приводила к увеличению содержания пектинов в клетках марены сердцелистной (*Rubia cordifolia* L.), тогда как экспрессия *rolC* ингибировала синтез пектинов. Ингибирующий эффект гена *rolC* зависел от уровня его экспрессии: снижение биосинтеза пектина было характерно только для трансгенов марены с высокой степенью экспрессии гена. При появлении признаков дифференциации клеток (образование корней) в трансгенах *rolC* ингибирующий эффект не наблюдался.

Выход АГ изменялся в зависимости от типа гена следующим образом: был в 1.4 раза выше в *rolB*, по сравнению с *rolC* трансгенами для линий с низким уровнем экспрессии, и не изменялся в линиях со средней и высокой экспрессией. Ген *rolA* не оказывал влияние на содержание АГ в трансгенных клетках. Совместная экспрессия генов *rol* в культуре RA4 приводила к увеличению продукции АГ в 1.7 раза по сравнению с контролем.

При изменении уровня экспрессии генов процентное содержание АГ также менялось. Выход увеличивался в 1.4 раза в *rolC* трансгенах с низкой экспрессией (линия RCL) и в 2.0, 1.7 и 1.4 раза в *rolB* трансгенах с низкой, средней и высокой экспрессией соответственно. В корнеобразующей с высокой экспрессией гена *rolC* каллусной культуре (RCH-RC) выход АГ снижался в 1.8 раза. Данные свидетельствуют о том, что экспрессия гена *rolB* оказывала больший стимулирующий эффект на биосинтез АГ в клетках, чем гены *rolA*, *rolC* и трансформация диким штаммом *A. rhizogenes*.

Таким образом, трансформация генами *rol* позволяла увеличить биосинтетическую активность культивируемых клеток растений.

Общая химическая характеристика пектиновых веществ трансгенных культур. Определен моносахаридный состав пектинов трансгенных культур марены сердцелистной, трансформированных генами *rol*, и проведено сравнение с немодифицированной культурой (табл. 2). Показано, что пектины из трансгенных и контрольных каллусов (линия R) марены содержали большое количество остатков D-галактуроновой кислоты (44–75%), основными нейтральными компонентами были остатки галактозы (5.3–12.2%), арабинозы (2.7–8.2%) и рамнозы (0.8–1.6%) (табл. 2). Соотношение арабиноза/галактоза составляло 1 : (0.9–2.6). В составе полисахарида также были обнаружены в небольшом количестве остатки глюкозы, ксилозы и маннозы.

При трансформации клеток генами *rolB* и *rolC* в линиях со средней (RBM и RCM) и высокой (RBH и RCH) экспрессией в составе пектина по сравнению с контролем (R) наблюдали снижение содержания остатков арабинозы в 1.3 и 1.4–2.4 раза соответственно. В линиях RBH и RCL отмечали увеличение содержания остатков галактозы в 1.6 и 1.3 раза соответственно. У корнеобразующей линии с высоким уровнем экспрессии RCH-RS происходило снижение содержания остатков арабинозы и галактозы в 1.2 и 1.5 раза соответственно по сравнению с контролем. В корнеобразующей линии RCH-RC наблюдали снижение содержания остатков галактозы в 1.4 раза. При сравнении каллусной линии RCH с корнеобразующими линиями RCH-RC и RCH-RS было установлено, что появление признаков дифференциации клеток приводило к увеличению содержания остатков арабинозы в пектине в 2.2 раза. В культурах, трансформированных геном *rolA* и диким штаммом *A. rhizogenes*, количество нейтральных моносахаридных остатков существенно не изменялось. Содержание остатков галактуроновой кислоты уменьшалось в *rolA*, *rolB*, и *rolC* трансгенах в 1.7, 1.5 и 1.2 раза соответственно, в корнеобразующих *rolC* трансгенах в 1.4–1.7 раза, в культуре, трансформированной диким штаммом *A. rhizogenes*, в 1.7 раза. Практически для всех линий отмечено снижение содержания белка и остатков глюкозы.

При трансформации клеток геном *rolA* и диким штаммом *A. rhizogenes* средневесовая молекулярная масса (M_w) пектина была близка к значению в контроле (табл. 2). В *rolB* трансгенах с низкой и средней экспрессией M_w пектина увеличивалась в 1.1 раза, а в трансгенах с высокой экспрессией снижалась в 1.1 раза. В *rolC* трансгенах с низкой, средней и высокой экспрессией M_w пектина возрастала в 1.1–1.3 раза. В корнеобразующих линиях RCH-RS наблюдали снижение M_w в 1.5 раза, тогда как в RCH-RC отмечалось увеличение M_w в 1.2 раза. Среднечисловая молекулярная масса

Таблица 2. Характеристика полисахаридов, выделенных из каллусных культур *R. cordifolia*, трансформированных генами *rol*

Фракция	Нейтральные моносахариды, %						GalA, %	Белок, %	M _w , кДа	M _n , кДа
	Gal	Ara	Rha	Glc	Xyl	Man				
Пектин										
R-II (контроль)	7.8	6.5	1.5	4.6	0.4	0.1	74.9	3.5	242	43.8
RA-II	8.5	6.5	1.4	1.7*	0.7	0.1	43.6*	0.5*	243	30.4
RBL-II	7.0	7.0	0.8*	1.3*	0.7	0.3	55.0*	3.7	268	22.8
RBM-II	9.0	5.4*	1.2	1.9*	0.6	0.2	49.1*	1.5*	273	30.8
RBH-II	12.2*	4.5*	1.6	2.3*	0.7	0.2	49.8*	3.5	224	28.0
RCL-II	10.4*	7.4	1.3	2.9*	0.5	0.1	68.7*	1.5*	317	30.0
RCM-II	8.3	4.9*	1.2	9.7*	0.7	0.1	61.9*	2.2*	265	27.0
RCH-II	6.8	2.7*	0.9	2.6*	0.6	0.2	67.5*	2.6*	263	26.3
RCH-RS-II	5.3*	5.6*	1.0	5.3*	0.8	0.2	52.2*	2.0*	163	23.5
RCH-RC-II	5.6*	6.3	1.3	0.9*	0.7	0.2	43.0*	2.8*	300	26.7
RA4-II	8.5	8.2	1.0	0.9*	0.6	0.3	44.5*	2.4*	249	28.6
Арабиногалактан										
R-I (контроль)	32.9	11.5	1.4	3.4	4.4	1.0	9.2	10.1	99	12.7
RA-I	36.5	7.2*	0.9	1.9*	2.8	0.5	8.7	7.2*	н.о.	н.о.
RBL-I	30.9	7.1*	0.4*	1.2*	2.8	0.3*	9.3	5.9*	106	22.7
RBM-I	33.5	4.6*	0.5*	4.8	3.7	0.3*	8.1*	3.2*	96	19.1
RBH-I	35.1	3.2*	0.4*	1.3*	2.1*	0.2*	8.5	5.1*	135	16.6
RCL-I	35.3	5.2*	0.3*	1.4*	1.7*	0.2*	9.5	8.2	н.о.	н.о.
RCM-I	36.3	4.7*	0.4*	2.0*	2.3*	0.5*	9.1	8.9	98	17.8
RCH-I	35.3	5.0*	0.5*	1.2*	2.3*	0.2*	7.0*	5.2*	91	16.6
RCH-RS-I	14.5*	14.4*	1.9	2.9	1.1*	0.5	8.6	28.9*	н.о.	н.о.
RCH-RC-I	35.9	6.8*	1.2	2.4	1.9*	0.6	8.1*	3.2*	н.о.	н.о.
RA4-I	32.1	3.7*	0.2*	2.6*	1.7*	0.5	7.3*	6.1*	120	20.0

* Различия достоверны при $p < 0.05$. I – фракции АГ, II – фракции пектина, н.о. – не определено.

(M_n) всех пектинов уменьшалась по сравнению с контролем.

Таким образом, содержание остатков арабинозы и галактозы изменялось под действием генов *rolB* и *rolC*, тогда как в *rolA* трансгене и линии, трансформированной диким штаммом *A. rhizogenes*, таких изменений не было обнаружено. С увеличением уровня экспрессии генов *rolB* и *rolC* происходило более существенное снижение содержания остатков арабинозы в пектине. Кроме того, с увеличением уровня экспрессии гена *rolB* наблюдалось увеличение количества остатков галактозы в пектине марены. Содержание остатков галактуронової кислоты изменялось в зависимости от типа гена следующим образом: снижение количества остатков увеличивалось в ряду от *rolC* к *rolB* и *rolA* трансгенов. Совместная экспрессия генов *rol* в культуре RA4 приводила к снижению количества остатков галактуронової кислоты до уровня *rolA*-трансгенной культуры. Данные сви-

детельствуют о том, что под действием генов *rol* происходило снижение содержания 1,4- α -D-галактуронана в пектиновой макромолекуле. Снижение M_w пектина при высоком уровне экспрессии гена *rolB* указывало на деполимеризацию пектина.

В моносахаридном составе АГ из трансгенных и нетрансгенных каллусов марены доминировали остатки галактозы (14.5–36.5%), арабинозы (3.2–14.4%) и галактуронової кислоты (7–9%) (табл. 2). Соотношение арабиноза/галактоза варьировало от 1 : 1 до 1.0 : 10.9. Остатки ксилозы, глюкозы, рамнозы и маннозы присутствовали в меньшем количестве. В АГ в результате трансформации клеток генами *rolA*, *rolB* и *rolC* наблюдали снижение содержания остатков арабинозы в 1.6, 1.6–3.8 и 2.2–2.5 раза соответственно. В культуре, трансформированной диким штаммом *A. rhizogenes*, отмечено снижение содержания остатков арабинозы в 3.1 раза. С увеличением уровня экспрессии гена *rolB*

Таблица 3. Активность ферментов (ед./мг белка) в клеточных культурах *R. cordifolia*, трансформированных генами *rol*

Линия	β -галактозидаза	α -L-арабинофуранозидаза	Полигалактуроназа	Пектинэстераза
R (контроль)	37.8 \pm 6.6	0	6.6 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3
RA	55.7 \pm 7.8*	57.3 \pm 4.9	1.0 \pm 0.2*	2.2 \pm 0.6*
RBL	26.4 \pm 5.6	0	3.4 \pm 0.6*	1.6 \pm 0.3*
RBM	46.1 \pm 8.6	45.8 \pm 1.0	0.9 \pm 0.2*	2.9 \pm 0.7*
RВН	23.8 \pm 0.9*	23.6 \pm 1.2	4.4 \pm 1.1*	1.4 \pm 0.4
RCL	21.9 \pm 2.7*	24.0 \pm 1.0	2.9 \pm 0.4*	1.1 \pm 0.3
RCM	51.3 \pm 14.0	65.6 \pm 21.9	4.9 \pm 0.4*	3.3 \pm 0.8*
RCH	37.9 \pm 7.6	43.7 \pm 16.2	1.4 \pm 0.1*	1.8 \pm 0.3*
RCH-RS	40.0 \pm 1.6	36.0 \pm 7.1	3.2 \pm 0.6*	1.9 \pm 0.2*
RA4	32.6 \pm 7.5	44.2 \pm 11.2	0*	0.8 \pm 0.2

* Различия достоверны при $p < 0.05$.

наблюдали более существенное снижение содержания остатков арабинозы в АГ. В корнеобразующей линии RCH-RS происходило увеличение содержания остатков галактозы в 1.3 раза и снижение остатков галактозы в 2.3 раза. В корнеобразующей линии RCH-RC наблюдали снижение содержания остатков арабинозы в 1.7 раза. Количество остатков галактуроновой кислоты уменьшалось в линиях RA4, RBM, RCH и RCH-RC. Почти для всех линий отмечено снижение содержания белка, а также остатков глюкозы, ксилозы и маннозы.

При трансформации клеток диким штаммом *A. rhizogenes* M_w АГ увеличивалась в 1.2 раза (табл. 2). В *rolB* трансгенах с высокой экспрессией M_w увеличивалась в 1.4 раза, в *rolC* трансгенах также с высокой экспрессией этот показатель уменьшался в 1.1 раза. M_n всех АГ увеличивалась по сравнению с контролем, при этом полисахариды характеризовались высокой полидисперсностью.

Таким образом, независимо от типа гена содержание остатков арабинозы в АГ снижалось и кроме того изменялось в зависимости от уровня экспрессии гена *rolB*.

Активность гликаназ в клетках, трансформированных генами *rol*. Показано, что активность β -галактозидазы в каллусных культурах RВН и RCL снижалась по сравнению с контролем (линия R) в 1.6 и 1.7 раза соответственно, тогда как в линии RA увеличивалась в 1.5 раза (табл. 3). Активность α -L-арабинофуранозидазы в трансгенах возрастала, достигая наибольших значений в линиях со средней экспрессией (RBM и RCM) и в линии RA. Активность полигалактуроназы в трансгенных каллусах снижалась в 1.4–7.2 раза. В результате трансформации клеток марены генами *rolA*, *rolB* и *rolC* наблюдали увеличение активности пектинэстеразы в 2.1–4.3 раза в линиях RA, RBL, RBM, RCM, RCH и RCH-RS. При этом наиболь-

шее увеличение активности наблюдали у линий со средней экспрессией (RBM и RCM).

Ранее было показано, что трансформация геном *rolC* значительно увеличивала активность некоторых карбогидраз и продуцирование их молекулярных форм [14]. В частности, было установлено, что в культурах клеток женьшеня *Panax ginseng*, трансформированных геном *rolC*, происходило увеличение активности α -, β -D-галактозидазы [14] и 1,3- β -D-глюканазы [15]. Однако в трансгенном каллусе марены активность β -галактозидазы увеличивалась только при трансформации геном *rolA*, и снижалась при трансформации генами *rolB* и *rolC*, что, вероятно, связано с использованием в качестве модели каллусных клеток другого вида растения. Кроме того, для трансгенных культур марены выявлено увеличение активности α -L-арабинофуранозидазы и пектинэстеразы.

Данные свидетельствуют о том, что гены *rol* участвуют в регуляции активности гликаназ и эстераз, которые оказывают гидролитическое действие на полисахариды растительных клеток, тем самым, модифицируя их структуру, в частности, строение боковых цепей пектина и АГ. Снижение содержания остатков арабинозы в пектине и АГ, вероятно, связано с ростом активности α -L-арабинофуранозидазы в трансгенных каллусах марены. Увеличение содержания остатков галактозы в пектинах ряда трансгенных линий марены (RВН и RCL) обусловлено снижением активности β -галактозидазы в них. Уменьшение содержания галактуроновой кислоты в пектинах и ряда образцов АГ, скорее всего, не связаны со снижающейся активностью полигалактуроназы в клетках. При трансформации генами *rol* в ряде случаев не наблюдалось зависимости содержания остатков арабинозы, галактозы и галактуроновой кислоты в полисахаридах от активности гликаназ в клетках, что может быть связано с несовпадением наблюдаемого *in vivo* эффекта и выявляемой *in vitro*

активности. Возможно, в условиях *in vitro* отсутствуют некие существенные кофакторы или существуют “запасные формы” ферментов [30]. Кроме того, ранее было показано, что изменение активности карбогидраз в клетках, трансформированных генами *rolC*, является, скорее всего, результатом экспрессии новых изоформ ферментов, а не индукцией существующих ферментов [14].

С появлением дифференциации клеток (корнеобразование) содержание остатков галактозы в пектине и АГ снижалось без изменения активности β -галактозидазы в клетках. Данные свидетельствуют о том, что степень дифференциации клеток имеет значение для уровня галактозы в полисахаридах, но при этом изменение активности β -галактозидазы не может быть объяснено изменением степени дифференциации клеток.

Хотя механизм действия генов *rol* в трансгенных растениях еще не ясен, но некоторые фенотипические изменения могут указывать на биохимический эффект генов на эндогенные гормоны через изменение размера пула ростовых промоторов или ингибиторов (гормональный баланс), или чувствительности к свободным активным гормонам [13]. Данные современных исследований свидетельствуют, что гены *rolC* снижают уровень индолилуксусной кислоты в клетках и ингибируют рост растений [13].

Изменение содержания остатков арабинозы и галактозы в пектине и АГ трансгенов марены, возможно, связано с увеличением чувствительности к ауксину, который, как известно, содействует переносу арабинозы из УДФ-арабинозы в АГ и пектин [31] и участвует в контроле потока УДФ-галактозы в полимеры клеточной стенки [32].

Таким образом, показано, что содержание и моносакхаридный состав полисахаридов в культурах клеток, трансформированных агробактериальными генами *rol*, изменялись в зависимости от типа гена и уровня экспрессии трансгена. Впервые показана связь между изменением активности гликаназ в клетках, трансформированных генами *rol*, и моносакхаридным составом синтезируемых полисахаридов. Механизм действия генов *rol* может заключаться как в регуляции активности гликаназ и эстераз, которые модифицируют структуру полисахаридов, так и в регуляторном эффекте генов на эндогенные гормоны, которые стимулируют перенос УДФ-сахаров в полимеры клеточной стенки. Трансформация генами *rol* оказывает неоднозначное влияние на активность гликаназ и на структуру пектиновых веществ и требуется дальнейшее исследование механизма их действия.

Применение агробактериальной трансформации генами *rol*, по-видимому, позволит изменять структуру полисахаридов, что открывает возмож-

ности получения полисахаридов с измененным строением и свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований УрО РАН, проект № 12-С-4-1006; программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”; гранта Президента РФ МК-3459.2011.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Оводов Ю.С., Головченко В.В., Гюнтер Е.А., Попов С.В. Пектиновые вещества растений европейского Севера России / Ред. А.В. Кучин. Екатеринбург: УрО РАН, 2009. 112 с.
2. Mohnen D. // *Cur. Opin. Plant Biol.* 2008. V. 11. P. 266–277.
3. Wagner H., Stuppner H., Schafer W., Zenk M. // *Phytochemistry*. 1988. V. 27. P. 119–126.
4. Roesler J., Emmendorffer A., Steinmuller C., Luettig B., Wagner H., Lohmann-Matthes M.-L. // *Int. J. Immunopharmacol.* 1991. V. 13. P. 931–941.
5. Оводов Ю.С. // *Биоорганическая химия*. 1998. Т. 24. С. 483–501.
6. Оводов Ю.С. // *Биоорганическая химия*. 2009. Т. 35. С. 293–310.
7. Sorensen S.O., Pauly M., Bush M., Skjtt M., McCann M.C., Borkhardt B., Ulvskov P. // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2000. V. 97. P. 7639–7644.
8. Willats W.G.T., McCartney L., Mackie W., Knox J.P. // *Plant Molecul. Biol.* 2001. V. 47. P. 9–27.
9. Oomen R.J.F.J., Doeswijk C.H.L., Bush M.S., Vincken J.-P., Borkhardt B., Broek L.A.M., Corsar J., Ulvskov P., Voragen A.G.J., McCann M.C., Visser R.G.F. // *Plant J.* 2002. V. 30. P. 403–413.
10. Fry S.C. // *New Phytologist*. 2004. V. 161. P. 641–675.
11. Bulgakov V.P., Khodakovskaya M.V., Labetskaya N.V., Chernoded G.K., Zhuravlev Yu.N. // *Phytochemistry*. 1998. V. 49. № 7. P. 1929–1934.
12. Bulgakov V.P. // *Biotechnol. Adv.* 2008. V. 26. P. 318–324.
13. Maurel C., Brevet J., Barbier-Brygoo H., Guern J., Tempe J. // *Mol. Gen. Genet.* 1990. V. 223. P. 58–64.
14. Bettini P., Baraldi R., Rapparini F., Melani L., Mauro M.L., Bindi D., Buiatti M. // *Scientia Horticulturae*. 2010. V. 123. P. 323–328.
15. Bulgakov V.P., Kusaykin M., Tchernoded G.K., Zvyagintseva T.N., Zhuravlev Yu.N. // *Fitoterapia*. 2002. V. 73. P. 638–643.
16. Kiselev K.V., Kusaykin M.I., Dubrovina A.S., Bezverbnny D.A., Zvyagintseva T.N., Bulgakov V.P. // *Phytochemistry*. 2006. V. 67. P. 2225–2231.
17. Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Khodakovskaya M.V., Glazunov V.P., Zvereva E.V., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. // *J. Biotechnol.* 2002. V. 97. P. 213–221.
18. Spena A., Schmuelling T., Koncz C., Schell J.S. // *EMBO J.* 1987. V. 6. P. 3891–3899.
19. Bulgakov V.P., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N. // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 643. P. 229–242.

20. Slightom J., Durand-Tardif M., Joanin L., Tepfer D. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 108–121.
21. Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. // Biotechnol. Bioeng. 2008. V. 100. P. 118–125.
22. Günter E.A., Ovodov Yu.S. // Phytochemistry. 2002. V. 59. P. 703–708.
23. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Bot. Marina. 1995. V. 38. P. 43–51.
24. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 350–356.
25. Knutsen S.H., Murano E., Amato M., Toffanin R., Rizzo R., Paoletti S. // J. Appl. Phycol. 1995. V. 7. P. 565–576.
26. York W.S., Darvill A.G., McNeil M., Stevenson T.T., Albersheim P. // Methods Enzymol. 1985. V. 118. P. 3–40.
27. Nelson N. // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. P. 37–38.
28. Грачёва И.М., Грачёв Ю.П., Мосичев М.С., Борисенко Е.Г., Богатков С.В., Гернет М.В. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов. М.: Легкая и пищевая пр-сть, 1982. С. 106–108.
29. Полюгалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов. Справочник. М: ДеЛи принт, 2003. С. 138–140.
30. Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. М.: Наука, 2007. 429 с.
31. Rubery P.H., Northcote D.H. // Biochim. Biophys. Acta. 1970. V. 222. P. 95–108.
32. Seifert G.J., Barber C., Wells B., Keith R. // Plant Cell. 2004. V. 16. № 3. P. 723–730.

Effect of the *rol* Genes from *Agrobacterium rhizogenes* on the Content and Structure of Pectic Substances and Glycanase Activity in *Rubia cordifolia* Transgenic Cell Cultures

E. A. Gunter^a, O. V. Popeyko^a, Yu. N. Shkryl^b, G. N. Veremeichik^b,
V. P. Bulgakov^{b, c}, and Yu. S. Ovodov^a

^a Institute of Physiology, Komi Science Centre, Urals Branch, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982 Russia
e-mail: gunter@physiol.komisc.ru

^b Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, 690022 Vladivostok

^c Far Eastern Federal University, 690950 Vladivostok

Received October 8, 2012

Abstract—The expression of the *rolB* gene was found to increase the pectic yield in *Rubia cordifolia* cells, while the *rolC* gene inhibited the pectin production, which correlated with its expression level. The expression of the *rolA*, *rolB*, and *rolC* genes led to an increase in the content of arabinogalactan (AG) in cells. The increase in the expression of the *rolB* and *rolC* genes resulted in a more significant reduction in the content of arabinose residues in pectin, which was accompanied by an increased activity of α -L-arabinofuranosidase in cells. Moreover, the amount of galactose residues in pectin increased with the enhancement of the *rolB* expression due to a decrease in the activity of β -galactosidase in cells. The content of galacturonic acid residues in pectin from transgenic cultures increased in the following order: *rolC* < *rolB* < *rolA*. The amount of arabinose residues in AG decreased independently of the gene type. The amount of arabinose residues in AG was found to be considerably reduced when the *rolB* expression level was increased.

УДК 547.541.64.995.12

ВЫДЕЛЕНИЕ D-ГЛЮКОЗАМИНА ИЗ ХИТИН-ГЛЮКАНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

© 2013 г. С. Д. Артамонова*, Ф. Ф. Шарнина**

*Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071

**Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, 424000

e-mail: svetlana.artamonova@gmail.com

Поступила в редакцию 13.03.2012 г.

Изучены особенности кислотного гидролиза хитин-глюкановых комплексов (ХГК) высших грибов и разработана технология выделения и очистки из гидролизата D(+)-глюкозамина гидрохлорида высокого качества. Состав, свойства и чистота продукта проанализированы с использованием комплекса физико-химических методов. Выход конечного продукта составил 20–60% в зависимости от содержания хитина в образцах ХГК. Полученный аминсахар представлял собой белый кристаллический порошок без запаха, легко растворимый в воде, малорастворимый в 95%-ном этиловом спирте, нерастворимый в хлороформе, в других органических растворителях и по основным показателям соответствовал качеству стандартного D(+)-глюкозамина гидрохлорида.

DOI: 10.7868/S0555109913030045

В настоящее время большое внимание уделяется синтезу лекарственных препаратов на основе природного сырья. Аминсахар D-глюкозамин (ДГА) – естественный компонент суставного хряща, присутствующий в организме человека. Он стимулирует синтез собственных гликозаминогликанов, нормализует метаболизм гиалиновой ткани, способствуя регенерации хрящевых поверхностей и суставной сумки. Поскольку ДГА при хранении на воздухе и даже в плотно закрытом сосуде быстро окисляется и разлагается, на практике обычно используют его хлоргидрат, 2-дезоксид-2-амино-β-D-глюкоза гидрохлорид [1, 2].

Солянокислый D-глюкозамин (ДГА • HCl) широко применяется в медицине в составе лекарственных препаратов хондропротекторного и противовоспалительного действия, в качестве иммуностимуляторов и компонентов пищевых добавок [3, 4]. Поэтому на сегодняшний день актуальными задачами являются как поиск новых источников получения ДГА, так и совершенствование способов выделения ДГА • HCl.

Технология препаративного выделения D(+)-глюкозамина гидрохлорида основана на полном кислотном гидролизе природного полисахарида хитина в концентрированной соляной кислоте с последующей очисткой гидролизата и перекристаллизацией продукта [2, 5–7]. При гидролизе (рис. 1) происходит расщепление ацетамидных и гликозидных связей, что приводит к процессам деацетилирования и деполимеризации [1].

В настоящее время основным сырьем для получения ДГА • HCl служит хитин ракообразных (креветка, краб, криль). В клеточной стенке грибов хитин содержится в виде хитин-глюканового комплекса (ХГК), который по своим показателям ни в чем не уступает хитину и является более дешевым и доступным сырьем для получения ДГА • HCl [6, 8, 9].

Данная работа посвящена разработке способа выделения ДГА • HCl из хитин-глюканового комплекса высших грибов. Исследован процесс кислотного гидролиза ХГК, выделения и очистки из гидролизата целевого продукта. Варьировались температурный режим, кислотность, продолжительность гидролиза и приемы отмывки от побочных продуктов кислотного гидролиза. На основании полученных результатов был разработан способ выделения ДГА • HCl из ХГК. Промывание целевого продукта проводилось холодной концентрированной соляной кислотой (от –10°C до –15°C). Выход аминсахара составил 20–60% от ХГК в зависимости от класса, вида и формы плодового тела высших грибов, из которого был выделен ХГК. Состав продукта и его химическая чистота исследовались методами элементного анализа, ТСХ, ИКС, ¹H-ЯМР (ПМР), определением удельного угла вращения, температуры плавления и доли основного вещества.

Цель работы – исследование кислотного гидролиза ХГК, выделение и очистка целевого продукта.

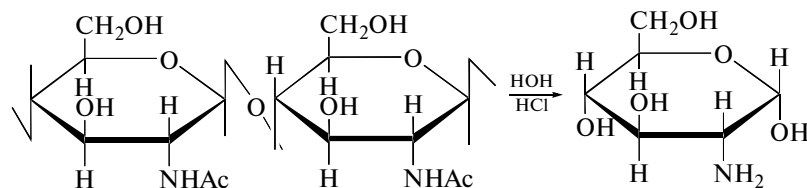


Рис. 1. Структурная формула фрагмента ДГА • HCl [1].

МЕТОДИКА

Материалы. В качестве сырья для выделения D(+)-глюкозамин гидрохлорида использовали ХГК из высших грибов (Марий Эл), *Armillariella mellea* (опенок настоящий), *Morchella esculenta* (сморчок настоящий), *Cantharellus cibarius* (лисичка настоящая), *Lactarius rufus* (груздь горький), *Amanita muscaria* (мухомор красный), *Macrolepiota excoriata* (гриб-зонтик белый), *Suillus bovinus* (козляк, решетник). Выделение ХГК из высших грибов проводили по разработанной нами четырехстадийной методике, описанной в работах [8, 9]. Данная методика предусматривает поэтапное удаление из биомассы грибов сопутствующих хитину веществ – протеинов, липидов, пигментов (в том числе и меланинов), жиров, минеральных веществ. В результате выделяются чистые образцы в виде порошка (ХГК грибов), имеющие цвет от светло-бежевого до белого, нерастворимые в щелочах, в разбавленных кислотах, в органических растворителях, в воде и сильно набухающие в ней. Характеристики ХГК грибов сопоставимы с характеристиками стандартного хитина из ракообразных (Arthropoda) и отвечают техническим требованиям (ТУ 15-02-538-89 и 15-01-472-87).

Получение D(+)-глюкозамина гидрохлорида. В трехгорловую колбу, снабженную электромешалкой, обратным холодильником и термометром, помещали 10 г сухого (с учетом влажности) измельченного ХГК, добавляли 100 мл концентрированной HCl ($\rho = 1.19 \text{ г/см}^3$) и при непрерывном перемешивании нагревали на водяной бане при 70–75°C в течение 3.5–4 ч. Затем колбу с реакционной смесью охлаждали, добавляли 100 мл дистиллированной воды и 2.5–3 г активированного угля. Реакционную массу продолжали нагревать при 50°C еще в течение 1–1.5 ч при непрерывном перемешивании. Охлажденную реакционную смесь черного цвета отфильтровывали на воронке Шотта или на воронке Бюхнера через плотный капрон в четыре слоя. Фильтрат светло-желтого оттенка упаривали с помощью водоструйного насоса (можно использовать водяную баню при 40°C) до объема 10–15 мл. После охлаждения выпавшие кристаллы ДГА • HCl отделяли от жидкости с помощью стеклянного фильтра или воронки Бюхнера через капроновую ткань в четыре слоя.

Кристаллы промывали на воронке Бюхнера холодной концентрированной HCl (от –10 до –15°C), далее поочередно этиловым спиртом и диэтиловым эфиром. Полученные кристаллы ДГА • HCl белого цвета сушили на воздухе до постоянной массы.

Методы исследования. В качестве стандартных образцов сравнения применяли: D(+)-глюкозамин гидрохлорид субстанция (ФСП 42-0314-1478-01, Научно-технический центр “ЭКОБИО-ТЕК” г. Мурманск, Россия), D(+)-глюкозу (ч.д.а., ГОСТ 6038-74), D(-)-фруктозу (ч., ТУ 6-09-1979-77) и D(+)-маннозу (ч., ТУ 6-09-07-666-76), технический хитин ракообразных – Arthropoda (ГОСТ 7630-87, Россия).

Анализ и степень чистоты ДГА • HCl из ХГК высших грибов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагельсодержащих пластинках Silufol-R и Silufol-UV 254 (“Avallier”, ЧССР) в сравнении со стандартами (D(+)-глюкозамин гидрохлорид субстанция, глюкоза, фруктоза, манноза). С целью исключения ошибок контроль процесса отделения ДГА • HCl от нейтральных сахаров осуществляли методом ТСХ в нескольких подобранных нами системах растворителей: 1) этанол–ацетон (3 : 2); 2) изопропанол–ацетон – 0.2 М молочная кислота (6 : 3 : 1); 3) этанол–ацетон–гексан (2 : 2 : 1), и по данным эксперимента определяли R_f .

Проявление хроматограмм осуществляли в парах йода или путем опрыскивания (0.25 мл свежеперегнанного анилина + 0.25 г дифениламина в 25 мл ацетона + 1 мл ортофосфорной кислоты) с дальнейшим нагреванием хроматографических пластинок в сушильном шкафу при температуре не более 70°C.

Долю основного вещества в ДГА • HCl определяли фотометрическим методом по Эльсону–Моргану. Элементный анализ по азоту, углероду и водороду проводили на автоматическом анализаторе C H N S/O Analyzer 2400 (“Perkin Elmer”, США). Удельное вращение образцов ДГА • HCl измеряли на поляриметре СМ-3 УХЛ 4.2 до и после установления равновесия α - и β -форм в течение 1 сут. ИК-спектры снимали на ИК-фурье-спектрофотометре VECTOR 22 (“Bruker”, Германия). ПМР-спектры получали на ЯМР спектрометре AVANCE 300 (“Bruker”, Германия). Температуру плавления образцов ДГА • HCl и смешанного

Таблица 1. Характеристика образцов солянокислого D-глюкозамина

ДГА • HCl	Выход, %	T _{пл} , °C	[α _D ²⁰], ° в воде	R _f	Основное вещество, %
ДГА • HCl (станд.)	—	210–211	+72.5	0.52	98.0
<i>C. cibarius</i>	57.8	210	+72.5	0.52	97.9
<i>A. mellea</i>	50.5	210	+72.5	0.52	97.8
<i>M. excoriate</i>	46.8	210–211	+72.0	0.53	97.6
<i>L. rufus</i>	42.4	210–211	+72.5	0.52	97.5
<i>A. muscaria</i>	43.7	209–210	+72.0	0.51	97.5
<i>S. bovinus</i>	40.3	210–212	+72.0	0.51	97.2
<i>M. esculenta</i>	23.8	209–210	+72.5	0.52	97.9

плавления фиксировали на столике Кофлера (“Voëtius”, Германия). Влажность и зольность образцов оценивали гравиметрическим методом по ТУ 15-02 538-89. Подлинность продуктов устанавливали по качественной реакции с реактивом Эрлиха [10, 11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения ДГА • HCl детально исследовались условия кислотного гидролиза ХГК гриба вида *A. mellea* (кислотность, соотношение хитин/кислота, время, температура) и способы очистки материала от побочных продуктов. На основании результатов исследования различных факторов была разработана технология получения солянокислой соли природного аминсахара.

Трудность выделения ДГА • HCl из ХГК заключалась в том, что в гидролизате ХГК присутствовал не только ДГА • HCl, но и достаточное количество глюкозы, фруктозы и даже маннозы, хорошо растворимых в воде и нерастворимых ни в одном из органических растворителей, что затрудняло их разделение. Большая часть примесей оставалась в растворе, а часть выпадала в осадок вместе с целевым продуктом. Данные сахара можно разделить методом перекристаллизации в разбавленном растворе этилового спирта [8], но это приводит к сильному снижению выхода целевого продукта. Применение для данной цели разных хроматографических колонок неперспективно, так как в случае промышленного синтеза препарата можно столкнуться как с проблемами материального характера, так и с трудностями в подборе оборудования. Было установлено, что солянокислый D-глюкозамин плохо растворим, а нейтральные сахара (глюкоза, фруктоза, манноза) прекрасно растворяются в холодной концентрированной соляной кислоте. Поэтому данная проблема была решена путем промывания осадка ДГА • HCl холодной (от –10 до –15°C) концентрированной HCl (контроль осуществляли методом ТСХ).

Таким образом, из гидролизата ХГК гриба вида *A. mellea* препаративно был выделен ДГА • HCl с использованием описанного выше метода. Выход целевого продукта составил 50% от ХГК (табл. 1). Полученный ДГА • HCl гриба *A. mellea* по основным показателям соответствовал качеству стандартного ДГА • HCl субстанции (ФСП 42-0314-1478-01) и представлял собой белый кристаллический порошок без запаха, легко растворимый в воде, мало растворимый в 95%-ном этиловом спирте и нерастворимый в хлороформе и в других органических растворителях. Реакция с реактивом Эрлиха была положительной, температура плавления 210°C с разложением, значение удельного вращения после установления равновесия α- и β-форм в течение 1 сут [α_D²⁰] = 72.5° (табл. 1), что соответствует данным литературы [2, 5].

Результаты ТСХ во всех трех системах растворителей свидетельствовали о наличии в полученном продукте одного вещества – ДГА • HCl. На хроматографических пластинках наблюдалось по одному пятну красно-бурого цвета, что подтверждает достаточную степень чистоты соли глюкозамина. Значения R_f для ДГА • HCl гриба *A. mellea* во всех трех системах растворителей идентичны с

Таблица 2. Элементный анализ образцов солянокислого D-глюкозамина

ДГА • HCl	Содержание, %		
	C	H	N
ДГА • HCl (теор. расч.)	33.41	6.49	6.49
ДГА • HCl (стандарт)	33.44	6.96	6.39
<i>A. mellea</i>	33.42	6.83	6.39
<i>C. cibarius</i>	33.40	6.67	6.39
<i>A. muscaria</i>	33.44	6.82	6.47
<i>M. esculenta</i>	33.43	6.67	6.45

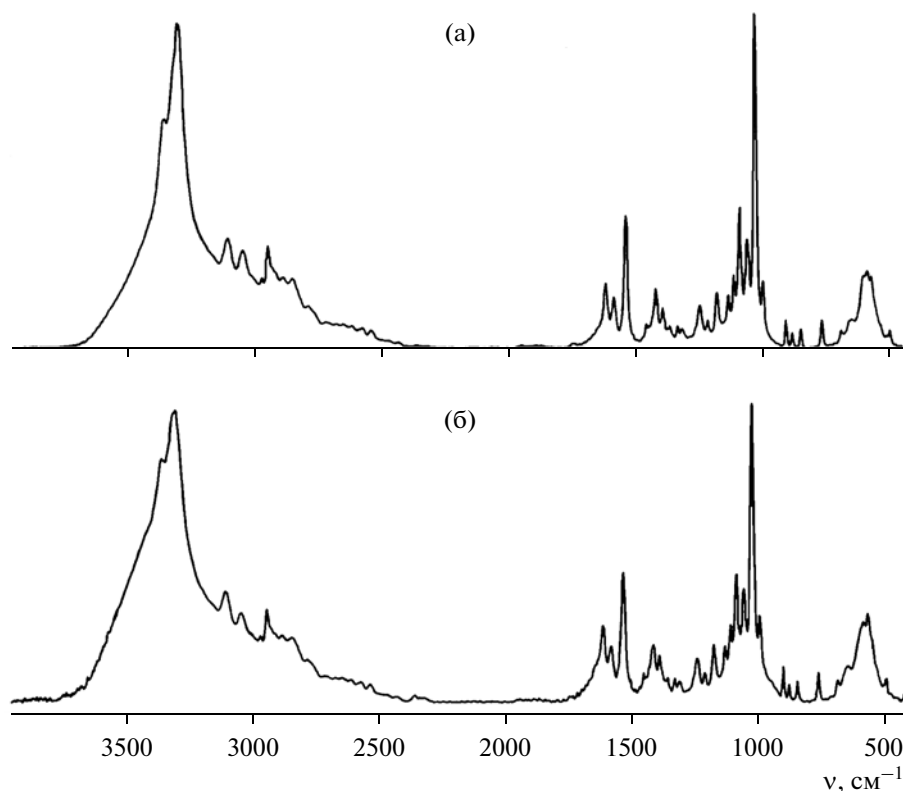


Рис. 2. ИК-спектры ДГА·НСІ из гриба *A. mellea* (а) и стандарта ДГА·НСІ (б).

R_f стандартного образца ДГА·НСІ (ФСП 42-0314-1478-01) и равны 0.52 (табл. 1).

Данные элементного анализа по азоту, углероду и водороду ДГА·НСІ гриба *A. mellea* и стандарта ДГА·НСІ (табл. 2) одного порядка и хорошо согласуются с теоретически рассчитанными значениями.

Строение ДГА·НСІ гриба *A. mellea* подтверждено методом ИК-спектроскопии (рис. 2) и ПМР (рис. 3) в сравнении со стандартным ДГА·НСІ. Сравнение основных характеристических полос поглощения образца ДГА·НСІ гриба

A. mellea и стандартного образца показало идентичность препаратов (табл. 3).

Разработанная методика выделения ДГА·НСІ из ХГК *A. mellea* была применена для кислотного гидролиза ХГК ряда видов высших грибов.

Характеристика и элементный состав солянокислого D-глюкозамина, выделенного из ХГК различных грибов, представлены в табл. 1 и 2. Выход конечного продукта составил 20–60% от ХГК в зависимости от вида, класса и формы плодового тела гриба, что связано с различным содержанием хитина в ХГК. Обращает на себя внимание наи-

Таблица 3. Данные ИК-спектра образцов D-глюкозамин хлоргидрата (ν , cm^{-1})

Характеристические полосы поглощения	ДГА·НСІ стандарт	<i>A. mellea</i>	<i>C. cibarius</i>	<i>M. esculenta</i>
ОН...О (связ.)	3300 ш.	3301 ш.	3301 ш.	3299
NH (связ.)	3041 сл.	3042 сл.	3042 сл.	3039
NH (дефор.)	1583 с.	1583 с.	1583 с.	1584
С–О–Н	1419 ср.	1418 ср.	1418 ср.	1421
С–N (вал.)	1247 с.	1247 с.	1247 с.	1249
С–О	1094	1094	1094	1094
С–О–С	1066	1066	1066	1066

Примечание: ш. – широкая, сл. – слабая, ср. – средняя, с. – сильная.

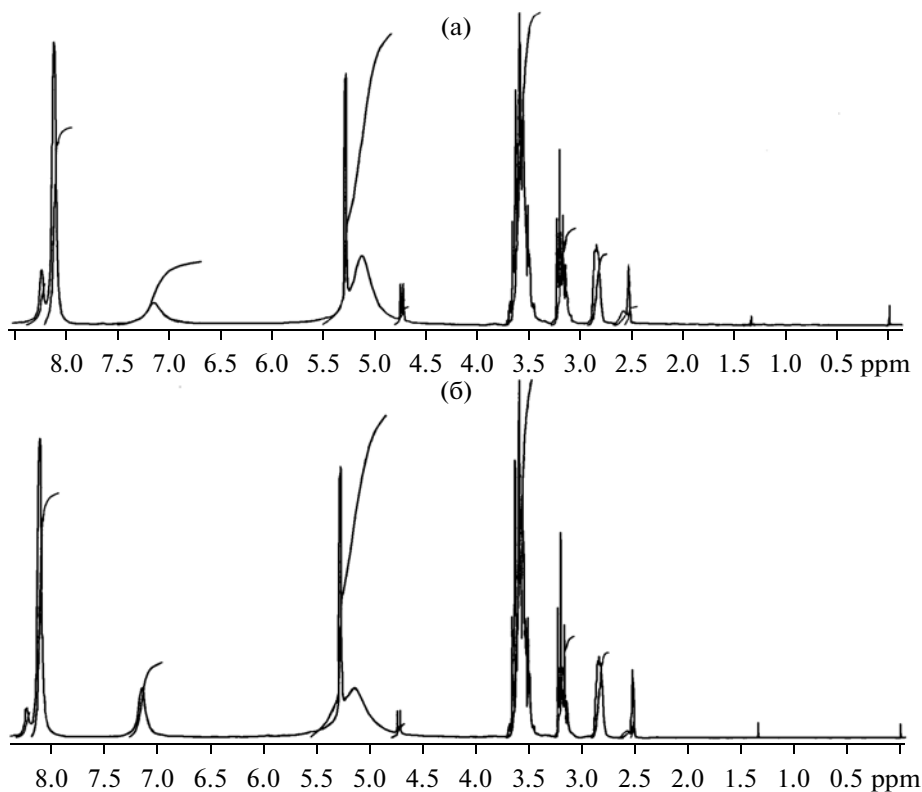


Рис. 3. ПМР-спектры ДГА • НСl из ХГК из гриба *A. mellea* (а) и стандарта ДГА • НСl (б).

меньший процентный выход (23.8%) солянокислого D-глюкозамина из ХГК гриба вида *M. esculenta* (сморчок настоящий). Это можно объяснить тем, что данный вид гриба относится к классу Ascomycetes, тогда как остальные вышеприведенные виды грибов относятся к классу Basidiomycetes.

Исследования показали, что температура плавления с разложением, удельное вращение и содержание основного вещества в образцах соответствуют данным литературы [2, 5].

Степень чистоты образцов ДГА • НСl различного происхождения также контролировалась методом ТСХ на пластинках Silufol-UV 254 в элюенте изопропанол – ацетон – 0.2 М молочная кислота (6 : 3 : 1). Результаты анализа свидетельствуют о наличии на хроматографических пластинках по одному пятну для каждого образца ДГА • НСl, выделенных из ХГК различных видов грибов. Значение R_f для всех образцов практически одинаково и колеблется в пределах нормы (от 0.51 до 0.53), что указывает на высокую степень чистоты и качества ДГА • НСl различного происхождения (табл. 1).

Анализ ИК-спектров образцов ДГА • НСl из ХГК различных видов грибов (табл. 3) показал, что полосы поглощения полученных целевых продуктов идентичны полосам поглощения стандарта ДГА • НСl и соответствуют данным литературы

[12]. Полоса в области 3300 см^{-1} для ДГА • НСl относится к валентным колебаниям ОН-группы (межмолекулярные водородные связи полиассоциатов). В ИК-спектрах соединений обнаружены интенсивные полосы в областях $3080\text{--}3010\text{ см}^{-1}$, $1690\text{--}1640\text{ см}^{-1}$, $1590\text{--}1520\text{ см}^{-1}$, относящиеся к колебаниям группы NH. В спектрах наблюдаются также полосы поглощения, относящиеся к группам С–О–Н и С–О–С, что также подтверждает структуру соединения [12].

Кроме того, для подтверждения чистоты и качества продуктов были сняты ПМР-спектры всех образцов ДГА • НСl, выделенных из хитина различного происхождения, сопоставление которых с ПМР-спектром стандартного образца ДГА • НСl показало полную их идентичность.

Таким образом, учитывая химические и физико-химические показатели достоверности полученных нами образцов солянокислого D-глюкозамина, можно сделать заключение о принципиальной возможности препаративного получения солянокислого D-глюкозамина высокого качества с достаточно высоким выходом из хитина высших грибов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кочетков Н.К., Бочков А.Ф., Дмитриев Б.А. Химия углеводов. М.: Химия, 1967. 671 с.
2. Лазурьевский Г.В., Терентьева И.В., Шамируин А.А. Практические работы по химии природных соединений. М.: Высшая школа, 1961. 192 с.
3. Verbuggen G., Goemaere S., Veys E.M. // Clin. Rheum. 2002. V. 21. P. 231–243.
4. Вергейчик Е.Н., Афиногенов Г.Е., Корнилов Н.В., Компанцев В.А., Анисимова Л.О., Нетьлько Г.И., Редько К.Г., Афиногенова А.Г. // Травматология и ортопедия России. 2003. № 3. С. 21–23.
5. Гаттерман Л., Виланд Г. Практические работы по органической химии / Ред. В.М. Родионов. М.-Л.: Госхимиздат, 1948. 516 с.
6. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С. // Микробиология. 1995. Т. 64. № 1. С. 27–31.
7. Марков. С. // Фармация (Бълг.). 1964. Т. 14. № 2. С. 30–32.
8. Ившин В.П., Артамонова С.Д., Ившина Т.Н., Шарнина Ф.Ф. // Высокомолек. соед. Б. 2007. Т. 49. № 12. С. 2215–2222.
9. Ившина Т.Н., Артамонова С.Д., Ившин В.П., Шарнина Ф.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 3. С. 348–353.
10. Методы химии углеводов / Ред. Н.К. Кочетков. М.: Мир, 1967. 512 с.
11. Elson L.A., Morgan W.T. // J. Biochem. 1933. V. 27. P. 1824–1828.
12. Казыцына Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. М.: Высшая школа, 1971. 264 с.

Isolation of D-Glucosamine from Chitin–Glucan Complexes

S. D. Artamonova^a and F. F. Sharnina^b

^a *Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^b *Mari State University, Yoshkar-Ola, 424000 Russia*

e-mail: svetlana.artamonova@gmail.com

Received March 13, 2012

Abstract—The peculiarities of the acidic hydrolysis of chitin–glucan complexes (CGCs) of higher fungi were studied, and the technology for the isolation and purification of D-(+)-glucosamine hydrochloride of high purity from hydrolysate was developed. The composition, properties, and purity of the product were analyzed by a combination of physicochemical methods. The yield of the final product was 20–60%, depending on the chitin content in CGC samples. The amino sugar obtained was a white crystalline odorless powder readily soluble in water, slightly soluble in 95% ethanol, and insoluble in chloroform and other organic solvents. It corresponds to the standard D-(+)-glucosamine hydrochloride in the main qualitative indicators.

УДК 577.19.591.21

ВЛИЯНИЕ ЭФИРНОГО МАСЛА ОРЕГАНО НА ПРИВИВАЕМОСТЬ И РАЗВИТИЕ КАРЦИНОМЫ ЛЬЮИС У МЫШЕЙ-ГИБРИДОВ F1 DBA C57 BLACK

© 2013 г. Т. А. Мишарина, Е. Б. Бурлакова, Л. Д. Фаткуллина, Е. С. Алинкина, А. К. Воробьева, И. Б. Медведева, В. Н. Ерохин, В. А. Семенов, Л. Г. Наглер, А. И. Козаченко

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

e-mail: tmish@rambler.ru

Поступила в редакцию 06.11.2012 г.

In vivo изучено влияние приема эфирного масла орегано (*Origanum vulgare* L.) в малых дозах с питьевой водой в течение 3 мес. на степень прививаемости опухоли карциномы Льюис и на некоторые показатели окислительного стресса у мышей-гибридов линии F1 DBA C57 Black. Установлено, что эфирное масло орегано обладало противораковой активностью. Его прием снижал степень прививаемости опухоли в 1.8 раза, уменьшал ее размер в 1.5 раза и существенно ингибировал развитие опухоли у заболевших мышей. Найдено, что прием эфирного масла не влиял на интенсивность перекисного окисления липидов в мозге мышей и приводил к значительному (на 36%) снижению содержания вторичных продуктов окисления липидов по их реакции с тиобарбитуровой кислотой в липидах печени по сравнению с контролем. Установлено, что через 3 мес. приема эфирного масла в печени мышей увеличивалась активность антиоксидантных ферментов (в 1.5–3 раза) по сравнению с контрольной группой. Такое действие эфирного масла подтверждает наличие у него свойств биоантиоксиданта.

DOI: 10.7868/S0555109913040090

Актуальной задачей современной биохимии является поиск веществ, защищающих живые организмы от неблагоприятного действия окружающей среды, в том числе от канцерогенных факторов. Ранее было показано, что заметную противоопухолевую активность проявляли синтетические антиоксиданты из группы экранированных фенолов, действие которых может быть обусловлено их способностью ингибировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) и стабилизировать геном при их введении в организм животных в малых и даже в сверхмалых дозах [1–3].

Известно, что многие продукты растительного происхождения, травы, пряности и их экстракты обладают биологической, в том числе антиоксидантной и фармакологической активностью [4, 5]. Эти продукты мало токсичны и рекомендуются для снижения риска заболеваний, вызываемых повышенным окислением компонентов клеток. Было показано, что натуральные антиоксиданты – α -токоферол, β -каротин и ликопин ингибировали окислительную модификацию липопротеинов низкой плотности *in vitro* [6–8]. Добавление в корм мышам флавоноидов, а также продуктов, содержащих эти соединения (сушеные яблоки, лук), увеличивало в печени животных содержание восстановленного глутатиона, уменьшало содер-

жание окисленного глутатиона и смешанного дисульфида белка с глутатионом [9]. Антиоксидантная активность флавоноидов обусловлена их способностью ингибировать прооксидантные ферменты, давать комплексы с катионами железа и меди и дезактивировать радикалы кислорода и азота [9].

Среди натуральных антиоксидантов растительного происхождения важное место принадлежит эфирным маслам, которые являются смесью летучих веществ, выделяемых из пряно-ароматических растений. В модельных экспериментах доказано наличие антиоксидантных свойств у многих эфирных масел, в том числе не содержащих производные фенола [10, 11]. Значительно меньше выполнено работ по оценке биологической активности эфирных масел на культурах клеток и *in vivo*. Было показано, что эфирное масло лимона и его отдельные компоненты ингибировали окисление липопротеинов низкой плотности человека *in vitro* с эффективностью, близкой к эффективности синтетических фенольных антиоксидантов [12]. Тимол, карвакрол, эвгенол и их производные показали зависимое от дозы уменьшение митохондриальной активности раковых клеток [13], доказана их способность уменьшать последствия окислительных стрессов [14]. Упо-

требление крысами с кормом эфирного масла тимьяна увеличивало активность антиоксидантных ферментов печени и общий антиоксидантный статус крыс [15]. Это свидетельствует о том, что некоторые эфирные масла могут проявлять свойства биоантиоксидантов, однако таких данных к настоящему времени крайне мало.

Цель работы – изучение *in vivo* влияния эфирного масла орегано (*Origanum vulgare* L.), принимаемого мышами-гибридами линии F1 DBA C57 Black в малых дозах с питьевой водой в течение 3 мес., на устойчивость мышей к прививаемой опухоли карциномы Льюиса и на некоторые показатели окислительного стресса у этих животных.

МЕТОДИКА

Эфирное масло орегано (ЭМО) получено из листьев и цветов растения орегано *Origanum vulgare* L. (компания Lionel Hitchen Ltd., Великобритания). Мышей – гибридов линии F1 DBA C57 Black получали из питомника (“Столбовая”, Московская обл.) в возрасте 7–9 нед (в среднем 2 мес.), размещали в клетках из нержавеющей стали размером 220 × 320 × 500 мм и в течение последующих экспериментов содержали на общевиварном рационе при температуре воздуха в помещении 20–22°C и при естественном освещении. 10 мышей в возрасте 2 мес. использовали для определения биохимических показателей в крови, печени и мозге молодых интактных мышей. Оставшиеся мыши были разделены случайным образом на 2 группы по 80 штук в каждой. Контрольная группа животных получала гранулированный стандартный лабораторный корм (ООО “Лабораторкорм”, Москва) и чистую питьевую воду (*ad libitum*). Опытная группа получала ЭМО с питьевой водой (концентрация масла в воде 0.15 мкг/мл) и стандартный корм. Каждая мышь в 1 сут выпивала 2 мл воды, то есть доза эфирного масла орегано составляла около 0.3 мкг/сут. Через 3 мес. эксперимента брали по 5 мышей в возрасте 5 мес. из контрольной и опытной групп для определения физико-химических характеристик крови и органов. Оставшимся животным контрольной и опытной групп переживали опухоль путем внутримышечного введения суспензии опухолевых клеток карциномы Льюиса в двух концентрациях: 5×10^4 или 5×10^5 кл. в 1 мл инокулята. Полученные таким образом 4 группы животных наблюдались в течение 1 мес., у них определяли степень прививаемости опухоли, ее размер и продолжительность жизни животных.

Определение степени гемолиза эритроцитов. Гемолиз проводили по следующей методике. 5%-ную взвесь отмытых эритроцитов в трис-НСI-буфере (рН 7.4), разведенном в соотношении 1 : 1 физиологическим раствором, центрифугировали при 700 g в течение 10 мин, отделяли супернатант и определяли его оптическую плотность при $\lambda =$

$= 532$ нм в кюветах толщиной 1 см на СФ-2000 (ЗАО “ОКБ Спектр”, Россия). Степень гемолиза эритроцитов рассчитывали по формуле:

$$\text{Степень гемолиза} = 0.5 \times A_{532} \times 100\%, \quad (1)$$

где A_{532} – оптическая плотность при $\lambda = 532$ нм.

Содержание веществ, образующихся при реакции тиобарбитуровой кислоты с продуктами ПОЛ (ТБК-АП). Содержание ТБК-АП в эритроцитах определяли следующим образом: 5%-ную взвесь отмытых эритроцитов в трис-НСI-буфере (рН 7.4), разведенном в соотношении 1 : 1 физиологическим раствором, контрольных и опытных образцов инкубировали с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) на кипящей водяной бане в течение 30 мин, охлаждали и измеряли оптическую плотность супернатанта при $\lambda = 532$ нм и 600 нм (A_{532} и A_{600}). Содержание ТБК-АП рассчитывали по формуле:

$$\text{ТБК-АП} = (A_{532} - A_{600}) \times 686.4 \text{ (нмоль/л)}. \quad (2)$$

Для определения содержания ТБК-АП в тканях мышей навески печени (по 1 г) и мозга (0.5 г) гомогенизировали вручную с 4 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и 0.25 мкл 0.01%-ного дибунола стеклянным пестиком с тефлоновым наконечником. Далее из каждой пробы брали по 2 навески, центрифугировали при 1800 g в течение 10 мин. К супернатанту добавляли по 1.36 мл 0.7%-ного раствора ТБК и фиксировали вес полученной пробы. Затем образцы на 15 мин помещали в кипящую водяную баню. После охлаждения образцов измеряли оптическую плотность проб при $\lambda = 532$ нм (A_{532}). Количественное содержание образовавшихся ТБК-АП рассчитывали по формуле:

$$\text{ТБК-АП} = (\text{вес пробы, г} \times A_{532}) / \text{навеска, г} \times 1.56 \times 10^5 \text{ (нмоль/мл)}. \quad (3)$$

Микровязкость мембран эритроцитов. Определение проводили методом ЭПР-спектроскопии с помощью двух парамагнитных зондов, локализующихся в поверхностном слое липидов мембран на разной глубине. Оба зонда являлись стабильными иминоксильными радикалами [16]: 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксипиперидин-1-оксил (**зонд 1**) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро- γ -карболин-3-оксил (**зонд 2**). Зонд 1 локализуется преимущественно в поверхностном гидрофобном слое липидов мембраны 2–4 Å, зонд 2 проникает в гидрофильную область прибрежных липидов на глубину 6–8 Å [17]. По поведению зондов 1 и 2 можно судить об изменениях в структуре и липидно-белковых взаимодействиях в клеточных мембранах. В 5%-ную взвесь эритроцитов добавляли спиртовые растворы зондов до их конечной концентрации 10^{-4} М, образцы инкубировали в течение 30–40 мин при температуре 6°C, затем регистрировали спектры ЭПР на спектрометре

ER-200D SRC (“Bruker”, Германия) при комнатной температуре. Анализ полученных спектров позволил определить время вращательной корреляции зонда, характеризующее микровязкость компонентов мембраны. Время вращательной корреляции зонда имеет значение промежутка времени, за который спин радикала успевает переориентироваться на угол $\pi/2$ и представляет собой величину $\tau_c \times 10^{-10}$ с [17, 18].

Активность ферментов печени. Активности антиоксидантных ферментов Cu,Zn- и Mn-супероксиддисмутаза (Cu,Zn-СОД, Mn-СОД), глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионтрансферазы (ГТ) определяли в цитозольной и митохондриальной фракциях печени мышей по методикам, приведенным в работе [19]. Активность ферментов ГП и ГТ измеряли в международных единицах (ед./мг белка). За одну единицу активности принимали количество фермента, превращающее 1 мкмоль субстрата в 1 мин. Для Cu, Zn-СОД и Mn-СОД определяли количество образца в 1 мл, вызывающее 50%-ное ингибирование ксантинооксидазной реакции в стандартных условиях, и относили к 1 мг белка [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Перевивание опухолевых клеток карциномы Льюис лабораторным животным является удобной экспериментальной моделью для изучения противоракового действия препаратов. При этом определяется влияние препарата на устойчивость организма к введению раковых клеток и его сопротивляемость к развитию опухолевого процесса. Контролируемыми параметрами являются степень прививаемости опухоли, кинетика ее роста и продолжительность жизни животных. Обработка полученных результатов выявила, что даже 3 мес. прием ЭМО в малых дозах оказывал значительное противораковое действие в изученной модели перевиваемой карциномы Льюис (табл.1). При концентрации клеток опухоли в инокуляте 5×10^5 кл./мл все животные контрольной группы погибли за 32 сут. В опытной группе также погибли все животные, но за 40 сут. Кроме того, в опытной группе опухоль развивалась медленнее и ее размер был достоверно меньше на 10% по сравнению с контрольной группой.

В группах мышей, которым прививали клетки в концентрации 5×10^4 кл./мл, различия были более значимыми: степень прививаемости опухоли в контрольной группе составляла 52%, а в опытной она была меньше в 1.8 раза и составляла только 29% (табл. 1). Кроме того, при этой концентрации клеток опухоль монотонно увеличивалась в размере до 50 сут в контрольной группе мышей, но в опытной группе она достигала максимального размера к 30 сут и более не увеличивалась вплоть до 60 сут. В среднем максимальный размер

Таблица 1. Влияние приема мышами эфирного масла орегано в течение 3 месяцев на степень прививаемости карциномы Льюис и максимальный размер опухоли

Концентрация клеток карциномы Льюис		Степень прививаемости, %	Максимальный размер опухоли, мм ³
5×10^5	Контроль (вода)	100	7800
	Опыт (вода + орегано)	100	7100
5×10^4	Контроль (вода)	52	6000
	Опыт (вода + орегано)	29	4100

опухоли у мышей опытной группы был на 30% меньше по сравнению с контролем (табл. 1). Эти данные с высокой достоверностью свидетельствуют о том, что даже краткосрочный прием мышами малых доз ЭМО увеличивал сопротивляемость организма воздействию агрессивных канцерогенных факторов, снижал степень заболеваемости и размеры опухоли у заболевших животных, то есть эфирное масло проявляло профилактическое действие. Следует отметить, что подобная активность ЭМО обнаружена впервые. Ранее сообщалось о способности ЭМО модулировать экспрессию ряда противовоспалительных цитокинов, в частности ФНО- α – одного из ключевых компонентов цитокиновой сети, обладающего выраженной противоопухолевой активностью [20]. Возможно, и в нашем случае, ЭМО влияло на развитие и течение опухолевого процесса также через активацию регуляторных молекул клеток.

Для более детального определения влияния приема малых доз ЭМО на организм мышей мы сравнили некоторые физико-химические показатели крови и органов мышей контрольной группы, получавшей чистую питьевую воду, и опытной группы, употреблявшей ЭМО в течение 3 мес. В табл. 2 приведены величины степени гемолиза эритроцитов, микровязкости мембран эритроцитов и содержание ТБК-АП.

Степень гемолиза эритроцитов является характеристикой устойчивости клеточных мембран к механическому разрушению. Одной из причин снижения их прочности может быть интенсификация процессов перекисного окисления липидов. Видно, что степень гемолиза эритроцитов достоверно снижалась на 20% у мышей в возрасте 5 мес. по сравнению с 2 мес. животными. Это означает, что в процессе роста мышей происходило увеличение резистентности мембран эритроцитов. Прием эфирного масла орегано в этот период (в течение 3 мес.) в дозировке 0.15 мкг/мл питьевой воды практически не изменял степень гемолиза, то есть не влиял на устойчивость мембран эритроцитов.

Таблица 2. Величины степени гемолиза, концентрации ТБК-АП и микровязкости липидов в мембранах эритроцитов и концентрации ТБК-АП в печени и мозге мышечной контрольной и опытной групп в возрасте 2 и 5 мес

Показатель	Контроль, возраст 2 мес.	Контроль, возраст 5 мес.	Опыт, возраст 5 мес.
Степень гемолиза эритроцитов, %	38.2 ± 1.5	29.5 ± 1.2	29.7 ± 1.5
Микровязкость поверхностных липидов эритроцитов, $\tau_c \times 10^{-10}$ с	0.34 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.32 ± 0.01
Микровязкость приобелковых липидов эритроцитов, $\tau_c \times 10^{-10}$ с	2.31 ± 0.08	2.04 ± 0.07	2.14 ± 0.07
ТБК-АП эритроцитов, нМ/л	68.2 ± 3.0	27.5 ± 2.0	26.0 ± 2.1
ТБК-АП в гомогенате печени, нМ/л	28.2 ± 2.5	24.5 ± 2.2	17.9 ± 1.9
ТБК-АП в гомогенате мозга, нМ/л	8.5 ± 1.5	6.2 ± 2.5	6.1 ± 2.5

Найденное увеличение устойчивости мембран эритроцитов обусловлено тем, что в период от 2 до 5 мес. снижалось содержание продуктов перекисного окисления липидов, которое характеризуется величинами ТБК-АП. Определение содержания вторичных продуктов свободнорадикального окисления липидов в виде их продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активных соединений) является общепринятой методикой оценки интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Продукты расщепления пероксидов жирных кислот в липидах, в основном малоновый диальдегид, дают окрашенные азометиновые комплексы с ТБК, содержание которых количественно определяется спектрофотометрическим методом.

Как видно из табл. 2, с увеличением возраста мышечной от 2 до 5 мес. содержание ТБК-АП существенно (~ в 2 раза) снижалось в опытной и в контрольной группе. Мыши в таком возрасте относятся к молодым, растущим организмам и, как видно из полученных данных, взросление приводит к снижению процессов ПОЛ в мембранах эритроцитов и это сопровождается найденным нами снижением величин степени гемолиза. Таким образом, снижение степени окисления липидов мембран эритроцитов хорошо коррелирует с устойчивостью мембран к механическому гемолизу. Краткосрочный, в течение 3 мес. прием ЭМО в период взросления мышечной незначительно увеличивал устойчивость липидов эритроцитов к окислению. Вероятно, на этом этапе жизни мышечной в клетках присутствует достаточное количество эндогенных ферментов-антиоксидантов с высокой активностью, которые поддерживают антиоксидантный статус организма на стабильном высоком уровне.

Следующей характеристикой мембран эритроцитов, связанной с их составом и степенью окисления липидов, являются величины микровязкости липидов в мембранах. Для определения этого параметра использовали метод ЭПР-спектроскопии, который контролирует изменение молекулярной подвижности парамагнитных частиц — стабильных

органических радикалов при изменении состава среды, в которой находятся эти частицы [16–18, 21]. Изменения в структуре клеточных мембран отражают их функциональное состояние, в частности, позволяют выявить отклонения в системе регуляции клеточного метаболизма. Так, например, изучение микровязкости различных областей клеточной мембраны дает возможность оценить качественные изменения в структуре мембран, не прибегая к их дезинтеграции и не нарушая естественной упаковки. С увеличением возраста мышечной микровязкость липидного бислоя мембран эритроцитов снижалась на 12%, прием ЭМО в течение 3 мес. приводил к снижению этого параметра на 6%. Аналогичные тенденции обнаружены и при исследовании микровязкости глубоколежащих приобелковых липидов эритроцитарных мембран (табл. 2). Найдено, что при увеличении возраста мышечной с 2 до 5 мес. микровязкость обеих областей мембраны эритроцитов незначительно снижалась, а прием ЭМО фактически возвращал величины микровязкости мембран эритроцитов к их значениям для 2 мес. мышечной.

Таким образом, найдено, что в молодом возрасте по мере взросления организма мышечной-гибридов снижалась интенсивность ПОЛ в мембранах эритроцитов и это приводило к увеличению их резистентности, незначительному снижению микровязкости, но не изменяло их структуру. Прием эфирного масла орегано незначительно, но улучшал эти характеристики мембран эритроцитов.

Для оценки возможного влияния малых доз ЭМО на антиоксидантный статус печени и мозга мы определили в этих органах величины ТБК-АП у мышечной контрольной и опытной групп (табл. 2). Можно видеть, что с увеличением возраста интенсивность ПОЛ в мозге мышечной снижалась на 27%, в печени — на 13%. Прием эфирного масла не влиял на этот процесс в мозге мышечной, величины ТБК-АП в контрольной и опытной группе были одинаковы (табл. 2). Прием масла приводил к значительному (на 36%) снижению содержания ТБК-АП в липидах печени мышечной по сравнению

Таблица 3. Активность антиоксидантных ферментов в цитозоле (цит) и митохондриях (мх) печени мышей контрольной и опытной групп в возрасте 5 мес

Образец	Cu,Zn-СОД, ед./мг	ГП цит, ед./мг	ГТцит, ед./мг	Mn-СОД, ед./мг	ГПмх, ед./мг	ГТмх, ед./мг
Контроль	251 ± 19	0.98 ± 0.08	0.24 ± 0.02	10.1 ± 0.2	0.067 ± 0.008	0.057 ± 0.004
Опыт	253 ± 21	1.23 ± 0.11	0.64 ± 0.05	15.2 ± 0.3	0.079 ± 0.006	0.104 ± 0.007

с 2 мес. контролем (табл. 2). Одной из причин такого снижения процессов ПОЛ в печени может быть увеличение активности антиоксидантных ферментов в печени мышей, принимавших ЭМО. Известно, что в формировании противоопухолевой активности принимает участие ферментная система организма, чувствительность которой к разного рода воздействиям зависит от локализации ферментов [19]. В нашей работе были измерены активности ферментов (Cu, Zn-СОД, Mn-СОД, ГП и ГТ) в двух фракциях клеток печени – в цитозольной и митохондриальной. Полученные результаты представлены в табл. 3. Измеренные ферменты участвуют в детоксикации супероксидных радикалов (СОД), пероксида водорода и органических пероксидов (ГП), а также различных ксенобиотиков (ГТ). Как видно из табл. 3, через 3 мес. после приема масла активности всех ферментов, кроме Cu,Zn-СОД, заметно повышены: активность Mn-СОД в 1.5 раза, ГП цитозоля и митохондрий – в 1.2 раза, ГТ цитозоля – в 3 раза и ГТ митохондрий – в 2 раза. Ранее было обнаружено, что способность некоторых природных соединений, в том числе эфирных масел, индуцировать активность детоксицирующих ферментов, например ГТ [22], может коррелировать с их противораковой активностью. Полученные данные свидетельствуют о том, что прием малых доз ЭМО увеличивал АО статус печени, снижал в ней уровень ПОЛ. Обменные процессы в печени идут намного быстрее, чем в мозге, принимаемые компоненты эфирного масла, такие, как карвакрол и тимол, попадая в печень, влияют на активность антиоксидантных ферментов, сами могут участвовать в обменных процессах и проявлять при этом *in vivo* свойства биоантиоксидантов.

Таким образом, проведенное исследование позволило установить наличие противораковой активности у ЭМО. Даже кратковременное 3 мес. употребление малых доз этого масла в качестве добавки в питьевую воду снижало степень прививаемости опухоли в 1.8 раза, уменьшало ее размер в 1.5 раза, увеличивало устойчивость к действию раковых клеток на здоровых животных и существенно ингибировало развитие опухоли у заболевших мышей. Впервые установлено, что в молодом возрасте по мере взросления организма мышей-гибридов увеличивалась механическая и окислительная резистентность мембран эритро-

цитов. Совокупность полученных данных по изменению биохимических и физико-химических показателей эритроцитов, печени и мозга мышей в процессе их взросления и влияния на эти параметры 3 мес. приема ЭМО свидетельствует о том, что масло не действовало отрицательно ни на один параметр. Наоборот, в опытной группе мышей, принимавших ЭМО, отмечено увеличение активности антиоксидантных ферментов печени мышей, снижение интенсивности ПОЛ в печени и эритроцитах мышей, увеличение антиоксидантного статуса организма, что характеризует ЭМО как природный биоантиоксидант. Совокупность различных видов биологической активности у ЭМО, включая его свойства биоантиоксиданта, способствуют увеличению сопротивляемости организма мышей вредным факторам окружающей среды, в том числе вводимой в их организм культуре раковых клеток. С большой степенью уверенности можно рекомендовать систематический прием малых доз эфирного масла орегано или экстракта травы орегано (душицы) в виде ежедневного чая как средство с профилактическим действием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурлакова Е.Б. Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты / Ред. Е.Б. Бурлакова, С.Д. Варфоломеев. М.: Наука, 2005. Т. 2. С. 1–27.
2. Беспалов В.Г., Александров В.А., Корман Д.Б. // Сибирский онколог. журн. 2012. Т. 50. № 2. С. 52–56.
3. Ерохин В.Н., Кременцова А.В., Семенов В.А., Бурлакова Е.Б. // Изв. РАН. Сер. биол. 2007. № 5. С. 583–590.
4. Dragland S., Senoo H., Wake K., Holte K., Blomhoff R. // J. Nutr. 2003. V. 133. P. 1286–1290.
5. Lampe J.W. // Amer. J. Clin. Nutr. 2003. V. 78. P. 579S–583S.
6. Jessup W., Rankin S.M., De Whalley C.V., Hout J.R.S., Scott J., Leake D.S. // Biochem. J. 1990. V. 265. № 2. P. 399–405.
7. Oshima S., Ojima F., Sakamoto H., Ishiguro Y., Terao J. // J. Agric. Food Chem. 1996. V. 44. № 10. P. 2306–2309.
8. Carpenter K.L.H., Van der Veen C., Hird R., Dennis I.F., Ding T., Mitchinson M.J. // FEBS Lett. 1997. V. 401. № 1. P. 262–266.
9. Meyers K.J., Rudolf J.L., Mitchell A.E. // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. № 3. P. 830–836.

10. Ruberto G., Baratta M. // Food Chem. 2002. V. 69. P. 167–174.
11. Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 6. С. 642–647.
12. Takahashi Y., Inaba N., Kuwahara S., Kuki W. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003. V. 67. № 1. P. 195–197.
13. Mastelić J., Jercović I., Blažević I., Poljak-Blaži M., Borović S., Ivančić-Baće I., Smrečki V., Žarković N., Brčić-Kostić K., Vikič-Topič D., Müller N. // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. № 11. P. 3989–3996.
14. Danesi F., Elementi S., Neki R., Maranesi M., D'Antuono L.F., Bordoni A. // J. Agric. Food Chem. 2008. V. 56. № 21. P. 9911–9917.
15. Youdim K.A., Deans S.G. // British J. Nutr. 2000. V. 83. № 1. P. 87–93.
16. Кузнецов А.Н. Метод спинового зонда. М.: Наука, 1976. 248 с.
17. Голощанов А.Н., Бурлакова Е.Б. // Биофизика. 1975. Т. 20. № 5. С. 816–821.
18. Степовая Е.А., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. // Бюлл. Экспер. биол. и мед. 2003. Т. 136. № 11. С. 553–557.
19. Вартамян Л.С., Гуревич С.М., Козаченко А.И., Наглер Л.Г., Бурлакова Е.Б. // Биохимия. 2001. Т. 66. № 7. С. 896–904.
20. Vukovská A., Cikos S., Juhás S., P'ková G., Reháč P., Koppel J. // Mediators Inflamm. 2007. V. 51. № 2. P. 254–260.
21. Бинюков В.И., Борунова С.Ф., Гольдфельд М.Г. // Биохимия. 1972. Т. 36. № 6. С. 1149–1152.
22. Lam L.K.T., Hasegawa S. // Nutrition and Cancer. 1989. V. 12. № 1. P. 43–47.

Effect of Oregano Essential Oil on the Engraftment and Development of Lewis Carcinoma in F1 DBA C57 Black Hybrid Mice

T. A. Misharina, E. B. Burlakova, L. D. Fatkullina, E. S. Alinkina, A. K. Vorob'eva, I. B. Medvedeva, V. N. Erokhin, V. A. Semenov, L. G. Nagler, and A. I. Kozachenko

*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia
e-mail: tmish@rambler.ru*

Received November 6, 2012

Abstract—The effect of a low uptake dose of oregano essential oil with drinking water for three months (*Origanum vulgare* L.) on the degree of Lewis carcinoma engraftment and some parameters of oxidative stress has been studied in vivo using F1 DBA C57 Black hybrid mice. Oregano essential oil has been established to possess an anticancer activity. The degree of tumor engraftment decreased by 1.8 times, its size decreased by 1.5 times, and the development of tumor was significantly suppressed in sick mice under the effect of oregano essential oil. It was found that the uptake of essential oil did not affect the intensity of lipid peroxidation in the brain of mice and resulted in a significantly (by 36%) decreased content of secondary lipid oxidation products in the liver as shown in a reaction with thiobarbituric acid as compared to control subjects. The activity of antioxidant enzymes was found to increase after three months of essential oil uptake (by 1.5–3 times) as compared to the control group. This effect of essential oil supports the presence of bioantioxidant properties in this essential oil.

**С.В. ПРУДНИКОВА, Т.Г. ВОЛОВА “ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ
ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ – АНАЛОГА СИНТЕТИЧЕСКИХ
ПЛАСТМАСС: ЗАКОНОМЕРНОСТИ БИОРАЗРУШЕНИЯ В ПРИРОДНОЙ
СРЕДЕ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МИКРООРГАНИЗМАМИ”.
КРАСНОЯРСК: КРАСНОЯРСКИЙ ПИСАТЕЛЬ. 2012. 184 с.**

DOI: 10.7868/S0555109913040120

Монография начинается с Введения, в котором дано представление о масштабах применения синтетических полимеров, уровень потребления которых намного превосходит уровень восполнения ископаемых углеродсодержащих ресурсов, что вносит большой дисбаланс в углеродный цикл и сопровождается загрязнением биосферы. Традиционное применение синтетических пластиков привело к чрезмерному росту количества не утилизируемых отходов, что превратилось сегодня в глобальную экологическую проблему. Реальным решением проблемы и выходом из сложившейся ситуации является переход на материалы нового поколения, разрушающиеся в природной среде, т.е. вписывающиеся в глобальные биосферные круговоротные циклы.

Глава 1 посвящена общим вопросам использования синтетических пластиков в качестве упаковочного материала как части глобальной экологической проблемы. Предлагаются различные пути, подходы для ее решения: получение пластмасс на основе воспроизводимых природных полимеров, придание свойств биоразлагаемости используемым в настоящее время высокомолекулярным синтетическим материалам и производство биоразрушаемых полиэфиров химическим или биотехнологическими способами.

Биопластмассы на основе природных биоразлагаемых материалов типа крахмала, целлюлозы, хитозана или белков представляют собой композиционные материалы с различными добавками. Материалы, получаемые из смеси растительных и натуральных продуктов, основным компонентом которых является целлюлоза и ее производные, широко используются при изготовлении упаковки, одноразовых изделий и предметов первой необходимости. Другое направление связано с приданием свойств биоразрушаемости синтетическим полимерам, производимым и используемым в огромных количествах. Для этого в структуры пластиков необходимо вводить функциональные группы, способствующие ускоренному фоторазложению полимера, создавать композиции с биоразлагаемыми природными добавками, инициирующими

распад основного полимера, а также целенаправленно синтезировать биodeградируемые пластики на основе уже имеющихся промышленных технологий. К основным направлениям получения разрушаемых биопластиков относится также производство полимеров на основе гидроксикарбоновых кислот, полиэферы которых разлагаются в природной среде под действием экзодеполимераз почвенной и водной микрофлоры.

Для использования в качестве упаковочного материала наиболее перспективным материалом является полилактид – продукт конденсации молочной кислоты, получаемый как химическим способом, так биотехнологически при сбраживании декстрозы, сахарозы или мальтозы, зернового суслу или картофеля. Полилактид в компосте разлагается в течение месяца, он усваивается также микроорганизмами обитающими в морской воде.

Перспективы использования полигидроксиалканоатов в качестве альтернативы синтетическим полимерным материалам и основы регуляции их синтеза обсуждаются во второй главе. По применяемым методам культивирования бактерии-продуценты можно разделить на две группы. Для одной группы характерен синтез ПГА при избытке в среде источника энергии и углерода в среде, но при лимитировании роста одним из биогенных элементов (азот, фосфор, сера, калий, магний или кислород). Для бактерий второй группы питательная среда содержит все необходимые компоненты, концентрацию которых повышают по мере увеличения биомассы, а также вводят в состав среды дополнительные органические источники азота (кукурузный и соевый экстракты, рыбный пептон). При этом достигается высокий выход биомассы при высоком внутриклеточном накоплении ПГА, поскольку у этих микроорганизмов оба эти процесса конститутивно сбалансированы.

Глава 3 содержит данные по конструированию различных образцов изделий на основе ПГА и изучению процессов их биоразрушения. Было показано, что процесс биodeградации изделий зависит от химического состава полимера, метода

изготовления, размеров и формы изделия, а также температуры среды. В зависимости от этих факторов половина массы изделия может деградировать в течение 15–40 суток. Причем пленки могут подвергаться процессу биodeградации быстрее, чем прессованные формы. Однозначно установлена биологическая природа разрушения и положительная роль ПГА для развития почвенных микроорганизмов. Показано, что на поверхностях полимерных образцов формируется микробиоценоз, отличающийся качественно и количественно от контрольных образцов почвы.

В монографии охарактеризованы биохимические пути синтеза ПГА, их многообразие, свойства, масштабы промышленного производства и потенциальные области применения; показано, что этот класс полимеров в настоящее время вслед за полимерами молочной кислоты, становится реальным кандидатом, претендующим на роль материала XXI века, однако, без комплексного изучения процесса разрушения этих полимеров в сложных и меняющихся условиях природной среды невозможно прогнозировать последствия их “поведения” в биосфере при наблюдающемся росте объемов производства.

Исключительный интерес представляет материал по кинетике биodeградации ПГА в регионах, различающихся микробиоценозами: в почвах средних широт Сибири, в тропических почвах Вьетнама, на морском побережье, в морской воде в Южно-Китайском море, в солоноводном озере Шира и пресноводных водоемах. Было показано, что в условиях Сибири в течение двух полевых сезонов, различающихся погодными условиями, процесс биodeградации зависит как от химического состава полимера, так и от характеристики почвы — температуры, влажности, состава микробиоценозов. Установлено, что на полимерных образцах формируется микробиоценоз, качественно отличающийся от контрольных образцов поч-

вы в котором доминируют грибы, относящиеся к роду *Penicillium* и бактерии рода *Micrococcus*. В условиях тропиков процесс биodeградации пластиков протекает с большей скоростью, чем в условиях Сибири, что объясняется, в том числе, иным составом микрофлоры.

На основании анализа структуры микробных сообществ в почвах и морской воде выявлена сукцессия микроорганизмов, вызванная поступлением ПГА в почву. Важным аспектом работы является исследование физико-химических свойств образцов в процессе разрушения. С применением современных физико-химических методов (РЭМ, X-Ray, высокоэффективной жидкостной хроматографии) показано, что механизм разрушения полимеров, зависящий от состава микробиоценозов, реализующих этот процесс, различен и включает как одновременное, так и преимущественное разрушение аморфных и кристаллических регионов ПГА. Результаты позволяют оценить «емкость» окружающей среды при наблюдающемся росте масштабов выпуска и применения этого биотехнологического продукта.

Появление монографии С.В. Прудниковой и Т.Г. Воловой весьма своевременно, учитывая огромный интерес к созданию биodeградебельных полимеров, в том числе полигидроксиалканоев, а также наращивание объемов их выпуска и применения, с одной стороны, и практически полное отсутствие в концентрированном виде сведений о закономерностях разрушения этих полимеров в природе, с другой.

Практическая ценность издания для специалистов, работающих в этой области, не вызывает сомнений. Книга адресована биологам, экологам, биотехнологам, преподавателям и студентам биологических и химических факультетов университетов.

А.Г. Козловский, В.П. Желифонова

ПОЗДРАВЛЯЕМ ТАТЬЯНУ АЛЕКСАНДРОВНУ ВАЛУЕВУ С ЮБИЛЕЕМ

DOI: 10.7868/S0555109913040168



Исполнилось 70 лет Татьяне Александровне Валуевой — профессору, доктору биологических наук, заведующей лаборатории биохимии протеолиза в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, лауреату Государственной премии Российской Федерации, члену редколлегии журнала “Прикладная биохимия и микробиология”.

Татьяна Александровна родилась 1 июля 1943 г. в городе Москва. В 1960 г. поступила на химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Дипломную работу выполняла под руководством известного биохимика доктора химических наук Л.М. Гинодмана. После окончания Университета работала по распределению два года младшим научным сотрудником во “ВНИИсинтезбелок”. В 1967 г. была зачислена в аспирантуру Института химии природных соединений РАН, где выполнила диссертационную работу по изучению механизма действия протеолитического фермента, пепсина, под руководством академика В.Н. Ореховича. С 1970 по 1974 гг. продолжала исследования этого

фермента в лаборатории химии протеолитических ферментов в Институте химии природных соединений РАН, который впоследствии был переименован в Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. С 1974 г. по настоящее время работает в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, пройдя путь от младшего научного сотрудника до заведующей лабораторией. В 1990 г. защитила докторскую диссертацию.

Т.А. Валуева — видный специалист-биохимик, признанный лидер в изучении протеолитических ферментов и природных регуляторов их активности, ее работы внесли существенный вклад в исследование взаимосвязи структуры и функции белковых ингибиторов протеиназ как перспективного научного направления в биохимии, получив высокую оценку отечественных и зарубежных специалистов. Т.А. Валуева — автор монографии и более 300 научных статей в отечественных и зарубежных журналах, а также 12 патентов. Татьяне Александровне была присуждена Главная

премия “Международной академической издательской компании “Наука” за лучшую публикацию в издаваемых ею журналах (1995 г.).

Т.А. Валугевоу с сотрудниками определена роль природных ингибиторов протеиназ в защитной системе растений и изучены механизмы адаптации фитопатогенных микроорганизмов. Под руководством и при участии Т.А. Валугевоу из животных и растительных объектов выделено и охарактеризовано более 20 белков, действующих как ингибиторы протеолитических ферментов. Установлена их первичная структура и механизм действия. Ею сформулированы современные представления об уникальной роли и структурно-функциональном разнообразии белковых ингибиторов протеолитических ферментов, что способствовало эффективной реализации их биотехнологического потенциала. Совместно с сотрудниками лаборатории медицинских полимеров Института нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН разработаны и успешно внедрены в производство новые лекарственные препараты “овомин” и “овосорб”, используемые в практической медицине при лечении заболеваний, сопровождающихся активацией в крови и тканях организма систем протеолиза. На основе полимерных гидрогелей, содержащих иммобилизо-

ванный ингибитор сериновых протеиназ, создана система для перорального введения инсулина больным диабетом. В настоящее время завершен полный цикл предклинических исследований синтезированного препарата инсулина, получившего название “Рансулин”, получено разрешение Фармакологического комитета Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации на его клинические испытания и успешно завершена I фаза клинических испытаний препарата.

Татьяна Александровна ведет большую научно-организационную работу в ИНБИ РАН. Под ее руководством подготовлены и защищены 8 кандидатских диссертаций и выполнено несколько крупных целевых проектов (РФФИ, фонд Сороса, НАТО). Т.А. Валугевоу – член ряда ученых советов.

Отмечая многолетнюю плодотворную научную деятельность Татьяны Александровны, редакция журнала “Прикладная биохимия и микробиология” и коллектив возглавляемой ею лаборатории желают юбиляру крепкого здоровья и дальнейших творческих успехов.

Редколлегия