

	Название статьи	Страницы	Цит.
☐	СИСТЕМЫ ТОКСИН АНТИТОКСИН БАКТЕРИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ (ОБЗОР) Демидёнок О.И., Гончаренко А.В.	539	0
☐	ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ RESD-RESE BACILLUS CEREUS, ЭКСПРЕССИРОВАННЫХ В ШТАММАХ ESCHERICHIA COLI Шапырина Е.В., Шадрин А.М., Солонин А.С.	547	0
☐	ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ GL7ACA-АЦИЛАЗЫ БАКТЕРИИ BREVUNDIMONAS DIMINUTA, ПОЛУЧЕНИЕ БОЛЕЕ СТАБИЛЬНЫХ АНАЛОГОВ ФЕРМЕНТА Закирова С.А., Михайлова Т.В., Эльдаров М.А.	554	0
☐	ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ ЦВЕТНЫХ МЕТАЛЛОВ ИЗ МЕДЕПЛАВИЛЬНОГО ШЛАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АЦИДОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ Муравьёв М.И., Фомченко Н.В.	561	2
☐	СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЛИГНОЛИТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ, ПРИНАДЛЕЖАЩИХ К РАЗЛИЧНЫМ ТАКСОНОМИЧЕСКИМ И ЭКОЛОГИЧЕСКИМ ГРУППАМ Фёдорова Т.В., Шахова Н.В., Кляйн О.И., Глазунова О.А., Малошенков Л.Г., Куликова Н.А., Псурцева Н.В., Королёва О.В.	570	3
☐	ОБРАЗОВАНИЕ МИКРОМИЦЕТОМ ASPERGILLUS OCHRACEUS ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ АКТИВАТОРОВ ПРОТЕИНА С ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ГЛУБИННОМ И ТВЕРДОФАЗНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С.	580	4
☐	ANTIOXIDANT PROPERTIES OF FUNGAL METABOLITE NIGERLOXIN IN VITRO Suresha B.S., Srinivasan K.	587	0
☐	PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LACCASE SECRETED BY PHELLINUS LINTEUS MTCC-1175 AND ITS ROLE IN THE SELECTIVE OXIDATION OF AROMATIC METHYL GROUP Chaurasia P.K., Yadav A., Yadav R.S.S., Yadava S.	592	0
☐	DETERMINATION OF HYDRATION PROPERTIES AND THERMAL BEHAVIOR OF PAECILOMYCES VARIOTII BY DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY Canel R.S., Ludemann V., De la Osa O., Wagner J.R.	600	0
☐	РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА Бызова Н.А., Лухверчик Л.Н., Жердев А.В., Пивень Н.В., Бураковский А.И., Дзантиев Б.Б.	606	0
☐	СВОЙСТВА МОДИФИЦИРОВАННЫХ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ И КЛЕТОК METHYLOBACTERIUM NODULANS Кузнецова Т.А., Бесчастный А.П., Алфёров С.В., Троценко Ю.А.	613	1

УДК 577.11

СИСТЕМЫ ТОКСИН–АНТИТОКСИН БАКТЕРИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ (ОБЗОР)

© 2013 г. О. И. Демидёнок, А. В. Гончаренко

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

e-mail: demidenoksana@gmail.com

Поступило в редакцию 19.12.2012 г.

В обзоре рассматриваются структуры различных токсин-антитоксиновых (ТА) семейств и принципы их функционирования. ТА локусы имеют широкое распространение в геномах эубактерий и архей. Большинство ТА систем двухкомпонентны, принцип работы у всех ТА систем похож и заключается в нарушении стабильным токсином важнейших клеточных функций и его инактивации лабильным антитоксином.

DOI: 10.7868/S055510991306007X

Впервые гены, кодирующие двухкомпонентную систему токсин-антитоксин (ТА) были описаны в 80-е годы прошлого века как гены плазмид, которые обеспечивают поддержание и наследование малоконцентрированных плазмид в бактериальной клетке [1]. В настоящий момент опубликовано большое количество обзорных работ о ТА системах, но в русскоязычной научной литературе такой обзор один [2]. Принцип действия у всех ТА систем заключается в том, что стабильный белок токсин нарушает клеточные функции, лабильный антитоксин связывает токсин и таким образом его инактивирует. При делении бактерии дочерние клетки получают часть токсина и антитоксина материнской клетки. Если дочерняя клетка не получила плазмиду, кодирующую синтез токсина и антитоксина, унаследованный с цитоплазмой антитоксин разрушается, освобождая стабильный токсин. Таким образом, клетки, сохранившие плазмиду, не подвергаются воздействию токсина и имеют росто-вые преимущества. Относительно недавно с помощью биоинформационных методов были идентифицированы хромосомные гомологи плазмидных ТА систем у большого количества бактерий и архей [3]. Если в случае плазмидных ТА генов их функция очевидна, то биологический смысл хромосомных токсинов, направленных на саму бактерию, остается открытым и является предметом интенсивных исследований, о чем можно судить по возрастающему количеству публикаций [4–6]. В геномах бактерий ТА локусы, как правило, множественны и одна бактерия может содержать несколько ТА систем разных семейств. Однако у облигатных внутриклеточных паразитов, таких, как *Mycobacterium leprae*, *Chlamydia muridarum*, *C. trachomatis*, *C. caviae*, *C. pneumoniae* или у бактерий, живущих в близкой паразитической или симбиотической ассоциации с другими организмами,

локусы ТА отсутствуют [3]. Таким образом, бактерии, живущие в условиях постоянства внешней среды, лишены ТА локусов, что наводит на мысль об участии продуктов ТА локусов в механизмах адаптации к изменяющимся условиям существования и к стрессовым условиям. Отмечено, что у бактерий, характеризующихся низкими скоростями роста, количество ТА локусов значительно больше, чем у быстрорастущих видов (*Mycobacterium tuberculosis* — 80 локусов, *Vibrio cholerae*, *Salmonella spp.*, *M. smegmatis* — 3 локуса) [3].

ПРИНЦИП ОРГАНИЗАЦИИ ТА СИСТЕМ

Все ТА системы имеют сходную структурную организацию: гены антитоксина и токсина находятся в одном опероне, как правило, перекрываются в областях старт и стоп кодонов, ко-транскрибируются и ко-транслируются [7]. В оптимальных условиях роста белок токсин в клетках находится в неактивном состоянии в комплексе с антитоксином. Уровень транскрипции ТА оперона низок за счет связывания свободного антитоксина или антитоксина в составе ТА комплекса с промоторной частью собственного оперона [8]. Однако свободный антитоксин обладает меньшей аффинностью по отношению к оператору промоторной области по сравнению с антитоксином ТА комплекса [9]. При попадании бактерии в стрессовые условия (аминокислотное или углеродное голодание) в цитоплазме активируется клеточные протеиназы, которые разрушают антитоксин, что приводит к лавинообразному нарастанию концентрации свободного белка токсина и остановке клеточного роста или к смерти бактерии [10, 11].

Основываясь на природе антитоксина и его способе действия, ТА системы разделяют на 3 типа. Антитоксины I и III типа представляют собой

небольшие РНК, которые подавляют либо экспрессию токсина (тип I), либо его активность (тип III) [12, 13]. Антитоксины типа II являются белками, которые инактивируют токсины, связывая их в нейтральный комплекс [14]. Большинство ТА систем относятся к типу II. Токсिनотоксические компоненты всех ТА систем — это белки, ингибирующие такие важные клеточные процессы, как репликация, трансляция, синтез компонентов клеточной стенки. Основываясь на природе токсина, ТА локусы были классифицированы в несколько семейств (*vapBC*, *relBE*, *mazEF*, *ccd*, *parDE*, *phd/doc*, *higBA*, *hipBA*). Данные семейства различаются мишенями и способами действия, а также структурой кодируемых белков. Так, CcdB и ParE токсины являются ингибиторами фермента ДНК-гиразы [15, 16]; RelE, Doc и HigB токсины разрушают мРНК, связанную с рибосомами [17–19]; HipA ингибирует элонгацию полипептидной цепи, фосфорилируя фактор элонгации Tu [20], VapC и MazF токсины являются РНКазами и разрушают свободные мРНК и тРНК [21, 22].

Семейство *mazEF*. Гены данного семейства локусов были обнаружены одними из первых [23]. На сегодняшний день механизм действия, регуляции, генетическая организация и функции *mazEF* изучены наиболее подробно по сравнению с другими семействами.

Как и подавляющее большинство ТА систем *mazEF* имеет стандартную генетическую организацию [24]. Оперон *mazEF* образуют частично перекрывающиеся гены *mazE* и *mazF*, кодирующие синтез, соответственно, стабильного белка токсина MazF и лабильного антитоксина MazE, который *in vivo* деградируют АТФ — зависимые сериновые протеиназы. Стоит отметить, что в опероне, помимо генов *mazE* и *mazF*, располагается ген *relA*, кодирующий синтез ppGpp — синтетазы. Белок RelA катализирует образование нуклеотида ppGpp, уровень которого в клетке, в свою очередь, регулирует уровень экспрессии локуса *mazEF* [24, 25]. В цитозоле клетки белки формируют нейтральный комплекс, который, связываясь с промоторной областью P₂, регулирует транскрипцию генов локуса [26, 27]. Антитоксин MazE связывает в нейтральный комплекс две молекулы MazF. Предполагается, что структура антитоксина MazE имитирует одноцепочечную структуру мРНК, что приводит к связыванию токсина MazF и, как следствие, ингибированию его эндорибонуклеазной активности [28, 29]. Молекула токсина MazF имеет два сайта связывания с антитоксином. Таким образом, белки могут формировать довольно длинный линейный олигомер, состоящий из перемежающихся MazE и MazF [26].

Механизм действия токсина MazF. Токсин MazF — это эндорибонуклеаза, которая ингибирует процесс трансляции в клетке, гидролизует

фосфодиэфирные связи. Показано, что для *Escherichia coli* гидролиз осуществляется по АЦА последовательности на 5'-конце мРНК [23, 30]. В отличие от эндорибонуклеаз других ТА семейств (например, RelE), MazF расщепляет мРНК, не связанные с рибосомами [23].

Помимо мРНК, мишенью для токсина MazF может также служить и тмРНК, которая представляет собой гибрид мРНК и тРНК, способный осеивать рибосомы, связываясь с их А-сайтом, на котором располагается поврежденная мРНК [31].

Примечательно, что мРНК, кодирующая синтез токсина MazF, содержит много последовательностей АЦА: внутри открытой рамки считывания их насчитывается 9 АЦА, 4 из которых располагаются в центре рамки. Возможно, что трансляция MazF отрицательно регулируется им же [26].

В геномах различных бактерий было обнаружено множество хромосомных гомологов локусов *mazEF*. Гомологи токсина MazF также обладают эндорибонуклеазной активностью, однако последовательность, по которой происходит разрезание мРНК, у них другая [26].

Семейство *relBE*. Впервые гены локуса *relBE* были обнаружены в геноме *E. coli* [32, 33] а позже и в геномах других эубактерий и архей [34]. Локус *relBE* состоит из двух частично перекрывающихся генов, *relE* и *relB*, кодирующих, соответственно, синтез токсина RelE и антитоксина RelB [7].

Токсин RelE формирует плотный комплекс с антитоксином RelB, в результате чего инактивируется [35]. Комплекс RelB/RelE авторегулирует транскрипцию локуса *relBE*, связываясь через антитоксин с промоторной областью оперона. Свободный антитоксин RelB так же, как в большинстве ТА систем, может регулировать собственный промотор [36]. Степень связывания RelB с промоторной областью локуса зависит от соотношения RelE/RelB. В присутствии большого количества токсина RelE в клетке снижается аффинность RelB к промоторной области и возобновляется транскрипция локуса *relBE* [36].

Механизм действия токсина RelE. RelE — эндорибонуклеаза, структурно похожая на группу сайт-специфических эндорибонуклеаз, которые расщепляют свободную мРНК [37]. Однако в активном центре токсина отсутствуют аминокислотные остатки, которые позволяют осуществлять гидролиз мРНК, не связанных с рибосомами [17, 37]. Поэтому для активности токсина RelE необходимо присутствие рибосом (а именно, 16S рРНК), которые обеспечивают правильное ориентирование мРНК для действия RelE [37].

Спорным является вопрос специфичности гидролиза РНК, вызываемого RelE. С одной стороны, *in vitro* показано, что гидролиз мРНК, обусловленный действием RelE, происходит между 2 и 3 основаниями преимущественно стоп-кодо-

нов (УАГ, УАА, УГА), а также некоторых смысловых кодонов (ЦАГ, УЦГ, ЦАГ) [17]. В экспериментах *in vivo* специфичность гидролиза не была подтверждена [38].

Семейство *phd/doc*. Локус *phd/doc* был впервые обнаружен в составе бактериофага P1 *E. coli*, наследуемого клетками как низкокопийная плазмида [39]. Гены, кодирующие белки Phd и Doc, располагаются в одном опероне. Ген *doc* кодирует небольшой токсичный белок Doc, ген *phd* – антитоксин Phd, нейтрализующий Doc [40, 41]. Белок антитоксин лабилен и подвержен действию клеточных протеиназ [42].

В цитозоле клетки белки Phd и Doc формируют комплекс, состоящий из одной молекулы токсина Doc и двух молекул антитоксина Phd. Образование данного комплекса сопровождается изменениями вторичной структуры белка Phd. Белковый комплекс Phd/Doc формируется при низких концентрациях компонентов, нестабилен, присутствует в клетке в очень небольших количествах и имеет очень короткий промежуток жизни [43].

Антитоксин Phd – ДНК-связывающий белок, который ингибирует транскрипцию собственного гена, связываясь с операторной областью локуса. Связывание операторной части локуса и ингибирование его транскрипции антитоксином усиливается в присутствии токсина Doc [43, 44].

Механизм действия токсина Doc. Механизм действия токсина Doc сходен с механизмом действия аминогликозидных антибиотиков (например, гиромидина) [45]. Токсичный белок Doc взаимодействует с 30S субъединицей рибосомы, тем самым ингибируя этап элонгации полипептидной цепи. Токсин препятствует переходу пептидил – тРНК с А-сайта рибосомы на Р-сайт, что приводит к накоплению так называемых “застывших” рибосом по всей длине активно транслируемой мРНК. [46].

Хромосомные гомологи семейства *phd/doc* были обнаружены в геномах широкого круга бактерий и некоторых архей [3].

Семейство *varBC*. Локусы *varBC* (*virulence associated proteins*) представляют собой самое большое из 9 известных и описанных семейств [47, 48]. Впервые локус *varBC* был обнаружен в составе плазмиды, обуславливающей вирулентность *Salmonella dublin* [49]. Данный локус имеет такую же генетическую организацию, которая свойственна всем *bona fide* ТА системам: два частично перекрывающихся гена – *varB* и *varC* – кодируют синтез соответствующих белков: антитоксина VarB и токсина VarC.

Белки токсин и антитоксин семейства *varBC* в цитозоле клетки образуют нейтральный комплекс. [50]. Белковый комплекс VarB/VarC осуществляет регуляцию транскрипции своего локуса по следующему принципу: при избытке антитоксина,

комплекс данных белков связывается с промоторной областью оперона и подавляет транскрипцию. Если же отношение VarC/VarB высокое, то избыточное количество токсина приводит к дестабилизации комплекса VarBC с оператором, возобновлению транскрипции оперона *varBC* и синтеза токсина и антитоксина [51]. Такая зависимость закрытости промотора от количества токсина имеет биологический смысл, так как иначе трудно представить, как клетка справляется с избытком токсина, накопившегося в связи с возрастанием уровня протеиназ.

Механизм действия токсина VarC. Токсин VarC принадлежит семейству PIN – доменовых белков. PIN – домены характерны для Mg²⁺- или Mn²⁺-зависимых нуклеаз [52]. У прокариот подавляющее большинство PIN-доменовых белков являются токсическими компонентами ТА систем. PIN-домены были обнаружены у эукариот, архей и почти у многих секвенированных прокариот, включая множество важных патогенов, таких, как *Neisseria gonorrhoeae* [53, 54] и *M. tuberculosis* [55, 56].

Несмотря на то, что неоднократно была продемонстрирована неспецифическая рибо- и дезоксирибонуклеазная активность токсина VarC *in vitro*, конкретная мишень белка оставалась до недавнего времени неизвестной [56–59]. Однако недавно было обнаружено, что VarC токсин *Shigella flexneri* представляет собой сайт-специфическую эндорибонуклеазу, которая разрезает инициаторную тРНК по всей длине на небольшие фрагменты между основаниями шпильчатой структуры антикодона [22].

Семейство *hipBA*. Семейство *hipBA* (*high persistence*) было изучено в основном на клетках *E. coli* [60]. Два частично перекрывающихся гена *hipB* и *hipA* кодируют синтез белков антитоксина HipB и токсина HipA, соответственно. Антитоксина HipB, как и большинство антитоксинов, является ДНК-связывающим белком, что позволяет ему не только контролировать активность токсина, образуя с ним нейтральный комплекс, но и регулировать транскрипционную активность локуса *hipBA*, связываясь с операторной частью промотора [61, 62]. В комплексе HipA–HipB–ДНК молекула антитоксина HipB как бы “зажата” с каждой стороны молекулами токсина hipA [63].

Механизм действия HipA. Структуры белка HipA гомологична структуре циклинзависимых протеиназ эукариот [64]. В силу этой особенности, а также того факта, что для токсина HipA характерна высокая степень аффинности к АТФ, данный белок относят к классу серинтреонинподобных киназ эукариот [63]. Было показано, что один из клеточных белков, фактор элонгации Tu (EF–Tu) подвергается фосфорилированию по Thr³⁸² неизвестной киназой [65, 66]. Возможно, что неизвестная киназа – это токсин HipA, так как было установлено, что в присутствии ГТФ и

АТФ и Mg^{2+} EF—Tu может взаимодействовать с HrpA [63]. Вероятно, HrpA фосфорилирует фактор элонгации Tu по Thr³⁸², в результате чего происходят конформационные изменения белка и он теряет способность связываться с аминоксил-тРНК [63]. Однако помимо указанной, предполагается также наличие и других клеточных мишеней HrpA [67, 68].

Семейство *parDE*. Система генов *parDE* широко представлена в геномах многих микроорганизмов в составе низкокопийной плазмиды pRK2/RP4 [3].

Так же, как и в большинстве ТА систем, токсин ParE является положительно заряженным белком, который способен образовывать комплекс с отрицательно заряженным белком антитоксином ParD, меньшим по размеру [69]. Антитоксин ParD включает в себя два функционально и структурно различных региона [70]. С помощью одного из них ParD авторегулирует локус *parDE* [71, 72], а за счет другого региона осуществляется связывание с токсином и его нейтрализация [73, 74]. В результате взаимодействия белков образуется ParE/ParD комплекс, который предотвращает действия токсина ParE [75].

Механизм действия токсина ParE. Токсин ParE ингибирует репликацию ДНК в клетке путём инактивации фермента ДНК-гиразы. Токсин взаимодействует с ферментом только на определенном этапе процесса суперспирализации ДНК; образование комплекса “токсин—ДНК—гираза” сопровождается гидролизом АТФ [16].

Семейство *higBA*. Первоначально, *higBA* (“host inhibition of growth”) был открыт как ТА локус, обеспечивающий стабилизацию плазмиды Rts1, которая обычно реплицируется в клетках *Proteus* ssp. и обуславливает устойчивость клеток к канамицину [7]. Хромосомные гомологи этого семейства были обнаружены в 200 бактериальных геномах, в том числе таких патогенов, как *Vibrio cholerae* и *Streptococcus pneumonia* [3].

От других известных ТА систем локус *higBA* отличается его генетическая организация: ген *higB*, кодирующий токсин, находится перед геном *higA*, кодирующим антитоксин, тогда как все известные ТА модули имеют прямо противоположное расположение генов. Очищенные белки HigA и HigB формируют стабильный комплекс, в котором оба белка находятся в эквимоллярных количествах [76].

Механизм действия токсина HigB. Взаимодействие токсина HigB с 50 S субъединицей рибосомы приводит к изменениям его структуры и активирует его сайт-специфическую эндорибонуклеазную активность [76], гидролизуя транслируемую мРНК по всей длине всех имеющихся AAA триплетов. Разрезание мРНК может происходить как внутри рамки считывания, так и вне ее. Помимо AAA триплетов, правда с гораздо меньшей эффектив-

ностью разрезания, мишенью HigB может стать и АА последовательность и даже отдельные А основания [76].

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ФУНКЦИИ ТА СИСТЕМ

В настоящее время существует множество работ, посвященных изучению функций ТА систем [77–82]. Поскольку частичные удаления ТА локусов не приводили ни к каким физиологическим изменениям у бактерий, существовало мнение, что гены токсина—антитоксина не что иное как “генетический мусор” [83, 84]. Результаты таких работ теперь можно объяснить тем, что в геномах бактерий содержится большое количество ТА локусов, и удаление их части может не давать выраженных фенотипических изменений. Кроме того, удаление ТА локусов может проявить себя только в особых, стрессовых для бактерии условиях.

По мере исследования структуры и механизмов действия ТА систем стали появляться предположения, что ТА гены участвуют в сохранении целостности генома клеток. К примеру, для локуса *parDE* было показано, что он предотвращает потерю хромосом [85]. Как известно, геном всех членов рода *Vibrionaceae* состоит из двух хромосом. В результате потери хромосомы II, наблюдался процесс деградации оставшейся в клетке хромосомы I. Повреждения, которым при этом подвергалось ДНК, были аналогичны тем, которые обусловлены действием токсина ParE, что, в конечном счете, приводит к смерти клетки [86].

Согласно предположению Ханны Энгельберг—Кульки, ТА системы могут принимать участие в запуске “программируемой клеточной смерти” (ПКС), что было продемонстрировано на клетках *E. coli* при индукции экспрессии токсина MazF. ПКС — активный процесс, позволяющий выжить здоровой части бактериальной популяции, к примеру, при фаговом поражении клеток [87]. Оказалось, что способность MazF индуцировать ПКС зависит от плотности популяции. В ответ на стрессовое воздействие антибиотиками в клетках начинают накапливаться сигнальные молекулы EDF (Extracellular Death Factor). Накопление EDF приводит к активации токсина MazF, что в свою очередь приводит к увеличению синтеза EDF и, как следствие, к гибели клетки [88].

Бактерицидный эффект гиперэкспрессии MazF был продемонстрирован также на клетках *M. smegmatis*. Экспрессия токсина MazF останавливала клеточный рост и приводила к падению количества колониеобразующих единиц на два порядка [89].

При определенных условиях эффект MazF может носить бактериостатический, обратимый характер. Однако после прохождения бактериями,

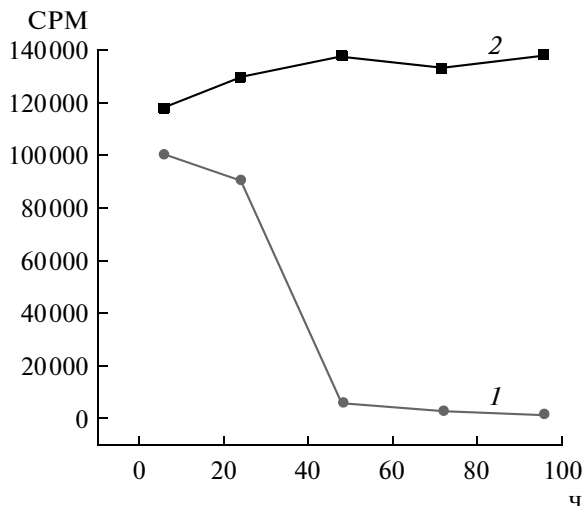


Рис. 1. Включение 5,6-Н³ урацила в клетках *M. smegmatis* с экспрессией токсина VarC (1) и штамма дикого типа (2).

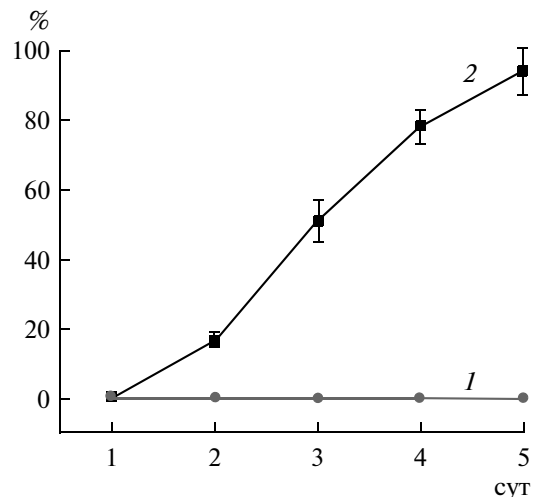


Рис. 2. Динамика образования покоящихся форм клетками *M. smegmatis* с гиперэкспрессией антитоксина VarB (1) и штамма дикого типа (2).

экспрессирующими MazF, так называемой “точки невозврата” бактериостатическое действие токсина переходит в бактерицидное [90]. Однако действие большинства токсинов носят все же бактериостатический, обратимый характер [91].

Обратимость действия токсинов послужила основанием для предположения об участии ТА систем в адаптации бактерии к стрессовым условиям, а именно, была обнаружена связь между ТА системами и явлением бактериальной персистенции. Основанием для предположения об участии ТА систем в бактериальной персистенции послужило обнаружение гена *hipA* (*high persistence*), мутации в котором привели к увеличению количества персистирующих клеток [60, 67, 68]. Суть данного явления заключается в том, что при воздействии антибиотиками на бактериальную популяцию определенное количество клеток (10^{-6} в экспоненциальной культуре, 10^{-2} в стационарной) выживает [92]. Такие клетки называют персистирующими и они характеризуются только фенотипической устойчивостью, т.е. никаких генетических изменений эти клетки не претерпевают, и их потомство остается чувствительным к воздействию антибиотиков. Фенотипическая устойчивость обусловлена особым физиологическим состоянием бактерии, вероятно, остановкой или замедлением тех процессов, на которые направлено действие антибиотиков.

Настоящим прорывом в понимании роли ТА локусов в явлении фенотипической устойчивости являются работы Кена Гердеса, в которых была установлена прямая связь между наличием ТА локусов и количеством персистирующих клеток [93]. Авторы показали, что при последовательном удалении ТА локусов из генома *E. coli* количество

персистирующих клеток в бактериальной популяции падает. Тот же эффект был получен при удалении гена, кодирующего синтез Lon протеиназы, контролирующей количество антитоксина в клетке [93].

Особый интерес вызывают множественные ТА локусы *M. tuberculosis*, в связи со способностью этой бактерии образовывать покоящиеся формы, с которыми связывают латентный туберкулез, не поддающийся терапии антибиотиками. Предполагается, что ТА системы играют роль в формировании покоящегося состояния микобактерий, в частности латентного туберкулеза [91].

Согласно нашим неопубликованным данным, продукты локуса семейства *varBC* принимают участие в формировании покоящегося состояния *M. smegmatis*. Экспрессия токсина VarC приводит к изменению морфологии клеток и падению уровня метаболической активности практически до нуля (рис. 1). В то же время при гиперэкспрессии антитоксина VarB бактериальные клетки теряют способность переходить в состояние покоя в модельном эксперименте образования покоящихся форм (рис. 2).

Мы полагаем, что персистенция и покой не являются синонимами. Состояние покоя характеризуется отсутствием метаболической активности, зачастую сопровождается некультивируемостью. Кроме того, клетки в покоящемся состоянии могут сохраняться в течение длительного времени [94]. О свойствах персистирующих клеток мы можем только предполагать, так как их количество чрезвычайно мало и нет возможности работать с ними непосредственно. Персистенцию связывают с флуктуациями количества Lon протеиназы, ppGpp, и, соответственно, уровнем токсина [95], которые

носят кратковременный характер. Возможно, в основе персистенции и покоя лежат общие механизмы, требующие изучения. Вероятно, что ТА системы лежат в основе механизмов формирования покоя и персистенции.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТА ЛОКУСОВ В ФАРМОКОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

ТА системы были идентифицированы в геномах многих патогенов, в том числе и устойчивых к антибиотикам. Бактерицидное/бактериостатическое действие токсинов позволяет рассматривать ТА системы как весьма привлекательные мишени для разработки принципиально новых антибактериальных препаратов. Самым очевидным является создание лекарственных препаратов на основе веществ, блокирующих действие антитоксина. Такое действие приведет к накоплению свободного токсина в клетках, что в конечном итоге приведет к клеточной гибели.

Увеличение количества свободного токсина можно достичь также поддержанием высокого уровня транскрипции ТА локусов. В этом случае повысится концентрация в бактериальной клетке как токсина, так и антитоксина. Но учитывая относительно короткое время жизни антитоксина, особенно при активации внутриклеточных протеиназ, можно предположить, что его количества будет недостаточно для инактивации всего свободного токсина. Реализация такого подхода возможна через разработку лекарственного препарата, препятствующего связыванию ТА комплекса с промоторной областью, что приведет к разблокировке ТА промотора и увеличению уровня транскрипции.

Для *mazEF*⁺ бактерий перспективно использование синтетических аналогов сигнальных молекул EDF как активаторов токсина MazF [98].

Но возможен другой, диаметрально противоположный подход. Этот подход связан с предположением, что токсины ТА семейств участвуют в формировании популяции персистирующих клеток и покоящихся форм бактерий, невосприимчивых к действию антибиотиков. Можно предположить, что инактивация токсинов приведет к снижению субпопуляции покоящихся бактерий и, соответственно, к повышению эффективности антибиотических препаратов. В этой связи можно предположить, что комбинированное использование антибиотикотерапии и ингибитора токсинов у больных с острой формой инфекционных заболеваний, например туберкулеза, не позволит болезням перейти в латентную стадию.

Другое направление, связанное с ТА локусами, может состоять в создании новых вакцинных препаратов на основе живых бактерий с низким по-

тенциалом реактивации. Например, антитуберкулезная вакцина БЦЖ низкоэффективна и иногда осложняется реактивацией бактерии (развитием так называемых “бецжитов”), особенно при иммунодефицитных состояниях. Предпринимаются попытки создания новой живой вакцины и, например, дополнительная аттенуация противотуберкулезной вакцины путем удаления определенных ТА локусов, может предотвратить развитие осложнений, связанных с реактивацией бактерии.

* * *

До сих пор важность ТА систем не вполне осознана, но распространенность этих локусов в бактериальном мире свидетельствует об их значимости. На сегодняшний день накоплены экспериментальные подтверждения участия ТА систем в развитии таких важных физиологических состояний у бактерий, как персистенция, покой и программируемая клеточная смерть. В связи с этим, можно предполагать, что использование потенциала ТА систем приведет к появлению нового класса противобактериальных препаратов и вакцин.

Благодарим профессора А.С. Капрельянца за помощь в написании данного обзора.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 12-04-01604-а, № 11-04-00713-а, № 11-04-01440-а, № 12-04-01760-а) и ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (грант № 14.740.11.1056), Программы РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ogura T., Hiraga S. // Cell. 1983. V. 32. № 2. P. 351–360.
2. Прозоров А.А., Даниленко В.Н. // Микробиология. 2010. Т. 79. № 2. С. 147–159.
3. Pandey D.P., Gerdes K. // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. № 3. P. 966–976.
4. Gerdes K., Christensen S.K., Løbner-Olesen A. // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. № 5. P. 371–382.
5. Yamaguchi Y., Park J.H., Inouye M. // Annu. Rev. Genet. 2011. № 45. P. 61–79.
6. Hayes F., Van Melder L. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2011. V. 46. № 5. P. 386–408.
7. Tian Q.B., Ohnishi M., Tabuchi A., Terawaki Y. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 220. № 2. P. 280–284.
8. Jensen R.B., Gerdes K. // Mol. Microbiol. 1995. V. 17. № 2. P. 205–210.
9. Garcia-Pino A., Christensen-Dalsgaard M., Wyns L., Yarmolinsky M., Magnuson R.D., Gerdes K., Loris R. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 45. P. 30821–30827.
10. Tsuchimoto S., Nishimura Y., Ohtsubo E. // J. Bacteriol. 1992. V. 174. № 13. P. 4205–4211.

11. Christensen S.K., Maenhaut-Michel G., Mine N., Gottesman S., Gerdes K., Van Melderen L. // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 51. № 6. P. 1705–1717.
12. Fozo E.M., Hemm M.R., Storz G. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008. V. 72. № 4. P. 579–589.
13. Blower T.R., Short F.L., Rao F., Mizuguchi K., Pei X.Y., Fineran P.C., Luisi B.F., Salmond G.P. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. № 13. P. 6158–6173.
14. Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E.V. // *Biol. Direct.* 2009. V. 4. № 19.
15. Simic M., De Jonge N., Loris R., Vesnaver G., Lah J. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 30. P. 20002–20010.
16. Yuan J., Sterckx Y., Mitchenall L.A., Maxwell A., Loris R., Waldor M.K. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 51. P. 40397–40398.
17. Pedersen K., Zavialov A.V., Pavlov M.Y., Elf J., Gerdes K., Ehrenberg M. // *Cell.* 2003. V. 112. № 1. P. 131–140.
18. Liu M., Zhang Y., Inouye M., Woychik N.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 15. P. 5885–5890.
19. Hurley J.M., Woychik N.A. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 28. P. 18605–18613.
20. Schumacher M.A., Piro K.M., Xu W., Hansen S., Lewis K., Brennan R.G. // *Science.* 2009. V. 323. № 5912. P. 396–401.
21. Winther K.S., Gerdes K. // *Nucleic. Acids Res.* 2012. V. 40. № 10. P. 4347–4357.
22. Zhang Y., Zhang J., Hoefflich K.P., Ikura M., Qing G., Inouye M. // *Mol. Cell.* 2003. V. 12. № 4. P. 913–923.
23. Aizenman E., Engelberg-Kulka H., Glaser G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 12. P. 6059–6063.
24. Metzger S., Dror I.B., Aizenman E., Schreiber G., Toone M., Friesen J.D., Cashel M., Glaser G. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 30. P. 15699–15704.
25. Kamada K., Hanaoka F., Burley S.K. // *Mol. Cell.* 2003. V. 11. № 4. P. 875–884.
26. Marianovsky I., Aizenman E., Engelberg-Kulka H., Glaser G. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 8. P. 5975–5984.
27. Zhang J., Zhang Y., Inouye M. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 34. P. 32300–32306.
28. Lah J., Simic M., Vesnaver G., Marianovsky I., Glaser G., Engelberg-Kulka H., Loris R. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 17. P. 17397–17407.
29. Zhang Y., Zhang J., Hara H., Kato I., Inouye M. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 5. P. 3143–3150.
30. Christensen S.K., Pedersen K., Hansen F.G., Gerdes K. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 332. № 4. P. 809–819.
31. Bech F.W., Jørgensen S.T., Diderichsen B., Karlström O.H. // *EMBO J.* 1985. V. 4. № 4. P. 1059–1066.
32. Diderichsen B., Fiil N.P., Lavallé R. // *J. Bacteriol.* 1977. V. 131. № 1. P. 30–33.
33. Gerdes K. // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. № 3. P. 561–572.
34. Galvani C., Terry J., Ishiguro E.E. // *J. Bacteriol.* 2001. V. 183. № 8. P. 2700–2703.
35. Overgaard M., Borch J., Gerdes K. // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 394. № 2. P. 183–196.
36. Overgaard M., Borch J., Jørgensen M.G., Gerdes K. // *Mol. Microbiol.* 2008. V. 69. № 4. P. 841–857.
37. Neubauer C., Gao Y.G., Andersen K.R., Dunham C.M., Kelley A.C., Hentschel J., Gerdes K., Ramakrishnan V., Brodersen D.E. // *Cell.* 2009. V. 139. № 6. P. 1084–1095.
38. Hurley J.M., Cruz J.W., Ouyang M., Woychik N.A. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 17. P. 14770–14778.
39. Lehnher H., Maguin E., Jafri S., Yarmolinsky M.B. // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 233. № 3. P. 414–428.
40. Magnuson R., Lehnher H., Mukhopadhyay G., Yarmolinsky M.B. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 31. P. 18705–18710.
41. Lehnher H., Yarmolinsky M.B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 8. P. 3274–3277.
42. Gazit E., Sauer R.T. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 24. P. 16813–16818.
43. Gazit E., Sauer R.T. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 5. P. 2652–2657.
44. Magnuson R., Yarmolinsky M.B. // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. № 23. P. 6342–6351.
45. Brodersen D.E., Clemons W.M.Jr., Carter A.P., Morgan-Warren R.J., Wimberly B.T., Ramakrishnan V. // *Cell.* 2000. V. 103. № 7. P. 1143–1154.
46. Liu M., Zhang Y., Inouye M., Woychik N.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 15. P. 5885–5890.
47. Sevin E.W., Barloy-Hubler F. // *Genome Biol.* 2007. V. 8. № 8. P. 155.
48. Anantharaman V., Aravind L. // *Genome Biol.* 2003. V. 4. № 12. P. 81.
49. Pullinger G.D., Lax A.J. // *Mol. Microbiol.* 1992. V. 6. № 12. P. 1631–1643.
50. Miallau L., Faller M., Chiang J., Arbing M., Guo F., Cascio D., Eisenberg D. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 1. P. 276–283.
51. Robson J., McKenzie J.L., Cursons R., Cook G.M., Arcus V.L. // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 390. № 3. P. 353–367.
52. Clissold P.M., Ponting C.P. // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. № 24. P. 888–890.
53. Hopper S., Wilbur J.S., Vasquez B.L., Larson J., Clary S., Mehr I.J., Seifert H.S., So M. // *Infect. Immun.* 2000. V. 68. № 2. P. 896–905.
54. Mattison K., Wilbur J.S., So M., Brennan R.G. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 49. P. 37942–37951.
55. Arcus V.L., Rainey P.B., Turner S.J. // *Trends Microbiol.* 2005. V. 13. № 8. P. 360–365.
56. Ramage H.R., Connolly L.E., Cox J.S. // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. № 12. P. 1767.
57. Arcus V.L., Bäckbro K., Roos A., Daniel E.L., Baker E.N. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 16. P. 16471–16478.
58. Winther K.S., Gerdes K. // *Mol. Microbiol.* 2009. V. 72. № 4. P. 918–930.
59. Daines D.A., Wu M.H., Yuan S.Y. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 14. P. 5041–5048.
60. Scherrer R., Moyed H.S. // *J. Bacteriol.* 1988. V. 170. № 8. P. 3321–3326.
61. Black D.S., Irwin B., Moyed H.S. // *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. № 13. P. 4081–4091.
62. Black D.S., Kelly A.J., Mardis M.J., Moyed H.S. // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. № 18. P. 5732–5739.

63. Schumacher M.A., Piro K.M., Xu W., Hansen S., Lewis K., Brennan R.G. // *Science*. 2009. V. 323. № 5912. P. 396–401.
64. Honda R., Lowe E.D., Dubinina E., Skamnaki V., Cook A., Brown N.R., Johnson L.N. // *EMBO J.* 2005. V. 24. № 3. P. 452–463.
65. Lippmann C., Lindschau C., Vijgenboom E., Schröder W., Bosch L., Erdmann V.A. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 1. P. 601–607.
66. Alexander C., Bilgin N., Lindschau C., Mesters J.R., Kraal B., Hilgenfeld R., Erdmann V.A., Lippmann C. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 24. P. 14541–14547.
67. Moyed H.S., Broderick S.H. // *J. Bacteriol.* 1986. V. 166. № 2. P. 399–403.
68. Moyed H.S., Bertrand K.P. // *J. Bacteriol.* 1983. V. 155. № 2. P. 768–775.
69. Oberer M., Zangger K., Gruber K., Keller W. // *Protein Sci.* 2007. V. 16. № 8. P. 1676–1688.
70. Oberer M., Zangger K., Prytulla S., Keller W. // *Biochem. J.* 2002. V. 361. № 1. P. 41–47.
71. Johnson E.P., Strom A.R., Helinski D.R. // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. № 5. P. 1420–1429.
72. Oberer M., Lindner H., Glatzer O., Kratky C., Keller W. // *Biol. Chem.* 1999. V. 380. № 12. P. 1413–1420.
73. Ruiz-Echevarría M.J., Berzal-Herranz A., Gerdes K., Díaz-Orejas R. // *Mol. Microbiol.* 1991. V. 5. № 11. P. 2685–2693.
74. Santos-Sierra S., Pardo-Abarrio C., Giraldo R., Díaz-Orejas R. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2002. V. 206. № 1. P. 115–119.
75. Dalton K.M., Crosson S. // *Biochemistry*. 2010. V. 49. № 10. P. 2205–2215.
76. Hurley J.M., Woychik N.A. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 28. P. 18605–18613.
77. Yamaguchi Y., Inouye M. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2011. V. 9. № 11. P. 779–790.
78. Lewis K. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. № 64. P. 357–372.
79. Wang X., Wood T.K. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77. № 16. P. 5577–5583.
80. Guglielmini J., Van Melder L. // *Mob. Genet. Elements*. 2011. V. 1. № 4. P. 283–290.
81. Engelberg-Kulka H., Amitai S., Kolodkin-Gal I., Hazan R. // *PLoS Genet.* 2006. V. 2. № 10. P. 135.
82. Bukowski M., Rojowska A., Wladyka B. // *Acta Biochim. Pol.* 2011. V. 58. № 1. P. 1–9.
83. Lerat E., Ochman H. // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. № 10. P. 3125–3132.
84. Ochman H., Davalos L.M. // *Science*. 2006. V. 311. № 5768. P. 1730–1733.
85. Szekeres S., Dauti M., Wilde C., Mazel D., Rowe-Magnus D.A. // *Mol. Microbiol.* 2007. V. 63. № 6. P. 1588–1605.
86. Yamaichi Y., Fogel M.A., Waldor M.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 2. P. 630–635.
87. Engelberg-Kulka H., Hazan R., Amitai S. // *J. Cell Sci.* 2005. V. 118. № 19. P. 4327–4332.
88. Kolodkin-Gal I., Sat B., Keshet A., Engelberg-Kulka H. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. № 12. P. 319.
89. Frampton R., Aggio R.B., Villas-Bôas S.G., Arcus V.L., Cook G.M. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 8. P. 5340–5356.
90. Amitai S., Yassin Y., Engelberg-Kulka H. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 24. P. 8295–8300.
91. Pedersen K., Christensen S.K., Gerdes K. // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 45. № 2. P. 501–510.
92. Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y., Lewis K. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2004. V. 230. № 1. P. 13–18.
93. Maisonneuve E., Shakespeare L.J., Jørgensen M.G., Gerdes K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 32. P. 13206–13211.
94. Ануцин А.М., Гончаренко А.В., Галон И.В., Демидёнок О.И., Кудыкина Ю.К., Мойсенович М.М., Мулюкин А.Л., Капрельяни А.С. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2010. Т. 46. № 3. С. 308–314.
95. Gerdes K., Maisonneuve E. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2012. V. 66. P. 103–123.
96. Moritz E.M., Hergenrother P.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 1. P. 311–316.
97. Rosvoll T.C., Pedersen T., Sletvold H., Johnsen P.J., Sollid J.E., Simonsen G.S., Jensen L.B., Nielsen K.M., Sundsfjord A. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2010. V. 58. № 2. P. 254–268.
98. Kolodkin-Gal I., Hazan R., Gaathon A., Carmeli S., Engelberg-Kulka H. // *Science*. 2007. V. 318. № 5850. P. 652–655.

Bacterial Toxin—Antitoxin Systems and Perspectives for Their Application in Medicine: A Review

O. I. Demidenok and A. V. Goncharenko

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

e-mail: demidenoksana@gmail.com

Received December 19, 2012

Abstract—The structure of various toxin—antitoxin (TA) families and the principles of their action are reviewed. TA loci are widely distributed in the genomes of eubacteria and archaea. Most TA systems are two-component and function in a similar way: a stable toxin alters vitally important cell functions and can be inactivated by a labile antitoxin.

УДК 577.112.083

ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ResD-ResE *Bacillus cereus*, ЭКСПРЕССИРОВАННЫХ В ШТАММАХ *Escherichia coli*

© 2013 г. Е. В. Шапырина*, А. М. Шадрин**, А. С. Солонин*

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

**Лондонский королевский колледж, SW7 2AZ

e-mail: evshapyrina@gmail.com

Поступила в редакцию 14.05.2013 г.

Сконструированы рекомбинантные штаммы *E. coli*, экспрессирующие гены *resD* и *resE* *Bacillus cereus* ATCC 14579^T, слитые с геном убиквитина, проведена очистка белков ResD и ResE, кодируемых этими генами. Использованный подход позволил впервые получить электрофоретически гомогенные препараты этих белков, минуя стадии очистки в денатурирующих условиях. Простота разработанного метода позволила использовать его для выделения и последующего скрининга мутантных вариантов ResD и ResE с высокой производительностью. Выход рекомбинантных белков составил 150 мг/г сырой массы клеток.

DOI: 10.7868/S0555109913060160

Бактерии различных штаммов вида *Bacillus cereus* продуцируют большое количество потенциальных факторов патогенности: гемолизины, фосфолипазы, эметические токсины, энтеротоксины, металлопротеазы и коллагеназы. Показано, что синтез ряда энтеротоксинов у *B. cereus*, таких как Nhe (негемолитический энтеротоксин), Hbl (двухкомпонентный гемолизин BL), а также синтез глобального регулятора PlcR зависит от чувствительной к окислительно-восстановительному потенциалу среды двухкомпонентной системы (ДС) сигнальной трансдукции ResDE, отвечающей за регуляцию генов микроаэробного и анаэробного метаболизма у бактерий рода *Bacillus* [1, 2]. ДС состоит из связанной с мембраной сенсорной гистидинкиназы ResE и цитоплазматического регулятора ответа ResD [3–5]. Свойства данной ДС хорошо изучены у непатогенного вида *B. subtilis*, однако лишь недавно появились первые работы по изучению роли ДС ResDE в регуляции продукции токсинов *B. cereus* [6, 6а, 7]. Эти исследования указывают на ключевую позицию ДС ResDE в иерархии регуляции различных сигналов, отвечающих за выбор пути синтеза тех или иных токсинов. В то же время, согласно исследованиям “European Food Safety Authority” [8], *Bacillus cereus sensu lato* входит в группу лидеров среди бактерий, вызывающих пищевые отравления. Эти факты указывают на необходимость исследования механизмов действия ДС ResDE на молекулярном уровне, расшифровка которых позволит разработать подходы к терапии заболеваний, вызванных *B. cereus*, а также создаст предпосылки для разработки нового класса лекарственных средств, “выключающих” продукцию токсинов.

Поскольку ResD является транскрипционным регулятором, важным аспектом исследований механизма действия ДС ResDE представляется изучение взаимодействия ДНК с белком ResD как в апо-, так и в фосфорилированной форме.

Цель работы – создание системы для экспрессии и очистки транскрипционного регулятора ResD и функциональной части сенсорной гистидинкиназы ResE, позволяющей получить каталитически активные гомогенные препараты белков с высоким выходом.

МЕТОДИКА

Реактивы. В состав сред для выращивания бактерий входили: бакто-триптон, бакто-дрожжевой экстракт, сердечномозговая вытяжка ВНИ (Brain Heart Infusion) фирмы “Difco”, США. Также в работе были использованы эндонуклеазы рестрикции, реактивы для ПЦР, ДНК-полимераза и ДНК-лигаза бактериофага Т4 (“Fermentas”, Литва; “СибЭнзим”, Россия), реактивы для электрофореза в ПААГ (“Sigma”, США). Олигонуклеотиды синтезированы в фирме “Евроген” (Россия).

Культивирование бактерий и использованные плазмиды. Штаммы бактерий и плазмиды представлены в таблице. Клетки *E. coli* выращивали при температуре 37, 28, 18, 16°C на качалке (180 об/мин) в среде Лурия–Бертони (LB) с добавлением антибиотиков: ампициллин 50–100 мкг/мл; хлорамфеникол 30 мкг/мл; канамицин 25 мкг/мл, рифампицин 100 мкг/мл. *B. cereus* ATCC 14579^T культивировали в среде, содержащей сердечно-мозговую вытяжку, при температуре 28°C и интенсивности перемешивания 180 об/мин в колбах на качалке.

Штаммы и плазмиды, использованные в работе

Штамм или плаزمида	Характеристика	Источник
<i>Bacillus cereus</i>	Типовой штамм <i>B. cereus</i>	ATCC14579 ^T = BKM B-504 ^T = JCM 2152 ^T = 6A5 BGSC
Escherichia coli		
BL21(DE3)	-ompT hsdS _B (r _B –, m _B –) gal dcm (DE3) не содержит ompT и lon протеазы, что позволяет выделить рекомбинантный продукт интактным	“Novagen”
C41(DE3)	F–ompT hsdS _B (r _B – m _B –) gal dcm (DE3), производный BL21(DE3), обычно используемый для экспрессии токсичных или труднорастворимых белков, так как имеет не охарактеризованную мутацию, обеспечивающую устойчивость к токсичным белкам	“Novagen” [9]
HMS174(DE3)	F– recA1 hsdR(rK12– mK12+) (DE3), Rif ^R , обладает recA мутацией, что приводит к снижению гомологичной рекомбинации и, в конечном итоге к стабилизации рекомбинантных генов	“Novagen”
M15[pREP4]	<i>E. coli</i> K12 (nal ^s str ^s rif ^s lac [–] ara [–] gal [–] mlt [–] F [–] recA ⁺ , uvr ⁺ lon ⁺) pREP4 – Km ^R	“Qiagen”
JM109	endA1, recA1, gyrA96, thi, ΔΔ(lac-proAB), hsdR17(r _k [–] m _k [–]), supE44, relA1, [F ⁺ , traD36, proAB, lacI ^q , ZΔΔM15];	[10]
TOP10	F– mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG, сине-белая селекция	“Invitrogen”
Плазмиды		
pUC128	Вектор для клонирования, Amp ^R	[11]
pET19mod	Вектор для экспрессии рекомбинантных белков под контролем сильно-го промотора РНК-полимеразы бактериофага T7, Amp ^R	[12]
pQE30	Вектор для экспрессии рекомбинантных белков под контролем сильно-го промотора РНК-полимеразы бактериофага T5, Amp ^R	“Qiagen”
pHUE	(His-tagged Ub expression vector) – вектор для экспрессии аутентичных рекомбинантных белков, Amp ^R	[13]
pLacIRARE	Вектор для восполнения редких tPHK у <i>E. coli</i> , Cm ^R	“Novagen”
pT-GroE	Вектор, экспрессирующий GroESL шаперон <i>E. coli</i> под контролем промотора бактериофага T7, Cm ^R Шапероны снижают количество “телец включения”, так как могут участвовать в правильном фолдинге рекомбинантного белка	[14]
pUC128-resD	Производная pUC128, содержащая клонированную по сайту EcoRV ОРС гена resD, Amp ^R	Данная работа
pUC128-resE	Производная pUC128, содержащая клонированную по сайту EcoRV ОРС гена resE, Amp ^R	То же
pET19mod-resD	pET-19mod, содержащая ОРС гена resD, Amp ^R	»
pET19mod-resE	pET-19mod, содержащая ОРС гена resE, Amp ^R	»
pQE30-resD	pQE30, содержащая ОРС гена resD, Amp ^R	»
pQE30-resE	pQE30, содержащая ОРС гена resE, Amp ^R	»
pHUE-Ub-resD	pHUE, содержащая ОРС гена resD, Amp ^R	»
pHUE-Ub-resE	pHUE, содержащая ОРС гена resE, Amp ^R	»
pET-TEV	Вектор на основе вектора pET для экспрессии TEV- протеазы, Amp ^R	[15]
pHUsp2cc	Вектор на основе вектора pHUE для экспрессии деубиквитиназы Usp2-cc, Amp ^R	[13]

Общие методы. Выделение хромосомной ДНК, клонирование ДНК и трансформацию компетентных клеток проводили согласно стандартным методикам [16]. Для быстрого выделения плазмидной ДНК и препаративного выделения фрагментов ДНК из геля использовали наборы реактивов фирмы “Promega” (США) Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System и Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System соответственно.

Получение векторов для сверхэкспрессии рекомбинантных белков ResD и ResE (1-195). Открытые рамки считывания (ОРС) генов *resD* и *resE* (1-195) амплифицировали с геномной ДНК типового штамма *B. cereus* ATCC 14579^T с помощью сочетаний праймеров *resD*for (5'-GGCTC-GAGAATGAATCAAGAATTTTAAT-3', XhoI) и *resD*rev (5'-GGGGATCCCTCAGTCGTTTCAACAAC-CTCAA-3', BamHI), *resE*for (1-195) (5'-GGCTC-GAGTCTACTCGGATTACAGCAAA-3', XhoI) *resE*rev (5'-GGGGATCCCTAAATTATACGATTTCG-GTA-3', BamHI). Ген *resE* клонировали без 585 п.н. последовательности, кодирующей N-концевой гидрофобный трансмембранный домен белка длиной 195 аминокислот [17]. Очищенные ПЦР-фрагменты клонировали в EcoRV сайт pUC128. BamHI-XhoI-фрагменты из векторов pUC128-*resD* и pUC128-*resE*, содержащие последовательности генов *resD* и *resE* (1-195) (717 п.н. и 1188 п.н. соответственно), клонировали в плазмиды pET19mod и pQE30, раскрытых по сайтам BamHI-XhoI, в результате чего получили векторы pET19mod-*resD*, pET19mod-*resE*, pQE30-*resD* и pQE30-*resE*. Для клонирования последовательностей генов *resD* и *resE* в pHUE, ОРС этих генов амплифицировали с использованием сочетаний праймеров *resD*-UbF (5'-ATCTCCGCGGTGG-TATGGAAAATGAATCAAGAAT-3', SacII) — *resD*-UbR (5'-TCAAGAAT-3', SacII) — *resE*-UbR (5'-CCAAAGCTTCAGTCGTTTCAACAACCT-CAAATTTG-3', HindIII). ПЦР-фрагменты, содержащие гены *resD* и *resE* (1-195), клонировали в pHUE, раскрытом по сайтам SacII и HindIII, в результате чего были получены плазмиды pHUE-Ub-*resD* и pHUE-Ub-*resE*. Последовательности векторов pET19mod-*resD*, pQE30-*resD*, pHUE-Ub-*resD*, pET19mod-*resE*, pQE30-*resE*, pHUE-Ub-*resE* были подтверждены секвенированием. Для получения штаммов-продуцентов полученными плазмидами трансформировали соответствующие штаммы для сверхэкспрессии белков ResD и ResE в сочетании со вспомогательными плазмидами (pT-GroE, pLacIRARE).

Экспрессия рекомбинантных белков His₆-ResD и His₆-ResE (1-195). Ночную культуру *E. coli*, трансформированного плазмидой для сверхэкспрессии, разводили в 100 раз в среде LB, содержащей селективные антибиотики. Клетки выращивали в 4.0 л среды при 37°C до ОП₅₉₀ 0.4–0.6 при интенсив-

ной аэрации. Экспрессию His₆-ResD и His₆-ResE (1-195) индуцировали, добавляя изопропилтиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 200–500 мкМ и дальнейшее культивирование продолжали при 18°C в течение 18 ч. После инкубации клетки отделяли центрифугированием на центрифуге Beckman J2-21 (США) 30 мин при 10000 g и хранили при –70°C.

Экспрессия рекомбинантных белков His₆-Ub-ResD и His₆-Ub-ResE (1-195). Для экспрессии рекомбинантных белков His₆-Ub-ResD и His₆-Ub-ResE (1-195) клетки выращивали в 2.0 л среды LB, содержащей ампицилин (100 мкг/мл) при 37°C до достижения культурой ОП₅₉₀ = 0.6–0.7. Затем синтез белков индуцировали добавлением 500 мкМ ИПТГ и культивировали в течение 4 ч. Клетки осаждали 20 мин при 10000 g на центрифуге Beckman J2-21 (Германия) и хранили при –70°C.

Очистка рекомбинантных белков. Белки His₆-ResD, His₆-ResE (1-195), His₆-Ub-ResD и His₆-Ub-ResE (1-195) очищали методом металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (“BioRad”, США) из штаммов-суперпродуцентов *E. coli* (таблица), согласно рекомендациям фирмы “Qiagen” (США) с небольшими изменениями. Рекомбинантная гистидинкиназа ResE в обоих случаях не несет 195 аминокислотных остатков на N-конце.

Белки His₆-ResD и His₆-ResE(1-195) очищали несколькими способами с применением буферов А, В, С или D. Буфер А содержал 50 мМ трис-НСl, pH 7.5, 0.5 М NaCl, 10 мМ имидазол. Буфер В содержал 50 мМ трис-НСl, pH 7.5, 0.5 М NaCl, 10 мМ имидазол, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0.3% тритон X-100. Буфер С содержал 50 мМ NaH₂PO₄, pH 7.5, 600 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 10 мМ имидазол. Буфер D имел тот же состав, что и буфер А, но с добавлением ДНКазы I (200 мкг/мл) и 1 мМ ингибитора протеаз фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ). При выделении белков His₆-Ub-ResD и His₆-Ub-ResE(1-195) использовали только буфер А. His₆-ResD и His₆-Ub-ResD диализовали против буфера Е (25 мМ трис-НСl, pH 7.5, 150 мМ NaCl, 50%-ный глицерин). Растворы очищенных белков His₆-ResE и His₆-Ub-ResE диализовали против буфера F, содержавшего 25 мМ трис-НСl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 50%-ный глицерин.

На первом этапе очистки 5 г сырой массы клеток *E. coli* ресуспендировали в 20 мл соответствующего буфера с добавлением лизоцима (10 мг/мл) и инкубировали во льду 30 мин. Клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе “MSE” (Англия) в следующем режиме: 6 циклов по 15 с с интервалами между циклами 1 мин при мощности 150 W и частоте ультразвука 10 кГц. Гомогенат центрифугировали в течение 1 ч при 10000 g и 4°C. Супернатант наносили на колонку с 1 мл Ni²⁺-нитрилтриаце-

татной агарозы (Ni-NTA, “Sigma”, США), предварительно уравновешенную соответствующим буфером А. После промывания колонки 10 об. исходного буфера А связавшиеся белки элюировали ступенчатым градиентом концентрации имидазола (20, 50, 100, 150 и 250 мМ). Белковые фракции анализировали при помощи электрофореза в 12- или 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях по методу Лэмли [18]. Для удаления полигистидиновой аффинной метки рекомбинантные белки инкубировали с TEV-протеазой (в молярном соотношении 1 : 10) в течение 12 ч в буфере для диализа (буферы Е и F). Очистку TEV-протеазы проводили как описано в работе [15]. Фракции, содержащие искомые белки, объединяли и диализовали против буфера Е- для ResD, и буфера F- для ResE(1-195), и хранили при -20°C .

Очистка рекомбинантных белков His₆-Ub-ResD и His₆-Ub-ResE (1-195). His₆-Ub-ResD и His₆-Ub-ResE (1-195) выделяли из суперпродуцентов *E. coli* согласно рекомендациям фирмы “Qiagen” с небольшими изменениями, используя буфер А. Для удаления полигистидиновой метки и убиквитина растворы белков инкубировали с деубиквитиназой Usp2-сс в молярном соотношении 1 : 10 в течение ночи в буфере Е для диализа. Выделение и очистку Usp2-сс проводили согласно рекомендациям [13].

Концентрацию белков определяли спектрофотометрическим методом, исходя из коэффициента экстинкции, рассчитанного при помощи программы Peptide Property Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>), используя реактив Брэдфорд.

Фосфорилирование ResD гистидинкиназой ResE. Реакцию фосфорилирования ResD проводили в присутствии АТФ. ResD (9.6 мкМ) и/или ResE (1-195) (5.9 мкМ) инкубировали с 1 мкКю $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-АТФ}$ при комнатной температуре в течение 15 мин в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl, рН 7.5, 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 10%-ный глицерин, 4 мМ дитиотреитол (ДТТ) и 4 мМ MgCl₂. Реакцию останавливали, добавляя к образцу денатурирующий буфер для электрофореза. Образцы анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях по методу Лэмли [18]. Гель экспонировали с рентгеновской пленкой “Retina” (Германия) в течение ночи.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Работы, посвященные изучению рекомбинантных белков ResD и ResE *B. subtilis*, показали, что очистка этих белков сопряжена со значительными трудностями, которые заключались как в низком выходе продуктов, так и в их низкой растворимости, поэтому авторы применяли очистку белков в денатурирующих условиях, а также слияние с

другими белками и аффинную хроматографию [19]. При очистке белков ResD и ResE другого вида бацилл — *B. cereus*, могли возникнуть те же трудности. Анализ последовательностей генов *resD* и *resE* *B. cereus* с помощью программы JCAT (Codon Adaptation Tool) (www.jcat.de) выявил низкое совпадение по частоте используемых кодонов по сравнению с *E. coli*: индекс CAI (Codon Adaptation Index), составил 0.63 и 0.37 для *resD* и *resE* соответственно. Полученные значения указывают на то, что использование системы трансляции *E. coli* может снижать общий выход и нарушать правильный фолдинг этих белков. В данной работе нами были предложены оптимальные условия для экспрессии и очистки белков двухкомпонентной системы ResD-ResE *B. cereus* в одну стадию.

Получение и очистка белков ResD и ResE. Для выбора оптимальной системы экспрессии генов *resD* и *resE* *B. cereus* были созданы плазмидные векторы, содержащие открытые рамки считывания генов *resD* и *resE*: pET19mod-*resD*, pQE30-*resD*, pHUE-*resD*, pET19mod-*resE*, pQE30-*resE*, pHUE-*resE*. Системы экспрессии pET19mod и pQE30, экспрессирующие рекомбинантные белки под контролем промоторов бактериофагов T7 и T5 соответственно, хорошо себя зарекомендовали и широко применяются для очистки белков из *E. coli*. В системах экспрессии на основе векторов серии pQE выход целевого белка обычно ниже, чем в системах на основе pET, поскольку мРНК синтезируется РНК-полимеразой *E. coli*, а не как в системах pET — за счет РНК-полимеразы бактериофага T7, которая в приблизительно в 3 раза эффективнее РНК-полимеразы *E. coli*. Однако соответствие уровня транскрипции уровню трансляции иногда необходимо для правильного фолдинга белка и в таких случаях системы на основе pQE более выигрышны. pHUE — относительно новая система, которая позволяет получить в результате экспрессии гена гибридный белок, слитый с убиквитином, что часто позволяет повышать растворимость труднорастворимых белков [13, 20, 21].

При экспрессии белков ResD и ResE с помощью классических систем экспрессии (pET19mod и pQE30) нами был проведен скрининг штаммов-продуцентов, для которых были оптимизированы концентрации индуктора ИПТГ и температура культивирования. Кроме того, в качестве хозяина дополнительно тестировали штаммы *E. coli*, несущие системы коэкспрессии шаперона GroE pT-GroE, для солюбилизации белков и системы pLacIRARE для восполнения редких тРНК (рис. 1). В результате проведенных экспериментов выяснилось, что наибольший выход белка ResD получен у штамма HMS174(DE3)/pLacIRARE (рис. 1, дорожки 4 и 5), а белка ResE — у штамма HMS174(DE3) (рис. 1, дорожки 13 и 14). В этих оптимальных условиях максимальный выход белков составил 0.1 мг на 1.0 г (сырой массы) клеток. При

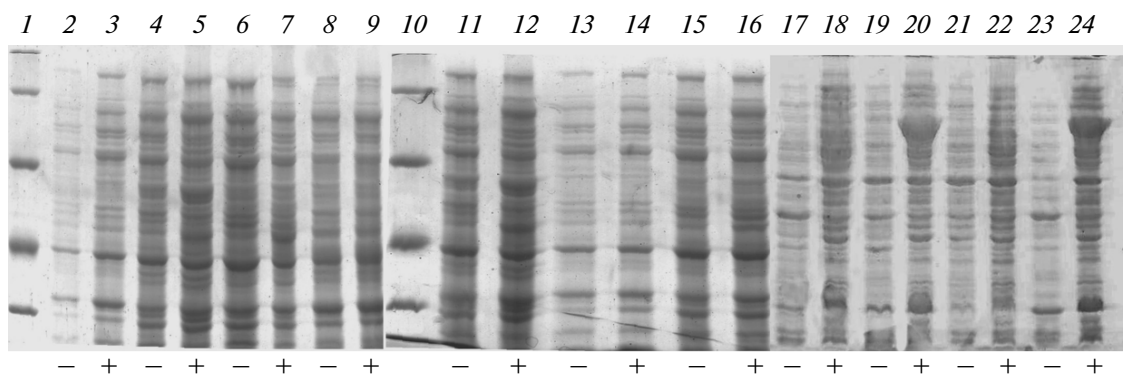


Рис. 1. Электрофоретическое разделение общих белков клеток различных экспрессионных штаммов *E. coli* в 15%-ном ПААГ. “–” – до внесения индуктора, “+” – после добавления 0.5 мМ ИПТГ с последующей инкубацией в течение 18 ч при 18°C в среде LB. 1, 10 – маркер молекулярной массы “Fermentas” (14.4–116 кДа); 2, 3 – BL21(DE3)/pLacIRARE/pET19mod-*resD*; 4, 5 – HMS174(DE3)/pLacIRARE/pET19mod-*resD*; 6, 7 – M15/pREP4/pQE30-*resD*; 8, 9 – C41(DE3)/pLacIRARE/pET19mod-*resD*; 11, 12 – HMS174(DE3)/pTGroE/pET19mod-*resD*; 13, 14 – HMS174(DE3)/pLacIRARE/pET19mod-*resE*; 15, 16 – BL21(DE3)/pLacIRARE/pET19mod-*resE*; 17, 18 – M15/pREP4/pQE30-*resE*; 19, 20 – C41 (DE3)/pLacIRARE/pET19mod-*resE*; 21, 22 – BL21(DE3)/pTGroE/pET19mod-*resE*; 23, 24 – HMS174(DE3) /pTGroE/pET19mod-*resE*.

этом более 90% белка находилось в “тельцах включения”. Снижение температуры выращивания до 16–18°C и концентрации ИПТГ до 0.05 мМ не привели к увеличению растворимости исследуемых белков, так же, как и введение в клетки дополнительной плазмиды pT-GroE (рис. 1).

Оптимизация состава буферов для выделения рекомбинантных белков посредством металл-хелатной хроматографии не привела к повышению растворимости белков. Кроме того, полагая, что ResD может связываться с ДНК и поэтому его выход может снижаться, очистка этого белка была проведена в буфере D, содержащем ДНКазу. Тем не менее, выход целевого продукта увеличивался

только в 2 раза и составлял 0.2–0.4 мг на 1.0 г (сырой массы) клеток.

Напротив, при экспрессии генов *resD* и *resE* в убиквитиновой системе pHUE все исследованные штаммы имели высокие выходы растворимых белков, по сравнению классическими экспрессионными системами вне зависимости от штамма–продуцента. Поскольку между штаммами–продуцентами не было существенных различий, в дальнейшей работе использовали штамм HMS174(DE3). Индукция экспрессии клонированных генов 0.5–1.0 мМ ИПТГ в штаммах с

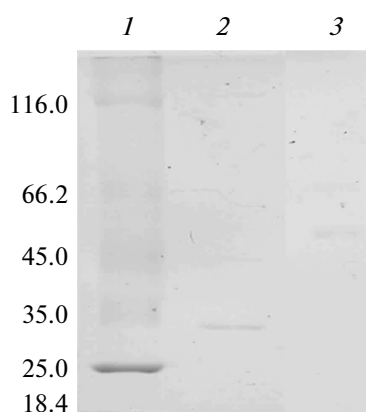


Рис. 2. Электрофореграммы препаратов очищенных рекомбинантных белков His₆-ResD в буфере D из штамма HMS174(DE3)/pLacIRARE/pET19mod-*resD* в 12%-ном ПААГ. 1 – маркер молекулярной массы “Fermentas” (14.4–116 кДа); 2 – препарат ResD; 3 – препарат ResE (1–195).

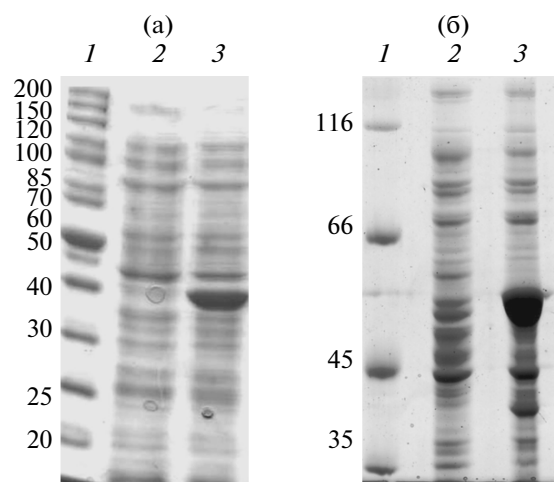


Рис. 3. Электрофоретическое разделение в 12%-ном ПААГ общих белков клеток экспрессионных штаммов *E. coli* HMS174(DE3)/pHUE-Ub-*resD* (а) и HMS174(DE3)/pHUE-Ub-*resE* (б). 1 – маркер молекулярной массы, “–” 2 – до внесения индуктора, “+” 3 – после добавления 1.0 мМ ИПТГ с последующей инкубацией в течение 4 ч при 37°C в среде LB.

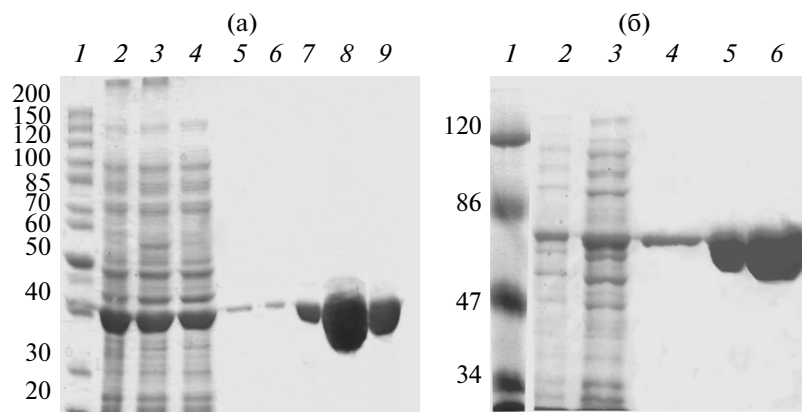


Рис. 4. Электрофоретическое разделение в 12%-ном денатурирующем ПААГ белковых фракций, содержащих рекомбинантные белки His₆-Ub-ResD (а) и His₆-Ub-ResE (б), в ходе очистки на Ni²⁺-NTA-агарозе. а – выделение His₆-Ub-ResD в буфере А: 1 – маркер молекулярной массы; 2 – индукция; 3 – растворимая фракция; 4 – супернатант, фракций содержащих 30 мМ имидазол, 5 – 40 мМ имидазол; 6 – 50 мМ имидазол; 7 – 100 мМ имидазол (38.1 кДа); 8, 9 – 200 мМ имидазол. б – выделение белка His₆-Ub-ResE в буфере А (56.6 кДа): 1 – маркер молекулярной массы; 2 – индукция; 3 – растворимая фракция; 4 – фракции, содержащие 50 мМ имидазол; 5 – 100 мМ имидазол; 6 – 200 мМ имидазол.

плазмидами pHUE-*resD* или pHUE-*resE* обеспечила успешную продукцию рекомбинантных белков при 37°C, причем до 80–95% целевых белков находились в растворимой фракции.

При последующей очистке белков ResD и ResE аффинной хроматографией были получены электрофоретически гомогенные препараты исследуемых белков с молекулярными массами 27 и 46 кДа соответственно, что полностью совпадало с расчетами (рис. 3, 4). Выход целевых белков составил около 200 мг белка на 1.0 г (сырой массы) клеток, что в 1000 раз выше, чем в случае использования классических систем.

Увеличение количества экспрессируемых ResD и ResE в системе pHUE можно объяснить следующими причинами. Во-первых, добавление убиквитина на N-конце белка может повышать эффективность трансляции и стабилизировать структуру белка, который перестает быть мишенью для внутриклеточных протеаз, так как сам убиквитин устойчив к их действию [21]. Во-вто-

рых, убиквитин способен выполнять функцию шаперона и обеспечивать правильную посттрансляционную сборку белка. В-третьих, убиквитин хорошо растворим в воде и не содержит цистеиновых остатков, что способствует повышению растворимости рекомбинантного полипептида посредством изменения поверхностного заряда белковой глобулы [22–24].

Фосфорилирование ResE и ResD. Еще одним возможным достоинством убиквитиновой системы является получение белков без аффинных меток при помощи обработки деубиквитирующим ферментом. При этом исключается влияние дополнительных аминокислотных остатков на активность белков. Для подтверждения того, что выделенные белки обладали функциональной активностью, была проведена реакция автофосфорилирования ResE в присутствии [γ -³²P]-АТФ, а также реакция фосфорилирования ResD в присутствии гистидинкиназы ResE. Очищенный препарат белка ResE проявлял ожидаемую автофосфорилирующую активность, а также фосфорилировал ResD (рис. 5). Полученные результаты согласуются с ранее полученными данными по фосфорилированию белков системы ResD-ResE у *B. subtilis* [26].

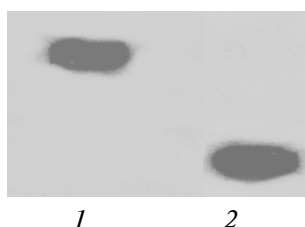


Рис. 5. Фосфорилирование ResD гистидинкиназой ResE (1-195). 1 – автофосфорилирование гистидинкиназы ResE в присутствии радиоактивно меченого [γ -³²P]-АТФ, 2 – перенос фосфорильной группы с гистидинкиназы на регулятор ResD.

Предлагаемый подход к экспрессии рекомбинантных генов *resD* и *resE* впервые позволил значительно ее увеличить, что привело также к увеличению выхода целевых продуктов по сравнению с “классическими методами” до 150 мг белка на 1 г (сырой биомассы). Кроме того, это дало возможность очистить белки двухкомпонентной системы в одну стадию, не прибегая к ренатурации полипептидов из “телец включения”. Установлено, что очищенные таким способом белки

ResD и ResE обладали биологической активностью. Полученные результаты могут найти применение при изучении не только белков системы ResDE, но и других труднорастворимых белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen R.T. M.L., Tsen H.Y. // J. Appl. Microbiol. 2002. V. 92. P. 912–919.
2. Duport C., Zigha A., Rosenfeld E., Schmitt P. // J. Bacteriol. 2006. V. 188. № 18. P. 6640–6651.
3. Sun G., Sharcova E., Chesnat R. et al. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. P. 1374–1385.
4. Nakano M.M., Dailly Y.P., Zuber P., Clark D.P. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 6749–6755.
5. Hartig E., Geng H., Hartmann A., Hubacek A., Munch R., Ye R.W., Jahn D., Nakano M.M. // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 6477–6484.
6. Nakano M.M., Zuber P., Glaser P., Danchin A., Hulett F.M. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. P. 3796–3802.
- 6a. Esbelin J., Armengaud J., Zigha A., Duport C. // J. Bacteriol. 2009. V. 191. № 13. P. 4419–4426.
7. Duport C., Zigha A., Rosenfeld E., Schmitt P. // J. Bacteriol. 2006. V. 188. № 18. P. 6640–6651.
8. The Community Summary Report: Food – Born Outbreaks in the European Union in 2007 // The EFSA Journal. 2009. V. 271. P. 1–129.
9. Miroux B., Walker J.E. // J. Mol. Biol. 1996. V. 260. P. 289–298.
10. Yanish-Perron C., Vieira J., Messing J. // Gene. 1985. V. 33. P. 103–119.
11. Keen N.T., Tamaki S., Kobayashi D., Trollinger D. // Gene. 1988. V. 70. № 1. P. 191–197.
12. Alexandrov K., Simon I., Yurchenko V., Iakovenko A., Rostkova E., Scheidig A.J., Goody R.S. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 265. P. 160–170.
13. Butt T.R., Jonnalagadda S., Monia B.P., Sternberg E.J., Marsh J.A., Stadel J.M., Ecker, Crooke S.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. 86. № 8. P. 2540–2544.
14. Yasukawa T., Kanei-Ishii C., Maekawa T., Fujimoto J., Yamamoto T., Ishii S. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. № 43. P. 25328–25331.
15. Catanzariti A., Soboleva T.A., Jans D.A., Board P.G., Baker R.T. // Protein Science. 2004. V. 13. P. 1331–1339.
16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Ed. 2. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1626 p.
17. Nakano M.M., Zhu Y., LaCelle M., Zhang X., Hulett F.M. // Mol. Microbiol. 2000. V. 37. № 5. P. 1198–1207.
18. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
19. Zhang X., Hulett M. // Mol. Microbiol. 2000. V. 37. № 5. P. 1208–1219.
20. McNulty D.E., Claffee B.A., Huddleston M.J., Kane J.F. // Protein Expr. Purif. 2003. V. 27. P. 365–374.
21. Baker R.T. // Curr. Opin. Biotechnol. 1996. V. 7. P. 541–546.
22. Sharp P.M., Wen-Hsiang L. // J. Mol. Evol. 1987. V. 25. P. 58–64.
23. Bachamir A., Finley D., Varshavsky A. // Science. 1986. V. 234. P. 179–186.
24. Pelham H. // Nature. 1988. V. 322. P. 776–777.
25. Bond U., Schlesinger M.J. // Mol. Cell. Biol. 1985. V. 5. P. 949–956.

Purification of Recombinant *Bacillus cereus* ResD-ResE Proteins Expressed in *Escherichia coli* Strains

E. V. Shapyrina^a, A. M. Shadrin^b, and A. S. Solonin^a

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

^b Imperial College, London, United Kingdom

e-mail: evshapyrina@gmail.com

Received May 14, 2013

Abstract—Recombinant *E. coli* strains expressing the *Bacillus cereus* ATCC 14579^T *resD* and *resE* genes fused with the ubiquitin gene were constructed, and purification of the ResD and ResE proteins was performed. The approach used in the study allowed us to increase the protein yield of the electrophoretic homogeneous ResD and ResE proteins without denaturation steps up to 150 mg per gram of wet cell weight.

УДК 579.66/577.115

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ЧЕТВЕРТИЧНОЙ СТРУКТУРЫ G17ACA-АЦИЛАЗЫ БАКТЕРИИ *Brevundimonas diminuta*, ПОЛУЧЕНИЕ БОЛЕЕ СТАБИЛЬНЫХ АНАЛОГОВ ФЕРМЕНТА

© 2013 г. С. А. Закирова*, Т. В. Михайлова**, М. А. Эльдаров*,***

*Биологический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, 119899

**Факультет биоинженерии и биоинформатики,
Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, 119899

***Центр “Биоинженерия” РАН, 117312

e-mail: eldarov1@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.01.2013 г.

Исследованы физико-химические и энзиматические характеристики гибридных аналогов G17ACA-ацилазы бактерии *Brevundimonas diminuta* (**BrdG1A**), содержащих N-концевой хитинсвязывающий домен бактериальной хитиназы (**BrdG1A/NmChBD**), либо C-концевую олигогистидиновую последовательность (**BrdG1A/H**). Повышенная термостабильность **BrdG1A/NmChBD** может указывать на стабилизирующее влияние хитинсвязывающего домена. Исследование профилей зависимости энзиматической активности рекомбинантных аналогов **BrdG1A** от pH не выявило значительных различий: каталитическая активность обоих вариантов мало менялась в интервале pH 6.0–9.0 и резко снижалась при более низких значениях pH. Оба аналога обладали и сходным характером чувствительности к действию денатурирующих агентов, подвергаясь полной инактивации в присутствии 2.0 М гуанидин-хлорида. Разработана система получения изолированных рекомбинантных α - и β -субъединиц **BrdG1A**. В опытах *in vitro* по реконструкции фермента показано, что присутствие α -субъединицы необходимо для формирования правильной пространственной структуры β -субъединицы и образования функционально-активного фермента.

DOI: 10.7868/S0555109913060184

Ацилазы глутарил-7-аминоцефалоспоровой кислоты (**G17ACA-ацилазы**, КФ 3.5.1.93) – промышленные ферменты, наряду с пенициллин ацилазами, способные превращать цефалоспорины в ценные промежуточные соединения, используемые для производства новых антибиотиков. G17ACA-ацилаза катализирует ферментативное превращение глутарил-7-аминоцефалоспоровой кислоты (**G17ACA**) в 7-аминоцефалоспоровую кислоту (**7-ACA**), при котором происходит расщепление амидной связи с образованием глутарата и 7-ACA [1].

7-ACA может быть получена либо путем химического деацетилирования цефалоспорина С (**CPC**), требующего использования токсичных соединений и специальных условий инкубации при сверхнизких температурах, или за счет энзиматического превращения. Два типа цефалоспорин-ацилаз, а именно G17ACA-ацилаза и цефалоспорин С-ацилаза способны гидролизовать G17ACA и CPC соответственно. Однако эффективность одностадийных процессов получения 7-ACA из CPC с применением цефалоспорин С ацилазы составляет не более 5%. Гораздо более эффективны двустадийные процессы, при участии оксидазы D-аминокислот (**DAO**, КФ 1.4.3.3), степень конверсии CPC в 7-ACA составляет 80–90% [2–5].

Активные ферменты G17ACA-ацилазы являются гетеротетрамерами, состоящими из 2 α - и 2 β -субъединиц, которые формируются из одноцепочечного полипептидного предшественника в результате специфического процессинга белка-предшественника и характеризуются высокой активностью по отношению к G17ACA, при низкой активности по отношению к цефалоспору С [6].

Гены G17ACA-ацилаз выделены из различных штаммов *Pseudomonas*, разработаны системы экспрессии этих ферментов в клетках *E. coli* и *Bacillus subtilis*, методы получения очищенных препаратов G17ACA-ацилаз и их различных аналогов для структурно-функциональных исследований и создания биокатализаторов [7–12]. В то же время существующие методы получения рекомбинантных G17ACA-ацилаз нельзя признать достаточно эффективными, что связано со сложной структурой предшественника и недостаточной изученностью закономерности процессинга и сборки функционально-активного тетрамера фермента [13, 14].

Нестабильность тетрамера белка при действии мягких денатурирующих агентов, при умеренных температурах, частичная инактивация фермента под действием “сшивающих” агентов, осложня-

технологии “автоиндукции” на среде Overnight Express TB при 30°C как описано [19].

Экспрессия и очистка рекомбинантных GlA10H и ChBD α . Фракцию белка, полученную после двухэтапного осаждения сульфатом аммония (35% и 60% насыщения), наносили на колонку с хитиновыми гранулами (1 × 2 см), уравновешенную в буфере Б (50 мМ фосфат натрия, pH 7.5, 1.0 мМ ЭДТА, 0.3%-ный цетилтриметил аммоний бромид, 2%-ный глицерин, 2.0 М NaCl). Колонку промывали 10 объемами буфера Б и элюировали 5 объемами буфера А. Полученную фракцию концентрировали ультрафильтрацией с помощью центрифужных концентраторов Амикон Ultra-15, 15 мл, NMWL 50000 производства фирмы “Millipore” (США). Очистку ChBD α проводили в аналогичных условиях, минуя стадию фракционирования сульфатом аммония. Для концентрирования очищенного белка использовали центрифужные концентраторы Амикон Ultra-15, NMWL 10000 (“Millipore”, США).

Выделение β -субъединицы Gl7ACA-ацилазы. 100 мкг очищенного препарата рекомбинантной GlA10H с концентрацией 2 мкг/мкл разводили в 10 раз в буфере, содержащем 8.0 М мочевины, 100 мМ имидазол, pH 7.5, выдерживали 12 ч при комнатной температуре и наносили на центрифужную миниколонку с Ni²⁺-NTA сорбентом (“Vivascience”, Hannover, Германия), уравновешенную в том же буфере. Колонку промывали три раза буфером для нанесения и элюировали в буфере, содержащем 6.0 М мочевины, 500 мМ имидазол, pH 7.5.

Дифференциальная сканирующая калориметрия. Анализ методом дифференциальной сканирующей калориметрии проводили на дифференциальном адиабатическом сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 (СКБ НП, Пушкино, Россия) с капиллярными платиновыми ячейками объемом 0.47 мл. Измерения проводили при скорости нагрева 1.0 градус в минуту в диапазоне температур от 20 до 100°C. Для предотвращения дегазирования растворов при повышении температуры во всех экспериментах в ячейках калориметра поддерживалось избыточное давление в 2 атм. Базовую линию записывали, помещая в рабочую и контрольную ячейки используемый в опыте буфер. После охлаждения ячеек до 2.5°C из рабочей ячейки отбирали буфер и помещали в нее препарат белка в том же буфере. Для проверки обратимости тепловой денатурации исследуемых образцов каждый образец подвергали повторному прогреву непосредственно после первого прогрева и последующего охлаждения. Для обработки и анализа кривых теплопоглощения изученных белков использовали пакеты программного обеспечения “Origin 1.16” и “Origin 6.0” фирмы “MicroCal Inc.” (США).

Определение температур плавления и значений теплоемкости процесса проводили для ги-

бридных белков BrdGlA/H и BrdGlA/NmChBD, полученных ранее [7].

Ренатурация GlA10H и β -субъединицы Gl7ACA-ацилазы. 100 мкг очищенного препарата рекомбинантной GlA10H с концентрацией 2 мкг/мкл и удельной активностью 15 МЕ/мг разводили в 10 раз в буфере, содержащем 8.0 М мочевины, 50 мМ фосфат натрия, pH 7.5, и выдерживали 16 ч при комнатной температуре для денатурации фермента и диссоциации его субъединиц. Денатурированный препарат разводили в 15 раз в буфере для ренатурации (0.15 М NaCl, 50 мМ фосфата натрия, pH 7.5), выдерживали 1 сут при комнатной температуре и определяли удельную активность фермента по стандартной методике [20].

Для ренатурации β -субъединицы препарат, полученный путем очистки с помощью металло-хелат-аффинной хроматографии, разводили в 15 раз в буфере для ренатурации и выдерживали 1 сут при комнатной температуре. При совместной ренатурации с α -субъединицей, к разведенному в буфере для ренатурации препарату β -субъединицы, добавляли 5-кратный молярный избыток очищенного препарата α -субъединицы.

Определение зависимости активности Gl7ACA-ацилазы от pH и действия денатурирующих веществ. 20 мкг образцов очищенных препаратов белка инкубировали в ацетатном, фосфатном или пирогосфатном буфере в интервале pH от 4.5 до 9.0 в течение нескольких минут при 37°C и использовали затем в реакции с субстратом — Gl7ACA.

20 мкг образцов очищенных препаратов белка инкубировали в натрий-фосфатном буфере, pH 7.5, содержащем различные концентрации гуанидин-хлорида (от 0.5 до 2.0 М) в течение 1 ч при 25°C и затем использовали в реакции с субстратом — Gl7ACA.

Определение активности Gl7ACA-ацилазы. Для определения глутарил-ацилазной активности использовали колориметрический метод, аналогичный методу, применяемому для определения 6-аминопенициллиновой кислоты [21] с использованием в качестве субстрата глутарил-7-ACA. За 1 ед. активности фермента принимали его количество, необходимое для превращения 1 мкмоль субстрата в течение 1 мин инкубации в оптимальных условиях.

Электрофорез белков. Белковые экстракты рекомбинантных штаммов и фракции белков, полученные на различных стадиях очистки рекомбинантных аналогов BrdGL7ACA, разделяли методом электрофореза в денатурирующем ДДС-ПААГ по методу Лэммли [21]. Окраску гелей осуществляли с помощью красителя PageBlue (“MBI Fermentas”, Литва). Содержание общего белка определяли по методу Брэдфорд [22].

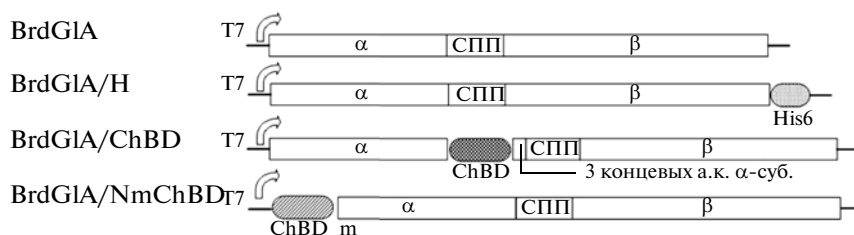


Рис. 1. Схема векторов экспрессии рекомбинантных аналогов BrdGIA. T7-T7 – промотор, СП – сигнальная последовательность, α – кодирующая последовательность α-субъединицы, β – кодирующая последовательность β-субъединицы, СПП – спейсерный пептид.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Термостабильность рекомбинантных аналогов BrdGIA. Исследование термостабильности полученных ранее очищенных рекомбинантных аналогов G17ACA-ацилазы, модифицированных присоединением С-концевой олигогистидиновой последовательности и N-концевым хитинсвязывающим доменом, BrdGIA/H и BrdGIA/NmChBD соответственно (рис. 1) [7, 18], проводили методом дифференциальной сканирующей калориметрии.

Для обоих белков наблюдали появление трех перекрывающихся пиков, соответствующих, вероятнее всего, отдельным калориметрическим доменам. Области до и после пика соответствовали температурной зависимости теплоемкости нативного и денатурированного состояния фермен-

та соответственно. Максимум температуры плавления BrdGIA/H составил 48.9°C (рис. 2а), в то время как для BrdGIA/NmChBD мы наблюдали значительное увеличение термостабильности. Тепловой переход T_m смещался в сторону более высокой температуры на 5.4°C и составил 54.3°C (рис. 2б). Денатурация в обоих случаях была необратимой.

Таким образом, повышение термостабильности рекомбинантного гибридного фермента обусловлено, скорее всего, стабилизирующим влиянием N-концевого хитинсвязывающего домена в молекуле G17ACA-ацилазы.

В результате определения профилей зависимости энзиматической активности полученных ранее рекомбинантных аналогов BrdGIA (рис. 1) [7, 18] от pH было показано, что они не имели значительных отличий для всех вариантов ферментов. В интервалах от pH 6.09.0 активность менялась незначительно, но резко снижалась при более низких значениях pH (рис. 3а), в соответствии с полученными ранее литературными данными для нативной G17ACA-ацилазы [23]. Такая же картина наблюдалась и при определении чувствительности фермента к действию денатурирующих агентов. Было показано, что присутствие 0.5 М гуанидин-хлорида приводило к снижению активности на 40%, а добавление гуанидин-хлорида до концентрации 2.0 М приводило к полной инактивации фермента (рис. 3б).

Таким образом, аналог G17ACA-ацилазы с присоединенным N-концевым ChBD [7] является весьма перспективным для дальнейшего структурно-функционального исследования этого важного фермента.

Обнаруженная нами и другими авторами неустойчивость тетрамера фермента под действием низких значений pH и денатурирующих агентов обосновывает целесообразность получения методами белковой инженерии более устойчивых аналогов G17ACA-ацилазы за счет стабилизации димер-димерных взаимодействий. Для разработки рациональных подходов к дизайну и получению таких аналогов мы изучили особенности процессов сборки функционально-активного фермента

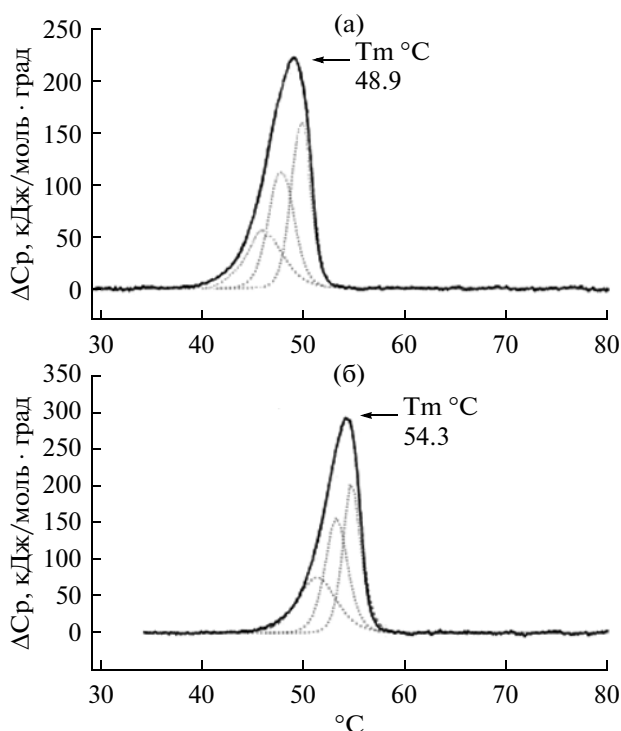


Рис. 2. Тепловая денатурация G17ACA-ацилазы. а – BrdGIA/H; б – BrdGIA/NmChBD.

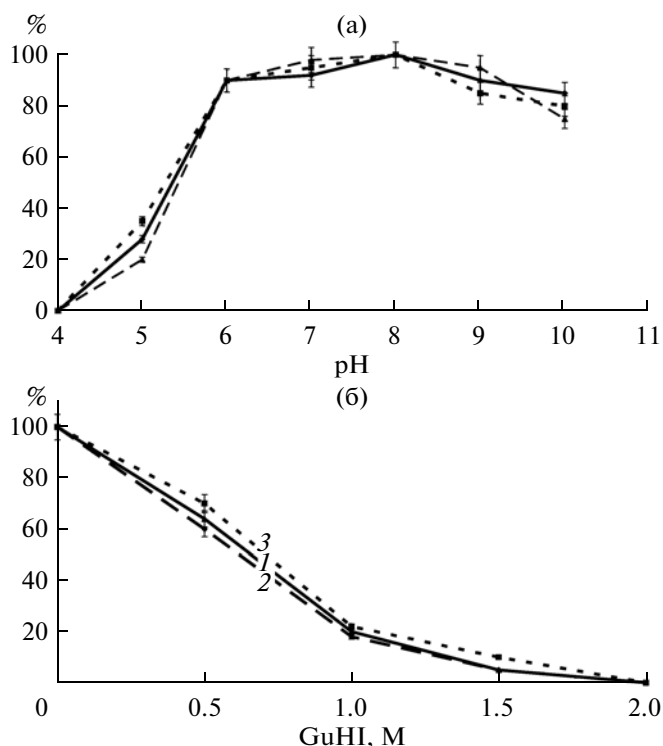


Рис. 3. Исследование чувствительности рекомбинантных аналогов BrdGIA/H (1), BrdGIA/ChBD (2), BrdGIA/NmChBD (3) к pH (а) и действию гуанидинхлорида (б). Ось Y — удельная активность фермента, %.

из его отдельных субъединиц. Для решения этой задачи были разработаны методы получения изолированных рекомбинантных субъединиц BrdGIA и ренатурации фермента.

Экспрессия субъединиц BrdGIA. При дизайне конструкций для экспрессии α - и β -субъединиц BrdGIA учитывали данные предыдущих исследований по экспрессии полноразмерной G17ACA-ацилазы, особенности пространственной структуры нативного фермента и процессинга предшественника G17ACA-ацилазы [13, 24].

Для получения рекомбинантной β -субъединицы была сконструирована плазмида pMTV3, направляющая экспрессию гибридного белка G1A10H, который является аналогом белка BrdGIA/NmChBD, модифицированного присоединением декагистидиновой последовательности к С-концу β -субъединицы. Плазмида pMTV1 — вектор экспрессии

α -субъединицы, модифицированной присоединением мутантного N-концевого связывающего хитинсвязывающего домена (ChBD α) (рис. 4).

Выделение β -субъединицы осуществляли в денатурирующих условиях с помощью металло-хелат-аффинной хроматографии после диссоциации нативного фермента G1A10H в буфере с 8.0 М мочевиной. В результате был получен препарат денатурированной β -субъединицы, свободный от примесей α -субъединицы, который был использован в опытах по ренатурации и реконструкции нативного фермента (рис. 5). Для очистки рекомбинантного белка ChBD α также использовали аффинную хроматографию на хитиновом сорбенте.

Реконструкция BrdGIA в системе *in vitro*. Для исследования возможности реконструкции G17ACA-ацилазы из очищенных препаратов α - и β -субъединиц проводили эксперименты по ренатурации выделенной β -субъединицы. Предварительно подбирали условия ренатурации денатурированного препарата G1A10H. После инкубации в буфере для ренатурации препарата, обработанного 8.0 М мочевиной, активность фермента восстанавливалась на 60% (рис. 6).

После ренатурации препарата β -субъединиц в аналогичных условиях и добавления препарата α -субъединицы активности не наблюдалось. Если перед ренатурацией к препарату β -субъединицы добавляли препарат α -субъединицы, активность восстанавливалась на 10% в пересчете на содержание β -субъединицы в исходном препарате G1A10H (рис. 6).

Полученные данные позволяют сделать вывод, что присутствие α -субъединицы необходимо для формирования правильной пространственной структуры β -субъединицы и образования функционально-активного фермента. Эти данные соответствуют известным наблюдениям, что раздельная экспрессия субъединиц G17ACA-ацилазы приводит к формированию функционально-активного фермента только при совместной экспрессии субъединиц в одной клетке [14].

Таким образом, совокупность полученных данных позволяет заключить, что формирование нативной пространственной конформации тетрамера G17ACA-ацилазы, скорее всего, происходит в про-

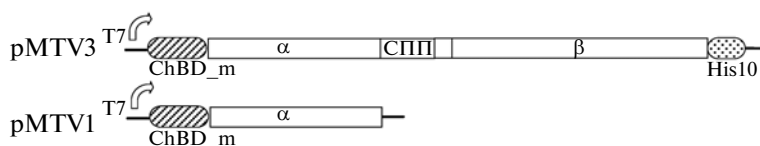


Рис. 4. Схема векторов экспрессии α - и β -субъединиц BrdGIA.

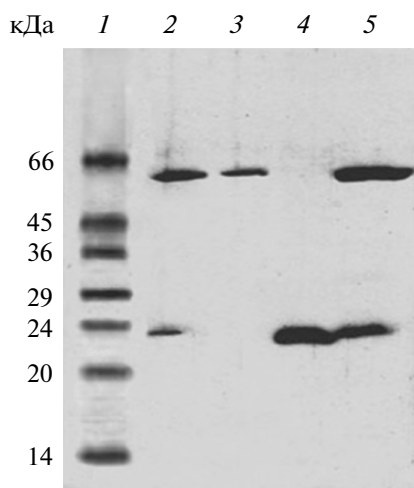


Рис. 5. ДДС-ПААГ-электрофорез очищенных препаратов α - и β -субъединиц G17ACA-ацилазы и гибридного фермента GLA10H.

1 — маркеры молекулярной массы; 2 — очищенный и денатурированный в 8 М мочеvine препарат GLA10H, нанесенный на колонку с Ni-NTA для выделения β -субъединицы; 3 — выделенный препарат β -субъединиц G17ACA-ацилазы; 4 — выделенный на хитиновом сорбенте препарат α -субъединиц G17ACA-ацилазы; 5 — полученный препарат GLA10H.

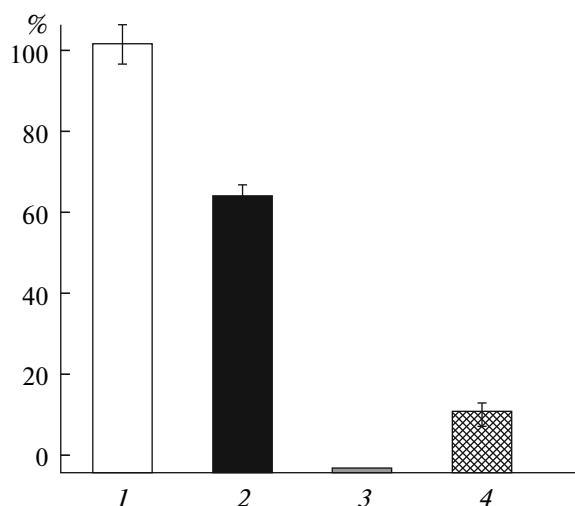


Рис. 6. Зависимость активности ренатурированной рекомбинантной GLA10H и β -субъединицы от условий ренатурации. 1 — GLA10H — нативный фермент, 2 — денатурированный в 8.0 М мочеvine препарат GLA10H, 3 — ренатурированный препарат β -субъединицы после добавления α -субъединицы, 4 — совместная ренатурация субъединиц. Ось Y — удельная активность фермента, %.

цессе синтеза и процессинга фермента и взаимодействия вновь синтезируемых субъединиц.

Авторы выражают благодарность профессору В.И. Муронцу (отдел биохимии животной клетки Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ) за консультации при проведении дифференциальной сканирующей калориметрии, А.А. Шульге за плодотворную дискуссию.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 12-08-01163а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barber M.S., Giesecke U., Reichert A., Minas W. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2004. V. 88. P. 179–215.
2. Kumar K.K., Sudhakaran V., Deshpande B.S., Ambekar S.S., Shewale J.G. // Hindustan Antibiot. Bull. 1993. V. 35. P. 111–125.
3. Aramori I., Fukagawa M., Tsumura M., Iwami M., Ono H., Ishtani Y., Hiroshi K., Kojo H., Kohsaka M., Udea Y., Imenaka H. // J. Ferment. Bioeng. 1992. V. 73. P. 185–192.
4. Aramori I., Fukagawa M., Tsumura M., Ono H., Ishtani Y., Kojo H., Kohsaka M., Udea Y., Imenaka H. // Eur. J. Biochem. 1995. V. 230. P. 773–778.
5. Deshpande B.S., Ambekar S.S., Sudhakaran V.K., Shewale J.G. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1994. V. 10. P. 129–138.
6. Ishii Y., Saito Y., Fujimura T., Isogai T., Kojo H., Yashimata M., Niwa M., Kohsaka M. // J. Ferment. Bioeng. 1994. V. 77. P. 591–597.
7. Khatuntseva S.A., Eldarov M.A., Redo V.A., Skryabin K.G. // J. Biotechnol. 2008. V. 133. P. 123–126.
8. Yong Li, Weihong Jiang, Yunliu Yang, Guoping Zhao, Enduo Wang // Protein Expr. Purif. 1998. V. 12. P. 233–238.
9. Luo H., Yu H., Li Q., Shen Z. // Tsinghua Sci. Technol. 2005. V. 10. P. 529–534.
10. Ledent P., Duez C., Vanhove M., Lejeune A., Fonze E., Charlier P. // FEBS Letters. 1997. V. 413. P. 194–196.
11. Huabao Zheng, Jun Chena, Liuli Sua, Yuhua Zhaob, Yunliu Yang, Hong Yu Zenge, Gang Xue, Sheng Yang, Weihong Jiang // Enzyme Microb. Technol. 2007. V. 41. P. 474–479.
12. Wang E.D., Zheng Y.G., Li Y., Jiang W.H., & Yang Y.L. // Acta Biochim. Biophys. Sin. 2002. V. 34. P. 526–531.
13. Li Y., Jiang W., Yang Y., Zhao G., Wang E. // Protein Expr. Purif. 2002. V. 12. P. 233–238.
14. Lee Y.S., Kim H.W., Park S.S. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 39200–39206.
15. Friehs K., Reardon K.F. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 1993. V. 48. P. 53–77.
16. Vethanayagam J., Flower A. // Microbial Cell Factories. 2005. V. 4. P. 3.
17. Kim Y., Yoon K., Khang Y., Turley S., Hol W.G. // Structure. Fold. Des. 2000. V. 8. P. 1059–1068.
18. Хатунцева С.А., Эльдаров М.А., Лопатин С.А., Зейналов О.А., Скрябин К.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 462–470.
19. Studier F. // Protein Expr. Purif. 2005. V. 41. P. 207–234.

20. Balasingham K., Warburton D., Dunnill P., Lilly M.D. // Biochim. Biophys. Acta. 1972. V. 276. P. 250–256.
21. Laemli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
22. Bradford // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
23. Battistel E., Bianchi D., Bortolo R., Bonoldi L. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1998. V. 69. P. 53–67.
24. Ishiye M., Niwa M. // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1132. P. 233–239.

Peculiarities of the *Brevundimonas diminuta* G17ACA-Acylase Quaternary Structure Formation and Obtaining Stable Enzyme Analogues

S. A. Zakirova^a, T. V. Mikhailova^b, and M. A. Eldarov^{a, c}

^a Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow

^b Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Moscow

^c Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow

e-mail: eldarov1@yandex.ru

Received January 11, 2013

Abstract—The physicochemical and enzymatic properties of hybrid analogues of the *Brevundimonas diminuta* G17ACA-acylase (BrdG1A), containing the N-terminal chitin-binding domain of the bacterial chitinase (BrdG1A/NmChBD) or the C-terminal oligohistidine sequence (BrdG1A/H), were studied. An enhanced thermostability level of BrdG1A/NmChBD could suggest the stabilizing effect of the chitin-binding domain. An analysis of pH profiles of the enzymatic activity of recombinant BrdG1A analogues did not reveal significant differences: the catalytic activity of both variants changed slightly in the interval of pH values from 6.0 to 9.0 but drastically decreased at lower pH values. Both analogues demonstrated similar sensitivity towards denaturing agents: addition of 2.0 M of guanidine chloride resulted in the complete inactivation of both enzymes. A scheme was developed for obtaining isolated recombinant α - and β -subunits of BrdG1A. In vitro enzyme reconstructions indicated that the α -subunit was necessary for the formation of a correct spatial structure of the β -subunit and for the formation of a functionally active enzyme.

УДК 66.061.34+579.66

ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ ЦВЕТНЫХ МЕТАЛЛОВ ИЗ МЕДЕПЛАВИЛЬНОГО ШЛАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АЦИДОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2013 г. М. И. Муравьев, Н. В. Фомченко

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

e-mail: maxmuravyov@gmail.com

Поступила в редакцию 12.03.2013 г.

Исследован процесс выщелачивания меди и цинка из медеплавильного конвертерного шлака серноокислыми растворами сульфата трехвалентного железа, полученными с использованием ассоциации ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов. Выбраны лучшие параметры химического выщелачивания: температура 70°C, начальная концентрация трехвалентного железа в выщелачивающем растворе 10.1 г/л, содержание твердой фазы в суспензии 10%. Проведение процесса при указанных параметрах обеспечивало извлечения меди в раствор 89.4, цинка — 39.3%. Показана возможность биорегенерации трехвалентного железа в растворе, полученного после химического выщелачивания шлака, железозакисляющими ацидофильными хемолитотрофными микроорганизмами без ингибирования их активности.

DOI: 10.7868/S0555109913060135

Шлаки являются отходом пирометаллургической переработки сульфидного сырья цветных металлов. В среднем при производстве 1 т меди образуется 2.2 т шлака, а годовое производство медеплавильных шлаков в мире составляет около 25 млн т [1]. Шлаки могут рассматриваться как техногенное сырье цветных металлов, содержание которых часто превышает содержание их в перерабатываемых рудах. Кроме того, высокая стоимость цветных металлов делает переработку подобного сырья экономически привлекательной.

В настоящее время в промышленном масштабе используются два способа переработки конвертерных медеплавильных шлаков: восстановительно-сульфидирующий способ обеднения в электропечах [2] и флотационное обогащение [3], при этом первый является преобладающим. Получаемые при этом обогащенные металлами продукты подвергаются дальнейшей переработке [4] или возвращаются на плавку, а отходы укладываются в отвалы.

Гидрометаллургические способы извлечения ценных компонентов из шлаков являются перспективным направлением их переработки. К ним относятся: выщелачивание с применением хлората [5], пероксида водорода [6], растворами серной кислоты [7], сульфатом или хлоридом трехвалентного железа [8–10], дихроматом калия [11], водными растворами диоксида серы [12, 13]. Ни один из указанных выше способов не нашел промышленного применения вследствие высокой стоимости и токсичности реагентов, а также технологических свойств получаемых продуктов.

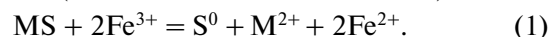
При переработке отходов образуются сточные воды, утилизация которых может являться более серьезной экологической задачей, нежели хранение в отвалах самих шлаков.

Выщелачивание отходов цветной металлургии с применением ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов может являться перспективным способом переработки указанного техногенного сырья.

Известен процесс двухстадийного выщелачивания сульфидных концентратов цветных металлов с использованием ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов [14, 15]. На первой стадии проводится выщелачивание металлов раствором сульфата трехвалентного железа, полученного биоокислением. При этом содержание твердой фазы может быть намного выше, чем в традиционной биогидрометаллургической технологии, а температура процесса — до 80°C, что значительно повышает его скорость. На второй стадии осуществляется главным образом регенерация трехвалентного железа. Процесс регенерации ведется различными сообществами ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов.

Химизм процессов может быть выражен уравнениями:

1 стадия (химическое выщелачивание):



2 стадия (регенерация окислителя — биоокисление):



где М — металл.

Разделение процесса на химическую и биологическую стадии позволяет создать условия, интенсифицирующие протекание как химических процессов окисления минералов, так и биоокисления.

Представленный способ выщелачивания цветных металлов достаточно гибкий и может быть применен практически к любому сырью, содержащему цветные металлы в составе сульфидных минералов, в том числе и конвертерным шлакам медеплавильных заводов.

Ранее было исследовано химическое выщелачивание хвостов флотационного обогащения конвертерных медеплавильных шлаков [16] сульфатом трехвалентного железа, полученного с помощью микроорганизмов.

Установлено, что лучшими технологическими параметрами процесса химического выщелачивания в периодическом режиме были: плотность пульпы 30%, значение pH 1.5, температура 70°C, начальная концентрация ионов трехвалентного железа 15.7 г/л, отсутствие аэрации, продолжительность 1.5 ч. При этом достигалось извлечение меди и цинка в раствор 81.6 и 37.7% соответственно при относительно небольшом извлечении железа — 26.2%. Содержание металлов в выщелоченном осадке составляло 0.13% Cu и 3.69% Zn. Увеличение температуры выше 70°C нецелесообразно вследствие интенсивного растворения силикатов с образованием геля.

Большее содержание меди в самих шлаках по сравнению с отходом флотационного обогащения делает их более привлекательным сырьем для двухстадийной гидрометаллургической переработки. Кроме того, представляет интерес исследование биорегенерации выщелачивающего раствора с применением ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов.

Цель работы — исследование выщелачивания цветных металлов из медеплавильного конвертерного шлака серноокислыми растворами трехвалентного железа, полученными с использованием ассоциации ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, и биорегенерации полученного раствора.

МЕТОДИКА

Характеристика шлака. Основную часть медеплавильного конвертерного шлака составляют магнетит Fe_3O_4 , фаялит Fe_2SiO_4 , а также стекло в сростании с ферритами и силикатами цинка. Медные минералы представлены включениями и сростаниями со стеклом дигенита, борнита, халькопирита, и металлической меди. Вид минералов шлака, полученных в сканирующем электронном микроскопе JSM-5610LV (“JEOL”, Япония), представлен на рис. 1. Содержание в пробе класса — 0.071 мм составляет 95%. Химический состав

шлака следующий (%): железо (42.7), медь (2.74), цинк (2.49), сера (5.0), диоксид кремния (20.2).

Получение выщелачивающего раствора. В качестве инокулята для получения раствора, содержащего трехвалентное железо для химического выщелачивания, использовали ассоциацию микроорганизмов, включающую бактерий *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus thermotolerans*, *Leptospirillum ferrooxidans*. Биоокисление двухвалентного железа проводили в бутылках объемом 5 л, содержащими 4 л жидкости при 40°C и аэрации 4 мин⁻¹. Окисление соли $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ осуществляли в среде 9К [17]. Значения pH поддерживали на уровне 1.5 добавлением 98.5%-ной H_2SO_4 . Конечная концентрация Fe^{3+} составила 33.6 г/л. После разведения дистиллированной водой до необходимой концентрации Fe^{3+} полученный раствор был использован для химического выщелачивания шлака.

Химическое выщелачивание. Выщелачивание проводили в периодическом режиме в реакторах объемом 2 л, содержащими 1 л пульпы. Температуру поддерживали с помощью U-образного теплообменника, соединенного с ультратермостатом. Скорость вращения закрытой турбинной мешалки составляла 760 мин⁻¹. Шлак добавляли в выщелачивающий раствор, предварительно нагретый до необходимой температуры. Значение pH поддерживали на уровне 1.5 добавлением 98.5%-ной серной кислоты.

Биорегенерация. Для исследований процесса окисления ионов двухвалентного железа в рабочем растворе (биорегенерация) были созданы две ассоциации микроорганизмов. Первая ассоциация — мезофильная, культивирующаяся при 30°C, вторая — умеренно термофильная, культивирующаяся при 40°C. Для создания мезофильной ассоциации были использованы музейные штаммы *Acidithiobacillus ferrooxidans* TFBk, TFV-1, TFUch, TFUd-5, TFSib, а также мезофильная накопительная культура, поддерживающаяся на медном концентрате Удоканского месторождения. Для создания умеренно термофильной ассоциации использовались музейные штаммы бактерий *S. thermotolerans* Kr1^T, *S. sibiricus* N1^T, *S. thermosulfidooxidans* BKM B-1269^T, штаммы бактерий рода *Sulfobacillus* Sh1, Sh8, а также умеренно термофильные накопительные культуры, поддерживаемые на медно-цинковом промпродукте Учалинского месторождения и на медном концентрате Удоканского месторождения. Опыты по окислению ионов железа проводились в конических колбах объемом 250 мл с объемом жидкости в них 100 мл на термостатируемых качалках с числом оборотов 150 мин⁻¹.

Аналитические методы. Значения pH определяли с помощью pH-метра pH-150МА (Беларусь). Концентрации Fe^{3+} и Fe^{2+} в жидкой фазе опреде-

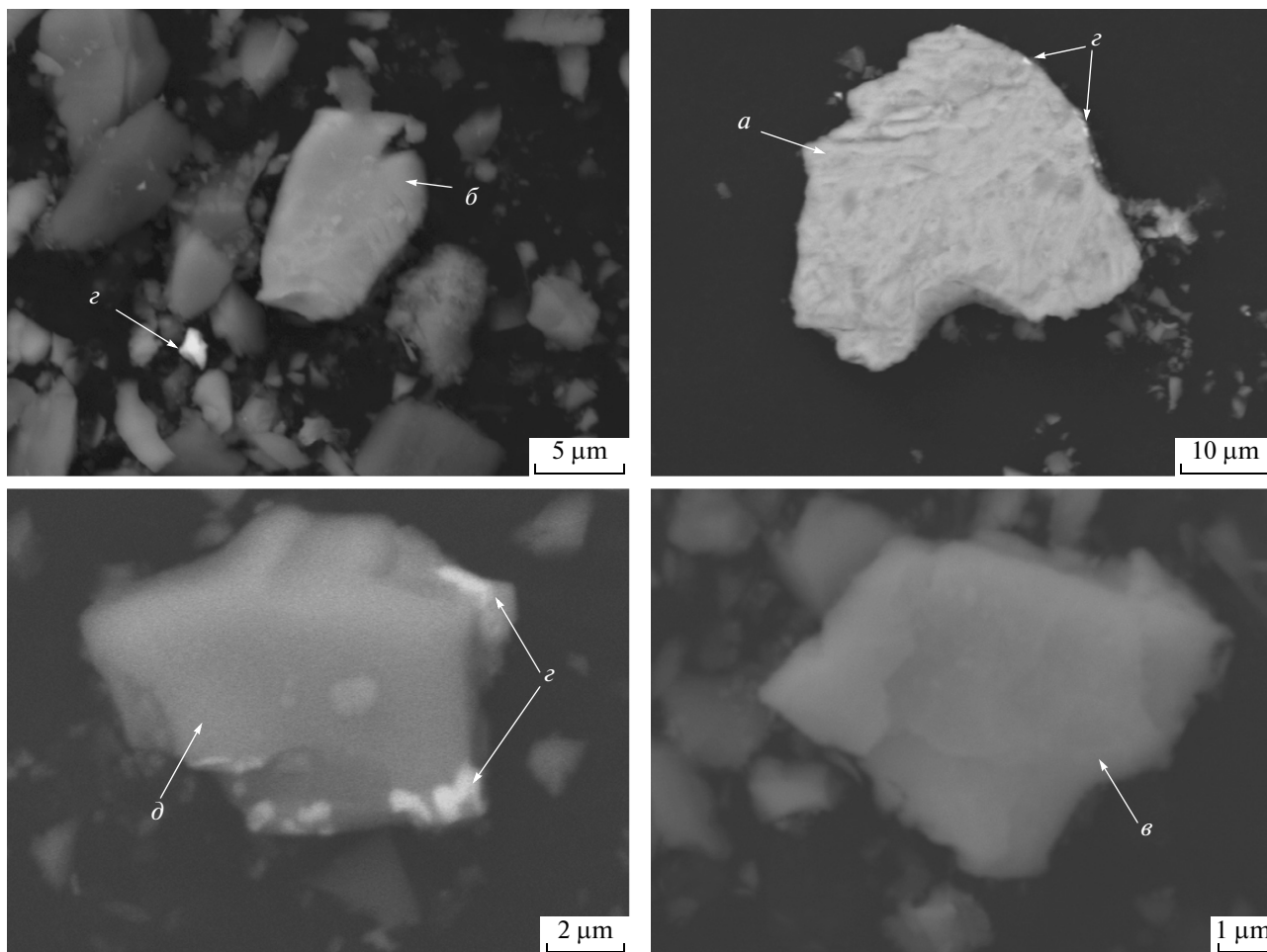


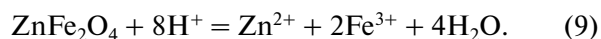
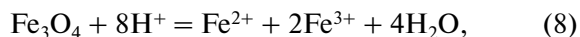
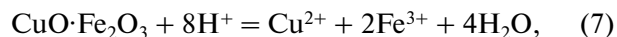
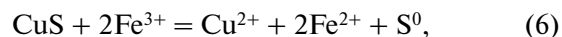
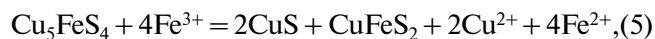
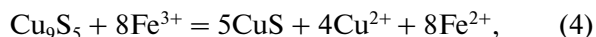
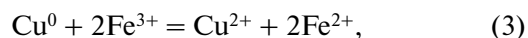
Рис. 1. Вид минералов медеплавильного конвертерного шлака в сканирующем электронном микроскопе: борнит (а), халькопирит (б), дигенит (в), франклинит (д).

ляли колориметрическим методом с роданидом калия [18] с использованием фотометра КФК-3 (Россия) при длине волны 475 нм. Концентрацию ионов меди и цинка определяли на атомно-абсорбционном спектрометре с пламенной атомизацией Perkin Elmer 3100 (США). Содержание металлов в твердой фазе определяли растворением последней в смеси концентрированных соляной и азотной кислот (3 : 1) с добавлением фторида аммония при кипячении с последующим определением концентрации металлов в растворе атомно-абсорбционным методом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

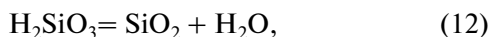
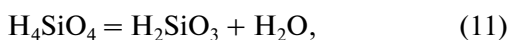
Анализ показывает, что основная часть меди в конвертерных шлаках сосредоточена в сульфидах в сростках со стеклом, окисленных минералах и металлической форме [8], которые окисляются растворами сульфата трехвалентного железа, переходя в раствор.

Химическое выщелачивание цветных металлов из конвертерного шлака основано на протекании реакций окисления или растворения металлической меди, дигенита, борнита, магнетита, а также ферритов цинка:



Вместе с тем конвертерные шлаки медеплавильных заводов — особый вид продукта, содержащий до 50% железа преимущественно в составе магнетита и силиката (фаялит), а также силикаты других металлов (в частности, цинк). Растворение силикатов в сернокислой среде, используемой

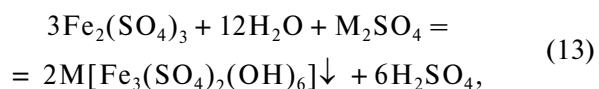
при выщелачивании, может приводить к образованию силикатного геля в соответствии с уравнениями реакций:



где М — металл (Fe, Zn, Cu и др.).

Силикатный гель затрудняет или делает невозможным дальнейшие операции разделения (фильтрование, отстаивание) фаз и выделения цветных металлов из растворов (жидкостная экстракция, химическое осаждение и др.). Поэтому процесс извлечения цветных металлов из шлаков цветной металлургии должен характеризоваться условиями, позволяющими перевести в раствор цветные металлы при минимальном растворении силикатной фазы.

Кроме того, чем выше температура и рН пульпы, тем интенсивнее протекает реакция с образованием ярозита [19]:



где М = K⁺, Na⁺, NH₄⁺, H₃O⁺.

Ранее было показано, что выщелачивание цветных металлов из отхода обогащения конвертерных шлаков достаточно эффективно протекает при рН 1.5, содержании твердой фазы в суспензии от 5 до 30% и концентрации ионов трехвалентного железа в исходном растворе 10–20 г/л [16]. Поэтому для исследования выщелачивания цветных металлов непосредственно из медеплавильных шлаков были использованы результаты этих опытов.

Влияние температуры. Как известно, наибольшее влияние на скорость химических реакций оказывает температура. Ранее проведенные исследования показали положительное влияние повышения температуры на процесс выщелачивания цветных металлов из хвостов обогащения конвертерных шлаков. Для подтверждения полученных результатов были проведены исследования по определению влияния температуры на динамику выщелачивания цветных металлов из шлака.

Опыты проводили при следующих параметрах: значении показателя рН 1.5, начальной концентрации ионов трехвалентного железа в выщелачивающем растворе 15.1 г/л и плотности пульпы 5%.

Извлечение меди и цинка в процессе выщелачивания конвертерного шлака представлено на рис. 2. Видно, что около 50% меди переходило в раствор в первые 5 мин процесса, и влияние температуры было незначительным. Это можно объяснить тем, что сначала реагируют окисленные

минералы меди и металлическая медь, которые растворяются наиболее быстро. Однако в течение последующих 2.5 ч при низкой (28–40°C) температуре медь практически не выщелачивалась, в то время как при температуре 70°C извлечение меди достигало почти 95%. Подобные закономерности наблюдались при выщелачивании цинка. Около 10–15% цинка переходило в раствор в первые 5 мин процесса, и влияние температуры было незначительным. Повышение температуры до 70°C обеспечивало самые высокие показатели по сравнению с более низкими температурами, однако извлечение цинка не превышало 46% за 2.5 ч.

Из представленных данных на рис. 2 и 3 видно, что с увеличением температуры увеличивалась интенсивность и эффективность извлечения меди и цинка. Повышение температуры процесса от 40 до 70°C приводило к увеличению извлечения меди более чем в 1.5 раза, цинка — почти в 3 раза за 2.5 ч процесса. Результаты проведенных исследований подтвердили полученные ранее закономерности при выщелачивании отхода обогащения шлаков по положительному влиянию температуры на извлечение цветных металлов в раствор.

Влияние концентрации ионов трехвалентного железа. Опыты проводили при значении рН 1.5, содержании твердой фазы в суспензии 20% и температуре 70°C. В реактор заливали выщелачивающий раствор, содержащий ионы трехвалентного железа с их начальной концентрацией 10.1 г/л, 15.1 г/л и 20.6 г/л.

Результаты исследований представлены на рис. 3. Показано, что около 50% меди также переходило в раствор в первые 5 мин процесса, в то время как извлечение цинка не превышало 10%. При этом повышение концентрации ионов трехвалентного железа в выщелачивающем растворе увеличивало извлечение меди в раствор и снижало извлечение цинка, особенно в первые 30 мин. Полученные результаты можно объяснить тем, что ионы трехвалентного железа являются реагентами в реакциях выщелачивания меди (3–6), увеличение концентрации которых увеличивает интенсивность реакций, в то время как в реакциях выщелачивания цинка и железа (8, 9), они являются продуктами, увеличение концентрации которых ингибирует эти реакции.

Сравнение процессов, проводимых при начальной концентрации трехвалентного железа 10.1 и 20.6 г/л, указывает на более высокую эффективность извлечения меди в последнем случае, однако концентрация 15.1 г/л Fe³⁺ обеспечивала также высокие показатели по извлечению цветных металлов.

Влияние содержания твердой фазы в суспензии. Гидродинамический режим в реакторе — важный параметр химических процессов. Он играет ключевую роль при протекании реакций, контролируемых скоростью диффузионных процессов. Одним

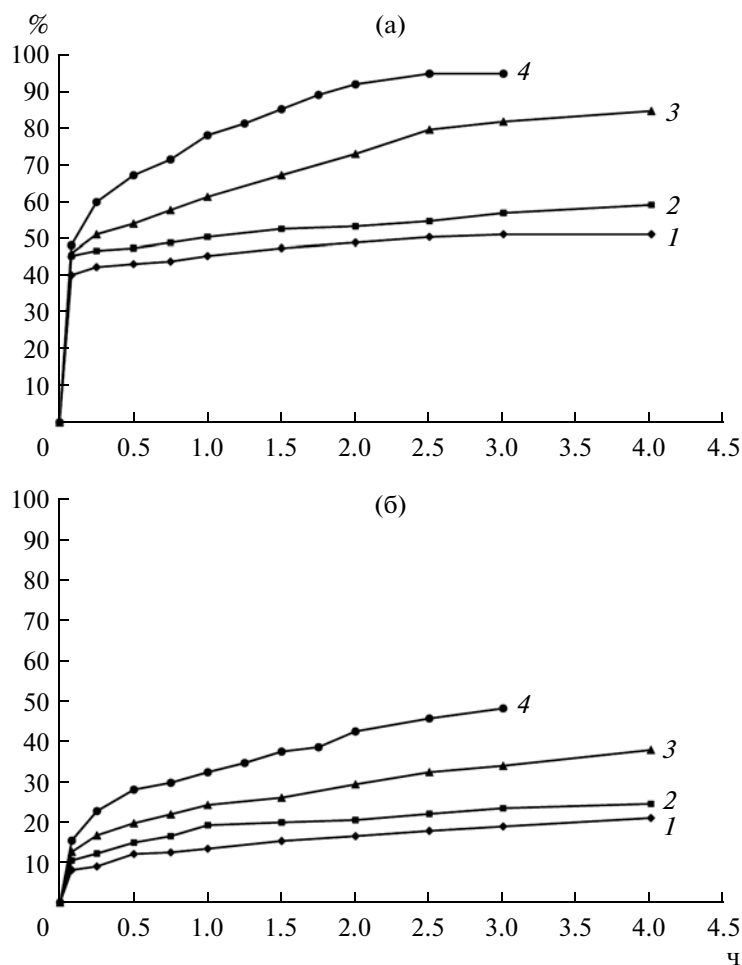


Рис. 2. Извлечение меди (а) и цинка (б) в процессе химического выщелачивания конвертерного шлака при различной температуре: 1 – 28, 2 – 40, 3 – 55, 4 – 70°C.

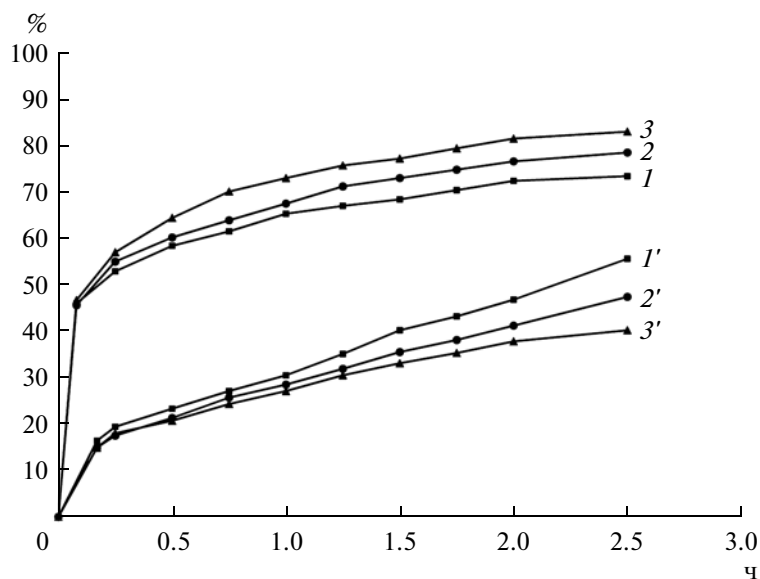


Рис. 3. Извлечение меди (1, 2, 3) и цинка (1', 2', 3') в процессе химического выщелачивания конвертерного шлака при различной начальной концентрации Fe^{3+} в выщелачивающем растворе: 1 – 10.1, 2 – 15.1, 3 – 20.6 г/л.

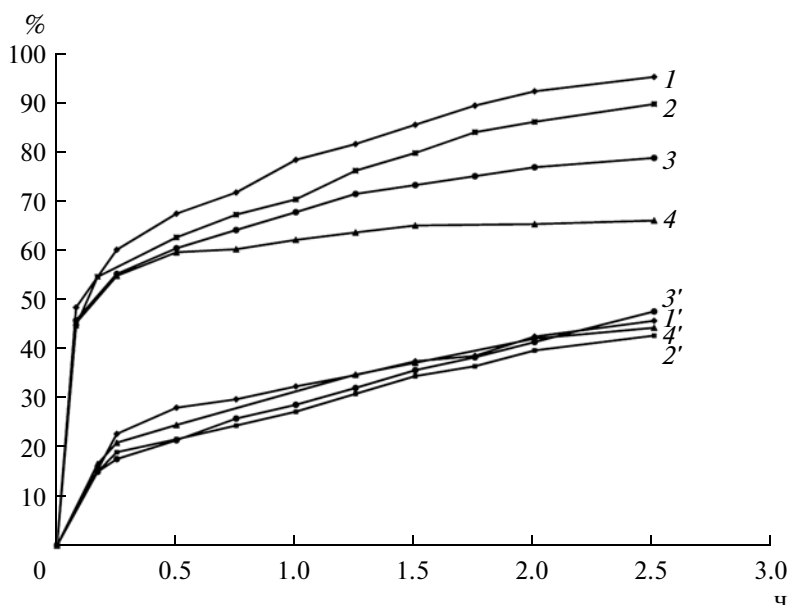


Рис. 4. Извлечение меди (1, 2, 3, 4) и цинка (1', 2', 3', 4') в процессе химического выщелачивания конвертерного шлака при различном содержании твердой фазы в суспензии: 1 – 5, 2 – 10, 3 – 20, 4 – 30%.

из главных параметров, влияющих на гидродинамическую обстановку в реакторе, является содержание твердой фазы в суспензии. С целью выяснения зависимости эффективности и интенсивности процессов химического выщелачивания цветных металлов из конвертерного шлака от гидродинамической обстановки в реакторе проведены исследования при различном содержании твердой фазы в суспензии.

Опыты проводили при ранее выбранном pH, равным 1.5, температуре 70°C и начальной концентрации трехвалентного железа в выщелачивающем растворе 15.1 г/л. В реактор добавляли твердую фазу в таком количестве, чтобы ее содержание в суспензии составляло 5, 10, 20 и 30%.

Результаты исследований представлены на рис. 4. Видно, что изменение содержания твердой фазы в диапазоне от 5 до 30% практически не влияло на извлечение цинка, тогда как извлечение меди значительно снижалось при увеличении этого параметра.

Так, за 2.5 ч процесса извлечение меди составило 89.4% при содержании твердой фазы 10% в то время как при 30% – только 60.8%. Подобная закономерность по извлечению меди в раствор в зависимости от плотности пульпы была получена также в работе [8] и может быть объяснена тем, что с увеличением количества твердой фазы в единице объема концентрация трехвалентного железа в растворе в процессе выщелачивания была меньше в каждый момент времени. Это связано с тем, что опыты были проведены в периодическом режиме при заданной начальной концентрации

трехвалентного железа в выщелачивающем растворе. При этом извлечение цинка в раствор за то же время выщелачивания менялось незначительно – от 35 до 42%.

Анализ представленных данных показывает, что увеличение содержания твердой фазы в суспензии приводит к снижению извлечения меди в раствор. Однако разница между содержанием 5 и 10% незначительна (около 5%), в то время как дальнейшее ее увеличение до 20, а особенно, до 30% резко снижало эффективность выщелачивания (извлечение меди снижалось примерно на 10 и 20% по сравнению с содержанием твердой фазы 10%).

Для создания технологии выщелачивания цветных металлов из шлаков необходимо предусмотреть замкнутый цикл водопотребления с использованием регенерированных оборотных растворов. Предполагается использовать процесс биорегенерации с использованием ацидофильных микроорганизмов – растворов после химического выщелачивания. Для исследования этого процесса необходимо знать поведение ионов железа в процессе химического выщелачивания.

Изменение концентрации ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} при выщелачивании медеплавильного конвертерного шлака при различном содержании твердой фазы в суспензии при 70°C, начальной концентрации Fe^{3+} в выщелачивающем растворе 15.1 г/л представлено на рис. 5. Из данных видно, что в процессе выщелачивания снижалась концентрация ионов Fe^{3+} и увеличивалась концентрация ионов Fe^{2+} . При содержании твердой фазы больше 10% концентрация ионов железа в растворе становилась настолько вы-

сокой, что его регенерация будет затруднительной, а концентрация ионов трехвалентного железа после регенерации — избыточной (выше 30 г/л).

Анализируя полученные результаты, можно отметить, что оптимальным содержанием твердой фазы в суспензии при выщелачивании шлаков является 10%, которое обеспечивает 89.4% извлечения меди в раствор, достаточное извлечение цинка (39.3%), а также наиболее приемлемую концентрацию ионов двухвалентного железа в растворе для его регенерации (20–25 г/л).

Биорегенерация раствора после химического выщелачивания шлака. Полученный продуктивный раствор может быть повторно использован для выщелачивания шлаков после окисления в нем ионов двухвалентного железа. Окисление железа может быть проведено с применением железозакисляющих ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов. Регенерация ионов Fe^{3+} в продуктивном растворе проводилась созданными мезофильной и умеренно термофильной ассоциациями при 30 и 40°C соответственно. Путем многократного пересева ассоциаций на среде 9К, с постепенным увеличением концентраций цветных металлов, обе ассоциации были адаптированы к концентрации меди и цинка 5 г/л. При этом скорость окисления ионов двухвалентного железа в питательной среде составляла 0.27 г/л · ч для мезофильной и 0.21 г/л · ч для умеренно термофильной ассоциации соответственно. Полученные скорости характерны для активных железозакисляющих культур, поэтому обе ассоциации микроорганизмов были использованы в опытах по регенерации окислителя в продуктивном растворе после химического выщелачивания шлаков.

Определение кинетики окисления двухвалентного железа проводилось с использованием продуктивного раствора, полученного при наиболее эффективном химическом выщелачивании шлаков (температура — 70°C, начальной концентрации Fe^{3+} в выщелачивающем растворе 15.1 г/л, содержание твердой фазы 10%) и содержащего 2.45 г/л меди и 0.98 г/л цинка. С целью определения наличия ингибирующих компонентов проводилось сравнение скоростей окисления ионов железа в исходном и разбавленном в 2 раза средой 9К, не содержащей железа, растворах. Разбавленный раствор содержал 1.23 и 0.49 г/л меди и цинка соответственно. Окисление ионов железа умеренно термофильной ассоциацией проводилось как в автотрофных, так и в миксотрофных условиях при добавлении дрожжевого экстракта (ДЭ).

Результаты исследований по скорости окисления ионов Fe^{2+} (биорегенерация Fe^{3+}) представлены в таблице. Как следует из данных таблицы, скорость окисления ионов железа при 30°C мезофильной ассоциацией была несколько выше в исходном продуктивном растворе по сравнению с

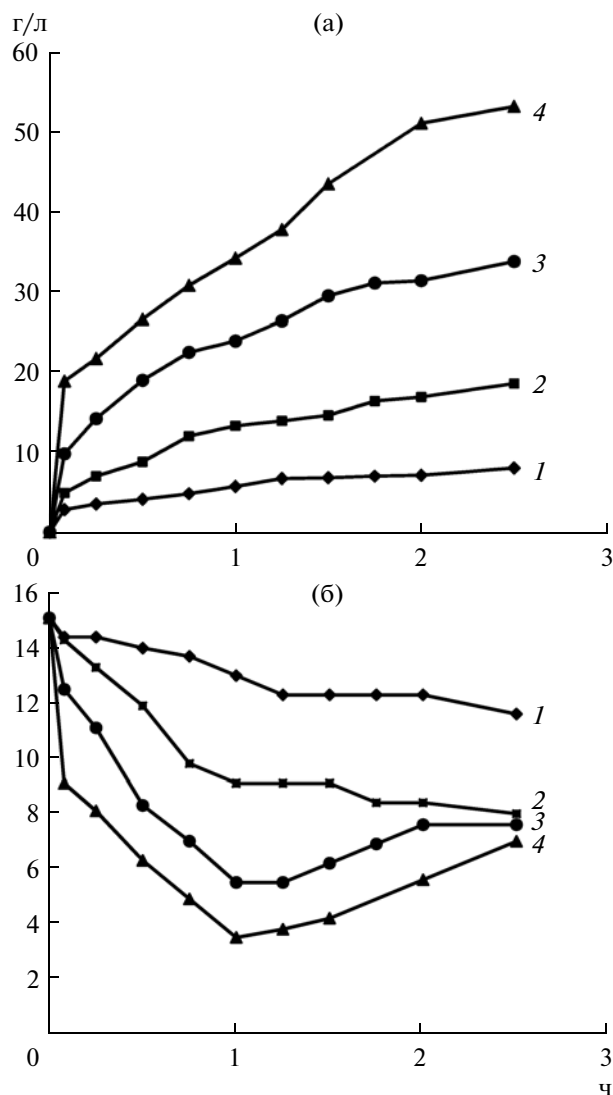


Рис. 5. Концентрации ионов Fe^{2+} (а) и Fe^{3+} (б) в процессе химического выщелачивания конвертерного шлака при различном содержании твердой фазы в суспензии: 1 — 5, 2 — 10, 3 — 20, 4 — 30%.

разбавленным средой 9К в соотношении 1 : 1 и составила 0.25 и 0.20 г/л · ч соответственно. Использование умеренно термофильной ассоциации при 40°C обеспечило скорость окисления Fe^{2+} 0.23 г/л · ч. Скорость окисления Fe^{2+} в растворе этой же ассоциацией с добавлением дрожжевого экстракта составила 0.25 г/л · ч, что близко к другим полученным показателям. При этом разбавление питательной средой не оказало положительного влияния на этот параметр. Это свидетельствовало о том, что в исходном продуктивном растворе не имелось ингибирующих компонентов для используемых микроорганизмов. Кроме того, все ассоциации обеспечили полное окисление ионов Fe^{2+} до Fe^{3+} .

Основные характеристики биорегенерации продуктивного раствора в различных условиях

Ассоциация микроорганизмов	Условие	Концентрация, г/л			Скорость окисления ионов Fe^{2+} , г/л · ч
		Fe^{3+} исходная	ΣFe исходная	Fe^{3+} конечная	
Мезофильная	Исходный раствор	11.6	23.5	20.5	0.25
	Разбавленный раствор	6.1	12.0	11.0	0.20
Умеренно термофильная	Исходный раствор	11.2	24.4	19.4	0.23
	Исходный раствор с добавлением ДЭ	11.2	24.4	20.0	0.25
	Разбавленный раствор	5.5	11.4	10.4	0.24
	Разбавленный раствор с добавлением ДЭ	5.5	11.4	10.2	0.22

Сравнение скоростей окисления Fe^{2+} обеими ассоциациями микроорганизмов показало принципиальную возможность их применения в операции регенерации продуктивного раствора для его повторного использования на стадии химического выщелачивания. При этом в процессе окисления ионов Fe^{2+} до Fe^{3+} наблюдалось снижение суммарной концентрации железа из-за частичного выпадения в осадок ионов Fe^{3+} в виде ярозита (реакция 13), но цветные металлы при этом оставались в растворе.

Таким образом, показано, что предложенный способ выщелачивания цветных металлов из конвертерного медеплавильного шлака с применением биогидрометаллургии позволяет извлечь практически полностью медь (~90%), частично цинк (~40%). При этом регенерация трехвалентного железа в продуктивном растворе может быть эффективно осуществлена мезофильной или умеренно термофильной ассоциациями железоокисляющих микроорганизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-288.2013.5.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gorai B., Jana R., Premchand K. // Resour. Conserv. Recycl. 2003. V. 39. № 4. P. 299–313.
- Kim T.J. // Copper Smelting – An Update. Proc. Int. Symp. New York: AIME, 1981. P. 33–39.
- Rao G.V., Nayak B.D. // J. Mines. Met. Fuels. 1992. V. 40. № 3–4. P. 131–134.
- Rudnik E., Burzynska L., Gumowska W. // Miner. Eng. 2009. V. 22. № 1. P. 88–95.
- Yang Z., Rui-lin M., Wang-dong N., Hui W. // Hydrometallurgy. 2010. V. 103. № 1–4. P. 25–29.
- Banza A.N., Gock E., Kongolo K. // Hydrometallurgy. 2002. V. 67. № 1–3. P. 63–69.
- Anand S., Rao K.S., Jena P.K. // Hydrometallurgy. 1983. V. 10. № 3. P. 305–312.
- Carranza F., Romero R., Mazuelos A., Iglesias N., Forcat O. // Hydrometallurgy. 2009. V. 97. № 1–2. P. 39–45.
- Carranza F., Iglesias N., Mazuelos A., Romero R., Forcat O. // Miner. Eng. 2009. V. 22. № 1. P. 107–110.
- Anand S., Rao P., Kanta X., Jena P.K. // Hydrometallurgy. 1980. V. 5. № 4. P. 355–365.
- Altundogan H.S., Boyrazli M., Tumen F. // Miner. Eng. 2004. V. 17. № 3. P. 465–467.
- Gbor P.K., Ahmed I.B., Jia C.Q. // Hydrometallurgy. 2000. V. 57. № 1. P. 13–22.
- Ahmed I.B., Gbor P.K., Jia C.Q. // Can. J. Chem. Eng. 2000. V. 78. № 4. P. 694–703.
- Муравьев М.И., Фомченко Н.В., Кондратьева Т.Ф. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 6. С. 663–671.
- Фомченко Н.В., Бирюков В.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 1. С. 64–69.
- Muravyov M.I., Fomchenko N.V., Usoltsev A.V., Vasilyev E.A., Kondrat'eva T.F. // Hydrometallurgy. 2012. V. 119–120. P. 40–46.
- Silverman M.P., Lundgren D.G. // J. Bacteriol. 1959. V. 77. № 5. P. 642–647.
- Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М.: Недра, 1970. 140 с.
- Dutrizac J.E. // Lead-Zinc-Tin '80. Proc. Int. Symp. New York: AIME, 1980. P. 532–564.

Leaching of Nonferrous Metals from Copper-Smelting Slag with Acidophilic Microorganisms

M. I. Muravyov and N. V. Fomchenko

Vinogradskii Institute of Microbiology, Moscow, 117312 Russia

e-mail: maxmuravyov@gmail.com

Received March 12, 2013

Abstract—The leaching process of copper and zinc from copper converter slag with sulphuric solutions of trivalent iron sulphate obtained using the association of acidophilic chemolithotrophic microorganisms was investigated. The best parameters of chemical leaching (temperature 70°C, an initial concentration of trivalent iron in the leaching solution of 10.1 g/L, and a solid-phase content in the suspension of 10%) were selected. Carrying out the process under these parameters resulted in the recovery of 89.4% of copper and 39.3% of zinc in the solution. The possibility of the bioregeneration of trivalent iron in the solution obtained after the chemical leaching of slag by iron—oxidizing acidophilic chemolithotrophic microorganisms without inhibiting their activity was demonstrated.

УДК 577.152.9

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЛИГНОЛИТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ, ПРИНАДЛЕЖАЩИХ К РАЗЛИЧНЫМ ТАКСОНОМИЧЕСКИМ И ЭКОЛОГИЧЕСКИМ ГРУППАМ

© 2013 г. Т. В. Фёдорова*, Н. В. Шахова**, О. И. Кляйн*, О. А. Глазунова*, Л. Г. Малошенок*,
Н. А. Куликова*,***, Н. В. Псурцева**, О. В. Королёва*

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

e-mail: fedorova_tv@mail.ru

**Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, 197376

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

Поступила в редакцию 7.06.2013 г.

Проведен скрининг лигнолитической активности грибов-базидиомицетов из Коллекции культур Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (LE-BIN), принадлежащих к различным таксономическим и экологическим группам. Выявлены закономерности расположения таксонов активных продуцентов лигнолитических ферментов в современной системе грибов. В результате проведенного кластерного анализа показано, что в группу грибов, обладающих наибольшим лигнолитическим и деградационным потенциалом, входят представители семейств Pleurotaceae, Polypogonaceae и Phanerochaetaceae, которые осуществляют первые стадии разложения древесины. В результате были отобраны виды, представляющие интерес для дальнейшего исследования их окислительного потенциала и использования в биотехнологии.

DOI: 10.7868/S0555109913060081

В последнее время неуклонно растет интерес к биоконверсии лигноцеллюлозных отходов, что обусловлено увеличением объема отходов целлюлозно-бумажной (ЦБП) и деревообрабатывающей промышленности и, как следствие, увеличением техногенной нагрузки на окружающую среду [1]. Так, по данным Федеральной службы государственной статистики общий объем отходов ЦБП в России увеличился с 2991.2 млн т. в 2005 г. до 4303.3 млн т в 2011 г. В то же время основными методами утилизации данных отходов в нашей стране остается складирование на полигонах и сжигание после обезвоживания и уплотнения.

Использование биотехнологических подходов для конверсии отходов ЦБП ограничено их токсичностью, обусловленной присутствием различных соединений, таких как полиароматические углеводороды ксенобиотики (диоксины, производные хлора и др.) и наличием лигнина — одного из самых труднодеградируемых биополимеров. Именно поэтому базидиальные грибы — наиболее активные деструкторы лигнина привлекают внимание исследователей как основной компонент технологии биоконверсии лигноцеллюлозных отходов. Из всех известных представителей базидиомицоты грибы белой гнили являются наиболее эффективными деструкторами лигнина [2]. Процесс деструкции лигноцеллюлозного субстрата этими грибами состоит из большого количества стадий и зависит от

наличия у них системы ферментов — уникального лигнолитического комплекса, в состав которого входят: лакказы (КФ 1.10.3.2) и различные пероксидазы, в том числе марганец пероксидазы (КФ 1.11.1.13) и лигнин пероксидазы (КФ 1.11.1.14) [3–5]. Известно, что некоторые виды грибов белой гнили — деструкторов древесины обладают уникальными механизмами детоксификации как продуктов деградации лигнина, так и различных ксенобиотиков [6, 7], поэтому исследователями постоянно проводятся работы по поиску, выделению и изучению новых штаммов базидиомицетов, перспективных для использования в технологиях биоконверсии и биоремедиации [8–10].

Настоящая работа является первым этапом разработки биотехнологии переработки твердых отходов ЦБП с использованием базидиомицетов.

Цель работы — скрининг и оценка лигнолитического и деградационного потенциалов грибов белой гнили из различных экологических и таксономических групп, выбор наиболее перспективных штаммов для использования в утилизации лигнинсодержащих отходов ЦБК.

МЕТОДИКА

Скрининг культур. Более 520 культур 330 видов высших грибов базидиомицетов, принадлежащих к различным таксономическим и экологическим

группам, из Коллекции культур Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (Санкт-Петербург) были использованы для оценки лигнолитического и деградационного потенциалов экспресс методами [11]. Для дальнейшей работы были отобраны наиболее активные штаммы, представленные в табл. 1. Все культуры хранились в пробирках на скошенном сусло-агаре (плотность сусла 4%; агар 1.5%) при 4°C.

Видовая идентификация. Видовую принадлежность грибов определяли морфологически с использованием традиционных методов с последующим генотипированием.

Штаммы выращивали на среде МЭА с 2% мальтэкстракта (“Диа-М”, Россия) и 1.6% агара (“Difco”, США), на чашках Петри (90 мм) при температуре 25°C в темноте. Рост штаммов характеризовали по диаметру колонии на 7 и 14 сут роста. Характеристику макро- и микроморфологических особенностей мицелия проводили на 4-х недельных колониях по стандартным методикам [12, 13]. Макроморфологическая характеристика включала описание воздушного мицелия, цвета, запаха и реверзума колоний, микроморфологическая — характерных особенностей гифальной системы, наличие на мицелии вздутий, пряжек и анаморф (структур бесполого размножения). Стадию телеоморфы (плодообразование) в культуре получали на субстратных блоках (березовые опилки с пшеничными отрубями 3 : 1) в климатической камере Sanyo MLR-351H при температуре 15°C и влажности 85%.

Для генотипирования исследуемых грибных штаммов было проведено частичное 18S, 28S и полное 5.8S определение нуклеотидных последовательностей рРНК, а также последовательности ДНК, находящейся между генами, кодирующими 18S, 5.8S и 28S рРНК (ITS1 и ITS2 регионы) с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров на консервативные участки генов рибосом ITS1F 5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3' и ITS4B 5'-CAG GAG ACT TGT ACA CGG TCC AG-3' [14]. ПЦР проводили в следующих условиях: 1 цикл 5 мин 95°C, далее 25 циклов (1 мин 90°C, 1 мин 56°C, 1 мин 72°C) и 1 цикл 10 мин 72°C.

Экспресс-метод оценки общей лигнолитической и лакказной активностей. Для качественной оценки лигнолитической и лакказной активностей экспресс-методом [11] штаммы выращивали в темноте при 25°C на чашках Петри (90 мм) на средах следующего состава: среда С-А, % — пивное сусло — 4.0, агар — 2.0; среда Г-П, г/л: KH_2PO_4 — 0.6; K_2HPO_4 — 0.4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5; CaCl_2 — 0.05; MnSO_4 — 0.05; ZnSO_4 — 0.001; FeSO_4 — 0.0005; пептон — 3.0; глюкоза — 10.0; агар — 2.0%; среда Г-П + Cu, г/л: состав тот же, что и у среды Г-П с добавлением 0.15 г/л CuSO_4 .

При посеве блоки 7-суточного мицелия гриба, выращенного на среде МЭА, диаметром 5 мм помещали с краю чашки мицелиальным слоем вниз. Активность лигнолитических ферментов определяли через 1 и 2 нед роста. Около растущего края колонии вырезали мицелиальные блоки диаметром 5 мм, переносили в лунки микробиологических планшетов и по каплям наносили растворы гваякола (“Sigma”, США) 2 мл/100 мл H_2O и 1.0%-ного синингалдазина (“Sigma”, США) в $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Активность оценивали визуально по интенсивности цветовой реакции: от “—” — нет активности до “+++” — высокая активность, через 5, 15, 30, 60 мин и 3, 24 ч.

Экспресс-метод оценки лигнинпероксидазной активности. Качественную оценку лигнинпероксидазной активности проводили диффузионным экспресс методом [15]. Штаммы выращивали в темноте при 25°C на чашках Петри (90 мм) на средах С-А, Г-П, Г-П + Cu с добавлением в них в стерильных условиях перед розливом 0.02%-ного раствора азура Б. При посеве блоки 7-суточного мицелия на среде МЭА диаметром 5 мм помещали с краю чашки мицелиальным слоем вниз. Активность лигнинпероксидазы определяли через 1 и 2 нед роста. Активность оценивали визуально по интенсивности изменения окраски красителя в диапазоне “—” — нет активности до “+++” — высокая активность.

Методы культивирования. Инокулят грибов выращивали стационарно в 750 мл конических колбах с фарфоровыми бусами на среде Г-П без добавления агара при 25°C 10–14 сут в зависимости от скорости роста гриба. Перед засевом инокулят измельчали фарфоровыми бусами 20 мин при 180 об/мин до образования однородной суспензии, которую в объеме 10% стерильно вносили в колбы для культивирования.

Глубинное культивирование проводили на качалке при 180 об/мин в течение 20 сут в 750 мл конических колбах на средах С-А, Г-П и Г-П + Cu без агара. Отбор проб культуральной жидкости для измерения лакказной активности проводили ежедневно.

Определение лакказной активности. Активность лакказы регистрировали спектрофотометрически по увеличению оптической плотности после добавления 0.1 мл 0.018%-ного спиртового раствора синингалдазина в реакционную смесь (1.7 мл фосфатно-цитратного буфера, pH 5.0 и 0.2 мл культурального фильтрата при длине волны $\lambda = 525$ нм [16]. За условную единицу ферментативной активности принимали увеличение оптической плотности в 1 мл реакционной среды за 1 мин.

Выделение ДНК. Для выделения грибной хромосомной ДНК использовали мицелий на 8–10 сут поверхностного культивирования. Мицелий промывали дистиллированной водой, после чего

Таблица 1. Характеристика исследуемых штаммов грибов

Штамм	Видовая принадлежность	Таксономическая принадлежность	Географическое происхождение	Экология вида
LE-BIN 1998	<i>Antrodiella faginea</i> Vampola & Pouzar	Steccherinaceae, Polyporales	Россия, Дальний Восток. Субстрат — сухие ветви лиственных деревьев.	Вторичный ксилотроф (характерный для сильно разложившейся древесины или сохраняющийся на ней до 15 и более лет), вызывает белую гниль. Заселяет валежные веточки, крупные ветви и стволы лиственных деревьев, реже кустарников, из родов <i>Fagus</i> , <i>Quercus</i> , <i>Acer</i> , <i>Betula</i> , <i>Alnus</i> , <i>Populus</i> , <i>Salix</i> , <i>Padus</i> , <i>Corylus</i> , <i>Syringa</i> .
LE-BIN 0677	<i>Corioloopsis caperata</i> (Berk.) Murrill	Polyporaceae, Polyporales	Куба	Ксилотроф, вызывает белую гниль. Обитает на разрушенной древесине покрытосеменных в сомкнутых лесных сообществах и мангровых зарослях тропической зоны.
LE-BIN 2047	<i>Lenzites betulina</i> (L.) Fr.	Polyporaceae, Polyporales	Финляндия, р-н Лахти. Субстрат — ствол березы <i>Betula</i> sp. в хвойном лесу.	Раневый первичный ксилотроф, (осуществляющий первые стадии разложения древесины приблизительно до 7 лет) вызывает белую гниль. Обитает на древесине лиственных деревьев, чаще всего на видах из родов <i>Betula</i> , а также <i>Acer</i> , <i>Alnus</i> , <i>Carpinus</i> , <i>Corylus</i> , <i>Fagus</i> , <i>Fraxinus</i> , <i>Juglans</i> , <i>Prunus</i> , <i>Quercus</i> , <i>Salix</i> , <i>Sorbus</i> , <i>Tilia</i> , <i>Ulmus</i> .
LE-BIN 2009	<i>Byssomerulius avellaneus</i> (Bres.) J. Erikss. & Hjortstam	Phanerochaetaceae, Polyporales	Россия, Дальний Восток. Субстрат — сухостойные ветви в дубовой роще.	Ксилотроф, вызывает белую гниль. Обитает на сухостойных и валежных ветвях, а также детрите широколиственных деревьев из родов <i>Acer</i> , <i>Alnus</i> , <i>Carpinus</i> , <i>Quercus</i> .
LE-BIN 0432	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P. Kumm.	Pleurotaceae, Agaricales	Россия, г. Сочи.	Раневый первичный ксилотроф (осуществляющий первые стадии разложения древесины приблизительно до 7 лет), вызывает желтую смешанную гниль. Заселяет ослабленные и усыхающие деревья, а также валежные ветви и пни многих лиственных, иногда — хвойных (<i>Picea</i> , <i>Araucaria</i>) пород деревьев.
LE-BIN 2142	<i>Peniophora lycii</i> (Pers.) Höhn. & Litsch.	Peniophoraceae, Russulales	Россия, Ростовская область. Субстрат — меловые отложения в степи.	Ксилотроф. Обитает на валежных ветвях различных лиственных (<i>Acer</i> , <i>Fagus</i> , <i>Rhamnus</i> , <i>Fraxinus</i>) и изредка — хвойных (<i>Pinus</i>) деревьев.
LE-BIN 1963	<i>Steccherinum murashkinskyi</i> (Burt) Maas Geest.	Steccherinaceae, Polyporales	Россия, Дальний Восток, Камчатский регион. Дерево произрастания — ствол обгоревшей березы <i>Betula platyphylla</i> .	Вторичный ксилотроф (характерный для сильно разложившейся древесины или сохраняющийся на ней до 15 и более лет), вызывает белую гниль. Обитает на валежных стволах и ветвях различных лиственных (<i>Acer</i> , <i>Betula</i> , <i>Populus</i> , <i>Salix</i> , <i>Quercus</i>) и изредка — хвойных (<i>Abies</i>) деревьев.
LE-BIN 1911	<i>Trametes gibbosa</i> (Pers.) Fr.	Polyporaceae, Polyporales	Россия, Самарская обл., Ставропольский район. Дерево произрастания — липа.	Ксилотроф, вызывает активно развивающуюся белую гниль. Обитает на отмершей, преимущественно крупномерной древесине (сухостой, пни, валеж, обработанная древесина) лиственных (чаще всего на <i>Betula</i> , реже — на <i>Alnus</i> , <i>Carpinus</i> , <i>Cerasus</i> , <i>Fagus</i> , <i>Populus</i> , <i>Salix</i> , <i>Tilia</i> и мн. др.), изредка — хвойных (<i>Abies</i> , <i>Picea</i>) пород деревьев. Высоко конкурентный вид, способен медленно вытеснять многие виды дереворазрушающих грибов на большинстве субстратов.
LE-BIN 1795	<i>Xerula radicata</i> (Relhan) Dörfelt	Marasmiaceae, Agaricales	Россия, Самарская обл., Ставропольский район. В основании сильно разрушенного пня.	Ксилотроф. Развивается на корнях (возможно, и на погребенной древесине) преимущественно широколиственных деревьев (<i>Quercus</i> , <i>Fagus</i>). Плодовые тела обычно встречаются в основании старых, сильно разрушенных пней, что позволяет отнести этот вид к вторичным ксилотрофам.

просушивали между слоями фильтровальной бумаги. Высушенный мицелий растирали в ступке с жидким азотом до получения однородного белого порошка. Выделение ДНК из измельченной грибной биомассы проводили согласно протоколам для выделения ДНК “DNeasy Plant Mini Kit (50)” (“Qiagen”, США). Чистоту полученных образцов контролировали методом электрофореза в агарозном геле. Полученные образцы хромосомной ДНК хранили при температуре -20°C .

Выделение суммарной РНК. Выделение суммарной РНК из полученной измельченной грибной биомассы проводили с использованием набора реактивов “RNeasy Plant Mini Kit (50)” (“Qiagen”, США), согласно методике, предложенной производителем, адаптированной для растительного материала и мицелиальных грибов. Суммарная РНК использовалась в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК в реакции обратной транскрипции.

Обратная транскрипция. Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили с использованием набора реактивов для синтеза кДНК Mint (“Евроген”, Россия), согласно инструкции производителя. Первую цепь кДНК амплифицировали в реакции ПЦР для получения двухцепочечной кДНК (дц-кДНК), обогащенной полноразмерными последовательностями. Полученную дц-кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР.

Проведение ПЦР. Хромосомную ДНК и дц-кДНК каждого исследуемого гриба использовали в качестве матрицы в реакционной смеси для проведения ПЦР. Для ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава: 2 мкл 10 X Encyclo буфер (“Евроген”, Россия), 0.4 мкл 50 X смесь dNTP (по 20 mM каждого) (“Евроген”, Россия), по 1.0 мкл прямого и обратного праймеров (0.5 мкМ), 0.4 мкл 50 X Encyclo полимеразы (“Евроген”, Россия), 1 мкл ДНК-матрицы, 14.2 мкл стерильной воды. Реакцию проводили в амплификаторе C1000 (“Bio Rad”, США). Электрофорез продуктов амплификации проводили в 1.2%-ном агарозном геле. Результат визуализировали на УФ-трансиллюминаторе при длине волны 260 нм.

Идентификация гена лакказы. Для определения наличия гена лакказы использовали следующую программу ПЦР: 1 цикл — 5 мин 94°C , далее 35 циклов (15 с 90°C , 20 с 56°C , 30 с 72°C) и 1 цикл 10 мин 72°C . ПЦР-фрагменты амплифицировали с использованием вырожденных праймеров:

LacA1 For 5'-CAYTGGCAYGGWTTTTCAR-3'

LacA1 Rev 5'-RTGRAARTCDATRTGRCARTG-3'

LacA2 For 5'-GGNACNTTCTGGTAYCAYAGYCA-3'

LacA2 Rev5'-RTANCGNAGDATAGCVGAGTT-3'.

Очистка и клонирование ПЦР-фрагментов. Продукты ПЦР очищали с применением набора

реактивов “QIAquick Gel Extraction Kit (50)” (“Qiagen”, США), согласно методике, предложенной производителем. Клонирование выделенных ПЦР-фрагментов проводили с использованием вектора для быстрого клонирования продуктов ПЦР “pAL-TA” (“Евроген”, Россия) в компетентных клетках *Escherichia coli* XL1-Blue.

Определение нуклеотидных последовательностей. Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов ДНК определяли с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems (США) в Центре коллективного пользования “Геном” ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН.

Анализ последовательностей. Поиск гомологий в GenBank проводили с помощью сервера BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) [17]. Редактирование аминокислотных и нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы “BioEdit Sequence Alignment Editor” (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Для выравнивания аминокислотных последовательностей белков применяли программу ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW>).

Статистическая обработка. Все эксперименты проводили в трех биологических и аналитических повторностях. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы STATISTICA 8.0. Для объединения исследованных штаммов грибов в группы, полученные экспериментальные данные были подвергнуты древовидной кластеризации. Для этого проводили предварительный перевод результатов скрининга в баллы. При формировании кластеров в качестве расстояния между объектами использовали Евклидово расстояние; при объединении кластеров руководствовались методом ближайшего соседа (одиночная связь).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Скрининг и определение видовой принадлежности культур. У исследуемых штаммов были изучены культурально-морфологические характеристики для верификации их таксономической принадлежности (табл. 1). Установлено, что культуральные признаки исследованных штаммов *Antrodiaella faginea* 1998, *Coriopsis caperata* 0677, *Lenzites betulina* 2047, *Pleurotus ostreatus* 0432, *Peniophora lycii* 2142, *Trametes gibbosa* 1911 и *Xerula radicata* 1795 были типичны для этих видов [12, 18]. Морфология вегетативного мицелия штаммов *Byssomerulius avellaneus* 2009 и *Steccherinum murashkinskyi* 1963 (рис. 1а, б) была изучена впервые и позволила провести их идентификацию, которая была подтверждена на полученных в культуре базидиомах (рис. 1в). Для подтверждения правильности идентификации

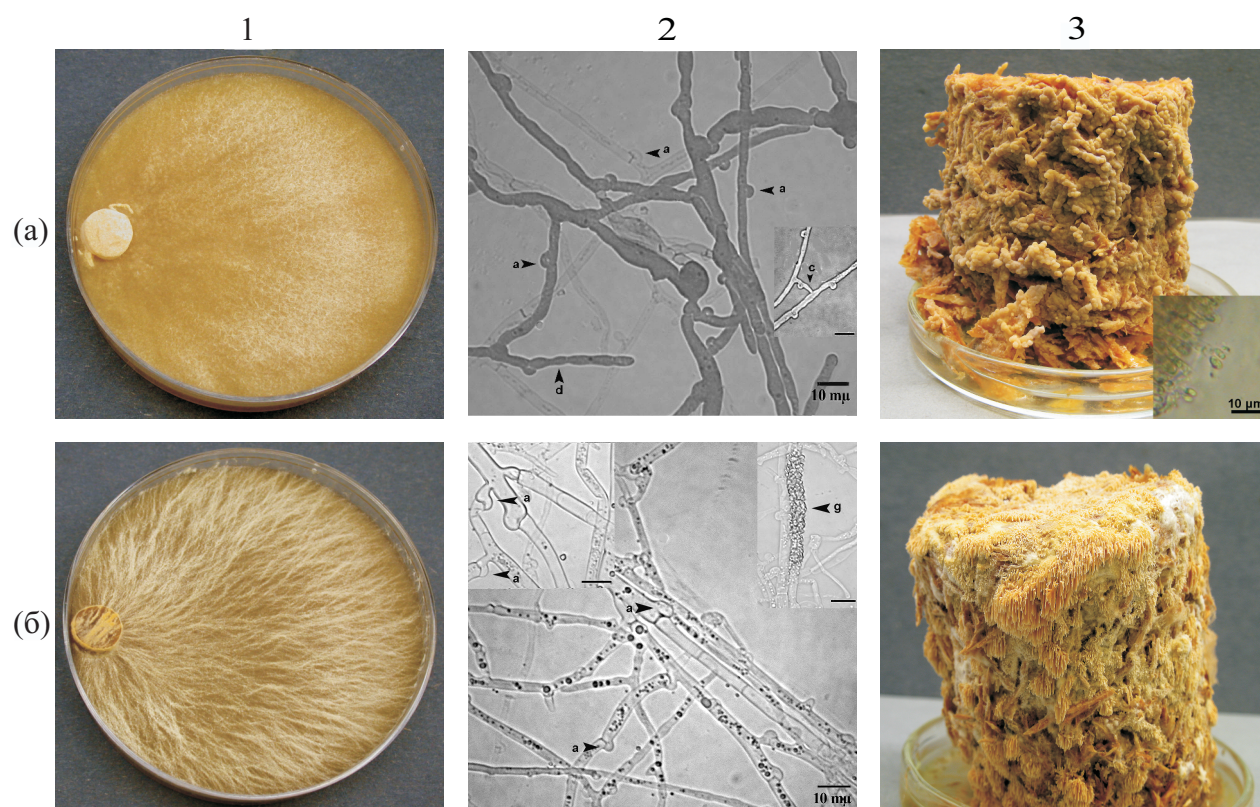


Рис.1. Грибы белой гнили *Byssomerulius avellaneus* 2009 (a) и *Steccherinum murashkinskyi* 1963 (б)
 1 – поверхностный рост грибов на среде С-А; 2 – мицелий грибов x1000; 3 – стадия образования
 плодового тела при выращивании на блоках из опилок. Стрелками и латинскими буквами обозначены:
 а – пряжки, с – ветвление гифов, d – глеоцистида, g – инкрустация гифы.

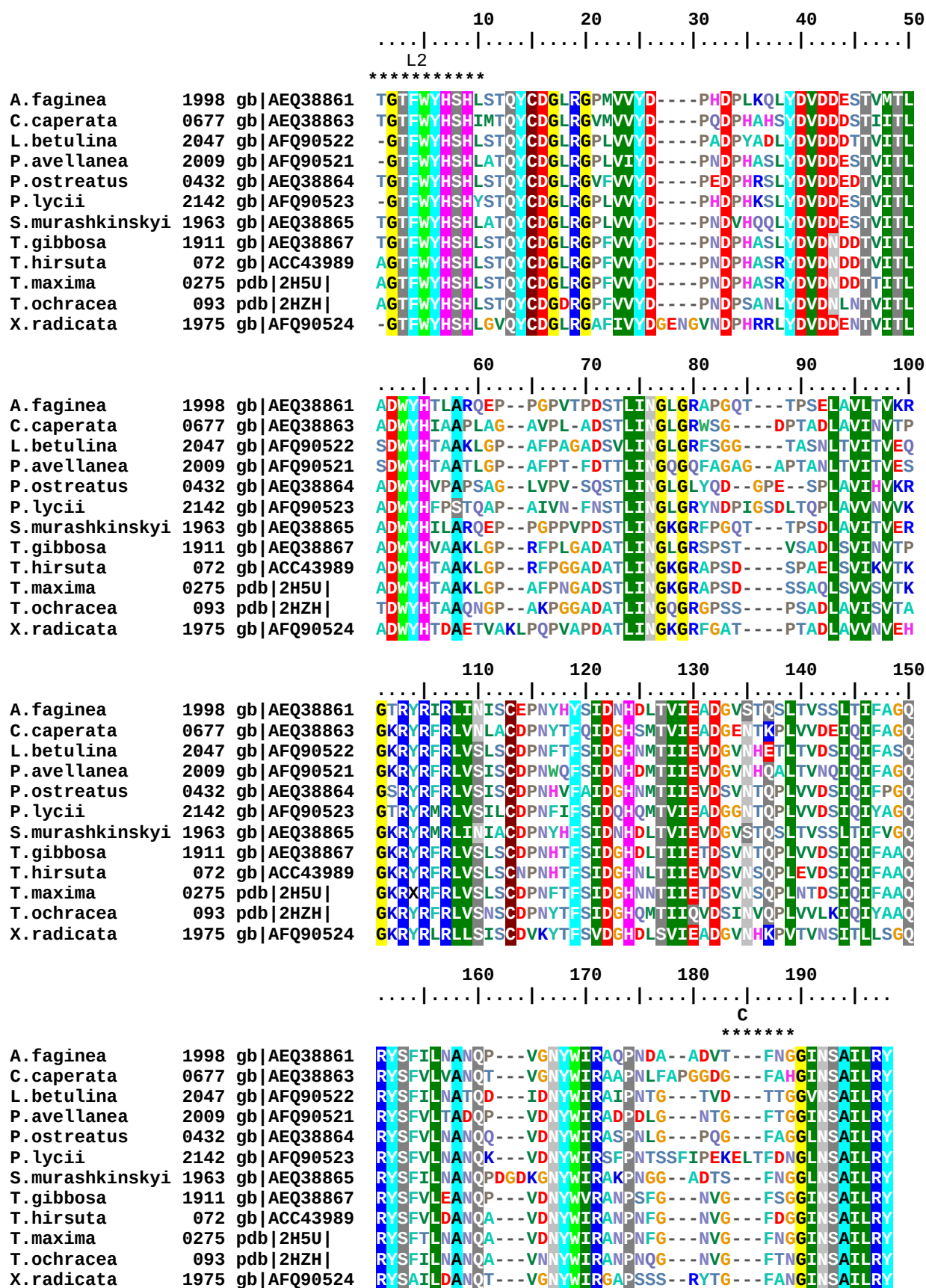


Рис. 4. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей полученных с кДНК исследуемых грибов частичных сиквенсов лакказ (номера в банке данных NCBI: AEQ38861, AEQ38863, AFQ90522, AFQ90521, AEQ38864, AFQ90523, AEQ38865, AEQ38867, AFQ90524) с аминокислотными последовательностями лакказ контрольных штаммов. Звездочками отмечены консервативные участки.

Таблица 2. Верификация видовой принадлежности грибных штаммов методом ДНК-типирования

Штамм	Наиболее близкий штамм из базы данных NCBI (Taxonomy ID)	Идентичность, %
<i>Antrodiella faginea</i> 1998	<i>Antrodiella faginea</i> (92699)	99
<i>Coriopsis caperata</i> 0677	<i>Coriopsis caperata</i> (195176)	100
<i>Lenzites betulina</i> 2047	<i>Lenzites betulinus</i> (5632)	99
<i>Byssomerulius avellaneus</i> 2009	<i>Phanerochaete avellanea</i> , синоним <i>Byssomerulius avellaneus</i> , (194676) GU062467	100
<i>Pleurotus ostreatus</i> 0432	<i>Pleurotus</i> sp. 'Florida' (188765)	99
<i>Peniophora lycii</i> 2142	<i>Peniophora lycii</i> (154539)	100
<i>Steccherinum murashkinskyi</i> 1963	<i>Steccherinum murashkinskyi</i> (627145) FJ798705	100
<i>Trametes gibbosa</i> 1911	<i>Trametes gibbosa</i> (160864)	100
<i>Xerula radicata</i> 1795	<i>Hymenopellis radicata</i> , синоним <i>Xerula radicata</i> (937743)	100

штаммов было проведено частичное 18S, 28S и полное 5.8S определение нуклеотидных последовательностей их рРНК, а также последовательностей ITS1 и ITS2 регионов (табл. 2). Видовая принадлежность штаммов 1998, 0677, 2047, 0432, 2142, 1911 и 1795, определенная по морфологическим признакам, совпадала с результатами ДНК типирования (уровень гомологии 100%). В случае штаммов 1963 (*Steccherinum murashkinskyi*) и 2009 (*Byssomerulius avellaneus*) полученная последовательность полностью не совпадала ни с одной из имеющихся в базе данных. Нуклеотидная последовательность базидиомицета *Byssomerulius avellaneus* 2009 имела 98% гомологии с таковой *Phlebia chrysocreas* (номер gi: 37622321), расхождения наблюдались как в области переменных ITS1 и ITS2 регионов, так и в области 28S рибосомы. В случае *Steccherinum murashkinskyi* 1963 наиболее гомологичные последовательности (идентичность 95% и 94% соответственно) обнаружены для *Steccherinum ochraceum* (номер gi: 157057321) и *Steccherinum litschaueri* (номер gi: 56181683), что позволило отнести исследуемый штамм к семейству *Steccherinaceae* sp. (Taxonomy ID: 81060). Последовательности 18S рРНК, 5.8S рРНК и 28S рРНК грибов *Phanerochaete avellanea* (синоним *Byssomerulius avellaneus*) и *Steccherinum murashkinskyi* внесены в NCBI под номерами GU062467 и FJ798705 соответственно.

Таким образом, в группе исследуемых штаммов оказались представители афиллофороидных ксилотрофных грибов из семейств *Phanerochaetaceae* (*P. avellanea*), *Steccherinaceae* (*A. faginea* и *S. murashkinskyi*), *Polyporaceae* (*C. caperata*, *L. betulina* и *T. gibbosa*), принадлежащих к порядку *Polyporales*, и агарикоидных из семейств *Marasmiaceae* (*Xerula radicata*) и *Pleurotaceae* (*P. ostreatus*), принадлежащих к порядку *Agaricales* и кортициоидных грибов из семейства *Peniophoraceae* (*P. lycii*), принадлежащего к порядку *Russulales*.

Для выбора наиболее перспективных штаммов в работе использовали традиционную технику проведения скрининга по лигнолитической активности. В качестве модельных субстратов для определения общей лигнолитической, лакказной и лигнин-пероксидазной активностей использовали гваякол [19], синингалдазин [20] и азур Б [15] соответственно. Обесцвечивание полифенольных красителей, к которым относится также азур Б, базидиомицетами может свидетельствовать также о наличии пероксидаз и H₂O₂-продуцирующих оксидаз [8]. Как было показано ранее, способность некоторых представителей афиллофороидных ксилотрофных грибов к обесцвечиванию полимерных красителей коррелирует с их способностью к деградации различных ксенобиотиков, что позволяет использовать тест по обесцвечиванию азура Б для поиска грибов с высоким детоксикационным потенциалом [8].

Результаты качественной оценки показали, что на всех средах исследуемые штаммы проявляли высокую лигнолитическую и лакказную активности уже через 1–2 нед роста (табл. 3). Состав питательной среды существенно влиял как на рост исследуемых грибов, так и на продукцию ими внеклеточных лигнолитических ферментов. Натуральное пивное сусло (среда С-А), использованное в эксперименте, является богатой органической средой и наилучшим образом подходит для культивирования базидиомицетов, к тому же содержит целый комплекс природных органических соединений, которые могут быть индукторами лигнолитических ферментов. Полусинтетическая среда Г-П, содержащая глюкозу в качестве источника углерода, и пептон как источник азота, с одной стороны, не содержит природных индукторов, а, с другой стороны, при росте на средах с глюкозой грибы белой гнили способны синтезировать глюкозооксидазу (КФ 1.1.3.4), которая является основным источником образования H₂O₂ у некоторых базидиомицетов в процессе роста на

Таблица 3. Активность лигнолитических ферментов исследуемых и контрольных штаммов грибов, определенная экспресс методом

Штамм	Среда	Время выращивания, сут	Рост, мм	Активность		
				гваякол	сириггалазин	азур Б
LE-BIN 1998	С-А	7	33.3 ± 1.1	+	++	—
		14	78.7 ± 0.9	++	++	+
	Г-П	7	36.3 ± 1.1	±	+	—
		14	89.3 ± 0.9	±	±	±
	Г-П + Cu	7	23.3 ± 4.4	±	++	—
		14	77.3 ± 1.8	+	+	—
LE-BIN 0677	С-А	7	71.0 ± 2.7	+++	+++	—
		14	>90.0	++	++	+
	Г-П	7	37.0 ± 2.0	++	++	—
		14	75.3 ± 1.8	+	+	—
	Г-П + Cu	7	46.3 ± 2.9	+++	+++	—
		14	70.6 ± 1.8	++	++	—
LE-BIN 2047	С-А	7	78.7 ± 0.9	++	++	+
		14	>90.0	+++	+++	+++
	Г-П	7	73.7 ± 2.2	±	±	—
		14	>90.0	±	±	±
	Г-П + Cu	7	56.7 ± 3.1	+	++	—
		14	>90.0	+	++	—
LE-BIN 2009	С-А	7	56.3 ± 2.4	+	++	—
		14	88.3 ± 2.2	++	++	±
	Г-П	7	26.7 ± 2.4	++	++	—
		14	69.3 ± 3.8	±	±	—
	Г-П + Cu	7	37.3 ± 0.9	±	±	—
		14	78.7 ± 0.9	+	—	—
LE-BIN 0432	С-А	7	75.0 ± 1.3	++	+++	±
		14	>90.0	++	++	+++
	Г-П	7	42.3 ± 1.1	±	±	—
		14	63.0 ± 2.0	±	±	—
	Г-П + Cu	7	60.7 ± 1.8	+	+	—
		14	>90.0	±	+	±
LE-BIN 2142	С-А	7	25.0 ± 0.1	++	+	—
		14	64.3 ± 3.8	+	+	±
	Г-П	7	51.0 ± 0.3	±	±	—
		14	87.3 ± 0.4	±	±	—
	Г-П + Cu	7	40.3 ± 1.8	+	++	—
		14	80.0 ± 0.1	++	+	—
LE-BIN 1963	С-А	7	34.7 ± 1.8	++	++	—
		14	68.3 ± 4.4	+++	+++	±
	Г-П	7	23.7 ± 1.1	++	+++	—
		14	47.0 ± 1.3	++	++	—
	Г-П + Cu	7	17.7 ± 0.4	+++	+++	—
		14	34.7 ± 0.4	+++	+++	—
LE-BIN 1911	С-А	7	73.0 ± 1.3	++	++	—
		14	>90.0	+++	++	+++
	Г-П	7	34.7 ± 0.4	++	+++	±
		14	72.0 ± 2.0	±	+	+
	Г-П + Cu	7	35.0 ± 2.0	+++	+++	—
		14	81.7 ± 2.4	++	+++	±

Таблица 3. Окончание

Штамм	Среда	Время выращи- вания, сут	Рост, мм	Активность		
				гваякол	сирингалдазин	азур Б
LE-BIN 1795	С-А	7	43.0 ± 0.5	±	—	—
		14	>90.0	+++	+++	—
	Г-П	7	45.0 ± 1.34	+	+	—
		14	87.3 ± 1.8	++	+	±
	Г-П + Cu	7	40.3 ± 1.8	+	++	—
		14	81.7 ± 2.4	+++	++	—
<i>Trametes hirsuta</i> 072*	С-А	7	>90.0	++	+++	—
		14		++	+++	++
	Г-П	7	65.7 ± 0.9	+++	+++	—
		14	>90.0	++	++	±
	Г-П + Cu	7	78.3 ± 1.0	+++	+++	—
		14	>90.0	+++	++	—
<i>T. maxima</i> 0275*	С-А	7	78.0 ± 1.3	+++	+++	+
		14	>90.0	+	+	+++
	Г-П	7	55.3 ± 3.1	+	++	—
		14	84.3 ± 0.9	±	±	±
	Г-П + Cu	7	65.5 ± 2.56	++	++	—
		14	85.5 ± 1.5	++	++	—
<i>T. ochracea</i> 093*	С-А	7	67.0 ± 2.7	++	++	—
		14	>90.0	++	++	+++
	Г-П	7	50.7 ± 0.9	±	±	—
		14	84.3 ± 1.6	±	±	—
	Г-П + Cu	7	54.7 ± 2.9	+	+	—
		14	84.7 ± 1.6	+++	+++	—

* Обозначены контрольные штаммы.

древесных субстратах [21]. Для стимуляции биосинтеза лигнолитического фермента лакказы в среду Г-П добавляли CuSO_4 (среда Г-П + Cu). Среда С-А оказалась более предпочтительной для штаммов *A. faginea* 1998, *L. betulina* 2047, *P. avellanea* 2009, *P. ostreatus* 0432 и *X. radicata* 1795. На среде Г-П рост грибов *C. caperata*, *P. avellanea*, *P. ostreatus*, *S. murashkinskyi* и *T. gibbosa* замедлялся — чашки Петри полностью покрывались мицелием на 1 нед позже по сравнению с ростом на сусле — цветовая реакция субстратов была менее интенсивной. Наоборот, штаммы *A. faginea* и *P. lycii* на среде Г-П росли быстрее, нежели на среде С-А, однако окисление гваякола и сирингалдазина при этом было менее интенсивным. Добавление меди в качестве индуктора (среда Г-П+Cu) увеличивало продукцию лигнолитических ферментов, в том числе лакказы у *C. caperata*, *L. betulina*, *P. lycii* и *T. gibbosa*, но не оказывало влияния на продукцию лигнолитических ферментов у грибов *A. faginea*, *P. avellanea* и *P. ostreatus*. Реакции с гваяколом и сирингалдазином при выращивании на среде С-А грибов *C. caperata* 0677, *L. betulina* 2047, *P. ostreatus* 0432 и *T. gibbosa* 1911, а также трех контрольных штаммов коррелировали с обесцвечиванием красителя азур Б. При этом полное обесцвечивание красителя было отмечено только для грибов *L. betulina*, *P. ostreatus* и *T. gibbosa*, а также 2 контрольных штаммов *T. maxima* 0275 и *T. ochra-*

cea 093. При росте грибов белой гнили на натуральных субстратах, к которым относится сусло, синтезируются как лигнинпероксидазы, так и различные оксидазы, способные генерировать пероксид водорода, необходимый для проявления каталитической активности пероксидаз [22]. Наличие генов, кодирующих данные ферменты, показано у *Phanerochaete chrysosporium*, *Peniophora gigantea*, *Trametes ochracea* [22, 23], *Trametes versicolor* [21], различных видов *Pleurotus* sp. [24].

Глубинное культивирование и определение наличия гена лакказы в геноме исследуемых грибов. Продукция лакказ в процессе глубинного культивирования была отмечена у всех исследованных штаммов, кроме *P. avellanea* 2009 и *X. radicata* 1795. Показано, что состав среды существенно влиял на величину лакказной активности (рис. 2). Так, для ряда штаммов оптимальной для биосинтеза лакказ была среда С-А: наиболее высокая активность наблюдалась у штаммов *A. faginea* 1998 и *S. murashkinskyi* 1963. Значительная индукция активности фермента солями двухвалентной меди была отмечена при культивировании *C. caperata* 0677, *L. betulina* 2047 и *T. gibbosa* 1911, которые относятся к грибам белой гнили семейства Polyporaceae — активным продуцентам лакказ [25]. Однако для *T. gibbosa* 1911 значения ферментативной активности при культивировании на средах С-А и Г-П + Cu разли-

чались несущественно (3.8 и 2.3 ед./мл, соответственно).

Поскольку все исследованные штаммы, согласно данным быстрого скрининга, окисляли синингалдазин, а в процессе глубинного культивирования штаммов *P. avellanea* 2009 и *X. radicata* 1795 ни на одной из трех сред лакказная активность не детектировалась, было проведено определение наличия генов лакказ в геномах изучаемых грибов.

Известно, что аминокислотные последовательности всех описанных на сегодняшний день лакказ имеют 4 консервативных участка [26]: 61-TSINWHXFQ-69, 106-FWYNSHLSTQY-116, 394-RHPFHLHGH-402 и 449-WFLHCHIDXHL-459 (использована нумерация для аминокислотной последовательности лакказы *Trametes hirsuta*, PDB code 3fpx), где символом X обозначены переменные аминокислотные остатки, входящие в состав консервативного участка. Остатки гистидинов, входящие в состав этих участков, отвечают за координацию ионов меди медного центра T1 и медного кластера T2/T3. В работе [27] описаны праймеры для определения генов лакказ, разработанные для первых двух участков (номера аминокислотных остатков 61–70 и 106–116), с помощью которых можно получить нуклеотидные фрагменты около 200 п.н. Однако, как показано в работе [27], данные праймеры не во всех случаях могут быть использованы. Так в геноме *P. avellanea* и *X. radicata* с помощью данных праймеров генов лакказ обнаружено не было, поэтому были сконструированы новые праймеры. Прямой праймер LacA2 For был подобран на второй консервативный участок последовательностей лакказ (106-FWYNSHLSTQY-116), а для дизайна обратного праймера LacA2 Rev было проведено выравнивание более 100 базидиальных лакказ из банка данных NCBI, в результате чего была определена консервативная последовательность 297-NSAILRY-303. Апробацию ПЦР провели на контрольных штаммах базидиальных грибов, из культуральных жидкостей которых выделены и охарактеризованы классические “голубые” лакказы: *Trametes maxima* 0275 (синоним *Cerrena maxima*), *Trametes ochracea* 093 (синоним *Coriolus zonatus*), *Trametes hirsuta* 072, а также определены полные нуклеотидные последовательности генов лакказ данных базидиомицетов [28]. При использовании пары праймеров LacA2 For – LacA2 Rev ПЦР-продукты амплифицировались во всех исследуемых и контрольных геномах грибов, их размер составлял 750 п.н. (рис. 3а). Специфичность амплификации проверяли секвенированием ПЦР продуктов. Поскольку наличие ПЦР фрагмента с соответствующей лакказе нуклеотидной последовательностью не может гарантировать, что данная последовательность не была амплифицирована с псевдогена, был проведен анализ транскриптома на наличие транскрибируемых генов лакказ методом обратной транскрипции с использованием праймеров LacA2

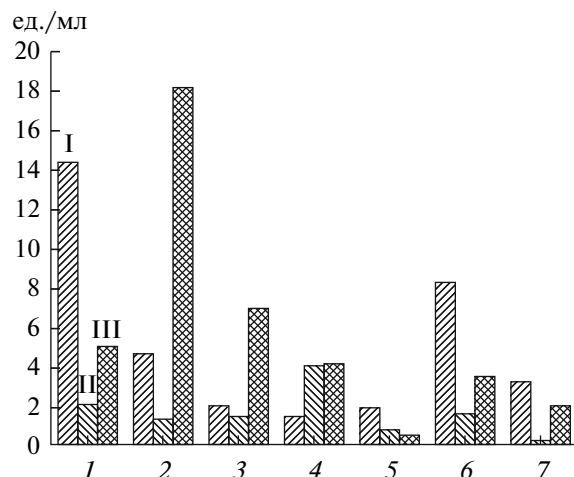


Рис. 2. Среднесуточная лакказная активность, определенная при глубинном культивировании грибов *A. faginea* 1998 (1), *C. caperata* 0677 (2), *L. betulina* 2047 (3), *P. lycii* 2142 (4), *P. ostreatus* 0432 (5), *S. murashkinskyi* 1963 (6), *T. gibbosa* 1911 (7) на средах С-А (I), Г-П (II) и Г-П + Cu (III).

For – LacA2 Rev. ПЦР продукты амплифицировались во всех исследуемых и контрольных геномах грибов, и их размер составил около 550 п.н. (рис. 3б). Таким образом, в геномах всех исследованных в работе базидиомицетов обнаружены экспрессирующиеся гены лакказ (рис. 4). Однако в случае штаммов *P. avellanea* 2009 и *X. radicata* 1795 для синтеза лакказ в условиях глубинного культивирования, по-видимому, необходима оптимизация условий культивирования, поскольку биосинтез этого фермента у разных штаммов грибов белой гнили может различаться и зависеть от многочисленных факторов, в том числе от вида и содержания источников углерода и азота, от наличия индукторов в среде, от фазы биологического цикла гриба и др. [29].

Кластерный анализ. Результаты древовидной кластеризации (рис. 5) показали, что все исследованные в данной работе штаммы грибов можно разделить на две большие группы, обитающие в природе на древесине лиственных пород деревьев разной степени разложения (табл. 1). Анализ экологии грибов, формирующих данные группы, показал, что в первую группу попадают грибы семейств Pleurotaceae, Polyporaceae и Phanerochaetaceae, являющиеся раневыми первичными ксилотрофами или обитателями мертвой, но не сильно разрушенной древесины, а во вторую – семейств Marasmiaceae, Peniophoraceae, Steccherinaceae – вторичные ксилотрофы, предпочитающие уже сильно разложившуюся древесину. Сравнение лигнолитической активности исследуемых штаммов и результатов кластеризации показало, что наиболее активные грибы-лигнолитики относятся к первой группе, что позволяет проводить первичный скрининг эффективных продуцентов лигнолитических фер-

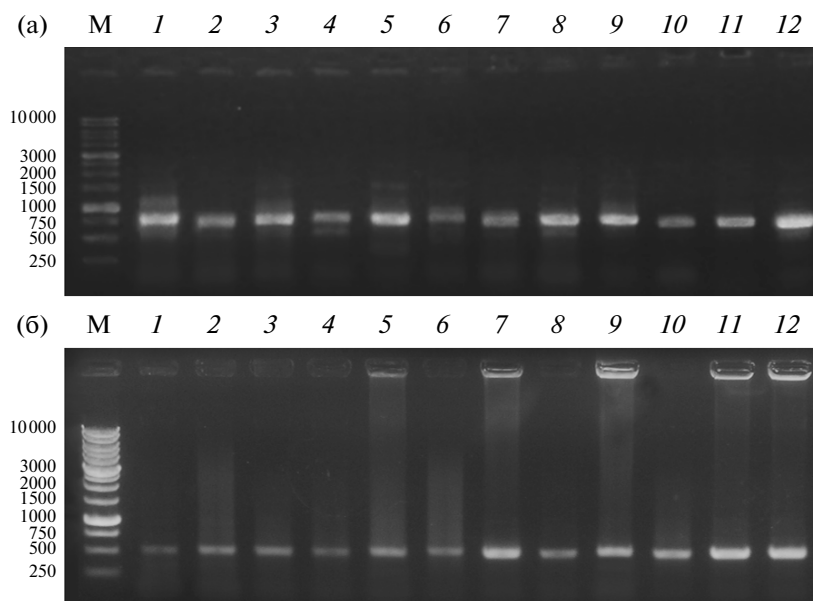


Рис. 3. Электрофорез продуктов амплификации, полученных с помощью ПЦР с использованием праймеров LacA2 For – LacA2 Rev хромосомной ДНК (а) и кДНК (б) исследуемых и контрольных штаммов грибов в 1.2%-ном агарозном геле. 1 – *A. faginea* 1998; 2 – *C. caperata* 0677; 3 – *L. betulina* 2047; 4 – *P. avellanea* 2009; 5 – *P. ostreatus* 0432; 6 – *P. lycii* 2142; 7 – *S. murashkinskyi* 1963; 8 – *T. gibbosa* 1911; 9 – *T. hirsuta** 072; 10 – *T. maxima** 0275; 11 – *T. ochracea** 093; 12 – *X. radicata* 1795; М – ДНК маркеры 1кВ. * – контрольные штаммы.

ментов среди грибов, принадлежащих к различным таксономическим и экологическим группам.

Таким образом, в результате проведенного скрининга обнаружены обладающие высокими лигнолитической активностью и деградационным потенциалом штаммы базидиальных грибов *Coriopsis ca-*

perata 0677, *Lenzites betulina* 2047, *Pleurotus ostreatus* 0432 и *Trametes gibbosa* 1911 – перспективные для дальнейшего использования в биотехнологии.

Работа подготовлена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 11-04-01539, № 11-04-01704), Министерства образования и науки РФ в

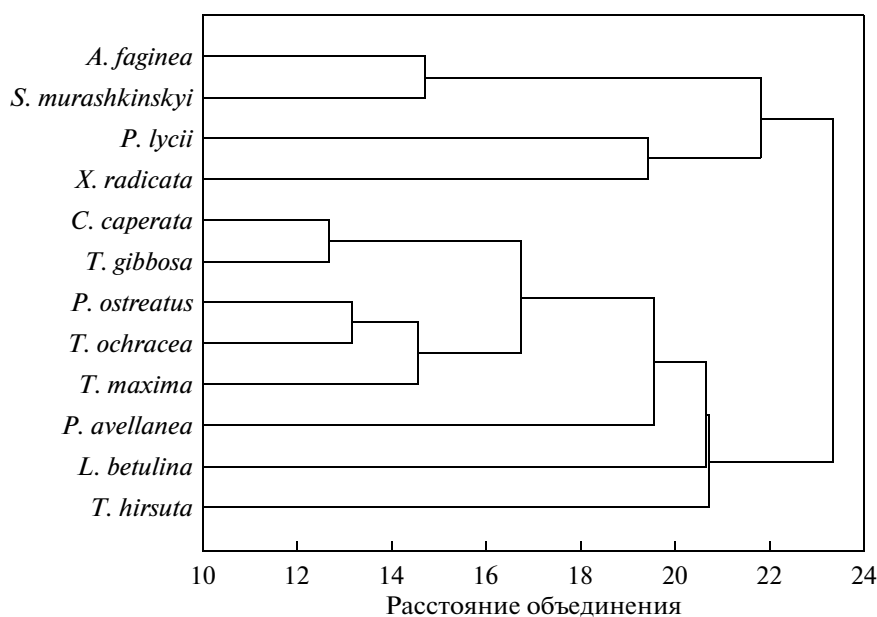


Рис. 5. Древовидная кластеризация исследуемых и контрольных штаммов грибов по лигнолитической активности, определенной методом быстрого скрининга, скорости роста и среднесуточной лакказной активности в процессе глубинного культивирования.

рамках ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы” (государственный контракт № 14.512.11.0067) и Программы ОБН РАН “Биологические ресурсы России”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лантев Л.П., Чаплиев В.Н., Гришин В.Т. // Целлюлоза. Бумага. Картон. 2004. № 1. С. 82–83.
2. Рабинович М.Л., Болобова А.В., Кондращенко В.И. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Т. 1. Древесина и разрушающие ее грибы. М.: Наука, 2001. 264 с.
3. Rezacova V., Hrselova H., Gryndlerova H., Miksik I., Gryndler M. // Soil Biol. Biochem. 2006. V. 38. P. 2293–2299.
4. Solaraska S., May T., Roddick F.A., Lawrie A.C. // Chemosphere. 2009. V. 75. P. 751–758.
5. Lundell T.K., Makela M.R., Hilden K. // J. Basic Microbiol. 2010. V. 50. P. 5–20.
6. Pinedo-Rivilla C., Aleu J., Collado I.G. // Curr. Org. Chem. 2009. V. 13. P. 1194–1214.
7. Rubilar O., Tortella G., Cea M., Acevedo F., Bustamante M., Gianfreda L., Diez M.C. // Biodegradation. 2011. V. 22. P. 31–41.
8. Hernandez-Luna C.E., Gutiérrez-Soto G. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 24. P. 465–473.
9. Nikiforova S.V., Pozdnyakova N.N., Makarov O.E., Chernyshova M.P., Turkovskaya O.V. // Microbiology. 2010. V. 79. P. 456–460.
10. Kachlishvili E., Khardziani T., Metreveli E., Kobakhidze A., Elisashvili V. // J. Waste Conversion, Bioproducts & Biotechnology. 2012. V. 1. P. 9–15.
11. Marr C.D. // Mycotaxon. 1979. V. 9. P. 244–276.
12. Nobles M.K. // Can. J. Botany. 1965. V. 43. P. 1097–1139.
13. Šaššek V. // Karstenia. 1978. V. 18. P. 49–52.
14. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications / Ed. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White. New York, USA: Academic Press Inc., 1990. P. 315–322.
15. Archibald F.S. // Appl. Environ. J. Microbiol. 1992. V. 58. P. 3110–3116.
16. Leonowicz A., Grzywnowicz K. // Enzyme Microbial Technol. 1981. V. 3. P. 55–58.
17. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // Nucleic Acids Research. 1997. V. 25. P. 3389–3402.
18. Stalpers J.A. // Studies in Mycology. 1978. V. 16. P. 1–248.
19. Okino L.K., Machado K.M.G., Fabris C., Bononi V.L.R. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2000. V. 16. P. 889–893.
20. Pointing S.B. // Fungal Diversity. 1999. V. 2. P. 17–33.
21. Daniel G., Volc J., Kubatova E. // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. P. 2524–2532.
22. Gold M.H., Alic M. // Microbiol. Mol. Biol. Reviews. 1993. V. 57. P. 605–622.
23. Pointing S.B., Pelling A.L., Smith G.J.D., Hyde K.D., Reddy C.A. // Mycol. Researches. 2005. V. 109. P. 115–129.
24. Varela E., Guillén F., Martínez A.T., Martínez M.J. // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V. 1546. P. 107–113.
25. Peláez F., Martínez M.J., Martínez A.T. // Mycol. Research. 1995. V. 99. P. 37–42.
26. Valderrama B., Oliver P., Medrano-Soto A., Vazquez-Duhalt R. // Antonie van Leeuwenhoek. 2003. V. 84. P. 289–299.
27. D'Souza T.M., Boominathan K., Reddy C.A. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 3739–3744.
28. Черкашин Е.А., Степанова Е.В., Ландесман Е.О., Королёва О.В., Тишков В.И. // Докл. РАН. 2007. Т. 157. С. 348–351.
29. Elisashvili V., Kachlishvili E. // J. Biotechnol. 2009. V. 144. P. 37–42.

Comparative Analysis of the Ligninolytic Potential of Basidiomycetes Belonging to Different Taxonomic and Ecological Groups

T. V. Fedorova^a, N. V. Shakhova^b, O. I. Klein^a, O. A. Glazunova^a, L. G. Maloshenok^a,
N. A. Kulikova^{a, c}, N. V. Psurtseva^b, and O. V. Koroleva^a

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

e-mail: fedorova_tv@mail.ru

^b Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 197376 Russia

^c Department of Soil Science, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

Received June 7, 2013

Abstract—Screening of the ligninolytic activity of basidiomycetes from the Culture Collection of the Komarov Botanical Institute, Russian Academy of Sciences, belonging to different taxonomic and ecological groups was performed. The patterns of the position of taxa of active producers of ligninolytic enzymes in the modern system of fungi were identified. Cluster analysis showed that the group of fungi with the greatest ligninolytic and degradation potential includes representatives of the families Pleurotaceae, Polyporaceae, and Phanerochaetaceae, which perform the first stages of wood decomposition. As a result, species of interest for the further study of their oxidative potential and use in biotechnology were selected.

УДК 582.282.123.4:577.152.34

ОБРАЗОВАНИЕ МИКРОМИЦЕТОМ *Aspergillus ochraceus* ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ – АКТИВАТОРОВ ПРОТЕИНА С ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ГЛУБИННОМ И ТВЕРДОФАЗНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

© 2013 г. А. А. Осмоловский*, В. Г. Крейер*, Н. А. Баранова*, А. В. Кураков*, Н. С. Егоров**

*Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

**Международный биотехнологический центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 30.05.2013 г.

Проведена оптимизация условий глубинного и твердофазного культивирования микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ F-4104D – продуцента внеклеточных протеиназ – активаторов протеина С плазмы крови человека. Показано, что в условиях твердофазного культивирования активаторная к протеину С активность микромицета в 1.5–3.5 раза выше по сравнению с глубинным культивированием из расчета на 1 мл питательной среды. Среди внеклеточных белков, секретируемых *A. ochraceus* ВКМ F-4104D при глубинном и твердофазном культивировании обнаружена активирующая протеин С протеиназа с pI 6.0–6.3.

DOI: 10.7868/S0555109913060147

Протеин С является одним из главных компонентов антикоагулянтной системы человека. В результате ограниченного протеолиза под воздействием комплекса тромбин–тромбомодулин этот белок превращается в свою активную форму – активированный протеин С, который играет важную роль в контроле тромбообразования, блокировании воспаления и ингибировании апоптоза, изменяет профиль экспрессии генов в эндотелиальных клетках [1–3]. Недостаточность содержания протеина С в плазме крови приводит к риску возникновения тромбоэмболических осложнений. Для определения концентрации этого белка в плазме были разработаны диагностические препараты, в состав которых входят протеиназы – активаторы протеина С, выделенные из яда змеи щитомордника *Agkistrodon contortrix contortrix* [4, 5].

Ранее была установлена способность внеклеточных протеиназ, образуемых рядом штаммов микромицета *Aspergillus ochraceus*, активировать протеин С плазмы крови человека [6], что делает их перспективными альтернативными источниками для получения активаторов протеина С.

Образование протеолитических ферментов мицелиальными грибами зависит от способа культивирования. Одним из перспективных способов культивирования микромицетов – продуцентов внеклеточных ферментов является твердофазное культивирование (ТФК) на твердых увлажненных и влагоемких субстратах (отрубях, жмыхах) или же

на инертных носителях (пенополиуретан, перлит и др.) с добавлением питательной среды [7–9]. Такой способ в отличие от глубинного культивирования имитирует естественные физиологические условия для роста грибов. По сравнению с глубинным культивированием, при ТФК мицелиальных грибов, наблюдается более высокий выход ферментов в связи с различиями в экспрессии генов, ответственных за синтез внеклеточных ферментов, а также отличия в физико-химических, кинетических и структурных свойствах секретируемых белков [10, 11].

Представители *A. ochraceus* образуют внеклеточные ферменты, активные в отношении белков системы гемостаза, а именно протеиназы с фибринолитической, коагулазной и антикоагулянтной активностями [12, 13]. Важным фактором, определяющим максимальное образование внеклеточных протеолитических ферментов мицелиальными грибами, являются источники азота в составе питательной среды [14–17]. Особый интерес представляет подбор среды с таким источником азота, на которой штамм проявляет максимальную активаторную к протеину С активность и минимальные значения других протеолитических активностей или их отсутствие.

Цель работы – оптимизация условий образования протеиназ – активаторов протеина С микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D при глубинном и твердофазном культивировании.

МЕТОДИКА

Объект исследования. Использовали штамм микелиального микроскопического гриба *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, отобранный в ходе предыдущих исследований как наиболее активный продуцент внеклеточных протеиназ — активаторов протеина С [6]. Для получения посевного материала микромицет выращивали в пробирках на скошенном сусло-агаре в течение 7 сут при 25°C.

Глубинное культивирование *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. С поверхности культуры, выращенной на скошенном сусло-агаре, делали смыв спор и вносили в качалочную колбу емкостью 750 мл со 100 мл питательной среды, содержащей в качестве источников углерода и азота сусло, глюкозу и пептон [18]. Культивирование проводили на орбитальной качалке (200 об/мин) в течение 2 сут при 28°C. Часть полученной биомассы переносили в ферментационные среды, отличающиеся источниками азота, в качестве которых были использованы соевая мука, гидролизат рыбной муки, пептон и нитрат натрия.

Исходной служила среда № 1, содержащая (%): глюкозу — 3.5, крахмал — 1.0, соевую муку — 0.2, гидролизат рыбной муки — 0.5, пептон — 0.5, NaCl — 0.2, KH_2PO_4 — 0.05, MgSO_4 — 0.05 [5].

В среде № 2 единственным источником азота был NaNO_3 (0.5%), в средах № 3 и № 4 — пептон или гидролизат рыбной муки, соответственно.

В среде № 5 из состава исходной среды № 1 была исключена соевая мука, а среда № 6 содержала все компоненты среды № 1 и NaNO_3 (0.5%).

Исходное значение pH этих сред устанавливали на уровне 5.5.

Оптимальный срок культивирования штамма *A. ochraceus* ВКМ F-4104D на вышеуказанных средах составлял 2 сут [6].

Оптимальные значения pH и температуры для образования протеиназ — активаторов протеина С определяли в диапазоне pH 3–9 (с интервалом через единицу) и при температурах культивирования 24, 28, 32 и 34°C на среде, на которой штамм проявлял наибольшую активаторную к протеину С активность.

Твердофазное культивирование *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. В конические колбы объемом 250 мл вносили пшеничные отруби или один из инертных носителей — пенополиуретан (в виде кубиков размером 5.0 × 5.0 × 5.0 мм), перлит, силикагель и вермикулит, стерилизовали и добавляли стерильную ферментационную среду, состав которой был аналогичен оптимальному составу для глубинного культивирования штамма. Оптимальное соотношение между количеством пшеничных отрубей или носителей и добавляемой ферментационной среды, как и продолжительность культивирования, определяли в предварительных эксперимен-

тах в зависимости от влагоемкости субстрата или носителя. В опыте с пшеничными отрубями количество субстрата и объем вносимой ферментационной среды составили — 5 г и 15 мл, с пенополиуретаном — 2.5 г и 20 мл, с перлитом — 5 г и 15 мл, с силикагелем — 10 г и 15 мл и вермикулитом — 5 г и 25 мл соответственно. Засев осуществляли 1 мл споровой суспензии, полученной путем смыва спор выращенной на сусло-агаре культуры. Культивирование *A. ochraceus* ВКМ F-4104D проводили в стационарных условиях при 28°C. Для элюции протеолитических ферментов использовали 0.05 М трис-HCl-буфер, pH 8.2. В колбы с пшеничными отрубями и с пенополиуретаном добавляли по 50 мл буфера, с перлитом и с силикагелем — по 20 мл, с вермикулитом — по 35 мл, после чего помещали на орбитальную качалку (200 об/мин) на 60 мин.

Биомассу определяли весовым методом, высушивая ее при 86°C до постоянной массы и рассчитывали в мг на мл ферментационной среды. В случае ТФК биомассу рассчитывали как разницу между весом высушенных биомассы с носителем и самого носителя.

Получение препаратов внеклеточных протеиназ. Препараты протеиназ культуральной жидкости (КЖ) *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, выращенного глубинным или твердофазным способами, получали путем осаждения внеклеточных белков сульфатом аммония при 80%-ном насыщении. Осадок отделяли центрифугированием при 15000 g в течение 20 мин при 4°C, растворяли в минимальном объеме 0.01 М аммоний-ацетатного буфера, pH 7.5, и диализовали в диализных мешках против этого же буфера при 4°C в течение 12 ч. Диализованный раствор белков центрифугировали в тех же условиях для удаления нерастворимой части осадка, замораживали в жидком азоте и лиофильно высушивали. Полученные препараты хранили при –20°C.

Изоэлектрофокусирование препаратов протеиназ. Для разделения протеолитических ферментов в полученных препаратах и изучения их качественного и количественного состава проводили изоэлектрофокусирование по методу Вестерберга при 4°C в градиенте pH амфолинов 3.5–10 и градиенте плотности сахарозы 0–40% в колонке объемом 110 мл фирмы “LKB” (Швеция) при напряжении 800 В в течение 36 ч [29]. В колонку вносили по 20–25 мг белка каждого препарата. По окончании изоэлектрофокусирования содержимое колонки собирали по фракциям объемом 1.5 мл, в которых определяли поглощение белка при 280 нм, pH и протеолитическую активность.

Определение протеолитической активности. Активность протеиназ *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в КЖ при глубинном культивировании и элюате после твердофазного культивирования определяли

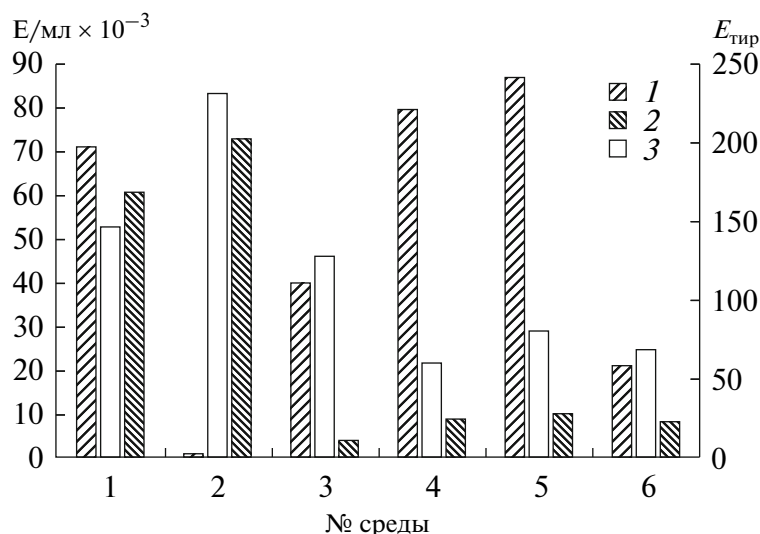


Рис. 1. Влияние источников азота на образование внеклеточных протеиназ *A. ochraceus* BKM F-4104D. 1 — активаторная к протеину С активность, 2 — тромбиноподобная активность, 3 — общая протеолитическая активность.

после предварительного отделения биомассы фильтрованием.

Общую протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона [19] и выражали в мкмоль тирозина, образовавшегося в течение 1 мин в 1 мл культуральной жидкости ($E_{\text{тир}}$).

Активаторную к протеину С активность определяли по расщеплению хромогенного пептидного субстрата пироглутамил-L-пролил-L-аргинил-L-нитроанилида (pGlu-Pro-Arg-pNA), тромбиноподобную активность — по расщеплению тозил-L-глицил-L-пролил-L-аргинил-L-нитроанилида (Tos-Gly-Pro-Arg-NA) как описано нами ранее [6]. Измерение оптической плотности проводили при 405 нм на спектрофотометре Hitachi 200-20 (Япония). За единицу активности (E) принимали количество мкмоль отщепившегося *n*-нитроанилина в 1 мл культуральной жидкости за 1 мин. В случае твердофазного культивирования активность протеиназ рассчитывали по формуле $E_{\text{ТФК}} = (A_{405}(V_c + V_6)K)/V_c$, где A_{405} — поглощение при 405 нм, V_c — объем среды, V_6 — объем добавленного для элюции буфера и K — коэффициент, рассчитанный по калибровочной кривой.

Определение белка. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд и спектрофотометрически, измеряя поглощение при 280 нм.

Электрофорез белков в ПААГ проводили по методу Дэвиса в трис-глициновом буфере, pH 8.3 [21] с концентрацией акриламида в верхнем концентрирующем геле 6.0% и в разделяющем нижнем — 7.5%. Для прокраски гелей использовали 0.08%-ный раствор кумасси бриллиантового синего G-250 в 3.5%-ной хлорной кислоте [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения влияния источников азота на образование протеиназ штаммом *A. ochraceus* BKM F-4104D при глубинном культивировании представлены на рис. 1. Активаторная к протеину С активность обнаружена на всех средах, содержащих белковые субстраты. Общую протеолитическую активность штамм проявлял как на средах с белковыми, так и неорганическим источником азота, причем максимальных значений она достигала на среде с нитратом натрия (среда № 2). Активаторная к протеину С активность у штамма на этой среде, напротив, практически отсутствовала. Добавление к среде с нитратом натрия белковых субстратов индуцировало образование протеиназ — активаторов протеина С (среда № 6). Максимальное ее значение было отмечено на среде № 5 с пептоном и гидролизатом рыбной муки и составило $86.6 \text{ E/ml} \times 10^{-3}$, что на 5.5 и 51.5% больше, чем на средах, содержащих эти компоненты по отдельности (№№ 3 и 4 соответственно) и на 18% больше, чем на исходной среде № 1 с тремя источниками белкового азота.

При культивировании *A. ochraceus* BKM F-4104D на изученных средах не наблюдали корреляции активаторной к протеину С, общей протеолитической и тромбиноподобной активности (рис. 1). Наибольших значений тромбиноподобная активность достигала на среде с минеральным источником азота (среда № 2), при этом активаторная к протеину С активность была минимальной. При глубинном культивировании *A. ochraceus* на среде № 1 время накопления максимальной тромбиноподобной, активаторной к протеину С и общей протеолитической активности не совпадали [6].

Таблица 1. Образование протеиназ — активаторов протеина *S. A. ochraceus* ВКМ F-4104D при ТФК

Субстрат/носитель	Количество питательной среды, мл/г субстрата (носителя)	Продолжительность культивирования для проявления максимальной активности, сут	Активаторная к протеину С активность, Е/мл $\times 10^{-3}$	Продуктивность мицелия, Е/мг биомассы $\times 10^{-3}$
Пшеничные отруби	3	5	116.3	—*
Пенополиуретан	8	5	131.8	6.1
Перлит	3	7	90.6	6.5
Силикагель	1.5	4	200.0	15.8
Вермикулит	5	7	300.0	22.7

* Не определяли.

Влияние начального значения pH среды и температуры на образование протеиназ — активаторов протеина *S. A. ochraceus* ВКМ F-4104D было изучено на оптимальной для секреции этих ферментов среде (среда № 5). Наибольшая активаторная к протеину С активность у изучаемого микромицета наблюдалась при pH 6.0–7.0. При подкислении среды до pH 4.0 активаторная к протеину С активность снижалась в 3.5–4 раза, а при подщелачивании до pH 9.0 — в 1.5–2 раза. При pH 3.0 культура не проявляла активаторной к протеину С активности. Влияние температуры в интервале 24–32°C на секрецию изучаемого фермента было незначительным, а при температуре выше 32°C происходило снижение образования протеиназ — активаторов протеина С.

Таким образом, оптимальными условиями для образования активаторов протеина С микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D при глубинном культивировании (200 об/мин) была среда № 5 с пептоном и рыбным гидролизатом в качестве источников азота, исходное значение pH среды 6.5 и температура 28°C.

Условия, обеспечивающие максимальную секрецию микромицетом *A. ochraceus* ВКМ F-4104D протеиназ с активаторной к протеину С активностью при глубинном культивировании, были использованы при твердофазном культивировании продуцента. Продолжительность культивирова-

ния и соотношение количества ферментационной среды и пшеничных отрубей или инертных носителей были установлены в предварительных опытах и приведены в табл. 1.

Образование протеиназ с активаторной к протеину С активностью культурой *A. ochraceus* ВКМ F-4104D происходило при его росте как на натуральном субстрате — пшеничных отрубях, так и на инертных носителях (табл. 1). Максимальные значения активности протеиназ — активаторов протеина С у изучаемого штамма наблюдали на вермикулите (300.0 Е/мл $\times 10^{-3}$ на 7 сут культивирования) и силикагеле (200.0 Е/мл $\times 10^{-3}$ на 4 сут). При выращивании *A. ochraceus* ВКМ F-4104D с использованием пенополиуретана активность фермента была несколько ниже (131.8 Е/мл $\times 10^{-3}$), а минимальная активность активаторов протеина С была при ТФК *A. ochraceus* ВКМ F-4104D на перлите и пшеничных отрубях — 90.6 Е/мл $\times 10^{-3}$ на 7 сут и 116.3 Е/мл $\times 10^{-3}$ на 5 сут соответственно. Однако, даже в этих случаях образование протеиназ — активаторов протеина С штаммом гриба было выше, чем при глубинном культивировании. Активаторная к протеину С активность при ТФК на силикагеле была в 2.3, а на вермикулите в 3.5 раза выше по сравнению с глубинным культивированием продуцента (табл. 1).

Продуктивность мицелия *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, рассчитанная на мг биомассы, также была значитель-

Таблица 2. Активаторная к протеину С и общая протеолитическая активность внеклеточных протеиназ *A. ochraceus* ВКМ F-4104D при глубинном и твердофазном культивировании на вермикулите

Показатель	Глубинное культивирование		ТФК	
	культуральная жидкость	препарат протеиназ	культуральная жидкость	препарат протеиназ
Общий белок, мг/мл	17.9	15.4	37.3	24.5
Удельная активаторная к протеину С активность, Е/мг белка $\times 10^{-3}$	4.6	5.3	7.8	8.5
Удельная общая протеолитическая активность, $E_{\text{тир}}$ /мг белка	11.7	18.9	15.0	21.3

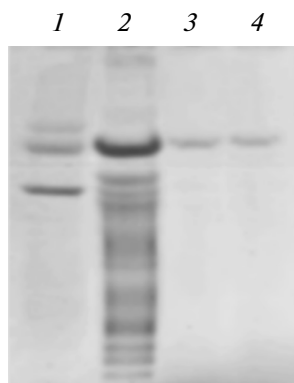


Рис. 2. Электрофорез внеклеточных белков микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. 1 — препарат белков, полученных при глубинном культивировании микромицета; 2 — препарат белков, полученных при твердофазном культивировании микромицета; 3 — протеиназа — активатор протеина С после ИЭФ препарата после глубинного культивирования; 4 — протеиназа — активатор протеина С после ИЭФ препарата после ТФК.

но выше в условиях ТФК. Так, при глубинном культивировании микромицета продуктивность составила $4.7 \text{ Е/мг} \times 10^{-3}$, а при ТФК оказалась в 1.3–4.8 раза выше, в зависимости от носителя (табл. 1).

В препарате протеиназ *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, полученном при ТФК на вермикулите, содержание белка было в 2 раза, а удельная общая протеолитическая и активаторная к протеину С активность оказались в 1.1 и 1.6 раза больше, соответственно, по сравнению с препаратом протеиназ, полученном при глубинном культивировании (табл. 2). Кроме того, как видно из рис. 2, при ТФК *A. ochraceus* ВКМ F-4104D секретирует большее

количество внеклеточных белков по сравнению с глубинным культивированием.

Изоэлектрофокусирование препарата внеклеточных белков, полученного при глубинном культивировании *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, выявило два пика с протеолитической активностью. Фракции белков пика 1 с pI 4.7–4.9 обладали общей протеолитической активностью. Белки пика 2 с pI 6.0–6.2 наряду с общей протеолитической активностью проявляли активаторную к протеину С и тромбиноподобную активность (рис. 3). В препарате внеклеточных протеиназ при ТФК было также два активных пика с pI 5.3–5.5 и 6.1–6.3. Протеиназы обоих пиков проявляли как общую протеолитическую, так и тромбиноподобную активности, а активаторную к протеину С активность наблюдали только во втором пике (рис. 4). Электрофоретический анализ фракций, проявивших активаторную к протеину С активность после изоэлектрофокусирования препаратов, полученных после глубинного и твердофазного культивирования, выявил в каждой из них по одной белковой зоне, обладавшей активаторной к протеину С активностью (рис. 2).

Интересно отметить, что по проявлению высокой тромбиноподобной активности с хромогенным пептидным субстратом Tos-Gly-Pro-Arg-pNA и значению pI в области pH 6.0–6.3 протеиназа — активатор протеина С микромицета *A. ochraceus* сходна с активатором протеина С из яда змеи *A. contortrix* [23].

Таким образом, установлено, что активаторная к протеину С активность внеклеточной протеиназы микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D индуцируется белковыми субстратами в среде для культивирования. В препаратах внеклеточных белков *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, полученных как

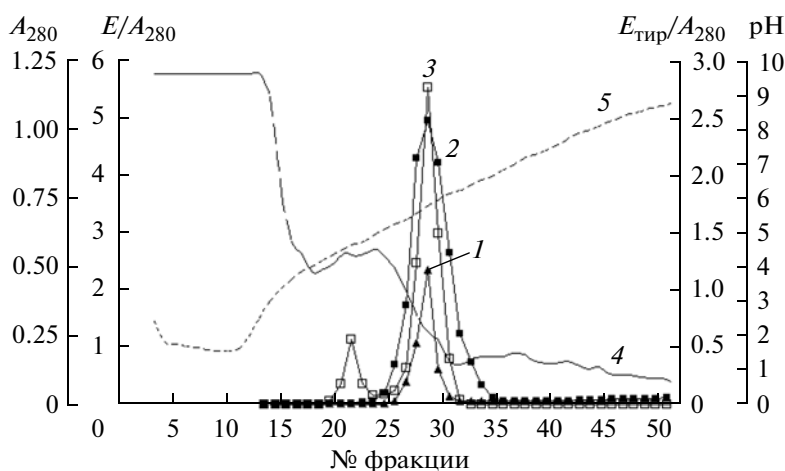


Рис. 3. Изоэлектрофокусирование комплексного препарата протеиназ *A. ochraceus* ВКМ F-4104D после глубинного культивирования. 1 — активаторная к протеину С активность, 2 — тромбиноподобная активность, 3 — общая протеолитическая активность, 4 — белок, 5 — pH.

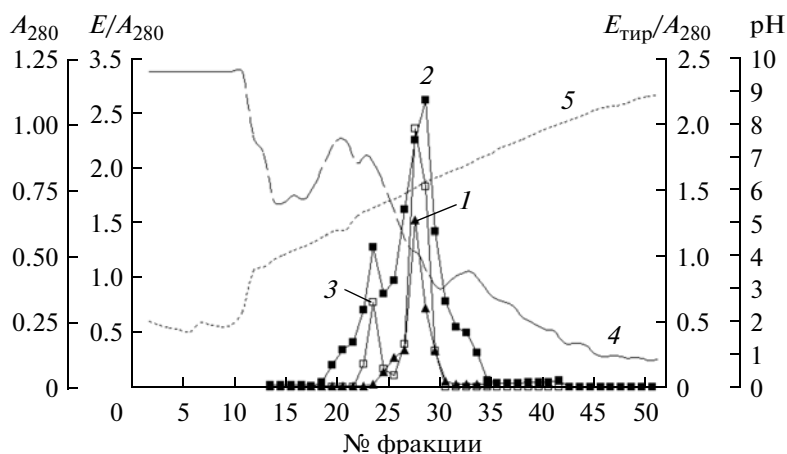


Рис. 4. Изоэлектрофокусирование комплексного препарата протеиназ *A. ochraceus* BKM F-4104D после ТФК на вермикулите. 1 — активаторная к протеину С активность, 2 — тромбиноподобная активность, 3 — общая протеолитическая активность, 4 — белок, 5 — pH.

при глубинном культивировании, так и при ТФК обнаружена протеиназа с активаторной к протеину С активностью с рИ 6.0–6.3. Подобранные оптимальные условия культивирования микромицета для образования этого фермента: источник азота, температура, pH, для ТФК — носитель. Сравнение исследованных способов культивирования для получения внеклеточных протеиназ — активаторов протеина С при выращивании *A. ochraceus* BKM F-4104D показало большую эффективность ТФК.

Авторы глубоко благодарны Ж.Д. Беспаловой (лаборатория синтеза пептидов отдела биотехнологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса (Москва)) за любезно предоставленные хромогенные субстраты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Струкова С.М. // Биохимия. 2004. Т. 69. № 10. С. 1314–1331.
2. Dahlbäck B., Villoutreix B.O. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2005. V. 25. № 7. P. 1311–1320.
3. Mosnier L.O., Zlokovich B.V., Griffin J.H. // Blood. 2007. V. 109. № 3. P. 3161–3172.
4. Gempeler-Messina P.M., Müller C. // Toxin Rev. 2006. V. 25. № 4. P. 335–349.
5. Stoker K., Fisher H., Meier J., Brogli M., Svedsen L. // Toxicon. 1987. V. 25. № 3. P. 239–252.
6. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 5. С. 537–542.
7. Barrios-González J. // Process Biochem. 2012. V. 47. № 2. P. 175–185.
8. Pandey A., Selvakumar P., Socol C.R., Nigam P. // Current Science. 1999. V. 77. № 1. P. 149–162.
9. Hölker U., Höfer M., Lenz J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 64. P. 175–186.
10. Acuña-Argüelles M.E., Gutiérrez-Rojas M., Viniegra-González G., Favela-Torres E. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995. V. 43. № 5. P. 808–814.
11. Renovato J., Rodríguez-Durán L.V., Rodríguez R., Aguilar C.N. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. V. 165. № 1. P. 382–395.
12. Ключевская В.В., Егоров Н.С. // Микробиология. 1983. Т. 52. № 3. С. 396–403.
13. Ландау Н.С., Кураков А.В., Гуликова О.М., Батомункеева Б.П., Струкова С.М., Егоров Н.С. // Микробиология. 1998. Т. 67. № 2. С. 215–220.
14. Jarai G., Buxton F. // Current Genetics. 1994. V. 26. P. 238–244.
15. Дунаевский Я.Е., Белякова Г.А., Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А. // Микробиология. 1995. Т. 64. № 3. С. 327–330.
16. Блешева Р.К., Сафуани Ж.Е., Исканбаева Ж.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 2. С. 213–216.
17. Кудрявцева Н.Н., Гвоздева Е.Л., Софьин А.В., Валуева Т.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 3. С. 355–362.
18. Батомункеева Б.П., Егоров Н.С. // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 602–606.
19. Егоров Н.С., Ландау Н.С., Буяк Л.И., Крейер В.Г. // Микробиология. 1991. Т. 60. № 4. С. 637–643.
20. Vesterberg O. // Biochem. Biophys. Acta. 1972. V. 257. № 1. P. 11–19.
21. Davis B.J. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1946. V. 121. № 2. P. 404–427.
22. Holbrook I.B., Leaver A.G. // Anal. Biochem. 1976. V. 75. № 2. P. 634–636.
23. Orthner C.L., Brattacharia P., Strickland D.K. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 7. P. 2558–2564.

Production of Extracellular Proteinases (Protein C Activators in Blood Plasma) by the Micromycete *Aspergillus ochraceus* during Submerged and Solid-State Cultivation

A. A. Osmolovskii^a, V. G. Kreier^a, N. A. Baranova^a, A. V. Kurakov^a, and N. S. Egorov^b

^a Department of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^b International Biotechnological Center, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
e-mail: aosmol@mail.ru

Received

Abstract—The conditions for the submerged and solid-state cultivation of the micromycete *Aspergillus ochraceus* VKM F-4104D, producing extracellular proteinases that activate protein C in human blood plasma, were optimized. It is shown that the protein C-activating activity of the micromycete in a solid-state culture was 1.5–3.5 times higher than in a submerged culture (as calculated per milliliter of culture medium). Among the extracellular proteins secreted by *A. ochraceus* VKM F-4104D during submerged and solid-state cultivation, a protein C-activating proteinase with a pI of 6.0–6.3 was identified.

UDC 579.61

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF FUNGAL METABOLITE NIGERLOXIN *IN VITRO*

© 2013 B. S. Suresha and K. Srinivasan

Department of Biochemistry and Nutrition, Central Food Technological Research Institute, CSIR, Mysore – 570 020, India
e-mail: ksri.cftri@gmail.com

Received November 26, 2012

We have recently reported the beneficial influence of the fungal metabolite nigerloxin, a new aldose reductase inhibitor and a lipoxygenase inhibitor on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats. In the present study we have investigated the antioxidant potential of nigerloxin *in vitro* as compared to one of the well known natural antioxidant, curcumin. The fungal metabolite nigerloxin was found to be an effective antioxidant in different *in vitro* assays including the phosphomolybdenum, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS^{•+}) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods. The antioxidant potency of nigerloxin may be attributed to its electron donating nature. The ferric reducing potency of nigerloxin as demonstrated by FRAP assay method was even found to be superior to that of the natural antioxidant curcumin.

DOI: 10.7868/S0555109913060172

The role of free radicals (molecular species carrying one or more unpaired electrons in their molecular orbitals) in the pathogenesis of many diseases is well documented [1]. In biological systems cellular metabolism is the most important source of production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). ROS and RNS include radicals such as superoxide ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl ($OH^{\cdot}$), hydroperoxyl ($HO_2^{\cdot}$), alkoxy ($RO^{\cdot}$), peroxy ($ROO^{\cdot}$), nitric oxide ($NO^{\cdot}$), nitrogen dioxide ($NO_2^{\cdot}$) and lipid peroxy ($LOO^{\cdot}$) [2]. The deleterious influence of free radicals on biological system is termed oxidative and nitrosative stresses [3–5]. These stresses may be due to overproduction of ROS/RNS or deficiency of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in biological system. Some of other non radicals like hydrogen peroxide (H_2O_2), hypochlorous acid ($HOCl$), ozone (O_3), peroxynitrite ($ONOO^-$), nitrous acid (HNO_2), dinitrogen trioxide (N_2O_3), lipid peroxide ($LOOH$) are also termed as oxidants and they are capable of leading to free radical reactions in living organisms.

The toxic influence of oxidative stress in many pathological conditions including cardiovascular disease, cancer, neurological disorders, diabetes, ischemia/reperfusion, other diseases and ageing has been well studied [6–9]. Compounds capable of donating electrons or hydrogen atom are able to protect from deleterious influence of free radicals. Antioxidants have exhibited beneficial influence in many pathological conditions [10]. There are several novel approaches in the study of free radicals/antioxidants for the improvement of human health.

A new aldose reductase inhibitor molecule of [2-amido-3-hydroxy-6-methoxy-5-methyl-4-(prop-1'-enyl) benzoic acid] (nigerloxin) obtained from solid-state fermentation of *Aspergillus niger* CFR-W-105 has been reported to exhibit inhibitory activity on the partially purified aldose reductase and lipoxygenase *in vitro* [11]. Animal study have been recently carried out to verify if this fungal metabolite exhibits aldose reductase inhibitory activity *in vivo* and to examine the influence of nigerloxin on modulation of the renal and retinal lesions [12] associated with diabetes in experimental rats, by virtue of its aldose reductase inhibitory potential. The aim of the study was to assess antioxidant potential of nigerloxin *in vitro* as compared to one of the major natural antioxidant, curcumin.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Nigerloxin was produced through solid state fermentation of *A. niger* CFR-W-105 (Central Food Technological Research Institute, Mysore, India) according to the procedure given by Rao et al. [13]. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH); 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS); 2,4,6-tris-(2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ); dimethyl sulfoxide (DMSO) and curcumin were obtained from Sigma-Aldrich (USA). All other chemicals and solvents used were of analytical grade obtained from Sisco Research Laboratories (India).

Antioxidant capacity of nigerloxin assessed by phosphomolybdenum method. Antioxidant potential of nigerloxin was evaluated by the protocol given by Prieto et al. [14] and compared with that of curcumin. Brief-

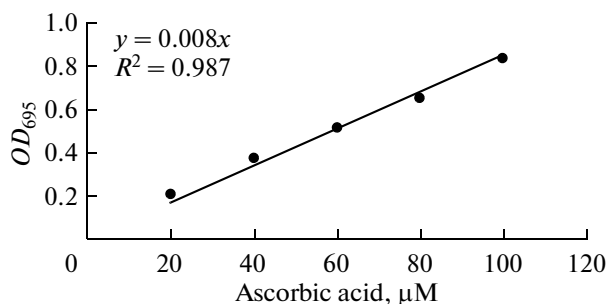


Fig. 1. The linear regression curve of ascorbic acid.

ly, nigerloxin (2–10 μg) or curcumin (2–10 μg) taken in different concentrations in 10 μL of DMSO was added to 1.0 mL of reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). Blank solution was constituted by adding 10 μL of DMSO in place of sample solution with 1 mL of reagent. The tubes were capped and incubated in a boiling water bath for 90 min. After the samples had cooled to room temperature, the OD₆₉₅ was measured against blank. Ascorbic was used as a standard and antioxidant capacities of nigerloxin and curcumin were expressed as ascorbic acid equivalents (μmol/mg of sample).

Free radical scavenging activity of nigerloxin assessed by DPPH assay. The DPPH radical scavenging potential of nigerloxin and curcumin were determined according to the method of Hatano et al. [15]. Briefly, nigerloxin (5–50 μg) or curcumin (2–10 μg) taken in different concentrations in 10 μL of DMSO, was mixed with 1 mL of 0.2 mM DPPH in methanol. The mixture was vigorously shaken and incubated at 28°C for 30 min. The absorbance was measured at 517 nm. The free radical quenching ability of nigerloxin and curcumin were determined as percentage decrease in the absorbance with respect to control having appropriate concentration of solvent. The effective concentration (EC₅₀) value was determined as the concentration of the sample required to reduce 50% of the absorbance with respect to control. Inhibition of free radical DPPH was calculated as follows:

$$\begin{aligned} \text{Inhibition of DPPH radical \%} &= \\ &= (OD_{\text{control}} - OD_{\text{sample}}) \times 100 / OD_{\text{control}}. \end{aligned}$$

ABTS radical cation decolorization assay. The ABTS radical scavenging activity was determined according to the protocol given by Re et al. [16]. ABTS radical was generated by incubating a mixture of 2 mM ABTS and 2.45 mM potassium persulfate in water for 16 h in the dark at room temperature. The ABTS radical solution was diluted with ethanol to produce absorbance of around 0.7 at 734 nm. Nigerloxin (5–50 μg) or curcumin (2–10 μg) taken in different concentrations in 10 μL of DMSO was mixed with 1 mL of pre-diluted ABTS radical solution. The mixture was vigorously

shaken and incubated at room temperature for 30 min and OD₇₃₄ was recorded. The percentage of radical scavenging was calculated for each concentration relative to a blank containing appropriate amount of solvent using the following equation and EC₅₀ value was expressed in μmol.

$$\begin{aligned} \text{Inhibition of ABTS radical \%} &= \\ &= (OD_{\text{control}} - OD_{\text{sample}}) \times 100 / OD_{\text{control}}. \end{aligned}$$

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. The ferric reducing potential of nigerloxin and curcumin were estimated by the procedure given by Benzie and Strain [17]. The reagent was constituted by adding 2.5 mL of a 10 mM TPTZ solution in 40 mM HCl, 2.5 mL of 20 mM FeCl₃ · 6H₂O and 25 mL of 300 mM acetate buffer, pH 3.6. Reagent was freshly prepared and warmed at 37°C before used. From one to five μg of nigerloxin or curcumin in several concentrations was prepared in 10 μL of DMSO and added to 1 mL of FRAP reagent. Reaction mixture was mixed thoroughly and incubated at 37°C for 30 min and OD₅₉₃ was recorded. Ferrous sulphate was used as standard and FRAP value was expressed as mM of ferrous sulphate equivalents/mg sample.

RESULTS

A dose-dependent antioxidant influence of nigerloxin and curcumin on phosphomolybdenum complex is shown in Fig. 1 and 2. The regression curve of ascorbic acid was constructed by plotting absorbance against concentration and antioxidant potency of nigerloxin and curcumin were calculated using regression equation. The antioxidant potential of nigerloxin and curcumin by this method was found to be 3791 and 4684 μM of ascorbic acid equivalents/mg, respectively. DPPH radical scavenging potential of nigerloxin and curcumin are presented in Fig. 3. Nigerloxin scavenged DPPH radical in a dose-dependent manner. Nigerloxin and curcumin exhibited EC₅₀ value at the concentration of 68.56 and 22.57 μM against DPPH radicals, respectively.

The dose-dependent inhibition of ABTS radical by nigerloxin and curcumin is shown in Fig. 4. Nigerloxin and curcumin potentially scavenged this radical and the EC₅₀ value was found to be 8.97 μM and 6.75 μM, respectively. The ferric ion reducing potential of nigerloxin and curcumin is presented in Fig. 5 and 6. The linear regression curve, absorbance against concentration of ferrous sulphate was constructed and regression equation was used to calculate the reducing strength of nigerloxin and curcumin. Nigerloxin and curcumin reduced ferric complex in a dose depended manner. The FRAP value of nigerloxin and curcumin was found 14.44 and 8.20 mM ferrous sulphate equivalents/mg, respectively.

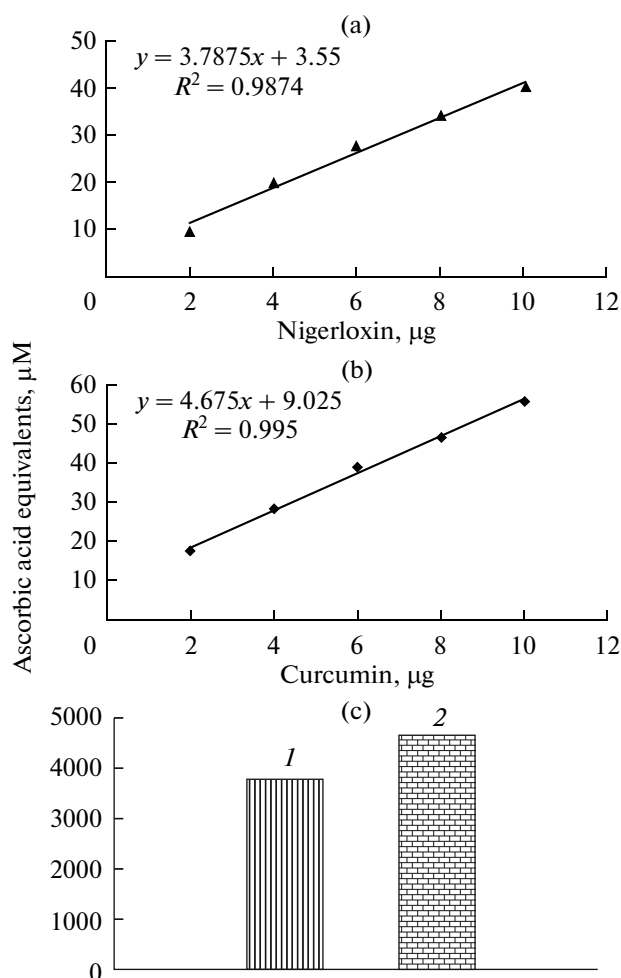


Fig. 2. Antioxidant capacities of nigerloxin (a) and curcumin (b) and comparison of them (c) for nigerloxin (1) and curcumin (2) assessed by phosphomolybdenum method.

DISCUSSION

The beneficial influence of fungal metabolite nigerloxin on the diabetes induced oxidative stress has been recently studied in experimental rats in the context of oxidative stress playing a key role in the progression of diabetes and its complications [18]. Administration of nigerloxin for 30 days at a daily dose of 100 mg/kg of body weight to diabetic rats significantly decreased the plasma and liver lipid peroxides and elevated the non-enzymatic antioxidants – ascorbic acid, reduced glutathione, and total thiols, and the activities of antioxidant enzymes in blood and liver.

This prompted us to examine the antioxidant potential of nigerloxin *in vitro* to assess it in comparison to the well known natural antioxidant biomolecule, curcumin. Curcumin is a natural antioxidant biomolecule present in turmeric (*Curcuma longa*). Several assay methods have been frequently used to estimate antioxidant potentials. In the present study mainly four

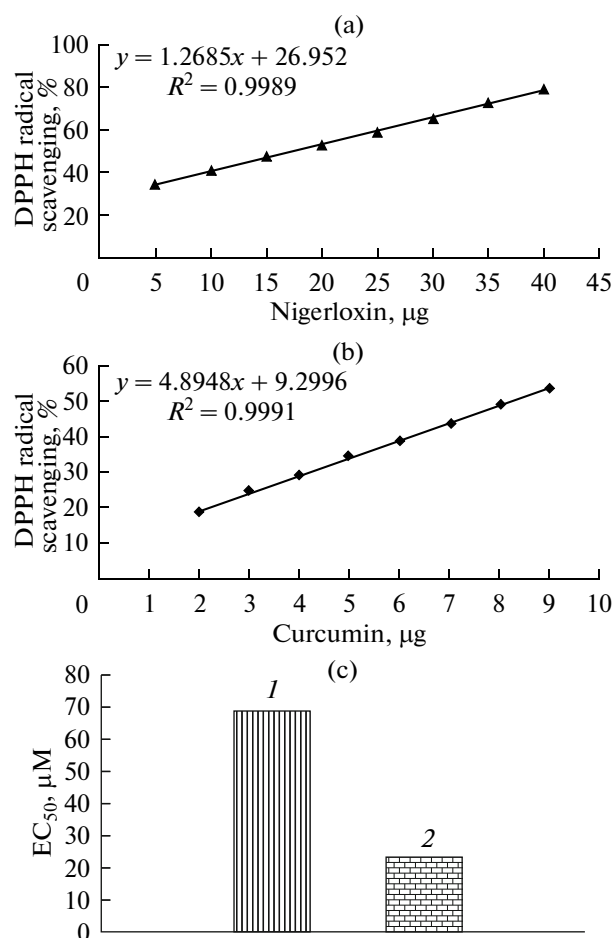


Fig. 3. DPPH radical scavenging potential of nigerloxin (a) and curcumin (b) and comparison of their EC_{50} values (c) for nigerloxin (1) and curcumin (2) against DPPH radical.

assay methods were employed to accomplish an electron donating and hydrogen atom donating strength of nigerloxin *in vitro*. The methods included ABTS radical cation and DPPH radical scavenging assays, ferric ion reducing activity and total antioxidant activity evaluated by phosphomolybdenum method. The total antioxidant capacity of nigerloxin was established by the formation of phosphomolybdenum complex. Antioxidant capable to reduce Mo(VI) to Mo(V) results in an increase of OD_{695} . Nigerloxin and curcumin exhibited different degrees of antioxidant capacities, viz., 3791 and 4684 μM/mg of ascorbic acid equivalents, respectively.

DPPH and ABTS radical scavenging assays are most common spectrophotometric methods to assess the antioxidant potential of chemical moieties. Advantages of these methods include easy performing, high sensitivity and rapidity. DPPH is commercially available long lived organic nitrogen radical and freely soluble in organic solvents. It produces stable purple

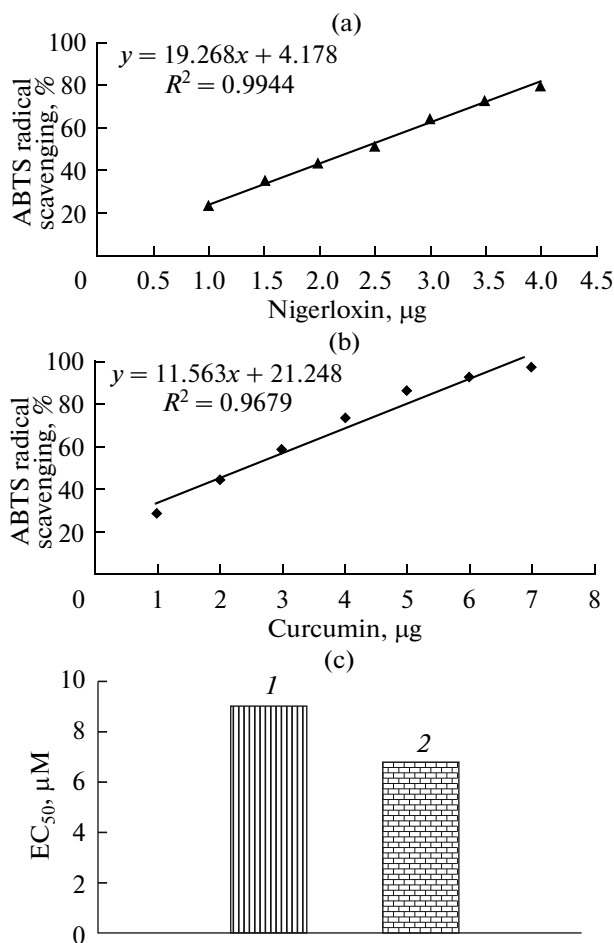


Fig. 4. ABTS radical scavenging potential of nigerloxin (a) and curcumin (b) and comparison of their EC_{50} values (c) for nigerloxin (1) and curcumin (2) against ABTS radical.

colored radical, having an absorption maximum at 515 nm. The DPPH assay is believed to involve hydrogen atom transfer reaction. On the other hand, Foti

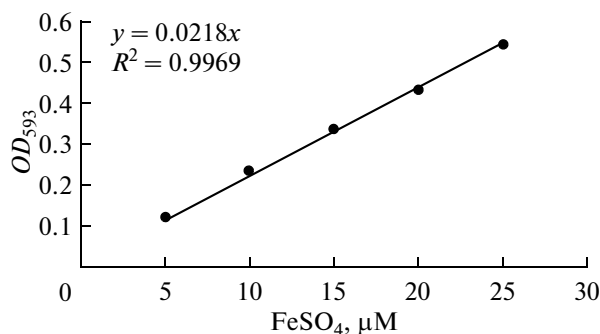


Fig. 5. The linear regression curve of ferrous sulphate.

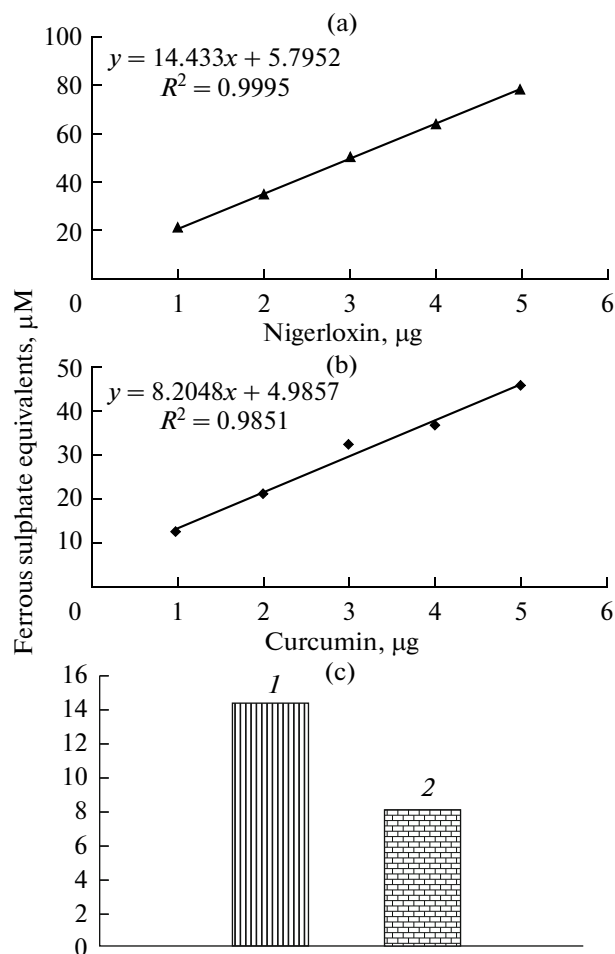


Fig. 6. Ferric reducing antioxidant potential of nigerloxin (a) or curcumin (b) and comparison of their FRAP values (c) for nigerloxin (1) and curcumin (2).

and coworkers [19] suggested that electron transfer reaction is the major principle involved in this assay. Therefore, the antioxidant strength of the compound depends upon its hydrogen or electron donating nature. The antioxidant potential of nigerloxin was measured by the bleaching of the purple colored methanol solution of the stable DPPH radical and compared with that of the most extensively studied natural antioxidant, curcumin. Nigerloxin exhibited EC_{50} of 68.56 µM against this radical. The potency of DPPH radical scavenging activity of curcumin was around three times less and had an EC_{50} value of 22.57 µM.

ABTS also forms a relatively stable free radical, which decolorizes in its non-radical form [20]. ABTS and potassium persulfate in aqueous media produce blue-green $ABTS^{\bullet+}$ chromophore. $ABTS^{\bullet-}$, the oxidant, is generated by potassium persulfate oxidation of $ABTS^{2-}$ and the radical cation is measured spectrophotometrically. This is a direct generation of a stable form of radical to create a blue-green $ABTS^{\bullet+}$ chro-

mophore prior to the reaction with antioxidants [21]. Bleaching of the preformed solution of the blue-green radical cation ABTS^{•+} was used here to assess the antioxidant capacity of nigerloxin and compared with curcumin. Nigerloxin and curcumin exhibited dose depended decolorization of this radical. The EC₅₀ value of nigerloxin against ABTS radical cation was found to be 8.97 μM as compared to curcumin having 6.75 μM.

The electron donating potential of a bioactive compound reflects its reducing power [22]. The ferric reducing potency of nigerloxin was demonstrated by FRAP assay method. This assay takes advantage of electron-transfer reactions, wherein the ferric salt, viz., Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃ is used as an oxidant [17]. In the presence of electron donating chemicals, ferric-tripyridyltriazine complex is reduced to blue colored ferrous-tripyridyltriazine complex. Measurement of the intensity of this color at 593 nm [17, 23] is one of the major assay methods used to demonstrate electron donating property of antioxidants. Our results revealed that nigerloxin has a tendency to donate electron. The ferric reducing potency of nigerloxin was in fact higher than that of curcumin.

Thus, in this study, the fungal metabolite nigerloxin was found to be an effective antioxidant in different *in vitro* assays including the phosphomolybdenum, DPPH[•], ABTS^{•+} and FRAP methods. The antioxidant potency of nigerloxin may be attributed to its electron donating nature. The ferric reducing potency of nigerloxin as demonstrated by FRAP assay method was even found to be superior to that of the natural antioxidant curcumin.

ACKNOWLEDGEMENT

B.S. Suresha thanks Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, for the award of Senior Research Fellowship.

REFERENCES

- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd Ed., Oxford: Oxford University Press. 1999.
- Pham-Huy, L.A., He, H., and Pham-Huy, C., *Int. J. Biomed. Sci.*, 2008, vol. 4, no. 2, pp. 89–96.
- Kovacic, P. and Jacintho, J.D., *Curr. Med. Chem.*, 2001, vol. 48, no. 7, pp. 773–796.
- Ridnour, L.A., Isenberg, J.S., Espey, M.G., Thomas, D.D., Roberts, D.D., and Wink, D.A., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2005, vol. 102, no. 37, pp. 13147–13152.
- Valko, M., Morris, H., Mazur, M., Rapta, P., and Bilton, R.F., *Biochim. Biophys. Acta*, 2001, vol. 1527, no. 3, pp. 161–166.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., and Milzani, A., *Clin. Chem.*, 2006, vol. 52, no. 4, pp. 601–623.
- Dhalla, N.S., Temsah, R.M., and Netticadan, T., *J. Hypertens.*, 2000, vol. 18, no. 6, pp. 655–673.
- Jenner, P., *Ann. Neurol.*, 2003, vol. 53, no. 3, pp. S26–S36.
- Sayre, L.M., Smith, M.A., and Perry, G.O., *Curr. Med. Chem.*, 2001, vol. 8, no. 7, pp. 721–738.
- Knight, J.A., *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 2000, vol. 30, no. 2, pp. 145–158.
- Rao, K.C.S., Divakar, S., Babu, K.N., Rao, A.G.A., Karanth, N.G., and Sattur, A.P., *J. Antibiot.*, 2002, vol. 55, no. 9, pp. 789–793.
- Suresha, B.S., Sattur, A.P., and Srinivasan, K., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2012, vol. 90, no. 4, pp. 387–394.
- Rao, K.C.S., Karanth, N.G., and Sattur, A.P., *Process Biochem.*, 2005, vol. 40, no. 7, pp. 2517–2522.
- Prieto, P., Pineda, M., and Aguilar, M., *Anal. Biochem.*, 1999, vol. 269, no. 2, pp. 337–341.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., and Okuda, T., *Chem. Pharm. Bull.*, 1988, vol. 36, no. 9, pp. 2090–2097.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C., *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, vol. 26, no. 9, pp. 1231–1237.
- Benzie, I.F.F. and Strain, J.J., *Anal. Biochem.*, 1996, vol. 239, no. 1, pp. 70–76.
- Suresha, B.S., Vasantha, K.Y., Sattur, A.P., and Srinivasan, K., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2013, vol. 91, no. 2, pp. 149–156.
- Foti, M., Daquino, C., and Geraci, C., *J. Org. Chem.*, 2004, vol. 69, no. 7, pp. 2309–2314.
- Shirwaikar, A., Shirwaikar, A., Rajendran, K., and Punitha, I.S., *Biol. Pharm. Bull.*, 2006, vol. 29, no. 9, pp. 1906–1910.
- MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., and Garg, M.L., *J. Sci. Food Agric.*, 2006, vol. 86, no. 13, pp. 2046–2056.
- Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A., *Food Chem.*, 2007, vol. 102, no. 4, pp. 1233–1240.
- Liu, T.Z., Chin, N., Kiser, M.D., and Bigler, W.N., *Clin. Chem.*, 1982, vol. 28, no. 11, pp. 2225–2228.

UDC 577.112

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LACCASE SECRETED BY *Phellinus linteus* MTCC-1175 AND ITS ROLE IN THE SELECTIVE OXIDATION OF AROMATIC METHYL GROUP

© 2013 P. K. Chaurasia, A. Yadav, R. S. S. Yadav and S. Yadava

Department of Chemistry, D.D.U. Gorakhpur University, Gorakhpur 273009, Uttar- Pradesh, India

e-mail: rssy_chemistry@rediffmail.com

Received November 26, 2012

A laccase from the culture filtrate of *Phellinus linteus* MTCC-1175 has been purified to homogeneity. The method involved concentration of the culture filtrate by ammonium sulphate precipitation and an anion exchange chromatography on DEAE-cellulose. The SDS-PAGE and native-PAGE gave single protein band indicating that the enzyme preparation was pure. The molecular mass of the enzyme determined from SDS-PAGE analysis was 70 kDa. Using 2,6-dimethoxyphenol, 2,2'[azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt] (ABTS) and 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde azine as the substrates, the K_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m values of the laccase were found to be 160 μ M, 6.85 s^{-1} , $4.28 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, 42 μ M, 6.85 s^{-1} , $16.3 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ and 92 μ M, 6.85 s^{-1} , $7.44 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$, respectively. The pH and the temperature optima of the *P. linteus* MTCC-1175 laccase were 5.0 and 45°C, respectively. The activation energy for thermal denaturation of the enzyme was 38.20 kJ/mole/K. The enzyme was the most stable at pH 5.0 after 1 h reaction. In the presence of ABTS as the mediator, the enzyme transformed toluene, 3-nitrotoluene and 4-chlorotoluene to benzaldehyde, 3-nitrobenzaldehyde and 4-chlorobenzaldehyde, respectively.

DOI: 10.7868/S0555109913060068

Laccase (benzenediol: oxygen oxidoreductase; EC 1.10.3.2) is a polyphenol oxidase, which belongs to the superfamily of multicopper oxidases [1, 2] and catalyzes [3–5] the four-electron reduction of molecular oxygen to water. Laccases are dimeric or tetrameric glycoproteins. To perform their catalytic functions, laccases use Cu atoms that are distributed at the 3 different copper centres. They are called blue (type-1), normal (type-2) and coupled binuclear (type-3) copper centres and differ in their EPR characteristics [6, 7]. The organic substrate is oxidized by one electron at the active site of the laccase generating a reaction radical which further reacts non-enzymatically. The electron is received at type-1 Cu centre and shuttled to the trinuclear cluster where oxygen is reduced to water.

Ortho- and para-diphenols, aminophenols, polyphenols, polyamines, lignins, and arylamines and some of the inorganic ions are the substrates for laccases. The ability of laccases to catalyze the oxidation of various phenolic compounds, coupled to the reduction of molecular oxygen to water makes them valuable from the point of view of commercial applications [4, 8–10]. The biotechnological importance of laccases has increased after the discovery that substrate range for oxidizable reaction could be further extended in the presence of small readily oxidizable molecules called mediators [11, 12]. During the last two decades, laccases have turned out to be the most promising enzymes for industrial uses [9, 10]

having applications in food, pulps, paper, textile, and cosmetics industries and in synthetic organic chemistry [13–16].

Laccases purified from different sources exhibit different properties and are suitable for many applications [3–6]. Thus, there is a scientific need to study laccases from new sources so that laccases with novel properties could be found.

Moreover, there are reports in the literature that the fungal strains which secrete blue laccases in liquid growth media, secrete yellow laccases when grow in the media containing solid lignocellulosic substrates like wheat straw [17, 18]. The yellow laccases lack the absorbance band around 610 nm found in case of blue laccases. Moreover, yellow laccases do not require the presence of mediator molecules for the oxidation of non-phenolic compounds [18].

Phellinus linteus MTCC-1175 is a white rot fungus growing on logs and its laccase has not been purified so far. It is not known which type of laccase (blue or yellow) is secreted when fungus grows in medium containing solid lignin-containing substrates. The aim of the research was to purify laccase from *P. linteus* MTCC-1175, to determine its type and to study physicochemical properties. Results reported have shown that *P. linteus* MTCC-1175 secretes blue laccase when grows in the presence of solid lignin-containing natural substrate, wheat straw, and this enzyme is suitable

for the conversion of aromatic methyl group to aldehyde group in the presence of mediator ABTS.

MATERIALS AND METHODS

Materials. 4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde azine (syringaldazine), 4-chlorotoluene and DEAE-cellulose were obtained from Sigma (USA). 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS) and 2,6-dimethoxyphenol (DMP) were purchased in Fluka Chemi (Switzerland). All other chemicals used in these investigations were obtained either from Himedia laboratory Ltd. (India) or from Merck (Germany) and used without further purifications. The chemicals used in the gel electrophoresis of the protein samples and the protein molecular weight markers were purchased from Bangalore Geni Pvt. Ltd., (India).

The fungal strain and its growth. *Phellinus linteus* MTCC-1175 was procured from the Microbial Type Culture Collection Center and Gene Bank, Institute of Microbial Technology, Chandigarh, (India) and maintained on agar slants as reported in MTCC Catalogue of strains-2000 [19]. The growth medium for the fungus contained (g/L): malt extract – 20.0 and agar – 20.0; the pH was adjusted to 6.5.

In order to detect the extracellular secretion of the laccase by *P. linteus* MTCC-1175, the liquid growth medium reported by Coll et al. [20] was used. This medium consisted of (g/L): glucose – 10.0, asparagine – 1.0, yeast extract – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01 and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01. The liquid growth medium was supplied with natural lignin substrates like coir dust, corn cob, wheat straw, saw dust or bagasse particles. Each of these substrates was prepared by adding 0.5 g to 25 mL of growth medium in 100 mL culture flasks which were sterilized. The sterilized growth media were inoculated with small pieces of the *P. linteus* MTCC-1175 mycelia (0.5 × 0.5 cm) under aseptic conditions and the fungal cultures were grown under stationary culture conditions at 25°C in a biological oxygen demand (BOD) incubator. In order to monitor the production of the laccase in the liquid culture medium, 0.5 mL aliquots of the growth medium were withdrawn at the regular intervals of 24 h and filtered through sterilized Millipore filter 0.22 µm (USA). The filtered extract was analyzed for the activity of the laccase using DMP as the substrate by the method [21] given below in assay section. The optimal time for extracellular secretion of the *P. linteus* MTCC-1175 laccase in the liquid medium was determined by plotting the enzyme activity (unit/mL) in the growth medium against the number of days after inoculation of the fungal mycelia. Each point on the curve was an average of 3 measurements. The growth medium for the control experiment did not contain natural lignolytic substrate. In order to optimize the conditions for maximum production of the laccase by *P. linteus* MTCC-1175, the

amount of the best enzyme inducer, wheat-straw particles, was varied from 100 to 1000 mg in 25 mL of the growth medium. The amount of the inducer in the growth medium which gave the maximum of the enzyme activity was taken as the optimal.

Enzyme assay. The assay solution using DMP as the substrate [20] contained 1.0 mM DMP in 50 mM sodium malonate buffer (pH 4.5) at 37°C, using ABTS as the substrate [22] contained 0.5 mM ABTS in 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0) at 25°C and using syringaldazine as the substrate [23] contained 0.1 mM syringaldazine in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) at 50°C. In case of DMP, the reaction was monitored by measuring OD_{468} and using the molar extinction coefficient [20] value of $49.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. In case of ABTS, the reaction was assayed by measuring OD_{420} and using the molar extinction coefficient [22] value of $36.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. In case of syringaldazine, the reaction was performed by measuring OD_{530} and using molar extinction coefficient [23] value $64.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The UV/Vis spectrophotometer Hitachi (Japan) model U-2900 fitted with electronic temperature control unit was used for absorbance measurement. One enzyme unit produced 1 µM of the product per min under the specified assay conditions.

Purification of laccase. For the purification of the laccase, *P. linteus* MTCC-1175 was grown in ten 100 mL culture flasks each containing 25 mL of growth medium with 400 mg of the inducer, wheat-straw particles, under stationary culture conditions in a BOD incubator at 30°C. The maximum activity of the laccase was revealed on 9 day after the inoculation of the fungal mycelia. On the 9 day, mycelia from all flasks were removed by filtration through 4 layers of cheese cloth. The culture filtrate was saturated up to 30% with ammonium sulphate and centrifuged at $5480 \times g$ and 4°C for 20 min. The precipitate was discarded and the supernatant was saturated up to 85% by further addition of ammonium sulphate. The resulting suspension was centrifuged at the same conditions and the supernatant was discarded. The precipitate was dissolved in 100 mM Na-acetate buffer (pH 4.5) and dialyzed against 10 mM Na-acetate buffer (pH 4.5) with 3 changes of buffer during 8 h. Thirty mL of dialyzate containing 2.7 mg/mL protein was concentrated using Amicon concentrator cell model 8200 (USA) and loaded on the DEAE-cellulose column (size 0.75 × 18.0 cm) which was pre-equilibrated with 10 mM Na-acetate/acetic acid buffer (pH 4.0) with flow rate 15 mL/h. The column was washed with 100 mL of the same buffer. The enzyme was eluted by applying linear gradient of 1 M NaCl in the same buffer (50 mL buffer + 50 mL buffer with 1.0 M NaCl). The fractions of 5.0 mL were collected and analyzed for the laccase activity [20]. The protein was measured by the Lowry method. All fractions containing laccase activity were combined and concentrated by Amicon concentrator cell model 8200 (USA) to 8 mL. The enzyme was stored in 10 mM Na-ace-

tate/ acetic acid buffer (pH 4.0) at 4°C. The enzyme did not loose any activity for one month under these conditions.

SDS-PAGE analysis. The purity of the enzyme preparation was checked by using SDS-PAGE [24]. The molecular weight markers were phosphorylase (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.0 kDa), ovalbumin (43.0 kDa), carbonic anhydrase (29.0 kDa), soyabean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and lysozyme (14.3 kDa). Gel was run at a constant current 20 mA. The molecular weight was determined by the Weber and Osborn method [25].

Native-PAGE and zymogram analysis. The native PAGE of the purified enzyme was done using the Schagger and von Jajow method [26]. The composition of resolving and stacking gels was similar to those used in SDS-PAGE except that SDS was absent. The reference protein was bovine serum albumin (66.0 kDa). Two sets of native gels were done. One set was stained with Coomassie brilliant blue R-250 and the other set was used for zymogram [27] preparation. For the preparation of zymogram 100 mM DMP solution was made in 10 mM Na-acetate buffer (pH 4.0). The native gel was dipped in zymogram solution for 5 min and a brown band appeared. The zymogram was removed from the DMP solution and washed thrice with the same buffer at the intervals of 5 min.

Steady state enzyme kinetics. The steady state kinetics of the purified *P. linteus* MTCC-1175 laccase was studied using DMP, ABTS, and syringaldazine as the substrates following the methods as mentioned in the assay section. K_m and k_{cat} values for the enzyme were determined from the linear regression of double reciprocal plots. The pH and temperature optima of the enzyme were determined by measuring the steady state velocities of the enzyme catalyzed reaction in the solutions of varying pH/temperature keeping the other parameters fixed and drawing graphs of steady state velocities versus the variable parameter.

Temperature optimum and thermal stability. Temperature optimum of the *P. linteus* MTCC-1175 laccase was detected in 1 mL of reaction solution containing 1.0 mM DMP in 100 mM sodium malonate buffer (pH 4.5) with varying temperature from 30 to 70°C. Thermal stability of the *P. linteus* MTCC-1175 laccase was tested by incubating an enzyme aliquot in the same reaction solution at a particular temperature for 60 min, assaying its residual activity and plotting the residual activity against temperature. The rate constants for the denaturation of the enzyme at different temperatures were determined by keeping the laccase aliquots at fixed temperatures and assaying the enzyme activity at regular intervals of time and plotting residual activity against time. The rate constants were calculated from $t_{1/2}$ values using the equation $k = 0.693/t_{1/2}$. Energy of activation for thermal denaturation of laccase was calculated from Arrhenius plot.

pH optimum and pH stability. pH optimum of the enzyme was determined in 1 mL of reaction solution containing 1.0 mM DMP in 100 mM sodium malonate buffer with varying pH (from 3.0 to 6.0). pH stability of the *P. linteus* MTCC-1175 laccase was tested by incubating enzyme aliquot at a particular pH for 60 min, assaying its residual activity and plotting the residual activity against pH. In this case 1 mL of the same reaction solution with varying pH from 4.0 to 6.0 was used.

Biotransformations in the presence of ABTS as mediator. The biotransformation of toluene to benzaldehyde [28, 29] was done in 15 mL of 100 mM Na-acetate buffer (pH 4.5) containing 0.1 mM ABTS as mediator and 40 µg of purified laccase mixed with 20 mM toluene in 20 mL of dioxane. The mixture was stirred vigorously for 30 min at room temperature in a 100 mL conical flask. The reaction solution was extracted thrice with 40 mL of ethylacetate and 20 µl of the ethyl acetate extract was injected in Waters HPLC Model 600E system (Waters, USA) using Spherisorb C18 column (5 UV, 4.5 × 250 mm). Methanol was used for elution with the flow rate of 0.5 mL/min. The detection of sample was made using Waters UV detector model 2487 (USA) at 254 nm.

The biotransformations of 3-nitrotoluene to 3-nitrobenzaldehyde and 4-chlorotoluene to 4-chlorobenzaldehyde were also studied using the method described above except that the stirring was done for 60 and 90 min, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the secretion of the laccase of *P. linteus* MTCC-1175 in the liquid growth medium supplied with various lignin-containing natural substrates like corn cob, coir dust, saw dust, wheat straw or bagasse particles. The control experiment had the same medium composition but without the supplement. It is obvious that the addition of lignin-containing natural substrates in the medium enhanced the secretion of the laccase. The maximum of extracellular secretion of the *P. linteus* MTCC-1175 laccase was observed the case of using wheat-straw particles. In order to optimize the process, secretion of the enzyme in presence of different amounts of wheat-straw particles was studied. The results are shown in Fig. 2. The maximum level of the laccase was revealed in the medium containing 400 mg of the wheat-straw particles per 25 mL of the culture medium.

The purification procedure of the laccase of *P. linteus* MTCC-1175 from the liquid culture filtrate is summarized in Table, and the elution profile of the laccase activity from DEAE cellulose column is shown in Fig. 3. The enzyme was bound to DEAE-cellulose in 10 mM Na-acetate/ acetic acid buffer (pH 4.0) and eluted by the linear gradient of NaCl in the range 0.32 to 0.73 M. The pooled and concentrated fractions containing laccase gave 16.5-fold purification with

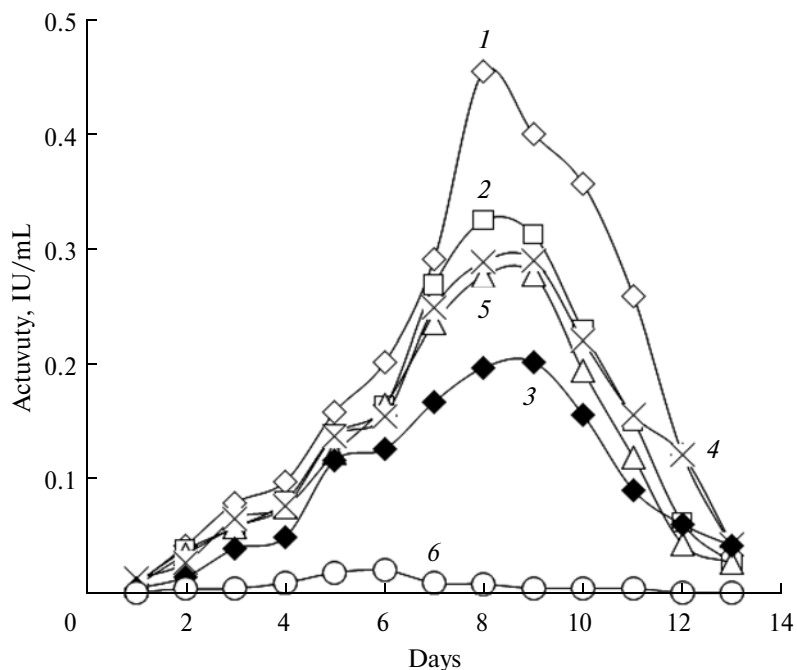


Fig. 1. Secretion of the *P. linteus* MTCC-1175 laccase in the liquid growth medium supplemented with different natural lignin-containing substrates: 1 – wheat straw; 2 – corn cob; 3 – bagasse; 4 – saw dust; 5 – coir dust and 6 – control.

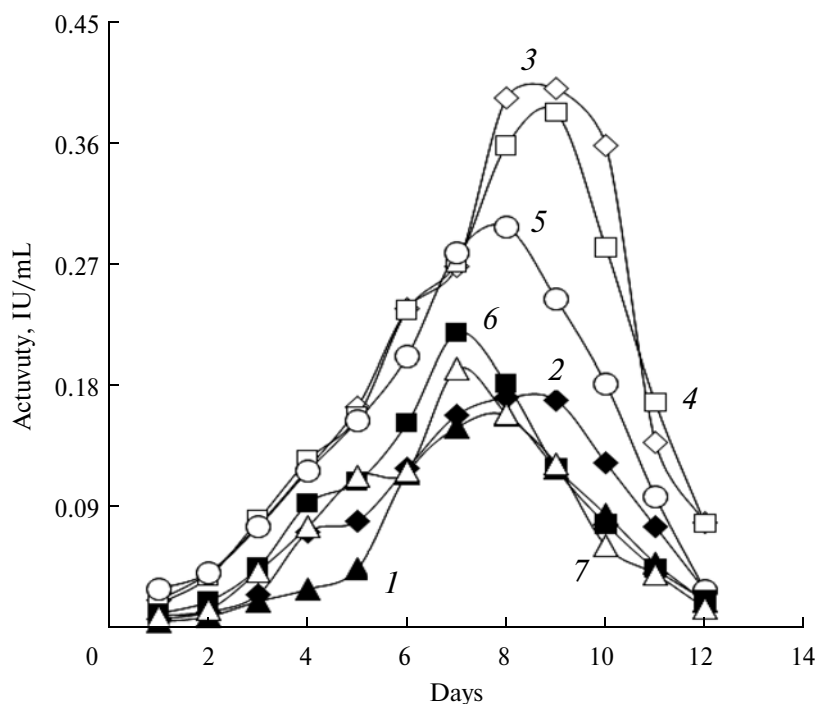


Fig. 2. Optimization of the *P. linteus* MTCC-1175 laccase secretion in liquid growth medium supplemented with different amounts of wheat-straw particles (mg/25 mL): 1 – 100; 2 – 200; 3 – 400; 4 – 500; 5 – 600; 6 – 800 and 7 – 1000.

32.1% recovery of the enzyme activity. The concentrated enzyme sample was analyzed by SDS-PAGE, native PAGE and zymogram preparation (Fig. 4). The

appearance of single protein band in SDS-PAGE indicated that the enzyme sample was pure (Fig. 4a). Native PAGE confirmed the purity of the enzyme (Fig. 4b). The

Purification of the *P. linteus* MTCC-1175 laccase

Step	Volume, mL	Activity, IU/mL	Protein, mg/mL	Specific activity, IU/mg	Total protein, mg	Total activity, IU	Purification, -fold	Yield, %
Culture filtrate	150	0.39	1.1	0.36	165.0	58.65	1	100.0
Ammonium sulphate precipitation	20	2.32	3.0	0.77	60.0	46.30	2.2	79.0
Dialysis	30	1.50	1.0	1.50	30.0	45.00	4.3	77.0
DEAE-cellulose	8	2.35	0.4	5.87	3.2	18.80	16.5	32.1

position of the purified laccase in the zymogram (Fig. 4c) of native PAGE coincides with the position of the single protein band of purified laccase in the native PAGE (Fig. 4b). The molecular mass of the purified laccase of *P. linteus* MTCC-1175 determined from the analysis of SDS-PAGE [25] was 70 kDa. It is compared to the molecular masses of laccases reported in the literature [4] which are in the range 43–383 kDa.

The purified *P. linteus* MTCC-1175 laccase had the characteristic colour of the blue laccases. Its UV/Vis spectrum is shown in Fig. 5. In the insert one can see the absorbance around 600 nm found in the cases of blue laccases. There are reports in the literature [18], that usually fungal strains which secrete blue laccases in the liquid growth media, secrete yellow laccase when grown in the medium containing solid natural lignin substrates like wheat straw, coir dust, bagasse etc. The results obtained with the *P. linteus* MTCC-1175 laccase

indicated that blue laccases could be secreted even in the growth medium containing solid natural lignin substrates.

The Michaelis-Menten and double reciprocal plots for the purified laccase of *P. linteus* MTCC-1175 were drawn using DMP, ABTS and syringaldazine as the variable substrates. The K_m , k_{cat} and k_{cat}/K_m values determined from the double reciprocal plots using DMP, ABTS and syringaldazine as the substrates were $160 \mu\text{M}$, 6.85 s^{-1} , $4.28 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $42 \mu\text{M}$, 6.85 s^{-1} , $6.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $92 \mu\text{M}$, 6.85 s^{-1} , $7.44 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively. The range of K_m values reported [4] for fungal laccases using DMP, ABTS, and syringaldazine as the substrates are $8\text{--}14720 \mu\text{M}$, $4\text{--}770 \mu\text{M}$ and $3\text{--}3400 \mu\text{M}$, respectively. However, the K_m value of the *P. linteus* MTCC-1175 laccase for DMP compares well with the K_m of enzyme

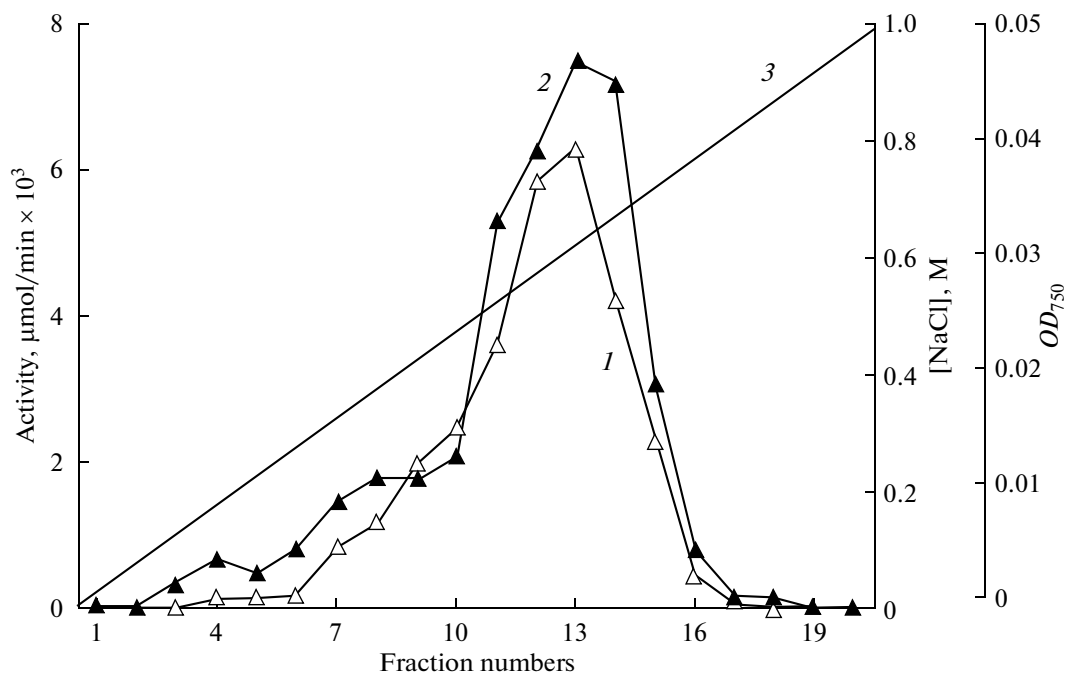


Fig. 3. Elution profile of the *P. linteus* MTCC-1175 laccase from the DEAE-cellulose column: 1 – activity; 2 – protein and 3 – NaCl.

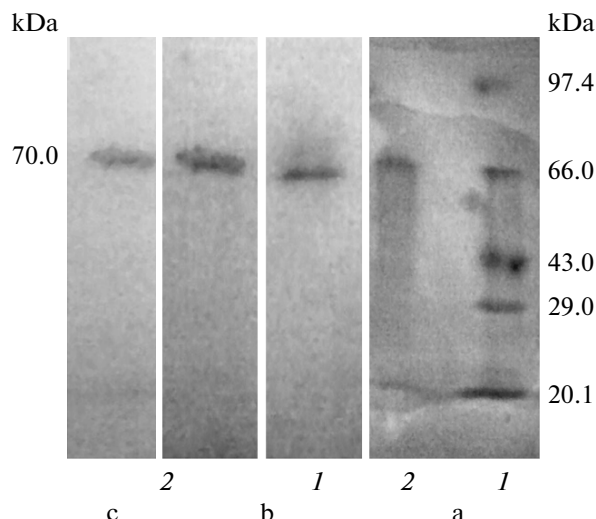


Fig. 4. SDS-PAGE (a), native-PAGE (b) and zymogram (c) of the *P. linteus* MTCC-1175 purified laccase. Lane 1 – molecular weight markers; lane 2 – purified laccase.

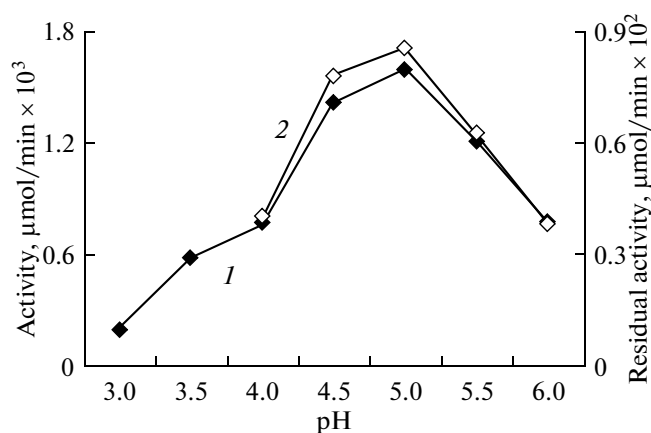


Fig. 6. Determination of pH optimum (1) and pH stability (2) of the *P. linteus* MTCC-1175 purified laccase.

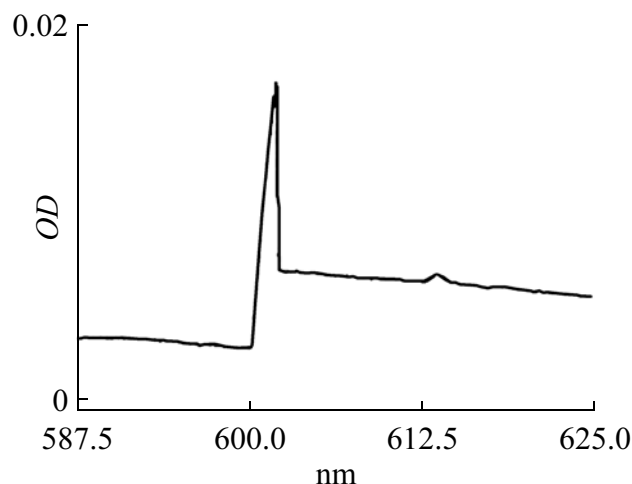


Fig. 5. UV-Vis spectrum of the *P. linteus* MTCC-1175 purified laccase (4.5 μM laccase in 10 mM Na-acetate/acetic acid buffer, pH 4.5).

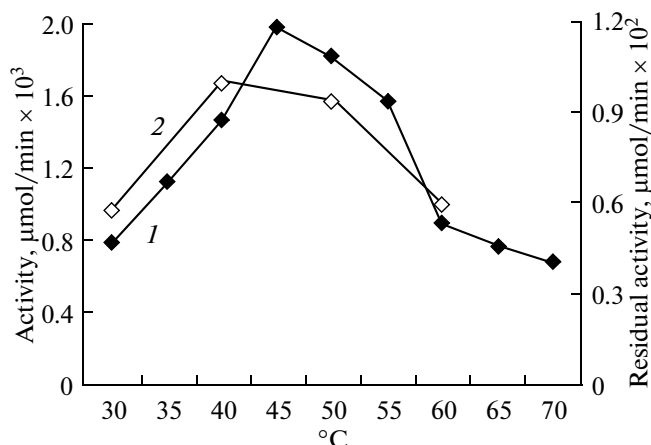


Fig. 7. Determination of temperature optimum (1) and thermal stability (2) of the *P. linteus* MTCC-1175 purified laccase.

purified from *Armillaria mellea* Lac I [4]. The K_m value of this enzyme using ABTS as substrate is similar to the K_m of laccases purified from *Coprinus friesli*, *Daedalea quercina* and *Trametes versicolor* [4]. The K_m value of this laccase for syringaldazine is comparable with the K_m of enzyme purified from *Pleurotus ostreatus* POXA 3b [4]. The value of k_{cat} determined for the purified *P. linteus* MTCC-1175 laccase has been found to be low in comparison to the values of k_{cat} reported for other fungal laccases [4]. It is worth mentioning over here that the catalytic performances of laccases span several orders of magnitude for different substrates and are characteristic for specific proteins [4].

The changes of the activity of the purified *P. linteus* MTCC-1175 laccase with the variation of pH of the reaction solution are shown in Fig. 6. The determined

pH optimum of the enzyme was 5.0. The pH optima reported in the literature [4] for laccases using DMP as the substrate are in the range 3.0–8.0 pH units. The pH optimum of the purified *P. linteus* MTCC-1175 laccase compares well with pH optima of laccases of *C. friesli*, *Hericium echinareum*, *Phellinus ribis*, *P. ostreatus* POXA 1W, *Ophiostoma novo-ulmi* and *Marasmius quercophilus* [4]. The results of the pH stability of the laccase studied are shown in Fig. 6 where the residual activities of the enzyme have been plotted against the different pHs for which the enzyme has been exposed for 1 h. It was revealed that the enzyme had maximum stability at pH 5.0.

The dependence of the activity of the purified *P. linteus* MTCC-1175 laccase on variation of the temperature of the reaction solution is shown in Fig. 7. The cal-

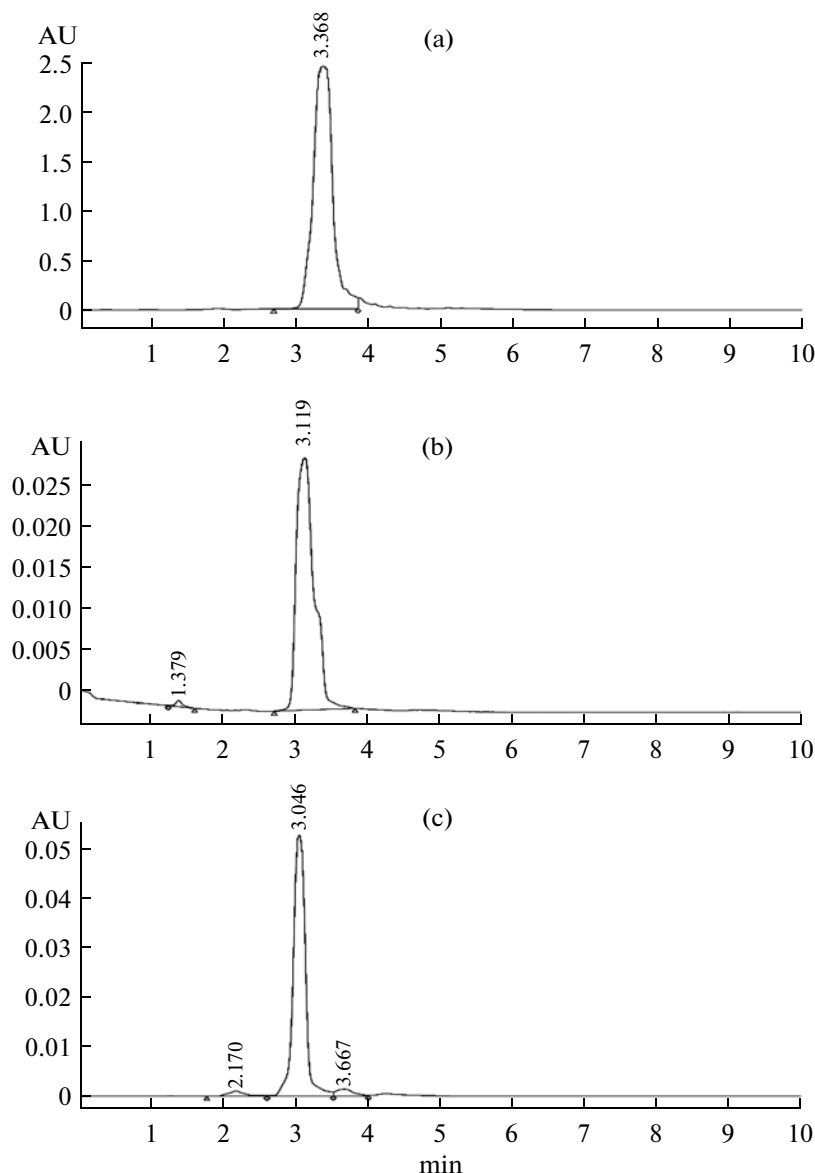


Fig. 8. Transformation of toluene to benzaldehyde by the laccase of *P. linteus* MTCC-1175 in presence of mediator. (a) and (b) the HPLC of the standard samples of toluene and benzaldehyde respectively, (c) the chromatogram of the ethyl acetate extract of the product formed by the enzyme with toluene in presence of mediator molecule.

culated temperature optimum was 45°C. The range of temperature optima reported for other laccases are 25–80°C [4]. The purified laccases of *Coriolus hirsutus*, *Thelephora terrestris* and *Volvariella volvacea* also have temperature optima at 45°C [4]. The results of the thermal stability of the purified laccase studied are shown in Fig. 7 where the residual activities of enzyme have been plotted against the temperatures for which the enzyme has been exposed for 1 h. The activation energy of the thermal denaturation of the purified *P. linteus* MTCC-1175 laccase has been found to be 38.2 kJ/mol/K.

One of the applications of the laccases in organic synthesis is the selective oxidation of aromatic methyl group to the aldehyde without further oxidation to carboxylic group. Blue laccases catalyze this reaction

in presence of ABTS or 1-hydroxybenzotriazole as mediators [28, 29]. The applications of the purified *P. linteus* MTCC-1175 laccase for the above conversion were tested in presence of ABTS diammonium salts [28] using toluene, 3-nitrotoluene and 4-chlorotoluene as the substrates. The results of the bioconversion of toluene to benzaldehyde are shown in Fig. 8. Figure 8a is the HPLC chromatogram of the ethyl acetate extract of the product formed by the reaction of the enzyme with toluene in the presence of mediator molecule. Figure 8b and c are the chromatograms of the standard samples of benzaldehyde and toluene, respectively. The retention time of the standard samples of toluene and benzaldehyde were 3.4 and 3.1 min, respectively. Thus, the retention time of the product of the enzyme-catalyzed

reaction (3.1) coincided with that of benzaldehyde showing that the product was benzaldehyde. Yield of the extracted benzaldehyde was found to be 94%.

The similar type of reactions were done for 3-nitrotoluene bioconversion to 3-nitrobenzaldehyde and 4-chlorotoluene bioconversion to 4-chlorobenzaldehyde in the presence of ABTS as the mediator molecule. The retention time of the standard samples of 3-nitrotoluene, 4-chlorotoluene, 3-nitrobenzaldehyde and 4-chlorobenzaldehyde were 6.6, 7.3, 5.9 and 6.2 min, respectively. Thus, the retention time of the products of the enzyme catalyzed reaction (5.9 and 6.2 min) revealed that the products of enzyme catalyzed reaction were 3-nitrobenzaldehyde and 4-chlorobenzaldehyde. In these cases, yield of the extracted 3-nitrobenzaldehyde and 4-chlorobenzaldehyde was 98% and 80%, respectively.

This communication reports the purification of a laccase from a new fungal source, *P. linteus* MTCC-1175, which can be used for the selective transformation of aromatic methyl group to aldehyde group in presence of diammonium salt of ABTS as the mediator. The reaction is eco-friendly, requires less than 2 h and the yield of the product is more than 80%.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the financial support of DST, Govt. of India, New Delhi given in the form of DST Young Scientist Scheme, DO. No. SR/FTP/CS-90/2007 to Dr. R.S.S. Yadav. Mr. P.K. Chaurasia is thankful to CSIR, New Delhi for the award of JRF, award no. 09/057(0201)2010-EMR-I. A. Yadav acknowledges the financial support of the department of Chemistry, D.D.U. Gorakhpur University, Gorakhpur (India) in the form of UGC-DSA fellowship for meritorious students. The authors are thankful to Prof. K.D.S. Yadav, Emeritus Scientist, CSIR, New Delhi (India) for his helpful discussions.

REFERENCES

- Hoegger, P.J., Kilaru, S., Jones, T.Y., Thacker, J.R., and Kuees, U., *FEBS J.*, 2006, vol. 273, no. 10, pp. 2308–2326.
- Multi-Copper Oxidases*, Ed. Messerschmidt A., Singapore: World Scientific Publishing, 1997.
- Riva, S., *Trends in Biotechnol.*, 2006, vol. 24, no. 5, pp. 219–226.
- Baldrian, P., *FEMS Microbiol. Rev.*, 2006, vol. 30, no. 2, pp. 215–242.
- Dwivedi, U.N., Singh, P., Pandeya, V.P., and Kumar, A., *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 2011, vol. 68, no. 2, pp. 117–128.
- Solomon, E.I., Baldwin, M.J., and Lowry, M.D., *Chem. Rev.*, 1992, vol. 92, pp. 521–542.
- Bento, I., Armenia, M., Corrondo, P.F., and Lindloy, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2006, vol. 11, pp. 919–927.
- Wandrey, C., Liese, A., and Kihumbu, D., *Org. Proc. Res. Dev.*, 2000, vol. 4 no. 4, pp. 285–290.
- Couto, S.R. and Harrera, J.L.T., *Biotechnol. Adv.*, 2006, vol. 24, pp. 500–513.
- Xu, F., *Ind. Biotechnol.*, 2005, vol. 1, no. 1, pp. 38–50.
- Acunzo, D.F. and Galli, C., *J. Eur. Biochem.*, 2003, vol. 270, pp. 3634–3640.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Shleev, S.V., and Yaropolov, Y.I., *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2007, vol. 43, pp. 523–535.
- Coniglio, A., Galli, C., and Gentili, P., *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 2008, vol. 50, no. 1, pp. 40–49.
- Mikolasch, A., Niedermeyer, T.H.J., Lalk, M., Witt, S., Seefeldt, S., Hammer, E. et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 2006, vol. 54, no. 5, pp. 632–638.
- Mikolasch, A., Niedermeyer, T.H.J., Lalk, M., Witt, S., Seefeldt, S., Hammer, E., et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 2007, vol. 55, no. 3, pp. 412–416.
- Mikolasch, A., Hammer, E., Jonas, U., Popowski, K., Stielow, A., and Schaner, F., *Tetrahedron*, 2002, vol. 58, no. 38, pp. 7589–7593.
- Leontievsky, A.A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J.K., Pozdnyakova, N., and Myasoedova, N.M., *FEBS Microbiol. Lett.*, 1997, vol. 156, no. 1, pp. 9–14.
- Leontievsky, A.A., Myasoedova, N., Pozdnyakova, N., and Golovleva, L., *FEBS Lett.*, 1997, vol. 413, no. 3, pp. 446–448.
- Catalogue of strains-2000. Microbial Type Culture Collection and Gene Bank Institute of Microbial Technology*. 5 edition, Institute of Microbial Technology, Chandigarh, (India), 2000, p. 60.
- Coll, M.P., Fernandez-Abalos, J.M., Villomueva, J.R., Somtamaria R., and Perez, P., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, vol. 59, no. 8, pp. 2607–2613.
- Sahay, R., Yadav, R.S.S., and Yadava, S., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2012, vol. 166, pp. 563–575.
- Bourbonnais, R. and Paice, M.G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1990, vol. 36, 823–827.
- Chefetz, B., Chen, Y., and Hador, Y., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, vol. 64, no. 9, pp. 3175–3179.
- Laemmli, U.K., *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685.
- Weber, K., and Osborn, M., *J. Biol. Chem.*, 1969, vol. 244, pp. 4406–4412.
- Schagger, H. and von Jajow, G., *Analyt. Biochem.*, 1991, vol. 199, no. 2, pp. 223–231.
- Zouri-Mechichi, H., Mechichi, T., Dhouib Sayadi, S., Martinez, A.T., and Martinez, M.J., *Enz. Microb. Technol.*, 2006, vol. 39, pp. 141–148.
- Potthest, A., Rosenanu, T., Chen, C-L., and Gratzl, J.S., *J. Org. Chem.*, 1995, vol. 60, pp. 4320–4321.
- Fritz-Langhals and Kunath, B., *Tetrahedron Lett.*, 1998, vol. 39, no. 33, pp. 5955–5956.

UDC 631.445.41

DETERMINATION OF HYDRATION PROPERTIES AND THERMAL BEHAVIOR OF *Paecilomyces variotii* BY DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY

© 2013 R. S. Canel*, **, V. Ludemann*, O. De la Osa* and J. R. Wagner*, **

*National University of Quilmes, Buenos Aires, 1876 Argentina

**National Scientific and Research Council, Buenos Aires, 1033 Argentina

e-mail: rcanel@unq.edu.ar

Received November 20, 2012

Due to the structure and the composition of *Paecilomyces variotii*, the mycelia of this fungus could have potential applications as ingredients in wettable foods. For this use, drying could be employed, justifying the study of thermal behavior of *P. variotii*. The objectives of this work were to perform a study of thermal behavior of *P. variotii* isolates, to evaluate the hydration properties of these mycelia and to analyze the effect of different technological parameters on the latter properties. Wet cultures exhibited a wide endothermic transition, with mean values of peak temperature of 61°C and denaturation enthalpy of 4 J/g dry matter. Initial (50°C) and final (80°C) temperatures of the endothermic transition were used to dry the mycelia. Freeze-drying was also assayed. For all dried mycelia, a decrease in denaturation enthalpy between 40 and 50% was observed for drying at 50°C and freeze-drying, and a drastic decrease of almost 100% for drying at 80°C. According to the hydration properties, wet mycelia exhibited water holding capacity (WHC) value of 45 g water/g dry matter. Significant differences among dried mycelia, resulting WHC values in order: 50°C > freeze-dried > 80°C ($p < 0.05$) were revealed for each *P. variotii* strain. Fungi obtained by drying at 50°C and by freeze-drying, showed a rapid water absorption ($t_{1/2} < 0.1$ min). Ionic strength, pH and particle size of dried mycelia influenced the hydration properties.

DOI: 10.7868/S0555109913060044

The genus *Paecilomyces* was split from *Penicillium* by Bainier in 1907 [1] on the basis of their differences in phialide shape and conidial color. *Paecilomyces* species are important as soil fungi and insect pathogens. Only two species are commonly isolated from foods: *Paecilomyces variotii* and *Paecilomyces lilacinus* [2]. *P. variotii* has not been reported as a mycotoxin producer [2], and is used in the food industry as a producer of enzymes. This fungus produces a thermostable glucoamylase [3]. α -amylases have the widest range of industrial applications [4, 5] including brewing, baking, textile and detergent production [6, 7]. *P. variotii* also produces tannase [8], an enzyme that cleaves ester linkages in hydrolyzable tannins.

Single cell protein (SCP) is a term coined in the 1960's to embrace microbial biomass products of fermentation [9]. *P. variotii* has been used for the production of microbial protein because of its excellent ability to grow in a variety of highly-polluting industrial effluents, such as molasses, hydrolyzed wood, spent sulfite liquor and vinasse [10–13]. *P. variotii* was the first fungus used in an industrial process for the production of microbial protein for animal feed, known as “Pekilo” process [10].

The successful adoption and use of microbial biomass depend on the properties of the fungus, which determine its usefulness as a functional food ingredi-

ent. Functional properties are defined as the physico-chemical properties that contribute with the rheological parameters and stability and sensory features of a food product. These properties can be classified as hydration, structuring, surface and organoleptic properties [14]. The water holding capacity (WHC) and the water absorption capacity (WAC) expresses the hydration properties. WHC refers to the ability of a hydrated material to retain water against the action of an external force of centrifugal gravity or compression, whereas WAC refers to the ability of a material to absorb water in its structure spontaneously when it comes in contact through a surface that remains wet. Both WHC and WAC are relevant for each food system [15].

The possible inclusion of Pekilo biomass has been studied in different food systems, such as sausages and meat balls [16]. *P. variotii* has been found to increase the hardness of sausages up to 30% substitution level, probably owing to its good water imbibing and gelling properties reported earlier [16]. Pekilo has also been studied in doughs, particularly in white wheat bread and soft and hard rye bread. This biomass has also been observed to increase the water binding of the dough from about 62% to approximately 72% when the flour substitution level is increased from 0 to 8%. The mild taste of Pekilo powder is distinctly found in bread, even at the lowest substitution levels [17].

In our previous work [18], we isolated and identified filamentous fungi from several sources. Non-toxic fungal strains, characterized by the *Artemia salina* bioassay [19], were used to study their composition (protein, total dietary fiber and β -glucan) and hydration properties (WAC and WHC). We found that these mycelia give the following composition: protein content ranged from 30 to 47% of dry weight, total dietary fiber content changed from 16 to 53% of dry weight and β -glucans content varied from 1 to 26% of dry weight. The highest values of these parameters were found in *P. variotii*. According to hydration properties, this fungus showed the highest values for WHC and WAC, with a rapid water absorption rate (mycelia dried at 50°C) [18]. These results suggest the potential application of this fungus as ingredient in wettable foods. For this use, *P. variotii* may require drying, which justifies the study of its thermal behavior.

Then, the objectives of this work were to perform a study of thermal behavior of *P. variotii* isolates, to evaluate the hydration properties of these mycelia and to analyze the effect of different technological parameters on the latter properties.

MATERIALS AND METHODS

Fungal strains and culture conditions. Four strains of *P. variotii* isolated from pepper were used. The isolates were identified according to Pitt and Hocking [2]. The cultures were inoculated by 1×10^5 conidia/mL and grown in liquid media containing (g/L): yeast extract – 20 and sucrose – 40 by shaking at 135 rpm and 25°C for 7 days. Mycelia samples were collected by filtration through Whatman N° 1 filter paper (USA) under vacuum and washed twice with distilled water.

Drying process. Wet mycelia of *P. variotii* were fractionated to be subjected to different drying conditions: a) drying in stove with air circulation at 50°C and 80°C until constant weight (moisture content <0.5%), and b) freeze-drying. For this latter process, samples were frozen at –80°C for 5 days. Freeze-drying was performed using HETO FD4 (Denmark) coupled to a Rotary Vane Vacuum Pump RZ5, for 30 h.

Protein, total dietary fiber and β -glucans determination. Dry mycelia were analyzed to determine protein [20], total dietary fiber (TDF) [21, 22] and β -glucan. The latter was analyzed by the Megazyme TM commercial kit instruction (Ireland).

Milling and fractionation. Dried mycelia were ground in an FW100 Model Chincan miller (China) and fractionated to obtain different particle sizes (>850 μ m, 500–850 μ m and <500 μ m) using IRAM 1501/76 ASTM-E-11-81 sieves No. 35 and No. 20 (Argentina).

Thermal behavior. The thermal behavior of wet and dried mycelia of *P. variotii* was studied by modulated differential scanning calorimetry (MDSC) using a

Q200 calorimeter (TA Instrument, USA, amplitude: $\pm 1^\circ\text{C}$, frequency: 60 sec). The samples were brought to 80% of water either by partial dehydration in the case of wet mycelia by Whatman No. 1 paper or by addition of water in the case of dry mycelia. Samples (12–15 mg) were hermetically sealed in standard aluminum pans and heated from 10 to 90°C at a heating rate of 5°C/min. An empty pan was used as reference. Enthalpies and peak temperatures (T_p) of endotherms were obtained from thermograms. Enthalpies (H) were expressed as J/g dry matter by perforating the pans and heating overnight at 105°C [23]. All assays were performed in duplicate.

Hydration properties. WAC was determined on dried mycelia. Water absorption kinetics was followed using the Baumann equipment [24], which consists of a funnel connected to a horizontal capillary. A 50 mg sample was dusted on a wetted filter paper which was fastened to a glass filter placed on top of the funnel filled with water. The apparatus was kept at 20°C. The amount of water uptaken by the sample at equilibrium was read in the graduated capillary. The maximum amount of water absorbed and the time to reach WAC were determined [25]. The half time ($t_{1/2}$) was defined as the time of the samples to absorb half of the maximum amount of water.

WHC was determined on both wet and dried mycelia of *P. variotii*. For WHC determination on wet mycelia, a full pellet was dispersed in distilled water and then shaken (for 2 h at 25°C and 100 rpm) and centrifuged (for 20 min at 15°C and $15000 \times g$). The pellet was dried in a stove with air circulation at 50°C until constant weight and finally weighed. For WHC determination of dry mycelia, 100 mg of sample was stirred with 9 mL of distilled water in an orbital shaker at 100 rpm for 2 h and then centrifuged for 30 min at $800 \times g$. The supernatant decanted and the pellet finally weighed. WHC and WAC were expressed as g of water/g of dry matter. Both determinations were performed using distilled water or 0.01 M phosphate buffer (pH 5.0 or 7.0) with different concentrations of NaCl (0, 1, 2 and 3%). Besides, hot water (80°C) was used to determine WHC. To this end, 100 mg of sample was stirred with 1 mL of distilled water at room temperature, in an orbital shaker for 1 min and then 8 mL of hot distilled water (80°C) was added. In the second assay, 100 mg of sample was stirred with 9 mL of hot distilled water (80°C). Both experiments were performed as previously described to determine WHC.

Viability of *P. variotii* dried at 50°C. A suspension (1% m/V) was obtained from dried fungi at 50°C (*P. variotii* 101 and *P. variotii* 440) in distilled water. Malt extract agar plates were inoculated at central point with 5 μ L of suspension. Then, these plates were incubated at 5°C or 25°C. The diameter of colonies developed was measured daily (in duplicate) from the first to the seventh day of cultivation and was expressed in millime-

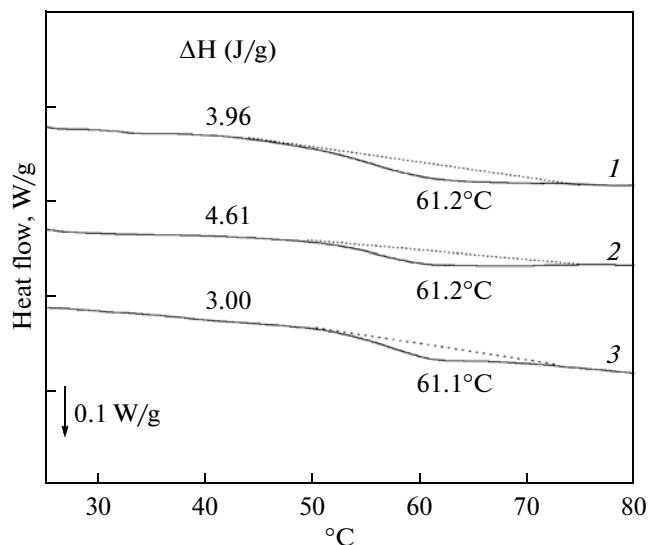


Fig. 1. Differential scanning calorimetric thermograms of wet mycelia of different *P. variotii* strains: 1 – *P. variotii* 101, 2 – *P. variotii* 102, 3 – *P. variotii* 439.

ters. From the growth curves obtained, the growth rate of mycelia ($K = \text{mm/day}$) was calculated by regression analysis.

Statistical analysis. The statistical analysis was performed by analysis of variance and tested of the least significant difference ($P < 0.05$) using the statistical program Statgraphics Plus 5.1.

RESULTS AND DISCUSSION

Protein, total dietary fiber and β -glucans determination. Dry mycelia of *P. variotii* 101, 102, 440 and 439 exhibited a protein content of 26, 28, 26, 29% of dry weight a TDF content of 51, 50, 58, 48% of dry weight and a β -glucans content of 26, 22, 22 and 26% of dry weight respectively.

Thermal behavior. Differential scanning calorimetric (DSC) thermograms of wet cultures for all the *P. variotii* strains exhibited a wide endothermic transition in the range between 45–50°C and 75–80°C, which could be attributed to protein denaturation (Fig. 1). An endothermic peak was observed with a temperature peak (T_p : 61°C) with the enthalpy mean value of 4 J/g of dry matter. Figure 1 shows the thermograms corresponding to *P. variotii* strains 101, 102 and 439. As mentioned before, the mycelia analyzed in this work have about 30% of protein/dry weight and the enthalpy values are in the order of 13 J/g of protein. This is in accordance with the results of Otero et al. [26], who obtained ΔH values of approximate 14–17 J/g of protein for *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluveromyces fragilis*, respectively, working with intact cells.

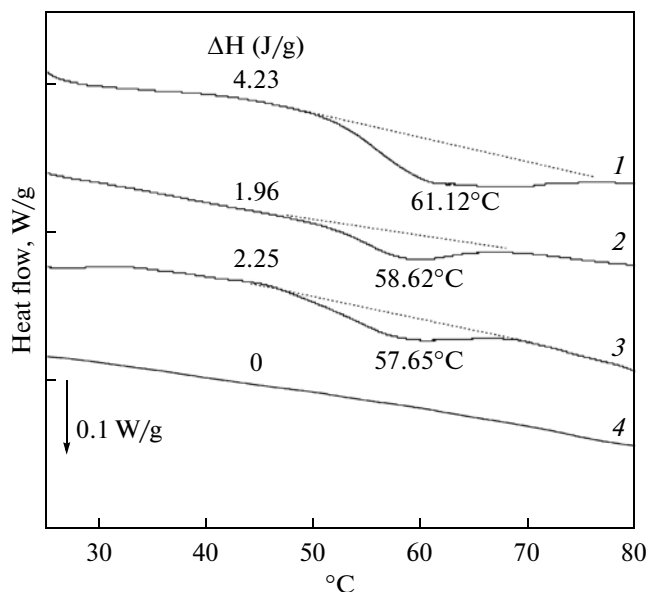


Fig. 2. Effect of drying conditions on differential scanning calorimetric thermograms of *P. variotii* 102: 1 – wet mycelium, 2 – freeze-dried mycelium, 3 – mycelium dried at 50°C, 4 – mycelium dried at 80°C.

The drying temperature used in this work was obtained from the DSC thermograms: 50°C and 80°C corresponding to the beginning and the end of the endothermic transition, respectively. Freeze-drying was an additional condition. Figure 2 demonstrates the thermograms obtained for *P. variotii* 102 as an example of the general behavior of all the strains studied. In comparison to wet control mycelium, for all dried mycelia (particle size $< 500 \mu\text{m}$), a decrease in denaturation enthalpy between 40 and 50% was observed for drying at 50°C and freeze-drying, and a drastic decrease of almost 100% occurred for drying at 80°C.

Hydration properties. Wet mycelia. All samples analyzed showed good hydration properties. Wet mycelia of the *P. variotii* strains showed high WHC, with mean values of 45 g of water/g of dry matter.

Effect of the drying conditions of mycelia. The dried mycelia used in this assay were sieved in $< 500 \mu\text{m}$ particle size, and distilled water was used to determine their hydration properties. Figure 3 shows the WHC values for the different strains of *P. variotii* dried under different conditions: 50°C > freeze-dried > 80°C ($p < 0.05$). Mean values of WHC were 8.8 g of water/g of dry matter at 50°C, 7.4 g of water/g of dry matter at freeze-drying and 3.5 g of water/g of dry matter at 80°C. These values correspond to losses in WHC of 80, 83 and 92%, respectively, compared with wet mycelia.

During study of the effect of the different drying conditions on WAC a similar pattern was revealed in all *P. variotii* strains. As an example, Fig. 4 shows the water absorption kinetics for *P. variotii* 101. The sam-

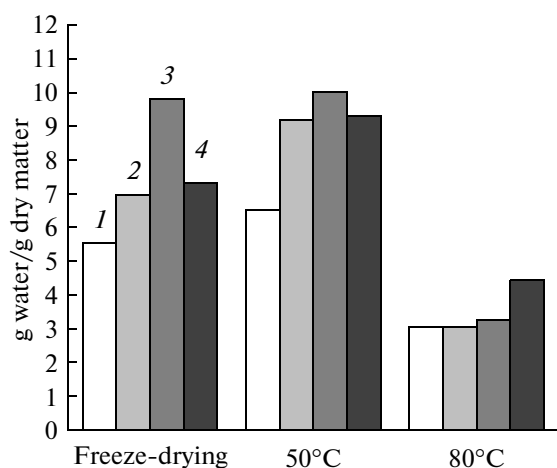


Fig. 3. The WHC of the *P. variotii* strains dried under different conditions. 1 – *P. variotii* 101; 2 – *P. variotii* 102; 3 – *P. variotii* 439; 4 – *P. variotii* 440.

ples dried at 50°C and freeze-drying showed rapid water absorption, with $t_{1/2}$ values shorter than 0.1 min. Freeze-dried mycelia exhibited the highest values of WAC (mean values: 6.4 g of water/g of dry matter). These values correspond to losses in WAC of 17% at 50°C and 75% at 80°C, respect to freeze-dried mycelia.

As a consequence of drying to 80°C, a pronounced loss of both hydration properties analyzed was observed. This effect could be related to the total protein denaturation of mycelia at this temperature.

Effect of particle size. Mycelia dried at 50°C were used for this assay. The larger particles of mycelia tended to improve WHC, except for *P. variotii* 101, where no significant differences ($p < 0.05$) for the different particle sizes were observed (Table 1). For WAC deter-

Table 1. WHC (g of water/g of dry matter) of mycelial particles from different strains of *P. variotii* dried at 50°C*

Fungal strain	Particle size, μm		
	<500	500–850	>850
<i>P. variotii</i> 102	8.8 $\pm$ 0.1 ^a	10.8 $\pm$ 0.9 ^b	10.3 $\pm$ 0.9 ^b
<i>P. variotii</i> 439	9.2 $\pm$ 0.7 ^a	10.4 $\pm$ 0.8 ^{ab}	12.6 $\pm$ 1.2 ^b
<i>P. variotii</i> 440	6.8 $\pm$ 0.3 ^a	7.5 $\pm$ 0.1 ^a	8.6 $\pm$ 0.5 ^b
<i>P. variotii</i> 101	7.8 $\pm$ 0.4 ^a	7.4 $\pm$ 0.3 ^a	7.7 $\pm$ 0.4 ^a

* All results are mean values and S.D. of 3 replicates. Values followed by the different letter (a, b) within the row are significantly different ($p < 0.05$) by the LSD test.

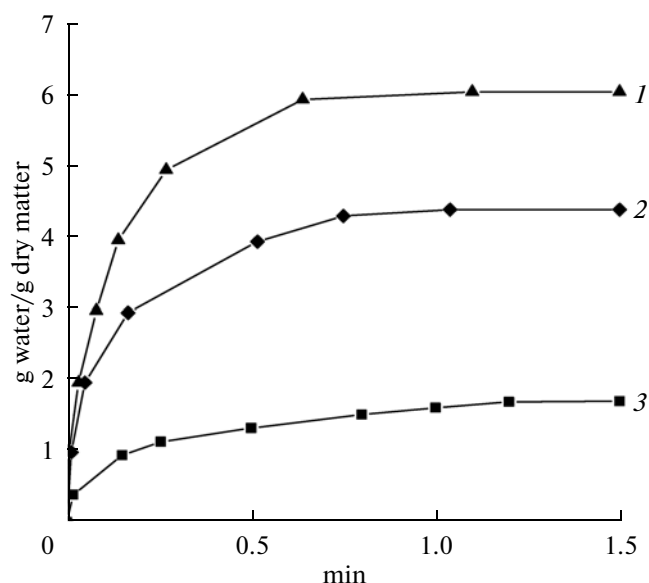


Fig. 4. Water absorption kinetics for *P. variotii* strain 101 dried under different conditions: 1 – freeze-drying, 2 – 50°C, 3 – 80°C.

mination, the 500–850 μm particles showed the highest values for all strains (Fig. 5), except for *P. variotii* 440. The kinetic values obtained for the larger particles were not reproducible among the repetitions. This was probably due to the lack of uniformity in the particle population.

Effect of the environmental medium. At pH 5.0 and 7.0 in the presence of 0 and 1% of NaCl mycelia samples exhibited the highest values of WAC at shorter times. As the concentration of NaCl increased, the WAC decreased, which is in agreement with that found in previous works on yeast protein [27] and isolated soy protein [23]. The reduced WAC can be attributed mainly to the shielding effect of NaCl ion pairs, which prevents water molecules from interacting with protein molecules [28].

At pH 7.0 0.1 M phosphate buffer increased the holding capacity of the mycelia compared to distilled water.

Table 2 demonstrates a trend towards a decrease in WHC at pH 7.0 as the NaCl concentration increased, reaching an average maximum decrease of 20% (3% NaCl) compared to control (0%), being *P. variotii* 102 the strain that suffered the sharpest decrease (26%).

At pH 5.0, the trend was similar but with lower absolute values. The mean maximum decrease was 14% (3% NaCl) compared to control, being *P. variotii* 439 the strain that suffered the largest decrease (16%).

Because we found no data on hydration properties of whole organisms, we compared our results (mean value of 11.9 g of water/g of dry mycelia) with works performed on proteins isolated from different sources.

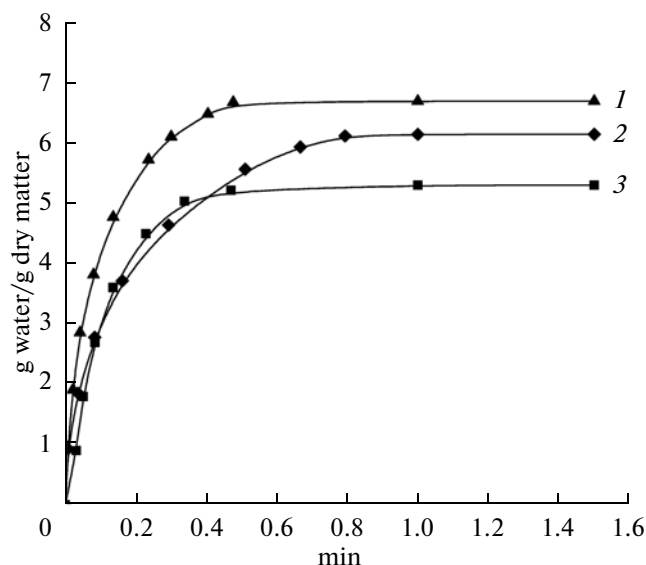


Fig. 5. Influence of particle size of mycelia on water absorption kinetics for strain *P. variotii* 439 dried at 50°C: 1 – 500–850 µm, 2 – <500 µm, 3 – >850 µm.

Thus, protein from plant sources, such as soybean, cottonseed and sunflower, exhibited WHC values ranging from 2.5 to 6.0 g of water/g of protein [27]. Protein isolates from yeast (*S. cerevisiae* and *K. fragilis*) treated under different conditions of incubation and precipitation exhibited WHC values from 3.58 to 6.94 g of water/g of protein [26]. These values of WHC are lower than those obtained in this work for *P. variotii* with 0% NaCl at pH 7.0 dried at 50°C. These results revealed the important contribution provided by the fibers, in addition to the protein, in the WHC of the whole organisms.

Effect of hot water on WHC. The WHC values were not negatively modified when hot water was used instead of room temperature water (Table 3). After these

assays, DSC determinations were performed on the pellets obtained. A complete protein denaturation was observed for the pellets treated with hot water (data not shown). These results suggest that rehydration in hot water, although producing total protein denaturation, does not affect WHC values.

Viability of *P. variotii* dried at 50°C. The growth rate of *P. variotii* dried at 50°C was 19.9 mm/day and 18.1 mm/day at 25°C for *P. variotii* 101 and *P. variotii* 440, respectively. There was no germination of these fungi when suspensions were incubated at 5°C for 30 days.

Wet mycelia of *P. variotii* exhibit good water holding capacity. The drying process required for the use of mycelia as a food ingredient affected both the WHC and WAC of mycelia. Drying at 50°C, at which protein denaturation was only partial, the WHC values were higher than those obtained with freeze-drying. Although the rehydration of fungal strains denatured the proteins completely in hot water at 80°C, it did not influence the WHC. On the other hand, drying at 80°C significantly reduced the hydration properties. This result might be due to a simultaneous process of protein denaturation and aggregation.

Environmental conditions, such as pH and ionic strength of the growth medium, also influence the water absorption and holding capacities, although not more than 20%. This behavior could be attributed mainly to the effect of the mentioned parameters on mycelial proteins and polysaccharides. These properties are also dependent on the particle size of dried mycelia.

The results of this study demonstrate the potential use of *P. variotii* in food, marketed dry to be then reconstituted in both cold and hot aqueous media, and be consumed at the time or after a short cooling time. However, this product should be subjected to rigorous toxicity studies imposed by the Food and Drug Adminis-

Table 2. WHC (g of water/g of dry matter) of different strains of *P. variotii* dried at 50°C and pH 7 for particles of 500–850 µm*

Fungal strain	NaCl, %			
	0	1	2	3
<i>P. variotii</i> 102	12.6 ± 0.7 ^b	12.9 ± 0.1 ^b	9.8 ± 0.3 ^a	9.1 ± 0.7 ^a
<i>P. variotii</i> 439	15.7 ± 0.9 ^b	13.2 ± 0.5 ^a	12.9 ± 0.9 ^a	12.5 ± 0.2 ^a
<i>P. variotii</i> 440	10.9 ± 0.7 ^b	10.3 ± 0.4 ^b	8.4 ± 0.2 ^a	9.1 ± 0.3 ^a
<i>P. variotii</i> 101	8.5 ± 0.1 ^{bc}	9.1 ± 0.2 ^c	8.1 ± 0.5 ^{ab}	7.7 ± 0.2 ^a

* All results are mean values and S.D. of 3 replicates. Values followed by the different letter (a, b, c) within the row are significantly different ($p < 0.05$) by the LSD test.

Table 3. WHC (g of water/g of dry matter) of *P. variotii* 101 and *P. variotii* 440 dried at 50°C under different measurement conditions*

Strain	Conditions	WHC
<i>P. variotii</i> 101	A	6.54 ± 0.35
	B	6.57 ± 0.21
	C	6.16 ± 0.08
<i>P. variotii</i> 440	A	6.47 ± 0.21
	B	6.67 ± 0.14
	C	7.65 ± 0.21

* A – 100 mg of sample + 9 mL of distilled water at room temperature. B – 100 mg of sample + 1 mL of distilled water at room temperature and 8 mL of hot distilled water (80°C). C – 100 mg of sample + 9 mL of hot distilled water (80°C).

tration (USA) for new ingredients and/or additives in food.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (Argentina) for their financial support.

REFERENCES

- Bainer, G., *Quarterly Newsletter of the Mycological Society of France*, 1907, vol. 23, pp. 26–27.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D., *Fungi and Food Spoilage*, Dordrecht: Springer, 2009.
- Michelin, M., Ruller, R., Ward, R.J., Moraes, L.A., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., and Polizeli, Mde L. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, vol. 35, no. 1, pp. 17–25.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., and Mohan, R., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2000, vol. 31, pp. 135–152.
- Rodriguez, V.B., Alameda, E.J., Gallegos, J.F.M., Requena, A.R., and López, A.I.G., *Biotechnol. Prog.*, 2006, vol. 22, no. 3, pp. 718–722.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., and Chauhan, B., *Process Biochem.*, 2003, vol. 38, no. 11, pp. 1599–1616.
- Liu, X.D. and Xu, Y., *Biores. Technol.*, 2008, vol. 99, no. 10, pp. 4315–4320.
- Battestin, V. and Macedo, G.A., *Biores. Technol.*, 2007, vol. 98, no. 9, pp. 1832–1837.
- Ugalde, U.O. and Castrillo, J.I., *Applied Mycology and Biotechnology. Agriculture and Food Production*, Amsterdam: Elsevier, 2002, vol. 2, pp. 123–149.
- Romantschuk, H. and Lehtomaki, M., *Process. Biochem.*, 1978, vol. 3, no. 29, pp. 16–19.
- Cabib, G., Silva, H.J., Giulietti, A., and Ertola, R., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1983, vol. 33B, pp. 21–28.
- Castlla, R.B., Waehner, R.S., and Giulietti, A.M., *Biotechnol. Lett.*, 1984, vol. 6, pp. 195–198.
- Bajpai, P. and Bajpai P., *J. Ferment. Technol.*, 1987, vol. 65, no. 3, pp. 349–351.
- Cheftel, J.C., Cuq, J.L., and Lorient, D., *Proteínas Alimentarias: Bioquímica, Propiedades Funcionales, Valor Nutricional, Modificaciones Químicas*, Zaragoza: Acribia, 1989, pp. 49–105.
- Fennema, O., *Química de los Alimentos*, 2 Ed., Acribia: Zaragoza, 2000.
- Koivurinta, J., Kurkela, R., and Koivistoinen, P., *Int. J. Food Sci. Technol.*, 1979, vol. 14, no. 6, pp. 561–570.
- Koivurinta, J., Kurkela, R., Koivistoinen, P., Holaso-vá, M., and Blattná, J., *Food/Nahrung*, 1980, vol. 24, no. 7, pp. 597–606.
- Kyanko, M.V., Canel, R.S., Ludemann, V., Pose, G., and Wagner, J.R., *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2013, vol. 49, no. 1, pp. 48–52.
- Harwing, J. and Scott, P.M., *Appl. Microbiol.*, 1971, vol. 21, no. 6, pp. 1011–1016.
- Official Method of Analysis*, Crude Protein in Animal Feed, Forage, Grain and Oilseeds, Washington: AOAC International, 2001.
- Prosky, L., Asp, N.G., Schweizer, T.F., DeVriesand, J.W., and Furda, I., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1988, vol. 71, no. 5, pp. 1017–1023.
- Lee, S.C., Prosky, L. and DeVries, J.W., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1992, vol. 75, pp. 131–133.
- Wagner, J.R. and Añón, M.C., *J. Food Sci.*, 1990, vol. 50, no. 3, pp. 765–770.
- Torgensen, H. and Toledo, R.T., *J. Food Sci.*, 1977, vol. 42, no. 6, pp. 1615–1618.
- Arrese, E.L., Sorgentini, D.A., Wagner, J.R., and Añón, M.C., *J. Agric. Food Chem.*, 1991, vol. 39, no. 6, pp. 1029–1032.
- Otero, M.A., Wagner, J.R., Vasallo, M.C., García, L., and Añón, M.C., *Food Chem.*, 2000, vol. 69, no. 2, pp. 161–165.
- Huang, Y.T. and Kinsella, J.E., *J. Agric. Food Chem.*, 1986, vol. 34, no. 4, pp. 670–674.
- Yao, J.J. and Inglett, G.E., *J. Food Sci.*, 1988, vol. 53, no. 2, pp. 464–467.

УДК 543.645:57.083.3

РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. Н. А. Бызова*, Л. Н. Лухверчик**, А. В. Жердев*, Н. В. Пивень**,
А. И. Бураковский**, Б. Б. Дзантиев*

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

**Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, 220141, Беларусь, e-mail: piven@iboch.bas-net.by

Поступила в редакцию 15.04.2013 г.

Разработан метод экспрессной детекции эпидермального фактора роста человека, представляющий собой иммунохроматографический анализ в “сэндвич”-формате. Контакт пробы и тест-полоски с нанесенными иммунореагентами инициирует движение жидкости по мембранным компонентам тест-полоски, иммунохимические взаимодействия и формирование окрашенных зон. В ходе разработки определены требования к комплектации тест-системы, обеспечивающие минимальный предел обнаружения. Показано, что данный метод позволяет за 5 мин детектировать эпидермальный фактор роста человека в концентрациях до 10 пг/мл в водных растворах, моче, сыворотке и плазме крови. Разработанная тест-система может быть использована для внелабораторной диагностики.

DOI: 10.7868/S0555109913060032

Эпидермальный фактор роста (ЭФР) — одноцепочечный глобулярный белок с м.м. 6,4 кДа, состоящий из 53 аминокислотных остатков [1]. ЭФР синтезируется преимущественно в слюнных железах [2] и присутствует во всех основных биологических жидкостях организма — в моче (в которой был описан как урогастрон), крови, cerebrospinalной жидкости, молоке, слюне, желудочном и панкреатическом соках [3]. ЭФР стимулирует пролиферацию различных эпидермальных и эпителиальных клеток (включая фибробласты, почечный эпителий, глиальные клетки, клетки гранулы яйчников и тиреоидные клетки) [4], а также эмбриональных клеток, способствуя высвобождению кальция из костной ткани и резорбции костей. Действие ЭФР вносит существенный вклад в процессы заживления ран и ангиогенеза. ЭФР играет важную роль в канцерогенезе, индуцируя, в частности, протоонкогены *c-fos* и *c-myc* [5]. Повышенный уровень ЭФР в крови и моче характерен для ряда онкологических заболеваний [6, 7].

Показано, что блокирование ЭФР антителами, препятствуя связыванию ЭФР со специфическим рецептором, тормозит развитие опухолей. Этот эффект используется в ряде разработок противоопухолевых вакцин [8–11]. Так, показана эффективность вакцины CimaVax-EGF для лечения немелкоклеточного рака легкого. При этом установлено, что ее терапевтический эффект зависит от уровня ЭФР в крови пациента [11].

На сегодняшний день в медицинской практике для определения концентрации ЭФР используются иммунохимические методы [12]. Коммерчески доступны иммуноферментные микропланшет-

ные наборы фирм “RnD Systems”, “eBioscience”, “RayBio”, “Invitrogen”, “Thermo Scientific”, “Abnova”, позволяющие определять природный и рекомбинантный ЭФР в среде для культивирования клеток, моче, сыворотке и плазме крови в концентрациях от 1 до 1000 пг/мл.

Однако иммуноферментный анализ (ИФА) в силу диффузионных ограничений требует довольно продолжительных инкубаций реагентов [13], вследствие чего продолжительность ИФА составляет от 2 до 4 ч. В последние годы в иммунохимическом анализе интенсивно идет замена традиционных форматов, таких как ИФА, на экспрессные тесты — иммуносенсорные, иммунохроматографические и др., позволяющие существенно (до 5–15 мин) сократить продолжительность определения и снизить его трудоемкость. Особый интерес в ряду этих методов представляет иммунохроматографический анализ (ИХА), в котором достигнуто максимальное методическое упрощение. Все необходимые для анализа реагенты предварительно наносятся на тест-полоску (мультимембранный композит). После ее контакта с тестируемой жидкой пробой одновременно с движением по тест-полоске впитавшейся жидкости осуществляются иммунохимические взаимодействия и формирование на определенных участках тест-полоски окрашенных зон, свидетельствующих о присутствии (а в ряде случаев — и о содержании) в пробе контролируемого соединения [13]. Таким образом, ИХА не предполагает использования устройств и реагентов, дополняющих тест-полоску, а также каких-либо действий оператора в ходе анализа. Это позволяет проводить тестирование вне специали-

зированных лабораторий и регистрировать его результат либо визуально, либо с помощью портативных детектирующих устройств — от видеокамеры мобильного телефона или офисного сканера [14] до серийно производимых видеоцифровых детекторов [15].

Иммунохроматографические тест-системы для определения ЭФР на сегодняшний день не описаны в научной литературе и не представлены на рынке как коммерчески доступные изделия. Учитывая практическую значимость контроля содержания ЭФР для онкодиагностики и терапии, целью проведенного исследования была разработка иммунохроматографической тест-системы для определения ЭФР в водных растворах, моче, сыворотке и плазме крови. Достижение этой цели предполагало решение ряда методических задач, связанных с характеристикой взаимодействия иммунореагентов в проточной мембранной системе и оптимизации условий проведения иммунохроматографии. В настоящей статье представлены результаты, полученные при решении этих задач и характеристике разработанной тест-системы.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали рекомбинантный человеческий эпидермальный фактор роста, мышинные моноклональные (МАт), клон 10827, и поликлональные (ПАт), АВ-236-NA, козы антигена против ЭФР (все — “RnD Systems”, США), антигена козы (GAMIss), кролика (RAMIss) и овцы (SAMIss) против иммуноглобулинов (Ig) мыши и антигена кролика (RAGIss) против Ig козы (“Имтек”, Россия), антигена козы (GAMI) против Ig мыши и антигена осла (DAGI) против Ig козы (“Arista Biologicals”, США), трис, Тритон X-100, цитрат натрия, азид натрия, золотохлористоводородную кислоту (“Sigma”, США), Твин-20, бычий сывороточный альбумин (БСА) (“MP Bio-medicals”, Великобритания). Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щелочи, органические растворители) были аналитической или химической чистоты.

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

Для изготовления иммунохроматографических тест-полосок использовали наборы mdi Easypack (“Advanced Microdevices”, Индия), включающие закрепленную на твердой основе рабочую мембрану CNPF-SN12 с размером пор 10 мкм, стекловолоконную мембрану для коллоидного конъюгата PT-R7, мембрану для нанесения пробы FR-1 и конечную адсорбирующую мембрану AP045.

Получение КЗ цитратным методом [16]. К 97.5 мл деионизированной воды добавляли 1.0 мл 1%-ного раствора золотохлористоводородной кислоты, доводили до кипения и при перемешивании добавляли 1.5 мл 1%-ного раствора цитрата натрия. Смесь кипятили 25 мин, затем охлаждали и хранили при 4–6°C.

Просвечивающая электронная микроскопия. Препараты КЗ наносили на сеточки (300 меш., “Pelco International”, США), покрытые пленкой-подложкой из поливинилформала, растворенного в хлороформе. Снимки получали на электронном микроскопе CX-100 (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении 3300000. Фотографии в цифровой форме анализировали в программе Image Tool.

Получение конъюгатов КЗ с антителами. Предварительную характеристику связывания антител с КЗ проводили согласно [17]. С этой целью к 0.1 мл раствора антител в воде (МАт либо ПАт; концентрацию варьировали от 5 до 250 мкг/мл) добавляли по 1.0 мл раствора КЗ ($D_{520} = 1.0$), перемешивали и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 0.1 мл 10%-ного хлорида натрия, перемешивали и через 10 мин измеряли D_{580} . Зависимость D_{580} от концентрации антител (флоккуляционная кривая) отражала агрегацию получаемого конъюгата при высокой ионной силе раствора. Выбор соотношений антитела : КЗ проводили на основании полученных концентрационных зависимостей, используя антитела в количестве, на 10–15% превосходящем точку выхода D_{580} на плато, как рекомендовано в [17].

Перед конъюгацией с КЗ антитела диализовали против 1 000-кратного объема 10 mM трис-НCl буфера, pH 9.0, в течение 2 ч при 4°C. К раствору КЗ ($D_{520} = 1.0$) добавляли 0.1 M карбонат калия до достижения pH 9.0 и вносили КЗ в раствор антител выбранной концентрации. Смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре и перемешивании, после чего вносили водный раствор БСА до конечной концентрации 0.25%. Частицы КЗ с иммобилизованными на них антителами отделяли от непрореагировавших антител центрифугированием при 8000 g в течение 30 мин. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в 10 mM трис-НCl буфере, pH 9.0, содержащем 0.25% БСА, 0.05% Твина 20 и 0.05% азида натрия (Трис-БТА). Препараты конъюгатов хранили при 4–6°C.

Изготовление иммунохроматографических тест-систем. Нанесение реагентов на мембраны, входящие в состав тест-системы, проводили с использованием автоматического диспенсера IsoFlow (“Image Technology”, США). Конъюгаты КЗ с МАт (МАт–КЗ) и ПАт (ПАт–КЗ) наносили на стекловолоконную мембрану в разведении, соответствующем $D_{520} = 6.0$ (16 мкл на 1 см ширины

стекловолоконной мембраны). Для формирования аналитической зоны использовали МАт или ПАт (0.5 мг/мл в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 0.1 М хлорида натрия, 0.05% БСА и 0.1% азида натрия, **ФБС-БА**), контрольной зоны — антигенов GAMI, GAMIss, RAMIss, SAMIss (0.5 мг/мл в **ФБС-БА**) для конъюгата МАт—КЗ либо антигенов RAGIss и DAGI (0.3 мг/мл в **ФБС-БА**) для конъюгата ПАт—КЗ. На 1 см ширины рабочей мембраны наносили по 2.0 мкл растворов. Полученные стекловолоконные и рабочие мембраны сушили на воздухе при 20–22°C не менее 20 ч. Из этих двух мембран, мембраны для нанесения пробы и конечной адсорбирующей мембраны собирали мультимембранный композит и получали из него тест-полоски шириной 3.5 мм, используя автоматический гильотинный нарезчик Index Cutter-1 (“A-Point Technologies”, США). Эти тест-полоски герметично упаковывали с силикагелем в качестве осушителя в пакеты из ламинированной алюминиевой фольги с помощью запаивателя с миниконвейером FR-900 (“Wenzhou dingli packing machinery”, Китай). Нарезку и упаковку проводили при 20–22°C в специальном помещении с относительной влажностью воздуха не более 30%. Упакованные тест-полоски хранили при комнатной температуре.

Иммунохроматографический анализ и регистрация результатов. Анализ проводили при комнатной температуре. Вскрывали пакет, извлекали тест-полоску и в вертикальном положении погружали ее нижний конец на 1 мин в аликвоту пробы (50 мкл), после чего помещали тест-полоску на горизонтальную поверхность. Через 5 мин после начала анализа контролировали результат, получая цифровое изображение тест-полоски на сканере CanoScan LiDE 90 (“Canon”) и рассчитывая интенсивность окрашивания зон на мембране с помощью программы TotalLab, как описано в работе [18], или с помощью видеоцифрового детектора Рефлеком фирмы “Окта-Медика”, Россия [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика реагентов для иммунохроматографии. Размеры молекулы ЭФР позволяют ожидать наличие у нее нескольких неперекрывающихся антиген-связывающих сайтов. Благодаря этому становится возможным реализовать для детектирования ЭФР двухсайтный “сэндвич”-формат иммунохроматографического анализа, основанный на формировании в ходе анализа комплекса (иммобилизованные в аналитической зоне антигенов против ЭФР) : (ЭФР в тестируемой пробе) : (антигенов против ЭФР, конъюгированные с КЗ). Для проведения данного анализа были получены препарат КЗ и его конъюгаты со специфическими антигенами.

Размеры и однородность частиц КЗ, синтезированных цитратным методом, определяли с по-

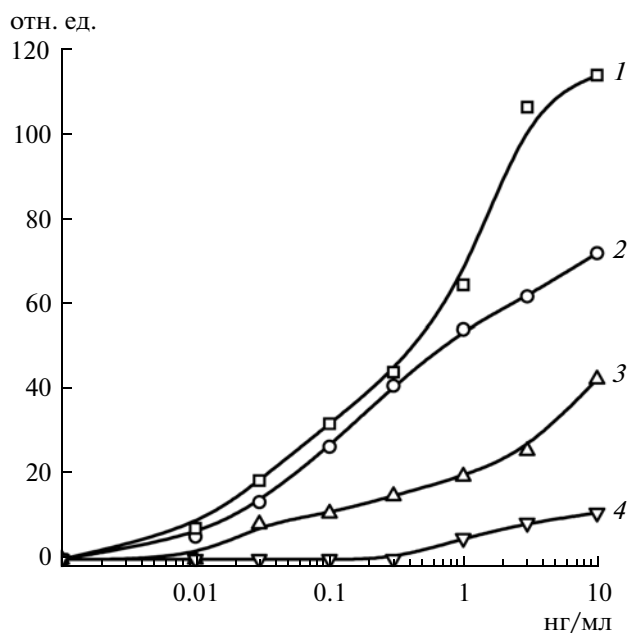


Рис. 1. Зависимость интенсивности окрашивания аналитической зоны (отн. ед.) от концентрации ЭФР (нг/мл) для четырех вариантов иммунохроматографических тест-систем: в аналитической зоне сорбированы ПАт (кривые 1, 3) либо МАт (кривые 2, 4); с коллоидным золотом конъюгированы МАт (кривые 1, 4) либо ПАт (кривые 2, 3).

мощью просвечивающей электронной микроскопии. Было показано, что полученный препарат КЗ не содержит агрегатов и характеризуется средним диаметром частиц 34 нм (по данным 90 измерений). Среднее значение максимальной оси изображений частиц составляло 37 ± 8 нм, минимальной оси — 30 ± 5 нм.

На основании флоккуляционных кривых для получения конъюгатов МАт—КЗ и ПАт—КЗ были выбраны концентрации антигенов, равные 12 (МАт) и 9 (ПАт) мкг/мл. Для этих условий синтеза конъюгатов молярное соотношение антигена : КЗ в реакционной смеси составляло 380 : 1 для МАт и 290 : 1 для ПАт, являясь, таким образом, избыточным по сравнению с пропорцией, достигаемой при монослойной иммобилизации [19]. Избыток непрореагировавших антигенов удаляли с супернатантом при осаждении конъюгатов центрифугированием.

Выбор комплектации иммунохроматографической тест-системы. С использованием двух препаратов антигенов, специфичных к ЭФР, были изготовлены иммунохроматографические тест-системы четырех видов (рис. 1). В первом и третьем вариантах тест-систем в аналитической зоне сорбировали ПАт, во втором и четвертом — МАт. В первом и четвертом вариантах с КЗ конъюгированы МАт, во втором и третьем — ПАт. Для каждой комплектации были получены зависимости интенсивности окрашивания аналитической зоны от

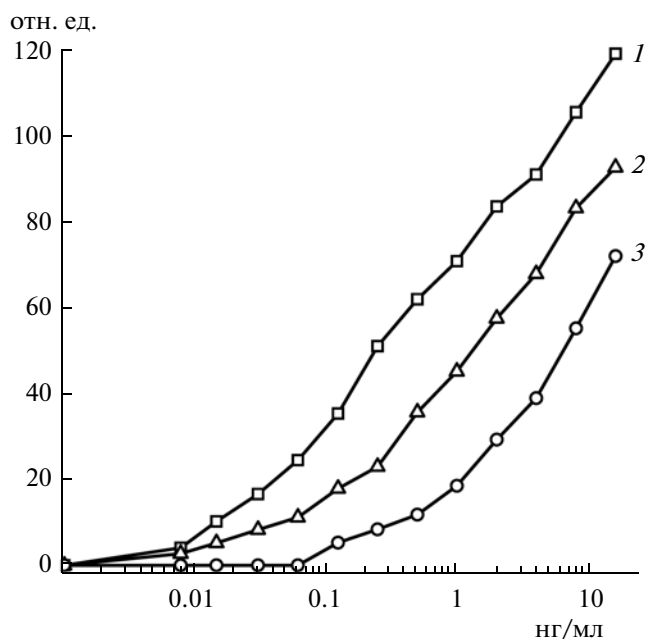


Рис. 2. Зависимости интенсивности окрашивания аналитической зоны иммунохроматографической тест-системы (отн. ед.) от концентрации ЭФР (нг/мл), полученные при сорбции ПАТ из концентраций 0.5, 0.25 и 0.125 мг/мл для кривых 1–3 соответственно.

концентрации ЭФР в пробе. Как следует из представленных на рис. 1 результатов, первый и второй варианты тест-систем позволяют детектировать ЭФР в концентрациях до 10 пг/мл, третий — до 30 пг/мл, а четвертый — до 1 нг/мл. Максимальная интенсивность окрашивания аналитической зоны для первого варианта тест-системы в 1.7, 4 и 12 раз больше, чем для второго, третьего и четвертого вариантов тест-систем соответственно. Таким образом, предпочтительным является первый вариант тест-системы: в аналитической зоне сорбированы ПАТ, а с КЗ конъюгированы МАТ.

Оптимизация выбранного варианта тест-системы. Для обеспечения максимальной достоверности результатов тестирования и выявления ЭФР в минимальных концентрациях была проведена оптимизация тест-системы, включавшая выбор типа и концентрации реагентов в контрольной, аналитической и стартовой зонах тест-полоски.

Исходя из данных наших предшествующих работ [18, 19], реагенты в контрольную и аналитическую зоны наносили из объема 2.0 мкл на 1 см ширины рабочей мембраны, что обеспечивает равномерность иммобилизации и, соответственно, минимальный разброс между изготовленными в одной серии тест-полосками по степени связывания окрашенного маркера при проведении анализа.

Конъюгат МАТ–КЗ наносили из раствора с $D_{520} = 6.0$ при скорости 16.0 мкл на 1 см ширины стекловолоконной мембраны. Это обеспечивало формирование интенсивно окрашенных зон в ходе анализа в сочетании с полнотой вымывания реагента из стартовой зоны и отсутствием неспецифического окрашивания рабочей мембраны.

Серия препаратов антител против Ig мыши, нанесенных в контрольную зону, была сопоставлена по связыванию конъюгата МАТ–КЗ в ходе иммунохроматографии. При насыщающих концентрациях реагентов (см. раздел “Методика”) интенсивность окрашивания контрольной зоны составляла: для козьих антител 80 отн. ед. (GAMIss) и 87 отн. ед. (GAMI), для кроличьих антител (RAMIss) — 51 отн. ед. и для овечьих антител (SAMIss) — 73 отн. ед. Для дальнейшего использования в анализе были выбраны козьи антитела GAMI фирмы “Arista Biologicals”, обеспечивающие максимальное связывание окрашенного маркера.

При формировании аналитической зоны варьировали количество сорбируемых ПАТ. На рис. 2 представлены градуировочные кривые ИХА ЭФР, полученные при иммобилизации в аналитической зоне ПАТ из растворов с концентрациями 0.5, 0.25 и 0.125 мг/мл. Установлено, что при концентрациях сорбируемых ПАТ 0.5 и 0.25 мг/мл предел обнаружения ЭФР составляет 10 пг/мл, а при концентрации ПАТ 0.125 мг/мл — 100 пг/мл. Интенсивность окрашивания аналитической зоны при концентрации ЭФР в пробе 16 нг/мл составляла 120, 93 и 72 отн. ед. для концентраций ПАТ, равных 0.5, 0.25 и 0.125 мг/мл соответственно. Исходя из этих данных и необходимости максимальной достоверности диагностики, был выбран вариант изготовления тест-систем, предусматривающих иммобилизацию ПАТ в аналитической зоне из раствора с концентрацией 0.5 мг/мл.

Характеристика разработанной иммунохроматографической тест-системы. На основании результатов оптимизации были изготовлены тест-полоски и охарактеризовано определение с их использованием ЭФР в стандартных растворах, моче, сыворотке и плазме крови.

На рис. 3 представлены результаты тестирования проб с разной концентрацией ЭФР в буфере (50 мМ К-фосфатный буфер, pH 7.4, с 0.1 М NaCl; ФБС). Предел обнаружения ЭФР составляет 10 пг/мл, точность определения (среднеквадратичное отклонение регистрируемой интенсивности окрашивания) — 5–7%.

Далее нами была проведена характеристика определения ЭФР в сыворотке и плазме крови. Как следует из представленных на рис. 4, 5 результатов тестирования и полученных концентрационных зависимостей, предел обнаружения ЭФР в этих видах проб также равняется 10 пг/мл. Отсутствие негативного влияния матрикса на результаты тести-

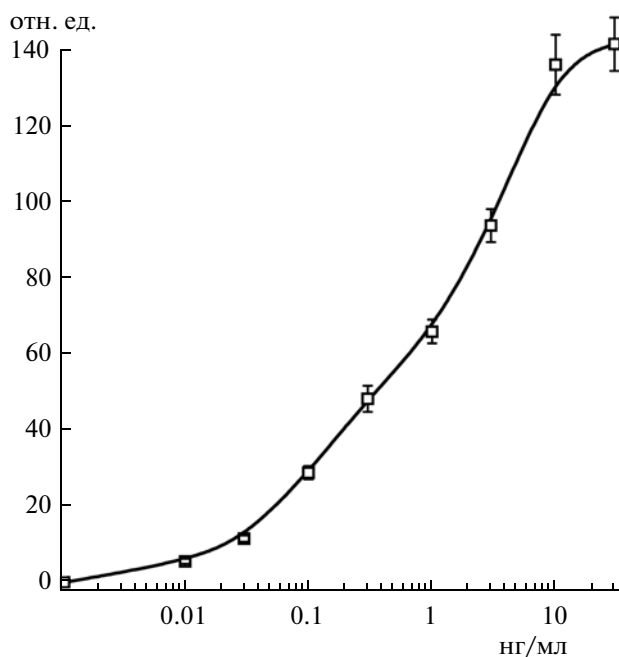


Рис. 3. Зависимость интенсивности окрашивания аналитической зоны (отн. ед.) от концентрации ЭФР (нг/мл) при определении ЭФР в ФБС с использованием иммунохроматографической тест-системы, изготовленной в соответствии с оптимизированной методикой.

рования исключает необходимость дополнительного разведения проб и упрощает процедуру проведения анализа. Точность определения при тестировании проб плазмы составляет 3–7%, а в сыворотке достигает 10%. Отметим монотонную зависимость интенсивности окрашивания от кон-

центрации ЭФР во всем диагностически значимом диапазоне концентраций — до 10 нг/мл (некоторый спад наблюдается лишь при детектировании ЭПР в концентрациях, больших 10 нг/мл, в пробах сыворотки). Таким образом, выбранные концентрации иммунореагентов исключают так называемый “хук”-эффект — снижение сигнала при высоких концентрациях антигена [20] — и позволяют проводить достоверное количественное определение ЭФР. Связывание конъюгата в аналитической зоне не препятствует контролю качества тест-системы по взаимодействию непрореагировавшего конъюгата с антивидовыми антителами в контрольной зоне. И в случае сыворотки, и в случае плазмы крови окрашивание контрольной зоны достоверно регистрируется во всем диапазоне концентраций ЭФР.

Для предварительной характеристики возможностей определения ЭФР в моче был охарактеризован ряд разведений биопробы (столбцы 2–8 на рис. 6), а также результаты добавления стандартного ЭФР в неразбавленную пробу мочи (столбцы 9, 10). Полученная корреляция интенсивности окрашивания с содержанием ЭФР (эндогенного или добавленного при проведении эксперимента) подтверждает возможность детектирования ЭФР в данном матриксе.

Поскольку матрикс проб потенциально может влиять на скорость движения фронта жидкости и иммунореагентов вдоль тест-полоски, была экспериментально исследована динамика окрашивания аналитической и контрольной зон при тестировании проб сыворотки. Как следует из представленных на рис. 7 данных, через 3 мин после начала движения фронта жидкости интенсивность окрашивания контрольной зоны составля-

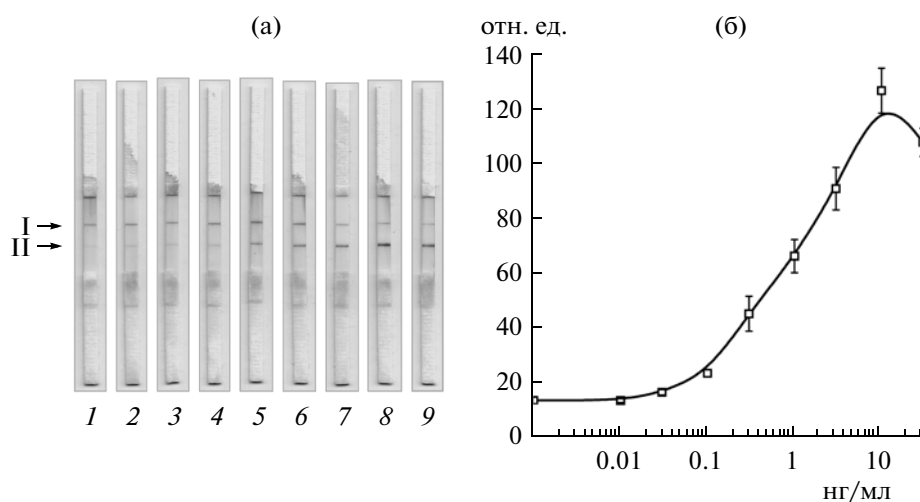


Рис. 4. Иммунохроматографическое определение ЭФР в сыворотке крови: а — внешний вид тест-полосок после проведения анализа (I — контрольная зона, II — аналитическая зона); 1–9 — концентрации ЭФР 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 и 30 нг/мл; б — зависимость интенсивности окрашивания аналитической зоны (отн. ед.) от концентрации ЭФР (нг/мл).

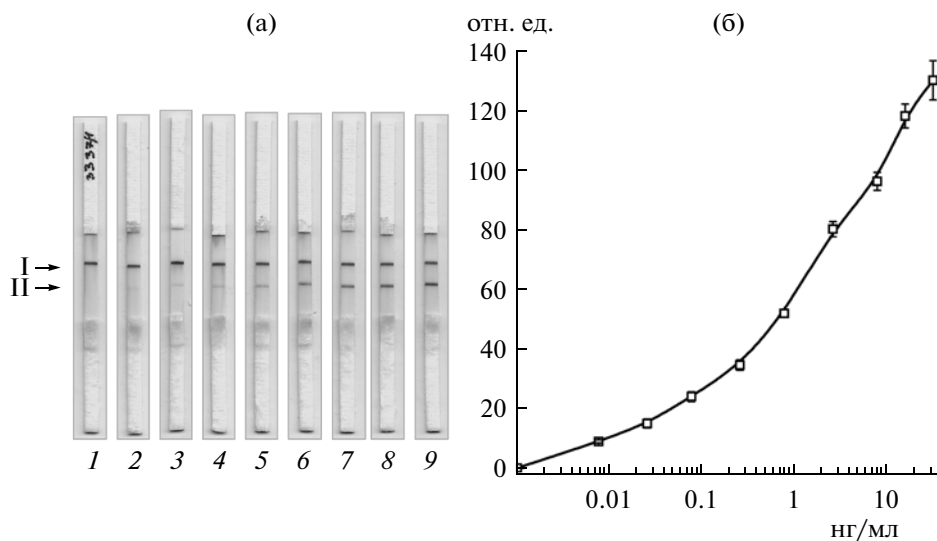


Рис. 5. Иммунохроматографическое определение ЭФР в плазме крови: а – внешний вид тест-полосок после проведения анализа (I – контрольная зона, II – аналитическая зона); 1–9 – концентрации ЭФР 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 и 30 нг/мл; б – зависимость интенсивности окрашивания аналитической зоны (отн. ед.) от концентрации ЭФР (нг/мл).

ла 81%, а аналитической зоны 48% от максимума, через 5 мин – 93 и 78%, через 7 мин – 97 и 88%, соответственно. Процесс формирования детектируемых комплексов не замедляется под действием матрикса проб и идет с такой же скоростью, как для стандартных растворов ЭФР, что позволяет осуществлять быстрое тестирование. Исходя из

полученных результатов, рекомендуемая продолжительность определения ЭФР с использованием разработанной тест-системы составляет 5 мин.

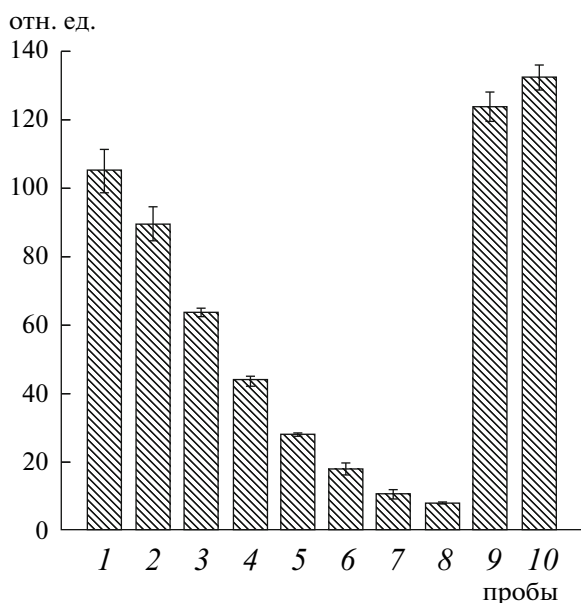


Рис. 6. Иммунохроматографическое определение ЭФР в моче. Проба 1 соответствует неразбавленной моче; пробы 2–8 – разбавлениям мочи ФБС в 2, 4, 8, 16, 32, 64 и 128 раз, соответственно; пробы 9 и 10 – неразбавленной моче с добавленным ЭФР в концентрациях 10 (9) и 20 (10) нг/мл.

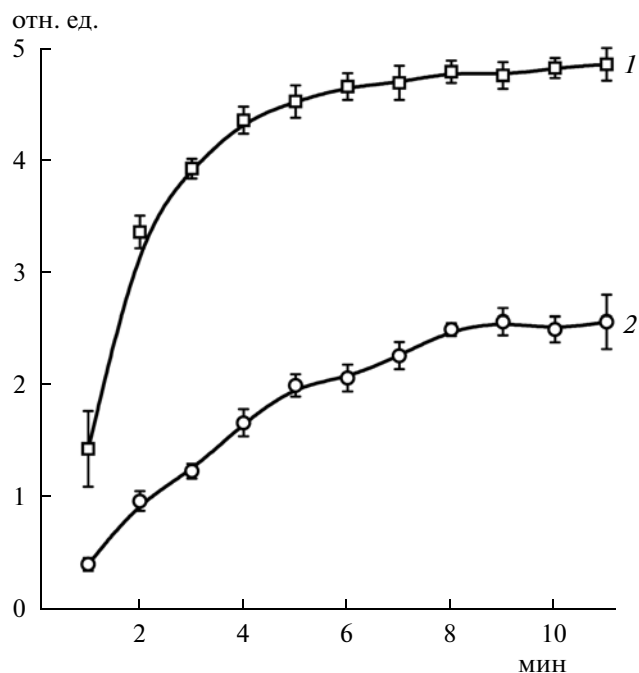


Рис. 7. Динамика окрашивания контрольной (1) и аналитической (2) зон в иммунохроматографической тест-системе определения ЭФР при тестировании сыворотки крови с концентрацией ЭФР 1 нг/мл. 1 отн. ед. интенсивности окрашивания, полученная с помощью Рефлекса, соответствует 35 отн. ед., полученным с помощью сканера.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения разработанной системы для детектирования ЭФР во всем физиологическом диапазоне концентраций — вплоть до 10 пг/мл. Регистрация интенсивности окрашивания аналитической зоны позволяет проводить количественное определение содержания ЭФР. Продолжительность анализа составляет всего 5 мин, причем тестирование биопроб (плазма, сыворотка, моча) не требует какой бы то ни было их предварительной подготовки. Нетривиальным результатом является универсальность тест-системы — пригодность одной и той же ее комплектации для характеристики и мочи, и препаратов крови. Впервые разработанная иммунохроматографическая система представляется перспективным аналитическим средством при диагностике онкологических заболеваний, планировании и контроле терапевтических мероприятий.

Исследования проведены при поддержке Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (государственный контракт № 14.740.11.1065 от 24 мая 2011 г.).

Авторы благодарят С.М. Придворову (Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва) за проведение электронно-микроскопических измерений препарата коллоидного золота.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boonstra J., Rijken P.J., Humbel B., Cremers F., Verkleij A.J., van Bergen en Henegouwen P.M.P. // *Cell Biol. Intern.* 1995. V. 19. № 5. P. 413–430.
2. Gresik E.W. // *Microsc. Res. Tech.* 1994. V. 27. № 1. P. 1–24.
3. Jorgensen P.E. // *Danish Med. Bull.* 1997. V. 44. № 2. P. 111–124.
4. Duffy M.J., O'Donovan N., Crown J. // *Cancer Treatment Rev.* 2011. V. 37. № 2. P. 151–159.
5. Aaronson S.A. // *Science*. 1991. V. 254. № 5035. P. 1146–1153.
6. Шаназаров Н.А., Сабилов А.Х., Сироткина С.М. // *Росс. биотерапевт. журн.* 2009. Т. 8. № 4. С. 85–90.
7. Унгер К., Муш А., Залуцкий И.В., Петрович С.В., Жаврид Э.А. // *Онкологич. журн.* 2009. Т. 3. № 1. С. 51–64.
8. Cheng J.Y., Kananathan R. // *Human Vaccines Immunotherapeutics*. 2012. V. 8. № 12. P. 1799–1801.
9. Gonzalez M., Gisela M., Santos E.S., Raez L.E. // *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2012. V. 12. № 4. P. 439–445.
10. Neningen E., Verdecia B.G., Crombet T., Viada C., Pareda S., Leonard I., Mazorra Z., Fleites G., Gonzalez M., Wilkinson B., Gonzalez G., Lage A. // *J. Immunother.* 2009. V. 32. № 1. P. 92–99.
11. Garcia B., Neningen E., de la Torre A., Leonard I., Martinez R., Viada C., Gonzalez G., Mazorra Z., Lage A., Crombet T. // *Clin. Cancer Res.* 2008. V. 14. № 3. P. 840–846.
12. Sizemore N., Dudeck R.C., Barksdale C.M., Nordblom G.D., Mueller W.T., McConnell P., Wright D.S., Guglietta A., Kuo B.S. // *Pharm. Res.* 1996. V. 13. № 7. P. 1088–1094.
13. Дзантиев Б.Б., Жердев А.В. // *Биохимические методы анализа* / Ред. Б.Б. Дзантиев. М.: Наука, 2010. С. 303–332.
14. Breslauer D.N., Maamari R.N., Switz N.A., Lam W.A., Fletcher D.A. // *PLoS ONE*. 2009. V. 4. № 7. P. e6320.
15. Старовойтова Т.А., Зайко В.В., Стериополо Н.А., Мартынкина Л.П., Кутвицкий В.А., Туголуков А.Е., Волощук С.Г., Тогузов Р.Т., Венгеров Ю.Ю. // *Биомед. журн. Medline.ru*. 2010. Т. 11. С. 44–62.
16. Frens G. // *Nat. Phys. Sci.* 1973. V. 241. № 105. P. 20–22.
17. Hermanson G.T. *Bioconjugate Techniques*. Amsterdam: Acad. Press, Elsevier, 2008. 900 p.
18. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B. // *Talanta*. 2010. V. 81. № 3. P. 843–848.
19. Бызова Н.А., Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. // *Прикл. биохим. микробиол.* 2011. Т. 47. № 6. С. 685–693.
20. Schweers B.A., Old J., Boonlayangoor P.W., Reich K.A. // *Forensic Sci. Intern.: Genetics*. 2008. V. 2. № 3. P. 243–247.

Development of an Immunochromatographic Test System for the Detection of Human Epidermal Growth Factor

N. A. Byzova^a, L. N. Lukhverchik^b, A. V. Zherdev^a, N. V. Piven^b, A. I. Burakovskii^b, and B. B. Dzantiev^a

^a A. N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect 33, Moscow, 119071 Russia

^b Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Kuprevich str. 5/2, Minsk, 220141 Belarus
e-mails: nbyzova@inbi.ras.ru; piven@iboch.bas-net.by

Received April 15, 2013

Abstract—A method was developed for the rapid detection of human epidermal growth factor based on a sandwich-format immunochromatographic assay. The contact between the sample and the test strip with immobilized immunoreagents initiates the fluid flow movement across the membrane components of the test strip, immunochemical reactions, and the formation of colored lines. Requirements on the configuration of the test system in order to achieve the lowest limit of detection were defined in the course of the development of the assay. It was shown that this method enables the detection of human epidermal growth factor within 5 min at concentrations as low as 10 pg/mL in aqueous solutions, urine, and the blood serum and plasma. The developed test system can be used for point-of-care diagnostics.

УДК 543.9:579.6+543.55

СВОЙСТВА МОДИФИЦИРОВАННЫХ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ МЕТАНОЛДЕГИДРОГЕНАЗЫ И КЛЕТОК *Methylobacterium nodulans*

© 2013 г. Т. А. Кузнецова**, А. П. Бесчастный*, С. В. Алфёров**, Ю. А. Троценко*

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

** Тульский государственный университет, Тула, 300600

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 26.04.2013 г.

Исследованы свойства амперометрических биосенсоров на основе метанолдегидрогеназы (МДГ), а также клеток *Methylobacterium nodulans* и графито-пастового электрода, модифицированного ферроценом (ФЦ). Показано, что внесение гидроксиапатита (ГА) в графитовую пасту повышало чувствительность и операционную стабильность МДГ-биосенсора. Линейный диапазон электрода составил: для метанола 0.0135–0.5 мМ, для формальдегида 0.032–1.5 мМ. Предел обнаружения метанола – 4.5, формальдегида – 11.0 мкМ. Потеря активности электрода в течение 10 сут хранения в присутствии 2.0 мМ KCN не превышала 12%. Цианид (10 мМ) полностью ингибировал ответы сенсора на формальдегид (1.0 мМ), что позволяло селективно определять метанол в присутствии формальдегида. Биосенсор на основе клеток обладал меньшей стабильностью и чувствительностью по отношению к метанолу и формальдегиду: коэффициенты чувствительности – 980 и 21 нА/мМ соответственно.

DOI: 10.7868/S055510991306010X

Пирролохинолинхинон (ПХХ) — зависимая метанолдегидрогеназа (МДГ, КФ 1.1.2.7), присутствующая исключительно у аэробных метилотрофных бактерий [1], является перспективным биокатализатором электрохимических сенсоров для чувствительного и недорогого метода определения метанола. Как известно, МДГ, прочно связанная с ПХХ, катализирует рН-зависимую двухэлектронную реакцию окисления метанола до формальдегида при низких положительных потенциалах, что отличает данный фермент от НАД-зависимой алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1). Другим важным преимуществом МДГ является независимость реакции от кислорода в отличие от ФАД-алкогольоксидазы дрожжей (КФ 1.1.3.13) [1–4].

Применение МДГ в биоэлектрокатализе отражено в научной литературе весьма фрагментарно. Так, на основе МДГ *Methylobacterium (Pseudomonas) extorquens* был разработан биотопливный элемент, анодный компартмент которого использовался как кулонометрический детектор первичных спиртов [5]. Также МДГ *Methylobacterium extorquens* AM1, иммобилизованная на графито-пастовом электроде, применялась для амперометрической детекции аммония в присутствии медиатора электронного транспорта — феназинметосульфата (ФМС). Электрод сохранял 50% активности через 15 сут [6]. Кроме того, МДГ *M. extorquens* AM1, иммобилизованную на поверхно-

сти стеклоуглеродного электрода, использовали для амперометрической детекции метанола. Наилучшие показатели были получены с ферроценом (ФЦ) в качестве медиатора [7].

В этих экспериментах при каждом измерении в кювету вносили медиаторы электронного транспорта из-за неспособности МДГ передавать электроны от активного центра к поверхности электрода. В связи с этим представляют интерес работы на основе электропроводящей ион-радикальной соли тетратиофульвален-тетрацианохинониметана и МДГ *Methylophilus methylotrophus* [8, 9], а также МДГ *Paracoccus denitrificans* [9]. Данные электроды обеспечивали транспорт электронов в отсутствие медиаторов.

За исключением единственной работы, графито-пастовые электроды не применялись для МДГ-биосенсора [6]. Возможно, это вызвано трудностью иммобилизации гидрофильной МДГ на гидрофобной поверхности графито-пастового электрода, что негативно влияет на чувствительность и стабильность биосенсора [10–12]. Однако известны модификации графито-пастовых электродов, придающие им гидрофильность [10, 13]. Так, недавно графито-пастовые электроды, модифицированные гидроксиапатитом (ГА), были использованы для электрохимического определения тяжелых металлов [14–16], *p*-нитрофенола [17] и параквата [18]. При этом ГА значительно улучшал аналитические характеристики электро-

дов, благодаря уникальным сорбционным свойствам и гидрофильности, что используется при хроматографии белков и нуклеиновых кислот, включая очистку МДГ из различных метиловых бактерий [11, 12, 19]. Ранее нами было показано, что внесение ГА в графитовую пасту улучшало характеристики биосенсора на основе МДГ *Methylobacterium nodulans* [19].

Цель работы — исследование свойств и оптимизация медиаторного амперометрического биосенсора метанола на основе МДГ *M. nodulans* и графито-пастового электрода, модифицированного ФЦ и ГА в сравнение с аналогичным сенсором на основе клеток метиловых бактерий.

МЕТОДИКА

Выращивание бактерий, выделение и очистку МДГ из *M. nodulans* ORS2060T осуществляли по ранее описанной схеме [19]. Удельная активность препарата МДГ составляла 3.9 ед./мг белка, концентрация — 6.7 мг/мл.

Рабочий электрод готовили, наполняя графитовой пастой пластиковую трубку диаметром 3 и высотой — 95 мм. Графитовую пасту готовили смешиванием следующих компонентов: 40–90 мг графитовой пудры (“Fluka”, Германия), 0–50 мг ГА (“Bio-Rad”, США), 10 мг ФЦ (“Aldrich”, Германия) и 40 мкл парафинового масла (“Fluka”, Германия) в агатовой ступке. Трубка содержала серебряную проволоку для электрического контакта с частицами графита. На поверхность электрода (площадь 7.1 мм²) наносили 10 мкл раствора МДГ в 20 мМ калий-фосфатном буфере (КФБ), pH 7.0, или 5 мкл суспензии клеток (200 мг/мл) и подсушивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Поверхность электрода накрывали диализной мембраной с размером пор 14 кДа (“Sigma”, США), закрепляя ее пластиковым кольцом. МДГ-электрод до использования хранили при +4°C в 50 мМ КФБ (pH 7.0) и 2.0 мМ KCN.

Амперометрические измерения проводили при 20°C в двухэлектродной ячейке при потенциале 250 мВ и непрерывном перемешивании (300 об/мин). Рабочим электродом служил модифицированный ФЦ и ГА графито-пастовый электрод с иммобилизованными клетками или МДГ. Электрод сравнения — хлорсеребряный. Если не указано особо, электролитическую ячейку заполняли 3.95 мл 50 мМ КФБ, pH 8.0, содержащего 15 мМ NH₄Cl, 2 мМ KCN для МДГ-электрода и 3.95 мл 50 мМ КФБ, pH 7.2, для микробного электрода и 50 мкл раствора метанола или формальдегида необходимой концентрации.

За ответ сенсора принимали величину разности силы тока ($\Delta I = I - I_0$) до внесения (I_0) и после внесения (I) субстрата в измерительную кювету. После регистрации ответа сенсора промывали

ячейку рабочим буферным раствором для МДГ, pH 8.0, и для клеток — pH 7.2. Регистрацию циклических вольтамперограмм проводили в трехэлектродной ячейке. Рабочим электродом являлся модифицированный графито-пастовый, вспомогательным — платиновый и электродом сравнения — хлорсеребряный.

Все электрохимические измерения и регистрацию данных проводили с помощью гальванопотенциостата IPC2000 (“Кронас”, Москва), сопряженного с компьютером с программным обеспечением IPC-Micro 8.65 (“Кронас”, Москва) для Windows XP. Диапазон регистрируемых токов 1 нА — 10 мА. Ошибка измерения потенциала не более 0.1 мВ для интервала ± 5 В.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Благодаря стабильности, МДГ *M. nodulans* является одним из наиболее перспективных биокатализаторов амперометрического биосенсора спиртов, в частности, на основе дешевого, безопасного для окружающей среды и простого в изготовлении графито-пастового электрода [19]. Однако МДГ *M. nodulans* при потенциалах до 600 мВ не способна передавать электроны на графито-пастовый электрод в отсутствие медиатора электронного транспорта, подобно аналогичным ферментам [5–7]. Поэтому графитовую пасту модифицировали ФЦ, как эффективным, нечувствительным к кислороду и свету медиатором МДГ [7]. Тем не менее, в присутствии ФЦ в пасте от 5.0 до 20% и иммобилизованной МДГ (0.25 Е) ответы сенсора на метанол в насыщающей концентрации (12.5 мМ) при pH 9.0 в 0.05 М КФБ в присутствии 15 мМ NH₄Cl не превышали 0.6 мкА.

Поскольку в процессе очистки МДГ *M. nodulans* было установлено, что фермент прочно связывается с ГА, это вещество добавляли в графитовую пасту для улучшения характеристик электрода [19]. Присутствие Ca²⁺ в графитовой пасте также могло стабилизировать фермент, так как данный ион обнаружен в активном центре МДГ [20].

Предварительно нами было исследовано влияние ГА на окислительно-восстановительные свойства ФЦ методом циклической вольтамперометрии в трехэлектродной системе. Повышение содержания ГА (10–50%) в пасте не влияло на величину потенциалов анодного и катодного пиков ФЦ, но приводило к пропорциональному увеличению соответствующих токов, что, очевидно, вызвано наличием ионогенных групп в ГА. Следовательно, ГА не влиял на обратимость окислительно-восстановительной системы “ферроцен-катион ферроцена” (рис. 1).

В дальнейшей работе использовали графитовую пасту с 30%-ной концентрацией ГА, обеспечивающей приемлемую величину начального то-

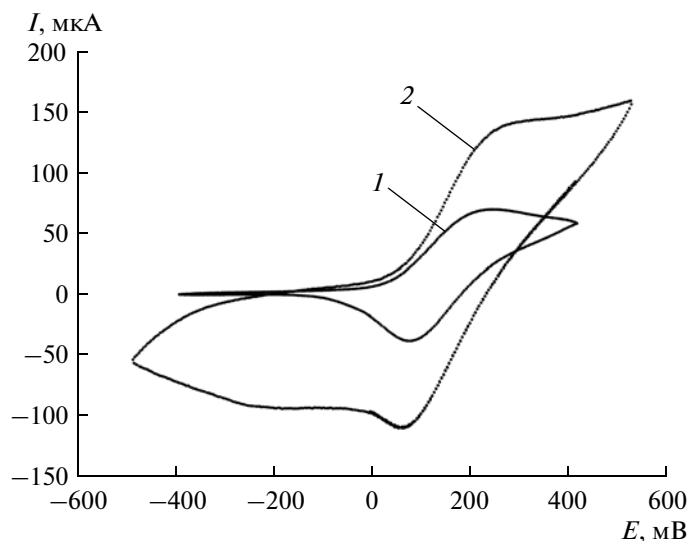


Рис. 1. Вольтамперные зависимости графитового электрода, модифицированного: 10% ФЦ (1), 10% ФЦ и 30% ГА (2).

ка при выраженном влиянии на эффективность электрода. После иммобилизации МДГ (0.25 ед.) на поверхности электрода, содержащего в графитовой пасте 30% ГА и 10% ФЦ, ответ биосенсора на метанол увеличился в 10 раз относительно пасты без ГА при одинаковых условиях измерения (рис. 2).

В отсутствие NH_4Cl биосенсор не реагировал на метанол, что согласуется с ранее полученными данными [6, 7, 9].

Зависимость активности биосенсоров от pH среды определяли в 0.05 М КФБ, содержащем 15 мМ NH_4Cl и оттитрованным концентрированной HCl или 5.0 М NaOH до pH 6–10. Изучение зависимости ответов сенсора на основе клеток от значений pH среды показало, что максимальная скорость ответа приходилась на значение pH 7.2 (рис. 3), что соответствовало оптимуму pH для роста этого штамма.

Максимальная чувствительность МДГ-биосенсора проявлялась в щелочной области (pH 9–10), что соответствовало ранее полученным данным для этого фермента в условиях измерения *in vitro* с ФМС [19]. Однако ФЦ, в отличие от ФМС, обеспечивал активность МДГ в более широком диапазоне pH. Так, при pH 7.0 биосенсор проявлял более половины максимальной активности, что представляет определенный интерес для биоаналитических целей. Поскольку при pH выше 9.0 фермент характеризовался меньшей стабильностью, дальнейшую работу проводили при pH 8.0.

Следовательно, применение клеток в качестве биокатализатора амперометрического сенсора позволяло выполнять анализ лишь в узком диапазоне pH, при этом незначительные колебания pH среды могут существенно снизить его чувствительность, тогда как расширенный диапазон pH МДГ-сенсора допускал проведение измерений в широком диапазоне pH практически без потери активности.

Операционную стабильность биосенсора оценивали на основании статистической обработки выборок из нескольких последовательных изме-

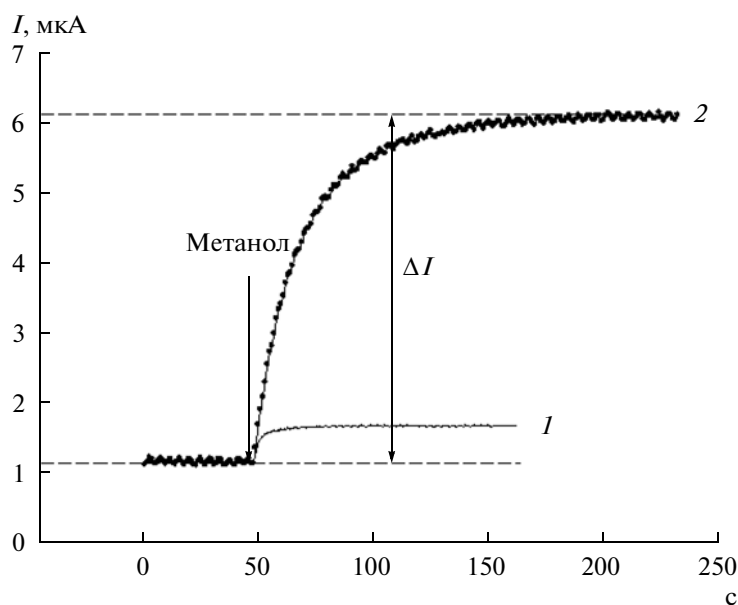


Рис. 2. Ответы на метанол (12.5 мМ) медиаторного (10% ФЦ) биосенсора с иммобилизованной МДГ (0.25 Е) без ГА (1) и в присутствии 30% ГА (2).

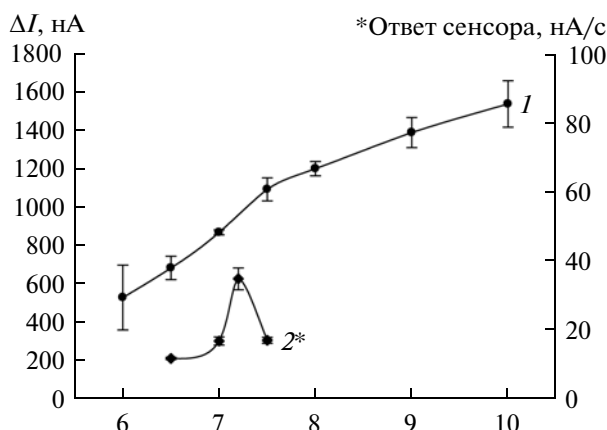


Рис. 3. Влияние pH на активность биосенсора на основе МДГ (1 — 1.25 мМ метанол) и клеток (2 — 6.25 мМ метанол).

рений концентрации метанола. Присутствие в графитовой пасте 30% ГА также приводило к увеличению операционной стабильности МДГ-биосенсора. При использовании графитовой пасты без ГА, ответы биосенсора снижались практически до нуля в течение пяти измерений (рис. 4).

Относительное стандартное отклонение ответов сенсора на основе ферментного электрода, содержащего 30% ГА, составляло 8.6% ($P = 0.95$ и $n = 8$). Так как цианид калия является стабилизатором МДГ [11, 12], в отдельном опыте KCN использовали в качестве добавки к рабочему буферному раствору для МДГ-электрода, модифицированного 30%-ным ГА. При этом отмечалось

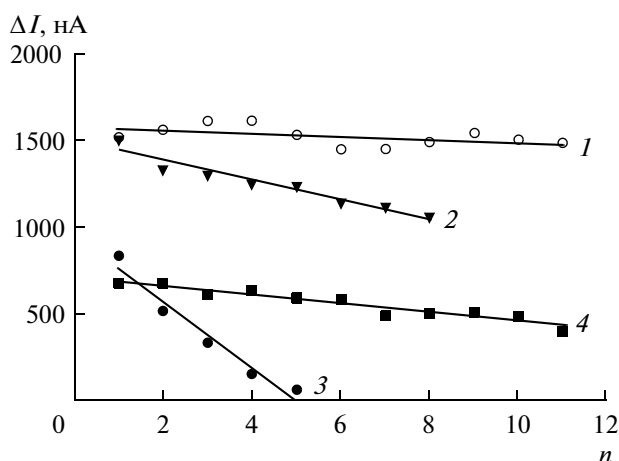


Рис. 4. Операционная стабильность биосенсоров на метанол (1.25 мМ):

1 — МДГ-электрод, модифицированный 30% ГА и 10% ФЦ в присутствии 2 мМ KCN; 2 — аналогичный электрод в присутствии цианида; 3 — МДГ-электрод без ГА с 10% ФЦ; 4 — электрод на основе клеток метиллобактерий, модифицированный 10%-ным ФЦ в присутствии 6.25 мМ метанола. n — число измерений.

улучшение операционной стабильности биосенсора: относительное стандартное отклонение ответов сенсора составляло 4.0% ($P = 0.95$; $n = 11$). Биосенсор на основе клеток был менее стабилен (рис. 4): относительное стандартное отклонение ответов сенсора — 15% ($P = 0.95$; $n = 11$). Вероятно, ФЦ ингибировал ферментные системы клеток или оказывал на них токсическое воздействие.

В присутствии 30%-ного ГА в графитовой пасте увеличивалась чувствительность и операционная стабильность МДГ-биосенсора. Добавление 2 мМ KCN к рабочему буферному раствору дополнительно стабилизировало биосенсор.

Определение биосенсором содержания метанола в культуральной среде метилотрофов осложняется присутствием формальдегида, который тоже является субстратом МДГ [11, 12, 19], поэтому исследовали характеристики биосенсоров на метанол и формальдегид. Зависимость силы тока от концентрации метанола и формальдегида была гиперболической, что обусловлено биокаталитической природой анализируемого сигнала (рис. 5).

Зависимости откликов биосенсора от концентрации метанола или формальдегида аппроксимировали уравнением Михаэлиса—Ментен [21]. Для определения характеристик использовали линейные участки градуировочных зависимостей.

Линейный диапазон определяемых концентраций метанола с помощью сенсора на основе МДГ *M. nodulans* составлял от 0.0135 до 0.5 мМ, формальдегида — 0.032–1.5 мМ; для сенсора на основе клеток — от 0.09 до 0.33 мМ метанола и от 0.4 до 8 мМ формальдегида.

Длительность единичного измерения, в которую входило развитие отклика сенсора и регенерация электрода, не превышала 10 мин для обоих типов биокатализаторов. Характеристики медиаторных биосенсоров на основе МДГ и клеток метиллобактерий приведены в таблице.

Параметры МДГ-биосенсора (коэффициенты чувствительности, пределы обнаружения метанола и формальдегида) различались незначительно, что указывало на невозможность селективного определения данных соединений при совместном присутствии. Напротив, коэффициенты чувствительности микробного сенсора по отношению к исследуемым субстратам различались на порядок, что позволяло определять концентрацию метанола в присутствии до 0.14 мМ формальдегида.

Изучение долговременной стабильности биосенсоров выявило значительное превосходство МДГ-электрода относительно сенсора на основе клеток. Модификация графитовой пасты 30%-ным ГА и внесение 2.0 мМ KCN в буфер позволили снизить потери активности сенсора до 12 % в течение 10 сут. Низкая стабильность микробного сенсора может быть обусловлена негативным действи-

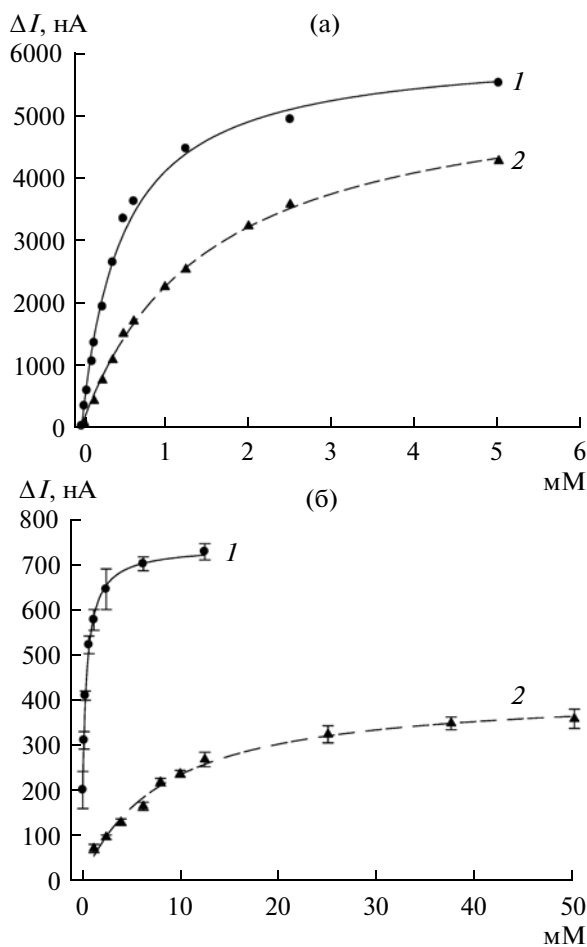


Рис. 5. Зависимость откликов биосенсора, от концентрации метанола (1) и формальдегида (2) на основе МДГ ((а) 0.25 ед.) и клеток метиловых бактерий (б).

ем ФЦ на клетки метиловых бактерий, что показано при изучении его операционной стабильности. Сравнительный анализ характеристик биосенсоров подтвердил преимущество сенсора на основе МДГ *M. nodulans* по основным метрологическим параметрам (таблица). Однако для селективного определения метанола необходимо подавить отклик сенсора на формальдегид.

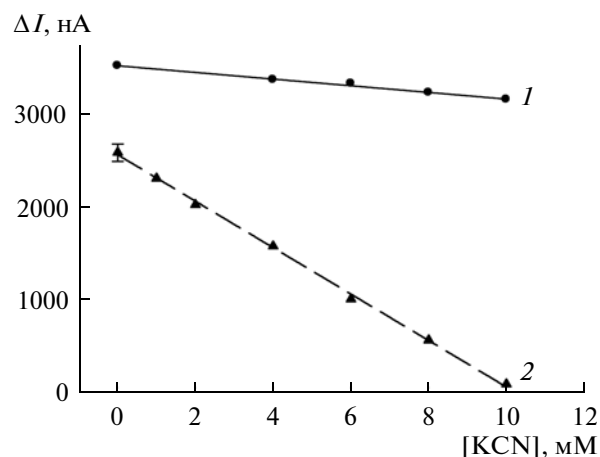


Рис. 6. Зависимость откликов биосенсора с МДГ от концентрации KCN в присутствии 1.25 мМ метанола (1) и 1.25 мМ формальдегида (2).

Известно, что цианид, образуя аддукт с ПХХ, является конкурентным ингибитором МДГ [11]. В присутствии 2.0 мМ KCN наблюдали значительные различия кажущихся значений K_M МДГ *M. nodulans* к метанолу и формальдегиду — 0.23 мМ и 7.2 мМ, соответственно [19]. Еще более значительно различалась степень ингибирования ответов МДГ-электрода на метанол и формальдегид при увеличении концентрации цианида до 10 мМ (рис. 6). При этом происходило практически полное ингибирование ответов сенсора на ФА, тогда как окислительная активность иммобилизованной МДГ к метанолу снижалась незначительно.

Таким образом, нами показано, что МДГ *M. nodulans* является эффективным биокатализатором амперометрического медиаторного графитопастового сенсора. Использование ГА для модификации графитовой пасты обеспечивает высокие каталитические токи окисления метанола и увеличение стабильности биосенсора. Цианид также стабилизирует данный сенсор и позволяет селективно определять метанол в присутствии формальдегида. Модифицированный амперометрический МДГ-биосенсор, будучи экономичным и простым в изготовлении, не уступает, а по некото-

Параметры медиаторного биосенсора на основе МДГ и клеток *M. nodulans*

Параметр	МДГ		Клетки	
	метанол	ФА	метанол	ФА
Коэффициент чувствительности, нА/мМ	7200 ± 300	3000 ± 50	980 ± 90	21 ± 1
Предел обнаружения, мМ	0.0045	0.011	0.03	0.14
Верхняя граница линейного диапазона определяемых концентраций (K_M), мМ	0.49 ± 0.03	1.5 ± 0.1	0.33 ± 0.02	8 ± 1
Стабильность, потеря активности за 10 сут, %	12		90	

рым аналитическим и метрологическим характеристикам превосходит другие биосенсоры для определения содержания метанола [22–24]. Использование клеток метиловых бактерий в качестве биокатализатора во многом облегчает проведение биосенсорного анализа, поскольку исключает трудоемкую стадию очистки фермента. Однако микробный сенсор значительно уступает по стабильности и чувствительности электроду на основе очищенной МДГ.

Работа выполнена при поддержке гранта ФЦП 14.В37.21.0561.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловых бактерии. / Ред. В.Ф. Гальченко. Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
2. Гвоздев А.Р., Тухватуллин И.А., Гвоздев Р.И. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 8. С. 1017–1032.
3. Ikeda T., Kano K. // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1647. № 1–2. P. 121–126.
4. Misra H.S., Rajpurohit Y.S., Khairnar N.P. // J. Biosci. 2012. V. 37. № 2. P. 313–325.
5. Davis G., Hill H.A.O., Aston W.J., Higgins I.J., Turner A.P.F. // Enzyme Microb. Technol. 1983. V. 5. № 5. P. 383–388.
6. Suye S., Nakamura Y., Inuta S., Ikeda T., Senda M. // Biosens. Bioelectron. 1996. V. 11. № 5. P. 529–534.
7. Liu Q., Kirchhoff J.R. // J. Electroanal. Chem. 2007. V. 601. № 1–2. P. 125–131.
8. Zhao S., Lennox R.R. // Anal. Chem. 1991. V. 63. P. 1174–1178.
9. Loughran M.G., Hall J.M., Davidson V.L., Turner A.P.F. // The Analyst. 1996. V. 121. № 11. P. 1711–1715.
10. Švancara I., Vytrás K., Kalcher K., Walcarious A., Wang J. // Electroanalysis. 2009. V. 21. № 1. P. 7–28.
11. Frank J., Duine J.A. // Methods Enzymol. 1990. V. 188. P. 202–209.
12. Day D.J., Anthony C. // Methods Enzymol. 1990. V. 188. P. 210–216.
13. Parellada J., Narváez A., Dominguez E., Katakis I. // Biosens. Bioelectron. 1997. V. 12. № 4. P. 267–275.
14. El Mhammedi M.A., Achakb M., Chtainia A. // J. Hazardous Materials. 2009. V. 161. P. 55–61.
15. Zhang Y., Liu Y., Ji X., Banks C.E., Zhang W. // J. Mater. Chem. 2011. V. 21. P. 7552–7554.
16. Zhang Y., Liu Y., Ji X., Banks C.E., Zhang W. // Chem. Commun. 2011. V. 47. P. 4126–4128.
17. El Mhammedi M.A., Achakb M., Bakasse M., Chtainia A. // J. Hazard. Mater. 2009. V. 163. P. 323–328.
18. El Mhammedi M.A., Bakasse M., Chtaini A. // Electroanalysis. 2007. V. 19. № 16. P. 1727–1733.
19. Кузнецова Т.А., Бесчастный А.П., Пономарева О.Н., Троценко Ю.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 6. С. 606–611.
20. Anthony C., Williams P. // Biochim. Biophys. Acta. 2003. V. 1647. P. 18–23.
21. Kurganov B.I., Lobanov A.V., Borisov I.A., Reshetilov A.N. // Anal. Chim. Acta. 2001. V. 427. № 1. P. 11–19.
22. de Garcia M.C., Manzano T., Duarte R., Alonso A. // Anal. Chim. Acta. 1995. V. 309. № 1–3. P. 241–250.
23. Алферов В.А., Зайцев М.Г., Пономарева О.Н., Кузнецова Т.А., Рогова Т.В., Решетилов А.Н. // Журн. аналит. химии. 2011. Т. 66. № 12. С. 1322–1329.
24. Gülce H., Gülce A., Kavanoz M., Coşkun H., Yıldız A. // Biosens. Bioelectron. 2002. V. 17. № 6–7. P. 517–521.

Properties of Modified Amperometric Biosensors Based on Methanol Dehydrogenase and *Methylobacterium nodulans* Cells

T. A. Kuznetsova^a, A. P. Beschastnyi^b, S. V. Alferov^a, and Yu. A. Trotsenko^b

^a Tula State University, Tula, 300600 Russia

e-mail: trotsenko@ibpm.pushchino.ru

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

Received April 26, 2013

Abstract—The properties of amperometric biosensors based on methanol dehydrogenase (MDH), *Methylobacterium nodulans* cells, and the ferrocene-modified carbon paste electrode were investigated. It was shown that the addition of hydroxyapatite (HA) to a carbon paste increased the sensitivity and operating stability of MDH biosensors. The linear range of the electrode was 0.0135–0.5 and 0.032–1.5 mM for methanol and formaldehyde, respectively. The detection limit of methanol and formaldehyde was 4.5 and 11.0 μM, respectively. The loss of activity of the electrode within 10 days of storage in the presence of 2.0 mM KCN did not exceed 12%. Cyanide (10 mM) completely inhibited the sensor responses to formaldehyde (1.0 mM), which allowed for the selective determination of methanol in the presence of formaldehyde. The biosensor based on cells exhibited lower stability and sensitivity toward methanol and formaldehyde; the sensitivity coefficients were 980 and 21 nA/mM, respectively.