

углеводородного субстрата. В составе второго гликолипидного компонента (25,3 вес. %) выявлено два жирнокислотных остатка (C₁₃-C₁₅), ковалентно связанных с молекулой трегалозы. Третий, преобладающий (50,5 вес. %) трегалозолипид, содержит лишь одну жирно-кислотную цепочку (C₁₂₋₁₆) и характеризуется более выраженной полярностью по сравнению с известными трегалозомонокориномиколатами коринебактерий, микобактерий и *R. erythropolis*.

Исследование токсичности гликолипидного комплекса в сравнении с таковой других биогенных (*R. erythropolis*, *Pseudomonas aeruginosa*), а также синтетических (стеарат сукрозы - ДК 50, корексит 9597, инипол ЕАР 22, финазол OSR-5, нонилфенол-(этиленоксид)₉-ацетат - EQ 9) сурфактантов свидетельствует о том, что полученный препарат в 100 раз менее токсичен, чем синтетические сурфактанты (финазол, корексит, инипол) и 2-10 раз, чем трегалозолипиды *R. erythropolis* и рамнолипиды *Ps. aeruginosa*.

Исследование влияния биосурфактантного препарата на модельное каррагениновое воспаление показало, что препарат обладает отчетливо выраженным противовоспалительным действием, вызывая достоверное 55%-ное торможение развития каррагенинового отека у лабораторных крыс. При этом не обнаружено изменения уровня лейкоцитов периферической крови опытных животных, что свидетельствует о неизменности генерализованной противовоспалительной реакции при использовании биопрепарата.

Полученный биосурфактантный препарат оказывает положительное воздействие на фагоцитоз, вызывая существенные изменения фагоцитарной активности нейтрофилов у крыс с каррагениновым воспалением. В частности, однократное введение биосурфактанта увеличивает процент фагоцитоза в 2,3, фагоцитарный индекс – 2,5, фагоцитарное число – 2,2 раза по сравнению с контрольными показателями.

Изучение влияния биосурфактантного препарата на гуморальную составляющую первичного иммунного ответа выявило его значительное иммуностимулирующее действие на В-лимфоцитарную систему опытных животных. Так, применение препарата в дозе 0,1 мл/кг вызывает 80%-ное увеличение числа антителообразующих клеток и 20%-ное повышение титра гемагглютинирующих антител по сравнению с таковым у животных, не получающих биопрепарат.

Таким образом, в результате проведенных исследований получен нетоксичный препарат биосурфактантного комплекса *Rhodococcus*, проявляющий широкий спектр биологической активности, в том числе выраженное иммуномодулирующее и противовоспалительное действие. После завершения исследования клинической безопасности биосурфактантного препарата он может быть рекомендован в качестве лекарственной формы или биологически активной добавки для профилактики и лечения воспалительных заболеваний и вторичных иммунодефицитных состояний.

Работа поддержана РФФИ (грант № 01-04-96461).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Рычкова М.И. Экологические аспекты использования алканотрофных родококков – новых продуцентов биосурфактантов//В кн.: Экологическая безопасность зон градопромышленных агломераций Западного Урала. Пермь, 1993. – С. 29-30.
2. Коронелли Т.В., Юферова С.Г. Поверхностно-активные свойства некоторых штаммов углеводородокисляющих бактерий//Вестник Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. – 1990. – N. 1. – С. 14-18.
3. Georgiou, G., Lin, S.-C., Sharma, M. M. Surface-active compounds from microorganisms//Biotechnol. – 1992. – V. 10. – P. 60-65.
4. Ivshina, I.B., Kuyukina, M.S., Philp, J.C., Christofi, N. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species//World J. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – V. 14. N. 5. – P. 711-717.
5. Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B., Philp, J.C., Christofi, N., Dunbar, S.A., Ritchkova, M.I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl-tertiary butyl ether extraction//J. Microbiol. Methods. – 2001. – V. 46. – P. 149-156.
6. Lang, S., Philp, J.C. Surface-active lipids in rhodococci//Antonie van Leeuwenhoek. – 1998. – V. 74. – P. 59-70.
7. Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V., Fredrickson, H.L. Characterisation of a new lipopeptide surfactant produced by a thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50//Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – V. 61. N. 5. – P. 701-713.

УДК 577.158

ЦИТОХРОМ P450-СОДЕРЖАЩИЕ МОНООКСИГЕНАЗНЫЕ ФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS

Леонтьев В.Н., Ахрамович Т.И., Бурак И.М.

Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь

В микробных клетках с реакций, катализируемых оксигеназами, начинается процесс усвоения многих химически инертных соединений. Как и большинство ферментативных реакций, реакции, катализируемые оксигеназами, протекают с высокой степенью специфичности и в мягких условиях, что открывает широкие перспективы для практического использования этих ферментов в тонком органическом синтезе и в других областях, например, для биodeградации промышленных отходов [1]. Оксигеназные ферментные системы бактерий весьма разнообразны по количеству и типам включающих в себя ферментов. Очень часто в их состав в качестве терминальной оксидазы входит уникальный гемопротейн – цитохром P450, являющийся гемопротейном b-типа. Оксигеназные реакции, катализируемые цитохромом P450, весьма разнообразны. К ним относятся реакции окислительного деалкилирования, гидроксирования циклических, алифатических углеводородов, N-окисление, окислительное дезаминирование и многие другие [2]. Данных о бактериальных цитохромах накоплено мало. Впервые цитохром P450 был обнаружен у бактерий *Pseudomonas putida* в качестве элемента трехкомпонентной монооксигеназной системы, состоящей из ФАД-содержащего флавопротеина (НАДФН⁺- или НАДН⁺-зависимая цитохром P450-редуктаза), желе-

осерного белка и цитохрома P450. Как правило, цитохром P450 взаимодействует с субстратом и молекулярным кислородом, остальные же компоненты оксигеназной системы осуществляют транспорт электронов от доноров к субстрату. По содержанию цитохрома P450 в клетке и по активности оксидоредуктаз в электронтранспортных цепях оксигеназной системы можно судить о степени вовлеченности ее в процесс окисления субстрата.

В данной работе было изучено участие монооксигеназной ферментной системы бактерий рода *Pseudomonas* в окислении различных по структуре субстратов - роль НАДФН·Н⁺- и НАДН·Н⁺-зависимых электронтранспортных цепей и вовлеченность в эти процессы цитохрома P450.

В клетках бактерий были измерены активности оксидоредуктаз с помощью добавленных акцепторов электронов, редокс-потенциал которых позволяет им взаимодействовать со строго определенными переносчиками. Активность оксидоредуктаз или скорость переноса электронов в редокс-цепях может быть измерена по скорости окисления НАДН·Н⁺ или НАДФН·Н⁺. Определение содержания цитохромов b₅ и P450 проводили по стандартной методике для микросом печени животных.

Полученные результаты (табл.1, табл.2) показали, что все использованные в работе штаммы бактерий рода *Pseudomonas* обладают цитохром P450-содержащими монооксигеназными ферментными системами.

Таблица 1

Активности оксидоредуктаз с добавленными акцепторами электронов в клетках бактерий рода *Pseudomonas*, выращенных на различных субстратах

Донор/акцептор электронов	Активность оксидоредуктаз, нмоль/мин·мг белка							
	субстрат							
	глюкоза	гексан	гексен-1	циклогексен	нонен-4	прометрин	симазин	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1							<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-7	
НАДН:2,6-ДХФИФ	1,71	2,30	2,70	2,61	3,51	3,76		—
НАДФН:2,6-ДХФИФ	2,21	2,94	3,07	1,20	1,68	2,45		—
НАДН:цитохром с	1,81	1,98	3,15	3,43	0,97	3,69		—
НАДФН:цитохром с	0,52	0,39	1,43	0,65	0,40	1,92		—
НАДН:K ₃ Fe(CN) ₆	21,47	79,90	83,24	64,40	35,48	39,52		—
НАДФН:K ₃ Fe(CN) ₆	14,24	43,07	26,22	24,48	20,54	22,41		—
НАДН:НТ	0,35	0,35	0,06	0,27	0,11	0,32		—
НАДФН:НТ	0,14	0,27	0,21	0,19	0,03	0,27	—	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B-22							<i>Pseudomonas aurantica</i> B-162	
НАДН:2,6-ДХФИФ	4,11	4,94	7,44	5,28	3,77	—		3,32
НАДФН:2,6-ДХФИФ	1,65	1,67	2,83	1,62	2,09	—		0,54
НАДН:цитохром с	1,66	2,78	4,17	2,16	0,37	—		3,35
НАДФН:цитохром с	0,51	0,86	0,84	1,39	0,43	—		1,28
НАДН:K ₃ Fe(CN) ₆	50,26	60,46	82,48	64,81	28,57	—		36,87
НАДФН:K ₃ Fe(CN) ₆	27,78	31,30	56,10	30,13	13,76	—		16,04
НАДН:НТ	0,10	0,17	0,14	0,14	0,14	—		0,37
НАДФН:НТ	0,23	0,21	0,12	0,11	0,07	—	0,08	

Примечание: 2,6-ДХФИФ – дихлорфенолиндифенолят натрия; НТ – неотетразолий синий.

Таблица 2

Содержание цитохромов b₅ и P-450 в клетках бактерий рода *Pseudomonas*

Субстрат	Содержание цитохрома b ₅ , нмоль/мг белка	Содержание цитохрома P-450, нмоль/мг белка
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1		
Глюкоза	0,01	0,02
Гексан	0,02	-
Гексен-1	0,04	0,04
Циклогексен	-	-
Нонен-4	0,03	0,08
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B-22		
Глюкоза	0,02	-
Гексан	0,05	0,08
Гексен-1	0,03	0,03
Циклогексен	0,04	0,02
Нонен-4	0,01	0,02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-7		
Прометрин	0,02	0,01
<i>Pseudomonas aurantica</i> B-162		
Симазин	0,02	0,04

Установлено, что независимо от структуры субстрата для всех штаммов бактерий происходит увеличение всех видов НАДН·Н⁺-редуктазных активностей, в то время как НАДФН·Н⁺-редуктазные активности или незначительно увеличиваются, или даже уменьшаются (табл.1).

Содержание цитохромов b_5 и P450, измеренное в клетках бактерий, находящихся в стационарной фазе роста, приблизительно одинаково у всех штаммов бактерий (табл.2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Wiseman A., King D.G. Microbial oxygenases - and their potential application // Top. Enzyme and Ferment. Biotechnol. - 1982. - Vol. 6. - P. 151-206.
2. Метелица Д.И. Активация кислорода ферментными системами. М.:Наука, 1982. - 255 с.

УДК579.2

ПОДДЕРЖАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ.

Литвинова Е.В., Иконникова Л.В., Петров П.Т.

Научно-фармацевтический центр АО «Белмедпрепараты», Минск, Республика Беларусь.

Поддержание и сохранение жизнеспособности и продуктивности промышленно ценных штаммов с целью получения препаратов путем микробиологического синтеза является актуальной проблемой.

В лаборатории промышленных микроорганизмов научно-фармацевтического центра АО «Белмедпрепараты» ведутся работы со штаммами-продуцентами антибиотиков (*Actinomyces aureofaciens*, *Bacillus polymyxa*), полиненасыщенных жирных кислот (*Entomophthora virulenta*), а также ферментов амилолитического, целлюлолитического, ксиланолитического и протеолитического действия (*Bacillus subtilis*, *Aspergillus awamori*, *Trichoderma reesei*).

Основными методами поддержания жизнеспособности перечисленных микроорганизмов являются пересевы на агаризованные питательные среды и хранение в лиофилизированном состоянии [1,2]. Хранение культур в пробирках на скошенных агаризованных средах путем периодических пересевов до сих пор используется многими коллекциями мира. Пересевы проводятся через определенные промежутки времени с таким расчетом, чтобы наилучшим образом сохранить физиолого-биохимические свойства штамма. Длительные промежутки между пересевами недопустимы, т.к. микроорганизмы в процессе роста и хранения потребляют из среды питательные вещества и накапливают продукты обмена, вредно влияющие на их свойства. Так, установлено, что максимальный срок хранения на агаризованных средах между пересевами составляет не более 20 суток для штаммов *Bacillus polymyxa*, *Actinomyces aureofaciens* и *Entomophthora virulenta*. Культура *Bacillus subtilis* может сохранять свои физиолого-биохимические свойства при таком хранении до 4-х месяцев, а штаммы *Aspergillus awamori* и *Trichoderma reesei* – до 6-ти месяцев. В отношении последних двух грибных культур аналогичные результаты были получены при хранении этих продуцентов поверхностным способом на твердой сыпучей питательной среде, состоящей из смешанных в определенном соотношении увлажненных пшеничных отрубей, солодовых ростков и свекловичного жома. В таких условиях штаммы *Aspergillus awamori* и *Trichoderma reesei* сохраняли высокий уровень синтеза глюкоамилазы и ксиланазы на протяжении 4-5 месяцев.

К преимуществам метода пересевов следует отнести простоту поддержания штаммов. Существенным недостатком является «вырождение» культуры при большой частоте пересевов вследствие спонтанно возникающих мутаций, либо, наоборот, реверсий к исходному типу в случае штаммов, полученных путем мутагенеза. Возникающие в результате этого формы морфологически могут не отличаться от первоначального типа, но утрачивают продуцирующую способность. Поэтому основным методом поддержания культур в лаборатории промышленных микроорганизмов является естественный ступенчатый отбор посредством рассева популяции продуцента на агаризованную среду с последующей селекцией типичных морфологических форм и проверкой их на способность сохранять первоначальный уровень продукции тех или иных биологически активных веществ. Ведение такой непрерывной селекции позволяет сохранить в активной форме исходную культуру продуцента, а в некоторых случаях даже повысить (на 10-20 %) продуктивность штаммов.

С целью длительного сохранения наиболее активных вариантов штаммов микроорганизмов используют высушивание из замороженного состояния под вакуумом (лиофилизацию). Этот метод позволяет сохранить культуры жизнеспособными и стойкими к вредным воздействиям благодаря переводу микроорганизмов в состояние анабиоза, при котором практически не протекают процессы обмена веществ [3]. Известно, что на качество лиофилизации культур оказывают влияние как скорость замораживания и продолжительность сушки, так и состав защитной среды, используемой для приготовления споровой либо вегетативной суспензии. Нами было использовано 2 варианта протекторных сред: 10%-ное обезжиренное молоко и желатина с глюкозой (по 3 %). Лиофилизации подвергались культуры в возрасте 2-3-х суток для бактериальных и 10-14-ти суток для грибных штаммов. Хранение ампул с лиофилизированными культурами осуществляется в холодильной камере при 4°C с периодической (2 раза в год) проверкой выживаемости и продуцирующей способности микроорганизмов.

Установлено, что лиофильно высушенная в среде с глюкозой культура *Actinomyces aureofaciens* сохраняет жизнеспособность и первоначальный уровень синтеза тетрациклина на протяжении не менее 8 лет. Работа с остальными культурами бактериального и грибного происхождения в лаборатории ведется относительно недавно (с 1995 – 1996 гг). Тем не менее можно утверждать, что выживаемость и промышленно ценные свойства сохраняются у них на протяжении как минимум 4-5-ти лет. В качестве защитных могут быть использованы оба вида отмеченных выше сред. Исключением оказался лишь штамм *Entomophthora virulenta*. При высеве на агаризованную среду регидратированной после лиофилизации культуры рост мицелия гриба отсутствовал, что, вероятно, связано со слабой способностью спорообразования у этого штамма. Тем не менее этот микроорганизм является одним из перспективных