

В. Н. Леонтьев, доцент; О. С. Игнатовец, ассистент;  
Т. И. Ахрамович, ст. преподаватель

## РОЛЬ ЦИТОХРОМ Р-450-ЗАВИСИМЫХ МОНООКСИГЕНАЗНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS* В БИОТРАНСФОРМАЦИИ И БИОДЕГРАДАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ

In the article the results of researches of microbial transformation and degradation xenobiotics by monooxygenases fermental system of bacteria genus *Pseudomonas* are presented. Activity of oxydoreductases and content of cytochromes P-450 and  $b_5$  were determined. Monooxygenase fermental system of bacteria genus *Pseudomonas* content of four component: NADPH·H<sup>+</sup>-cytochrome P-450 reductase, NADH·H<sup>+</sup>-cytochrome  $b_5$  reductase, cytochrome P-450 and cytochrome  $b_5$ . The results of investigation are demonstrate main role P-450-depended monooxygenase fermental system of bacteria genus *Pseudomonas* in transformation and degradation process of various xenobiotics.

**Введение.** В окружающей среде в результате хозяйственной деятельности постоянно накапливаются ксенобиотики, которые представляют реальную и потенциальную опасность для человека и для биосферы в целом. Это различные пестициды, растворители и мономеры органического синтеза, красители и др. Биологические методы, основанные на применении деградационной активности микроорганизмов, чрезвычайно актуальны для очистки почв и водных сред, загрязненных различными ксенобиотиками. Бактерии рода *Pseudomonas* в течение ряда лет привлекают внимание исследователей реальными перспективами использования в биотехнологических целях. Они обладают уникальной способностью осуществлять биотрансформацию различных природных и синтезированных соединений, а также выступать в качестве деструкторов ароматических ксенобиотиков.

Часто в состав ферментных систем бактерий, ответственных за аэробные процессы разложения ксенобиотиков, входит уникальный гемопротейн – цитохром Р-450 [1]. В присутствии доноров электронов (НАД(Ф)Н·Н<sup>+</sup>) цитохром Р-450 способен активировать молекулярный кислород, один атом которого восстанавливается до воды, а другой внедряется в молекулу окисляемого субстрата в виде гидроксильной группы. Такая модификация ксенобиотиков, многие из которых являются труднодоступными для клеток микроорганизмов в силу своей гидрофобности, увеличивает их растворимость и обуславливает ключевую роль цитохрома Р-450 в метаболизме ароматических соединений.

В электрон-транспортных цепях бактерий существует еще один гемопротейн – цитохром  $b_5$ . В последнее время накапливается все больше данных о том, что он функционирует как в НАДН·Н<sup>+</sup>-, так и НАДФН·Н<sup>+</sup>-зависимых электрон-транспортных цепях цитохром Р-450-содержащей ферментной системы. Поэтому содержание цитохрома  $b_5$  является показателем степени вовлеченности последней в процесс окисления субстрата. Кроме того, от содержания цитохрома  $b_5$  может зависеть монооксигеназная активность цитохрома Р-450.

В большинстве случаев цитохром Р-450 является индуцибельным ферментом, причем в качестве индукторов биосинтеза могут выступать различные органические соединения, в том числе и субстраты [2–4].

Что касается клеточной локализации бактериального цитохрома Р-450, то он может быть как мембранно-связанным, так и цитоплазматическим, иногда это определяется химической природой (структурой) индуктора [5].

Целью настоящей работы являлось изучение роли монооксигеназной ферментной системы бактерий рода *Pseudomonas* в биотрансформации и биодеградации алифатических и ароматических соединений.

**Основная часть.** В работе использовали следующие реактивы: гексан, нонан, гексен-1 («Реахим», РФ), нонен-4, глюкоза (Fluka, Швейцария). Симазин (2-хлор-4,6-бис(этиламино)-сим-триазин) и прометрин (2-метилтио-4,6-бис(изопропиламино)-1,3,5-триазин) были выделены из технического препарата экстракцией горячим ацетоном. Полученные таким образом прометрин и симазин представляли собой белые мелкокристаллические порошки с температурой плавления 120 и 225°C соответственно.

Объектами исследований являлись штаммы бактерий *Pseudomonas fluorescens* В-22, *Pseudomonas aeruginosa* РАО1, *Pseudomonas aurantica* В-162, *Pseudomonas aeruginosa* В-7 из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ. Ранее нами была установлена способность штаммов *P. aurantica* В-162 и *P. aeruginosa* В-7 осуществлять полную деградацию симазина и прометрина соответственно [6, 7]. Штаммы *P. fluorescens* В-22 и *P. aeruginosa* РАО1 способны эпоксилировать алкены с двойной связью в конце углеводородной цепи, причем бактерии *P. fluorescens* В-22 более эффективно эпоксидируют гексен-1 и нонен-4, чем бактерии *P. aeruginosa* РАО1 [8].

Для определения активностей оксидоредуктаз (АО) и содержания цитохромов  $b_5$  и Р-450 в клетках *P. aeruginosa* В-7 суточную культуру бактерий разводили средой ММ9 с глюкозой (0,2%) или ксенобиотиком (0,05%) в качестве

единственного источника углерода и энергии и инкубировали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл (объем среды 50 мл) на установке Environmental Shaker-incubator ES-20 «BioSan» в условиях аэрации (200 мин<sup>-1</sup>) при 30°C. Время выращивания варьировали в зависимости от субстрата и в соответствии с кривыми роста бактерий. Для измерения АО с добавленными акцепторами электронов и анализа содержания цитохромов b<sub>5</sub> и P-450 использовали культуру бактерий в экспоненциальной фазе роста. Клетки осаждали центрифугированием (6000 мин<sup>-1</sup>, 15 мин) и ресуспендировали в 100 мМ *трис*-HCl буферном растворе (pH 7,4) или дистиллированной воде в зависимости от цели эксперимента.

АО определяли по модифицированному нами методу [9, 10]. Разрушение клеток бактерий осуществляли с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Н при частоте 44 кГц в течение 90 с. Содержание цитохромов b<sub>5</sub> и P-450 определяли на спектрофотометре Specord M-40 по методу [11]. Образцы ресуспендировали в физиологическом растворе с добавлением 0,004% SDS и 0,004% Твина 20. Концентрацию белка устанавливали по методу Варбурга – Христиана [12].

Функционирование цитохром P-450-содержащей монооксигеназной ферментной системы требует участия оксидоредуктаз НАДФН·Н<sup>+</sup>- и НАДН·Н<sup>+</sup>-зависимых электрон-транспортных цепей, цитохромов b<sub>5</sub> и P-450. С целью изучения роли НАДФН·Н<sup>+</sup>- и НАДН·Н<sup>+</sup>-зависимых электрон-транспортных цепей бактерий рода *Pseudomonas* в окислении различных по структуре субстратов были измерены АО с помощью добавленных акцепторов электронов, редокс-потенциал которых позволяет им взаимодействовать со строго определенными переносчиками. Для этого была адаптирована методика измерения активностей оксидоредуктаз в микросомах печени животных с добавленными акцепторами электронов. Принцип метода основан на определении изменения поглощения акцепторов электронов при переходе их из окисленной формы в восстановленную. Участки редокс-цепей, с которых снимаются электроны, указаны на схеме редокс-цепей переноса электронов, функционирующих при окислении органических субстратов, штриховыми стрелками (см. рисунок).

АО или скорость переноса электронов в редокс-цепях может быть измерена по скорости окисления НАДН·Н<sup>+</sup> или НАДФН·Н<sup>+</sup>.

Определение АО осуществляли в дезинтегрированных ультразвуком клетках бактерий, выращенных на синтетической среде с различными источниками углерода до середины логарифмической фазы роста как наиболее метаболически активной. Предварительно был оптимизирован режим дезинтеграции клеток данных бактерий ультразвуком, при котором НАДН·Н<sup>+</sup>- и

НАДФН·Н<sup>+</sup>:K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>-редуктазные активности имеют максимальные значения. В связи с этим дезинтеграцию осуществляли при частоте 44 кГц, время дезинтеграции составило 1,5 мин (3 раза по 30 с – обработка с 30-секундными перерывами).

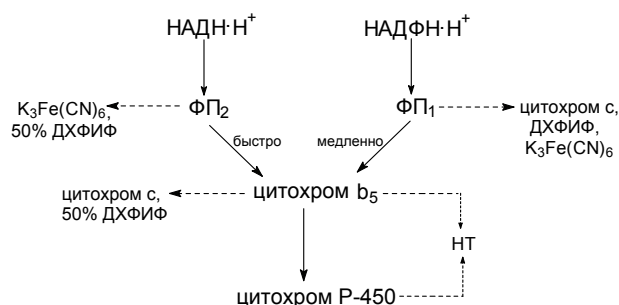


Рисунок. Схема редокс-цепей переноса электронов, функционирующих при окислении органических субстратов:

ФП<sub>1</sub> – НАДФН·Н<sup>+</sup>-цитохром P-450-редуктаза;

ФП<sub>2</sub> – НАДН·Н<sup>+</sup>-цитохром b<sub>5</sub>-редуктаза;

ДХФИФ – 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия;

НТ – неотетразолий синий

Для получения воспроизводимых результатов представлялось целесообразным выбрать оптимальную концентрацию белка, при которой значения оксидоредуктазных активностей практически не изменялись бы. Оптимальной концентрацией белка для обоих штаммов являются значения в пределах от 1 до 5 мг/мл, расположенные на начальных участках кривых зависимости НАДН·Н<sup>+</sup>- и НАДФН·Н<sup>+</sup>:K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>-редуктазных активностей от концентрации белка, где указанные редуктазные активности мало зависят от концентрации белка [8]. Что касается концентрации белка в пробе при измерении остальных редуктазных активностей, эта величина также соответствовала значениям 1–5 мг/мл, которые были определены пропорционально количеству вносимого белка микросом печени крыс при измерении оксидоредуктазных активностей по стандартной методике. Значения активностей оксидоредуктаз представлены в табл. 1, 2.

Результаты измерения содержания цитохромов b<sub>5</sub> и P-450 в клетках бактерий рода *Pseudomonas*, осуществляющих деградацию алифатических и гетероциклических ксенобиотиков, представлены в табл. 3. В качестве биотрансформационных были выбраны процессы эпоксицирования алкенов бактериями рода *Pseudomonas*. Стереохимия образовавшихся эпоксидов описана в работе [8]. В качестве ростовых субстратов использовали глюкозу, гексан или нонан, а в качестве трансформационных – гексен-1 и нонен-4. В качестве субстратов деградации были выбраны пестициды триазинового ряда – симазин и прометрин. Регистрацию интермедиатов и продуктов биodeградации ксенобиотиков осуществляли с помощью методов ГЖХ и ВЭЖХ.

Таблица 1

**Активности оксидоредуктаз в клетках бактерий,  
осуществляющих трансформацию алкенов в эпоксиалканы**

Донор/акцептор электронов	Активность оксидоредуктаз, нмоль/(мин · мг белка)							
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1				<i>P. fluorescens</i> B-22			
	глюкоза	гексан	гексен-1	нонен-4	глюкоза	гексан	гексен-1	нонен-4
НАДН:2,6-ДХФИФ	1,71	2,30	2,70	3,51	4,11	4,94	7,44	3,77
НАДФН:2,6-ДХФИФ	2,21	2,94	3,07	1,68	1,65	1,67	2,83	2,09
НАДН:цитохром с	1,81	1,98	3,15	0,97	1,66	2,78	4,17	0,37
НАДФН:цитохром с	0,52	0,39	1,43	0,40	0,51	0,86	0,84	0,43
НАДН:K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	21,47	79,90	83,24	35,48	50,26	60,46	82,48	28,57
НАДФН:K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	14,24	43,07	26,22	20,54	27,78	31,30	56,10	13,76
НАДН:НТ	0,35	0,35	0,06	0,11	0,10	0,17	0,14	0,14
НАДФН:НТ	0,14	0,27	0,21	0,03	0,23	0,21	0,12	0,07

Таблица 2

**Активности оксидоредуктаз в клетках бактерий,  
осуществляющих деградацию сим-триазиновых ксенобиотиков**

Донор/акцептор электронов	Активность оксидоредуктаз, нмоль/(мин · мг белка)			
	<i>P. aeruginosa</i> B-7		<i>P. aurantica</i> B-162	
	глюкоза	прометрин	глюкоза	симазин
НАДН:2,6-ДХФИФ	1,81	3,76	1,62	3,32
НАДФН:2,6-ДХФИФ	2,33	2,45	1,13	0,54
НАДН:цитохром с	1,87	3,69	1,74	3,35
НАДФН:цитохром с	0,61	1,92	0,72	1,28
НАДН:K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	21,54	39,52	20,19	36,87
НАДФН:K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	15,12	22,41	14,62	16,04
НАДН:НТ	0,33	0,32	0,23	0,37
НАДФН:НТ	0,15	0,27	0,18	0,08

Таблица 3

**Содержание цитохромов b<sub>5</sub> и P-450 в клетках бактерий, окисляющих ксенобиотики**

Субстрат	Содержание цитохромов b <sub>5</sub> и P-450, нмоль/мг белка							
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1		<i>P. fluorescens</i> B-22		<i>P. aeruginosa</i> B-7		<i>P. aurantica</i> B-162	
	b <sub>5</sub>	P-450	b <sub>5</sub>	P-450	b <sub>5</sub>	P-450	b <sub>5</sub>	P-450
Глюкоза	0,01	0,03	0,04	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
Гексан	0,02	0,05	0,12	0,10	–	–	–	–
Гексен-1	0,04	0,02	0,18	0,21	–	–	–	–
Нонен-4	0,06	0,09	0,05	0,18	–	–	–	–
Прометрин	–	–	–	–	0,02	0,04	–	–
Симазин	–	–	–	–	–	–	0,03	0,09

Как видно из представленных данных, замена углеводного субстрата на углеводородные приводит к увеличению содержания цитохромов b<sub>5</sub> и P-450 в клетках бактерий *P. aeruginosa* PAO1 и *P. fluorescens* B-22, причем это увеличение особенно заметно у *P. fluorescens* B-22 при эпоксирировании гексена-1, а у *P. aeruginosa* PAO1 – при эпоксирировании нонена-4. Кроме этого, в клетках бактерий, осуществляющих деградацию ксенобиотиков, увеличение содержания цитохромов b<sub>5</sub> и P-450 не такое значительное, как при трансформации алкенов в их эпоксипроизводные. Причем при деградации симазина клетками *P. aurantica* B-162 отмечается наиболее существенный прирост содержания цитохромов P-450 и b<sub>5</sub>. В клетках бактерий рода *Pseudomonas* независимо от того, осуществляют ли они транс-

формацию или деградацию, наблюдаются в значительной степени близкие значения активностей оксидоредуктаз. Причем отмечаются случаи более существенных изменений активностей оксидоредуктаз в пределах одного штамма, выращенного на разных субстратах, например для *P. fluorescens* B-22 НАДФН:K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>-редуктазная активность при переходе от гексена-1 к нонену-4 уменьшается примерно в 4 раза.

Подобные исследования проведены авторами [5] с целью изучения субклеточной локализации ферментов начальных этапов окисления *n*-алканов дрожжами *Candida maltosa*. В результате показано, что компоненты алканмоноксигеназы – цитохром P-450, НАДФН·Н<sup>+</sup>-цитохром с-редуктаза и НАДН·Н<sup>+</sup>-цитохром с-редуктаза локализованы во фракциях легких

мембран (микросомах), но отсутствуют в мембранах митохондрий и пероксисом.

Полученные нами результаты хорошо согласуются с литературными данными. Так, у алканокисляющих дрожжей *Candida guilliermondii*, *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis* и *Torulopsis candida* при их росте как на гексадекане, так и на интермедиатах его окисления – гексадеканоле и пальмитате – индуцируется синтез цитохрома P-450, но при росте на гексадеканоле и пальмитате его максимальное содержание в клетках в 3–4 раза меньше, чем при росте на гексадекане. Вместе с тем в экспоненциальной фазе роста культур для всех перечисленных субстратов имела место индукция синтеза цитохрома P-450, содержание которого уменьшалось при переходе культур в стационарную фазу [2–4].

**Заключение.** Таким образом, нами установлено, что в трансформации алкенов и деградации сим-триазиновых гербицидов бактериями рода *Pseudomonas* участвует цитохром P-450-содержащая монооксигеназная ферментная система, которая состоит из четырех компонентов, функционирующих как в НАДФН·Н<sup>+</sup>, так и в НАДН·Н<sup>+</sup>-зависимых электрон-транспортных цепях, сопряженных с реакцией окисления органических субстратов: НАДФН·Н<sup>+</sup>-цитохром P-450-редуктазы, НАДН·Н<sup>+</sup>-цитохром b<sub>5</sub>-редуктазы, цитохромов b<sub>5</sub> и P-450.

Полученные результаты свидетельствуют о ключевой роли цитохром P-450-зависимой монооксигеназной ферментной системы бактерий рода *Pseudomonas* в окислении ксенобиотиков.

### Литература

1. Munro, A. W. Bacterial cytochromes P-450 / A. W. Munro, Y. C. Lindsay // *Mol. Microbiol.* – 1996. – Vol. 20, № 6. – P. 1115–1125.
2. Gallo, M. Participation of cytochrome P-450 in the oxidation of alkanes in *Candida tropicalis* / M. Gallo, J. C. Bertrand, E. Azoulay // *FEBS Lett.* – 1971. – Vol. 19, № 1. – P. 45–51.
3. Lebeault, J. M. Fatty acid hydrogen hydroxylation in yeast: role of cytochrome P-450 in *Candida tropicalis* / J. M. Lebeault, E. T. Lode, M. J. Coon // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1971. – Vol. 42, № 3. – P. 413–418.
4. Индукция и активация цитохрома P-450 в дрожжах *Candida* при их выращивании на *n*-алканах / В. И. Козлов [и др.] // Цитохром P-450 и охрана внутренней среды человека: тез. докл. Всесоюз. конф., Москва, 12–18 авг. 1985 г. / Акад. наук СССР. – Москва, 1985. – С. 89–90.
5. Краузова, В. И. Исследование субклеточного распределения ферментов начальных этапов окисления *n*-алканов в клетках дрожжей *Candida maltosa* / В. И. Краузова, А. А. Шарышев // *Биохимия.* – 1987. – Т. 52, № 4. – С. 599–606.
6. Механизм деградации симазина бактериями рода *Pseudomonas* / О. С. Игнатовец [и др.] // Докл. НАН Беларуси. – 2006. – Т. 51, № 2. – С. 61–64.
7. Игнатовец, О. С. Механизм деградации симазина бактериями рода *Pseudomonas* / О. С. Игнатовец, В. Н. Леонтьев // Докл. НАН Беларуси. – 2008. – Т. 52, № 3. – С. 81–85.
8. Ахрамович, Т. И. Получение оптически активных эпоксидных соединений с применением ферментных систем микроорганизмов: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.23; 03.00.07 / Т. И. Ахрамович; Белорус. гос. техн. ун-т. – Минск, 2002. – 22 с.
9. Dallner, G. Studies on the structural and enzymic organisation of the membraneous elements of liver microsomes / G. Dallner // *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* – 1963. – Vol. 166. – P. 94.
10. Roering, D. L. Microsomal electron transport: tetrazolium reduction by rat liver microsomal NADPH-cytochrome c reductase / D. L. Roering, L. Mascaro, S. D. Aust // *Arch. Biochem.* – 1972. – Vol. 153. – P. 475–479.
11. Omura, T. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties / T. Omura, R. Sato // *J. Biol. Chem.* – 1964. – Vol. 239, № 7. – P. 2379–2385.
12. Warburg, O. Isolation and crystallization of enolase / O. Warburg, W. Christian // *Biochem. Z.* – 1942. – Vol. 310. – P. 384–421.