

УДК 579.861; 576.8

И.М. Бурак, аспирант; В.Н. Леонтьев, доцент; Т.И. Ахрамович, ассистент;
О.С. Игнатовец, аспирант; С.А. Кожемяко, студент; Н.В. Куприенко, студент

РОЛЬ ЦИТОХРОМ Р450-ЗАВИСИМЫХ МОНООКСИГЕНАЗНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ В БИОДЕГРАДАЦИИ АРОМАТИЧЕСКИХ ГАЛОГЕНСОДЕРЖАЩИХ КСЕНОБИОТИКОВ

The influence of atom of halogen in substrate on the level of cytochroms b₅ and -
P450 in *Rhodococcus opacus* was discussed.

В окружающей среде в результате хозяйственной деятельности постоянно накапливаются ксенобиотики, которые вызывают реальную и потенциальную опасность для человека и для биосферы в целом. Это различные пестициды, растворители и мономеры для органического синтеза, красители и другие. Многие из них являются галогенированными ароматическими соединениями. Наличие атома или атомов галогена обуславливает их высокую токсичность и устойчивость в окружающей среде. Основным фактором их детоксикации в почве и воде является деятельность микроорганизмов, главным образом бактерий, и в частности тех, которые обладают специальными ферментами, осуществляющими стадию дегалогенирования, – дегалогеназами. В литературе отмечена способность осуществлять дегалогенирование для многих родов основных почвенных бактерий: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* и др. У бактерий существуют разные механизмы дегалогенирования различных соединений. Чаще всего важные в промышленном отношении галогенированные органические соединения являются хлорированными; их деградация и трансформации были изучены достаточно подробно. Имеется большое количество литературных обзоров, посвященных этому вопросу [1–6].

Известны три метаболических пути удаления атома хлора из ароматических соединений: 1) окислительное расщепление кольца, сопровождаемое либо нет стадией дегалогенирования; 2) дегалогенирование через гидроксирование. Расщепление кольца может иметь место прежде, чем все хлор-заместители будут удалены, или ароматическое кольцо расщепляется после того, как все атомы галогена удалены; 3) восстановительное дегалогенирование. Ароматическое кольцо атакуется после удаления атома галогена. В последнее время некоторые исследования демонстрируют, что анаэробная обработка сточных вод с высокой нагрузкой по органическим галогенированным соединениям может быть более эффективна в их удалении, чем аэробная обработка [7]. Однако основные данные о биодеградации хлорированных соединений были главным образом получены для первого пути (окислительного).

Часто в состав ферментных систем бактерий, ответственных за аэробные процессы разложения ксенобиотиков, входит уникальный гемопротеин – цитохром Р450. В присутствии доноров электронов (НАД(Ф)Н·Н⁺) цитохром Р450 способен активировать молекулярный кислород, один атом которого восстанавливается до воды, а другой внедряется в молекулу окисляемого субстрата в виде гидроксильной группы. Такая модификация галогенированных ксенобиотиков, многие из которых являются труднодоступными для клеток микроорганизмов в силу своей гидрофобности, увеличивает их растворимость и обуславливает ключевую роль цитохрома Р450 в метаболизме галогенированных ароматических соединений.

Известно, что цитохром P450 может работать в отсутствие молекулярного кислорода, при наличии в среде пероксидов, сульфитов, дитионитов, иодбензола и др. [7, 8]. Атом кислорода, внедряемый в молекулу субстрата, происходит в этом случае из воды.

В электронтранспортных цепях бактерий существует еще один гемопротеин – цитохром b_5 . В последнее время накапливается все больше данных о том, что он вовлечен как в НАДН·Н⁺, так и НАДФН·Н⁺-специфичные электронтранспортные цепи цитохром P450-содержащей ферментной системы. Поэтому содержание цитохрома b_5 также может являться показателем степени вовлеченности его в процесс окисления субстрата. Кроме того, от содержания цитохрома b_5 может зависеть монооксигеназная активность цитохрома P450 [9, 10].

В большинстве случаев цитохром P450 является индуцибельным ферментом, причем индукторами могут быть как субстраты, так и не субстраты.

Что касается клеточной локализации бактериального цитохрома P450, то он может быть как мембранно-связанным, так и цитоплазматическим, иногда это определяется химической природой (структурой) индуктора.

В данной работе измеряли содержание цитохромов P450 и b_5 в клетках бактерий *Rhodococcus opacus*, выращенных на различных галогенированных субстратах. Штамм был получен из коллекции микроорганизмов ИМБ НАНБ и обозначен там как способный использовать в качестве единственного источника углерода хлорбензол. Нами была установлена способность этого штамма утилизировать ряд других соединений – бром- и йодбензола, орто- и пара-хлор(бром)бензойных кислот, а также бензола. В качестве начальных модельных соединений были взяты бензол, хлорбензол, бромбензол и йодбензол. Выбор этого ряда обусловлен тем, что, во-первых, хлорбензол и бромбензол являются структурными элементами многих ксенобиотиков, во-вторых, в литературе не встречалось данных о зависимости содержания и активности цитохрома P450 от типа галогена.

Данные о содержании цитохромов P450 и b_5 в клетках бактерий *Rhodococcus opacus* в стационарной и логарифмической фазах роста, выращенных на соответствующих субстратах в качестве единственного источника углерода, представлены в таблице.

Таблица

Содержание цитохромов P450 и b_5 в клетках бактерий *Rhodococcus opacus*

Субстрат	Содержание цитохрома b_5 , нмоль/мг белка		Содержание цитохрома P450, нмоль/мг белка	
	Экспоненциальная фаза роста	Стационарная фаза роста	Экспоненциальная фаза роста	Стационарная фаза роста
Бензол	0,010	0,003	0,033	0,012
Хлорбензол	0,016	–	0,077	–
Бромбензол	0,020	0,009	0,040	0,016

Физиологическая и биохимическая активность клеток, содержание и активность почти всех ферментов в клетке зависят от ее фазы развития. Поэтому содержание цитохромов P450 и b_5 определяли в логарифмической и стационарной фазах роста клеточной популяции.

Стационарная фаза роста клеток обусловлена истощением субстрата в среде.

Измерение содержания цитохромов b_5 и P450 проводили на спектрофотометре Specord M-40 по методу Омур и Сато [11].

Содержание цитохромов b_5 и P450 в клетках в логарифмической фазе выше, чем в стационарной, что соответствует общим представлениям о состоянии клеток в этих фазах.

Увеличение содержания цитохрома P450 при переходе от негалогенированного субстрата (бензола) к галогенированному (хлорбензолу) объясняется наличием атома галогена в последнем. Причины (механизмы) такого его влияния могут быть различными. Наиболее вероятными мы склонны считать следующие: 1) уменьшение субстратной специфичности активного центра цитохрома P450 к хлорбензолу по сравнению с бензолом, что вызывает необходимость синтеза дополнительного количества фермента для метаболизации субстрата (это объяснение работает как для случая синтеза в клетке одной и той же изоформы цитохрома P450, так и для случая, когда различные субстраты индуцируют различные изоформы одного и того же фермента); 2) ингибирование активности цитохрома P450 образующимися продуктами ферментативного превращения хлорбензола, среди которых могут быть и радикальные, что в конечном счете также приводит к снижению субстратной специфичности.

Уменьшение содержания цитохрома P450 при переходе от хлорбензола к бромбензолу можно объяснить обратными причинами (обратным образом).

Содержание цитохрома b_5 , от которого передается электрон, зависит, вероятнее всего, от того, какой субстрат связан с активным центром цитохрома P450. Это может быть как исходный субстрат, так и частично метаболизированный, в зависимости от того, какую стадию превращения катализирует цитохром P450. Кроме того, на комплекс субстрат–цитохром P450–кислород электрон может передаваться не от цитохрома b_5 , а от цитохром P450-редуктазы, и соотношение участвующих в этом процессе ферментов зависит от тонких энергетических характеристик процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haggblom M.M., Young L.Y. Chlorophenol degradation coupled to sulfate reduction // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1990. – Vol. 56. – P. 3255–3260.
2. Haggblom M.M. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds // *FEMS Microbiology Reviews*. – 1992. – Vol. 103. – P. 29–72.
3. Baxter R.M. Reductive Dehalogenation of Environmental Contaminants // *A Critical Review. Water Pollution Research Journal of Canada*. – 1989. – Vol. 24. – P. 299–322.
4. Reineke W., Knackmuss H.-J. Microbial degradation of haloaromatics // *Annual Review of Microbiology*. – 1988. – Vol. 42. – P. 263–287.
5. Fetzner S., Lingens F. Bacterial dehalogenase: Biochemistry, Genetics, and Biotechnological Applications // *Microbiol. Rev.* – 1994. – Vol. 58. – №. 4. – P. 641–685.
6. Fetzner S. Bacterial dehalogenation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1998. – Vol. 50. – P. 633–657.
7. Heimbrook D.C., Sligar S.G. Multiple mechanism of cytochrome P-450 catalyzed substrate hydroxylation // *Biochem. Biophys. Commun.* – 1981. – Vol. 99. – P. 530–535.
8. Burka L.T., Plucinski T.M., MacDonald T.L. Mechanism of hydroxylation by cytochrome P-450: Metabolism of monohalobenzenes by phenobarbital-induced microsomes // *Proceedings in National Academy of Sciences USA*. – 1983. – Vol. 80. – P. 6680–6684.

9. Noshiro M., Ullrich V., Omura T. Cytochrome b₅ as electron donor for oxycytochrome P-450 // *European Journal of Biochemistry*. – 1980. – Vol. 116. – P. 521.

10. Brunstrom A., Ingelman-Sundberg M. Benzo(a)pyrene metabolism by purified forms of rabbit liver microsomal cytochrome P-450, cytochrome b₅ and epoxide hydrolase in reconstituted phospholipid vesicles // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1980. – Vol. 97. – P. 582–584.

11. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. 1. Evidence for its hemoprotein nature // *J. Biol. Chem.* – 1964. – Vol. 239. – P. 2370–2378.

УДК 621.928.97 (088.8)

Н.С. Ручай, доцент; И.А. Гребенчикова, инженер; Е.И. Грушова, доцент

БИОСОРБЦИОННАЯ ОЧИСТКА ГАЗОВЫХ ВЫБРОСОВ И ЖИДКИХ ОТХОДОВ ГИДРОЛИЗНОГО ПРОИЗВОДСТВА

Sorption properties of different carriers towards bacterial microflora and furfural as a main component of hydrolysis production gaseous wastes were investigated. The efficiency of furfural removal from water phase using immobilized microflora was determined. The advisability of carbon fibres as a carrier in the furfural removal processes from gaseous and liquid hydrolysis production wastes was shown.

Гидролизные производства отличаются наличием больших количеств парогазовых выбросов (ПГВ), в составе которых фурфурол, метанол, уксусная кислота и другие примеси, а также фурфуролсодержащих конденсатов. В расчете на 1 т перерабатываемого сухого древесного сырья ПГВ содержат 3–6 кг фурфурола, около 1 кг органических кислот, 0,5 кг метанола [1]. На действующих предприятиях ПГВ частично очищают в конденсационных установках. Наиболее эффективны биологические методы очистки газовых выбросов, которые основаны главным образом на абсорбции загрязняющих компонентов жидкостью, содержащей микроорганизмы, или адсорбции загрязнителей растительными (торф, измельченный камыш и др.) либо синтетическими (полиамидное волокно) материалами, орошаемыми питательным раствором, обеспечивающим развитие микрофлоры [2].

В настоящей работе поставлена задача создания биосистемы с иммобилизованной микрофлорой, обеспечивающей эффективную очистку парогазовых выбросов или жидких отходов гидролизного производства, основным токсичным компонентом которых является фурфурол.

В основу нами положено предположение, что при биосорбционной очистке газов или жидкостей иммобилизованной на носителе микрофлорой наиболее эффективными будут биосистемы, у которых носитель не только удерживает на своей поверхности значительное количество микробных клеток, но и способен одновременно к эффективной сорбции деформируемых микрофлорой компонентов.

Для решения поставленной задачи эксперимент проводили в несколько этапов: экспериментальный подбор носителей с высокой сорбционной способностью по бактериальной микрофлоре; оценка сорбционной емкости носителей по основному компоненту газовых выбросов гидролизного производства – фурфуролу; определение эффективности удаления фурфурола из водной фазы микрофлорой, иммобилизованной на носителе. Все эксперименты осуществляли в идентичных по основным параметрам условиях. В качестве носителей использовали насадку «ВИЯ» (полиамидное волокно),