



УДК 615.9+577.472(28):614+577.4

Биосинтез метилэритритол-циклодифосфата у коринеподобных бактерий в условиях окислительного стресса

В. Ж. Цыренов¹, А. А. Санданов¹, Д. Н. Островский²

¹Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,
Улан-Удэ

²Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва
E-mail: office@esstu.ru

Аннотация. Изучен процесс биосинтеза 2-С-метил-D-эритритол-2,4-циклодифосфата у различных коринеподобных бактерий. В клетках культур микроорганизмов, исследованных с применением метода ³¹P-ЯМР, обнаружено большое количество (8) сигналов фосфорных соединений. В условиях окислительного стресса, индуцированного бензилвиологеном, количество сигналов уменьшается до трёх и обнаруживается новый сигнал, относимый к 2-С-метил-D-эритритол-2,4-циклодифосфата (МЭЦ). Определён наиболее перспективный продуцент МЭЦ.

Ключевые слова: метилэритрол-циклодифосфат, коринебактерии, окислительный стресс.

Введение

2-С-метил-D-эритритол-2,4-циклодифосфат (МЭЦ) является ключевым метаболитом недавно открытого метилэритрофосфатного пути (МЭФ-пути) биосинтеза изопреноидов [1]. МЭЦ имеет перспективы применения при создании новых антибиотиков, а также может быть использован для перевода микроорганизмов из дормантного состояния в активное [3]. Д. Н. Островским установлено накопление значительных количеств МЭЦ в клетках только одного штамма коринебактерий – *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 в условиях окислительного стресса [2]. Такое явление может быть использовано как биохимический механизм для препаративного получения МЭЦ методом микробиологического синтеза.

Цель настоящего исследования – изучить с использованием метода ЯМР-спектроскопии динамику содержания фосфорных соединений, в том числе МЭЦ, в клетках разных культур коринеподобных бактерий в условиях окислительного стресса, достигаемого использованием редокс-медиатора, установить ход микробиологического синтеза МЭЦ при использовании различных культур коринеподобных бактерий и определить наиболее эффективный продуцент.

Материалы и методы

Объектом исследований являлись следующие представители группы коринебактерий: *Corynebacterium ammoniagenes* ВСТИ 403, *C. flavum* ВСТИ 301, *C. sp.* ВСТИ 4 из коллекции ФГУП «ГосНИИгенетика» и кафедры биотехнологии ВСГТУ (г. Улан-Удэ); *C. ammoniagenes* АТСС 6872, *Micrococcus lysodeikticus (luteus)* из коллекции Института биохимии им. А. Н. Баха (г. Москва).

Посевная среда содержала: 20 г D-глюкозы моногидрата, 10 г пептона, 10 г дрожжевого экстракта и 2,5 г NaCl на 1 л воды. Перед стерилизацией рН доводили до 7,2 с помощью 3 н NaOH. Инокулят (10 %) готовили на посевной среде. Культуру микроорганизмов объёмом по 50 мл выращивали в колбах Эрленмейера объёмом 750 мл.

Ферментационная среда Nutrient broth M002 (Himedia, Индия) содержала 50 г глюкозы моногидрата, 3 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl на 1 л воды. Для осуществления биосинтеза МЭЦ ферментационную среду разливали по 200 мл в качалочные колбы объёмом 750 мл, доводили рН 5 н NaOH до 7,6 и стерилизовали в течение 15 мин при давлении 1 атм.

Культуру со скошенной среды петлёй переносили в 200 мл посевной среды и помещали на качалку (220 об./мин). После суток роста при 30 ± 1 °C посевной культурой в количестве 10 об. % инокулировали ферментационную среду. Для осуществления синтеза МЭЦ в ферментационную среду добавляли бензилвиологен 50 мкг/мл, а также глюкозу (40 %) 10 мл после 24 ч ферментации. Продолжительность ферментации составляла 48 ч.

Наблюдения за ростом клеток проводили измерением оптической плотности при 578 нм.

Бумажную хроматографию нуклеотидов проводили на бумаге Whatman (GE Healthcare Life Sciences). Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) клеточного экстракта с градиентной элюцией выполнялась по методу [2] с использованием хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies, США). Содержание нуклеотидов в элюате контролировали, измеряя поглощение при 260 нм.

Для идентификации и количественного определения МЭЦ биомассу бактерий осаждали центрифугированием. Раствор использовали для регистрации ^{31}P -ЯМР (спектрометр АМХ-400 (Bruker, США)).

Молярную концентрацию МЭЦ рассчитывали по интегралу спектра ^{31}P -ЯМР путём сравнения со спектром известной навески NADP при отношении интегралов к интенсивности сигналов стандарта.

Для выделения и очистки МЭЦ с сигналом ^{31}P -ЯМР с химическим сдвигом $-14,8$ м. д. клетки выращивали в присутствии радиоактивного фосфата (10 Мбк на 1 мл), экстракты наносили на колонку с анионообменником Dowex 1×4 (Serva Feinbiochemika, Германия) в формиатной форме.

Элюат с колонки анализировали на содержание радиоактивности и поглощение при 260 нм, а также на наличие сигналов ^{31}P -ЯМР [3].

В опытах использовали препарат МЭЦ, полученный в лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов Института биохимии им. А. Н. Баха РАН.

Результаты и обсуждение

Исследуемые микроорганизмы культивировали в отсутствии или присутствии бензилвиологена или другого редокс-медиатора, клетки экстрагировали этанолом, а экстракт использовали в качестве образца для снятия спектров ^{31}P -ЯМР, по интенсивности их сигналов определяя концентрацию фосфорных соединений.

Установлено, что в клетках большинства исследуемых нами культур коринеподобных бактерий в той или иной мере происходит накопление фосфорного соединения с химическим сдвигом в спектре ^{31}P -ЯМР = -14,8 м. д. Это иллюстрирует рисунок, на котором приведён спектр ^{31}P -ЯМР-экстракта из клеток *C. flavum* ВСТИ 301 после их инкубации с бензилвиологеном.

Данные соединения накапливаются в клетках всех исследуемых организмов в отсутствие редокс-медиатора, что впервые показано на примере культур *M. luteus* и *C. ammoniagenes* ATCC 6872, а соответствующее соединение идентифицировано как 2-С-метил-Д-эритритол-2,4-циклодифосфат (МЭЦ) [2].

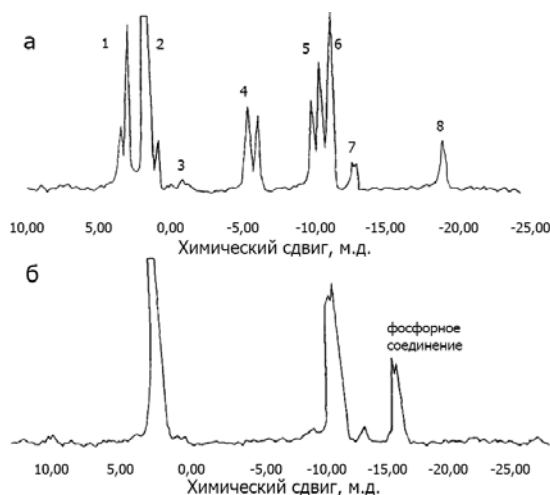


Рис. Спектр ^{31}P -ЯМР-экстрактов из клеток *Corynebacterium flavum* ВСТИ 301, выращенных в отсутствии (а) и в присутствии (б) бензилвиологена (50 мкг на 1 мл среды). Традиционное отнесение сигналов: 1 – фосфомоноэфиры; 2 – ортофосфат; 3 – фосфодиэфиры; 4 – гамма-фосфо+нулеозидди- и трифосфатов; 5 – альфа-фосфо-нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфаты; 6 – NAD; 7 – UDP-сахара; 8 – бета-фосфо-нуклеозидтрифосфаты, НФС – новое фосфорное соединение

Как видно на рис., а, в отсутствие бензилвиологена в клетке после их инкубации обнаруживается большее количество (около 8) сигналов фосфорных соединений, относимых к фосфомоноэфирам, ортофосфату, нуклеозид-фосфатам и другим соединениям. Также видно, что в присутствии редокс-медиатора бензилвиологена количество сигналов уменьшается до трёх и один из них (сигнал НФС) является сигналом нового вещества, индуцированного редокс-медиатором. Данное вещество в случае использования

M. luteus и *C. ammoniagenes* ATCC 6872 ранее было идентифицировано как МЭЦ [2].

Как видно из данных табл. 1, в клетках коринеподобных бактерий в присутствии бензилвиологена наблюдается накопление фосфорного соединения с химическим сдвигом в спектре ^{31}P -ЯМР = -14,8 м. д., которое, исходя из данных литературы, предварительно идентифицировано как МЭЦ.

Таблица 1

Содержание фосфорного соединения с химическим сдвигом в спектре ^{31}P -ЯМР = -14,8 м. д. в клетке у различных штаммов коринеподобных бактерий, выращенных в присутствии редокс-медиатора бензилвиологена в концентрации 100 мкг/мл

Микроорганизмы	Содержание фосфорного соединения со сдвигом -14 м. д., отнесённое к общему и к суммарному фосфору нуклеотидполифосфатов и нуклеотидов, в %	
	Робщ.	Рнукл.
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> ATCC 6872	12,7±1,0	26,8±2,5
<i>C. ammoniagenes</i> ВСТИ 403	11,4±1,0	21,5±2,5
<i>C. flavum</i> ВСТИ 301	14,2±1,5	25,8±2,5
<i>C. ammoniagenes</i> ВСТИ 404	12,9±1,5	23,3±2,5
<i>C. insidiosum</i> 224	3,2±0,3	5,7±0,5
<i>C. stationis</i> 336	3,6±0,3	4,1±0,5
<i>C. linenens</i> 242	2,4±0,3	4,8±0,5

Для уточнения идентификации -14,8 м. д. фосфорного соединения МЭЦ, обращающегося в клетках *C. flavum* ВСТИ 301, и дополнительной количественной оценки проводили его очистку и выделение по методу, основанному на использовании ионообменной хроматографии и изотопного анализа [2]. Для этого биомассу (около 2 г) *C. flavum* ВСТИ 301, выращенную в присутствии радиоактивного фосфата, отделяли центрифугированием, инкубировали с бензилвиолгеном и экстрагировали этанолом, образец экстракта наносили на хроматографическую колонку. Проводили ионообменную хроматографию этанольного экстракта клеток бактерий.

Хроматографические исследования начаты с постановки модельного опыта с радиоактивным препаратом ^{32}P мукл МЭЦ, который мы использовали в качестве реперного соединения. Было показано, что МЭЦ элюируется в виде одинарного пика по радиоактивности. Далее осуществляли хроматографию этанольных экстрактов клеток *C. flavum* ВСТИ 301, полученных после инкубации с редокс-медиатором бензилвиологеном и без него соответственно. Показано, что хроматографические профили опыта и контроля по показателю содержания УФ-поглощающих веществ (по A_{260}) одинаковы: в обоих случаях обнаруживаются 3 пика веществ, идентифицированных как производные нуклеотидов и других низкомолекулярных компонентов нуклеиновых кислот. Хроматографические профили опыта и контроля по ре-

зультатам анализа содержания радиоактивности в элюатах с колонки обнаруживали существенные различия.

На основе данных спектра ³¹P-ЯМР-экстрактов из клеток *C. ammoniagenes* ВСТИ 301 в присутствии бензилвиологена (опыт) и в его отсутствии (контроль) и сравнения с данными литературы [1–3] фосфорные соединения в экстракте клеток исследуемых бактерий, синтез которых индуцируется бензилвиологеном, нами идентифицированы как МЭЦ.

Для микробиологического синтеза МЭЦ микроорганизмы культивировали в ферментационной среде до конца логарифмической фазы роста, а затем вводили водные растворы бензилвиологена двуххлористого до концентрации 75 мкг/л.

Из данных табл. 2 следует, что все исследуемые коринеподобные бактерии в ответ на окислительный стресс, индуцируемый редокс-медиатором, осуществляют биосинтез МЭЦ. Уровень накопления данного метаболита у разных культур микроорганизмов различается в существенной мере. В случае использования в ферментации *C. flavum* ВСТИ 301 выход МЭЦ (30,5 мг/г) сырой биомассы высокий, что позволяет говорить о его сверхсинтезе. Данный штамм-продуцент может быть использован для получения препаратов МЭЦ для потребностей фармацевтической биотехнологии.

Таблица 2

Содержание МЭЦ в биомассе коринеподобных бактерий, выращенных в среде, содержащей 1,5 % глюкозы, и инкубированных в присутствии бензилвиологена в концентрации 75 мкг

Микроорганизм	Кол-во выросшей биомассы, г/л	Содержание МЭЦ, мг/л культуральной жидкости	Содержание МЭЦ, мг/г сырой биомассы
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> ATCC 6872	11,6	320±30	27,8±3
<i>C. ammoniagenes</i> ВСТИ 403	12,4	330±30	26,7±3
<i>C. flavum</i> ВСТИ 301	11,4	347±35	30,5± 3
<i>C. ammoniagenes</i> ВСТИ 404	8,9	190±20	21,7±3
<i>C. insidiosum</i> 224	7,8	36± 3	4,7± 3
<i>C. stationis</i> 336	6,4	28± 3	4,5± 3
<i>C. linenens</i> 242	8,5	34± 3	4 ± 3

Выводы

В клетках культур коринеподобных бактерий при использовании метода ЯМР обнаружено большое количество (8) сигналов фосфорных соединений, относимых к фосфомоноэфирам, ортофосфату, нуклеозидфосфатам и другим. В культурах в условиях окислительного стресса, индуцированного редокс-медиатором бензилвиологеном, количество сигналов уменьшается до трёх и появляется новый сигнал, относимый к 2-С-метил-Д-эритритол-2,4-циклодифосфату.

Различные культуры коринеподобных бактерий испытаны на способность синтезировать МЭЦ, отобран наиболее перспективный продуцент этого соединения с *C. flavum* ВСТИ 301.

Список литературы

1. Ершов Ю. В. 2-С-метилэритрофосфатный путь биосинтеза изопреноидов как мишень при поиске новых антибиотиков, гербицидов и иммуномодуляторов / Ю. В. Ершов // Прикл. биохимия и микробиология. – 2007. – № 2. – С. 133–157.
2. Островский Д. Н. Новые участники окислительного стресса у бактерий / Д. Н. Островский // Успехи биол. химии. – 1997. – Т. 37. – С. 147–169.
3. Санданов А. А. Нитроксильные соединения у бактерий / А. А. Санданов, К. В. Мазикин, Д. Н. Островский // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов. – Воронеж : Изд-во ВГУ, 2008. – № 10. – С. 124–127.

Biosynthesis of 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphate in *Corynebacterium* in Oxidative Stress

V. Zh. Tsyrenov¹, A. A. Sandanov¹, D. N. Ostrovsky²

¹East-Siberian State University of Technology and Management, Ulan-Ude

²A. N. Bach Institute of Biochemistry, Moscow

Abstract. The process of biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate in various coryneform bacteria was studied. The cells of microorganisms cultures studied by ³¹P-NMR revealed a large amount (8) signals of phosphorus compounds. Under conditions of oxidative stress induced by benzilviologen, the number of signals is reduced to three and a new signal is detected attributable to 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate (MEC). The most promising producer is determined.

Keywords: methylerythritol-cyclodiphosphate, coryneform bacteria, oxidative stress.

Цыренов Владимир Жигжитович
доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой
Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления
Институт пищевой инженерии
и биотехнологии
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40-а
тел.: (3012) 41–71–46
факс: (3012) 43–14–15
e-mail: office@esstu.ru

Tsirenov Vladimir Zhigzhitovich
Doctor of Sciences (Biology), Professor,
Head of Department
East-Siberian State University
of Technology and Management
Institute of Food Engineering
and Biotechnology
40-a, Klyuchevskaya st., Ulan-Ude, 670013
tel.: (3012) 41–71–46
fax: (3012) 43–14–15
e-mail: office@esstu.ru

Санданов Александр Андреевич
кандидат биологических наук
Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40-а
тел.: (3012) 41–71–46

Sandanov Aleksandr Andreevich
Candidate of Sciences (Biology)
East-Siberian State University
of Technology and Management
40-a, Klyuchevskaya st., Ulan-Ude, 670013
tel.: (3012) 41–71–46

факс (3012) 43–14–15
e-mail: alsandr@gmail.ru

Островский Дмитрий Николаевич
доктор биологических наук, профессор
Институт биохимии им. А. Н. Баха
119071 г. Москва, Ленинский проспект,
д. 33, строение 2
тел.: (495) 954–40–47
e-mail: ost@inbi.ras.ru

fax: (3012) 43–14–15
e-mail: alsandr@gmail.ru

Ostrovskii Dmitriy Nikolaevich
Doctor of Sciences (Biology), Professor
A. N. Bach Institute of Biochemistry
33/2, Lenin bld., Moscow, 119071
tel.: (495) 954–40–47
e-mail: ost@inbi.ras.ru