

**О.С. Броварська, В.М. Васильєв, А.М. Остапчук,
Е.О. Коваленко, О.В. Сащук**

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ МСП Д03680, Україна

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЗАКЛІТИННОГО ЛЕКТИНУ BACILLUS SUBTILIS IMB B-7014

Вивчено моносахаридний і жирнокислотний склад водної і органічної фаз лектину. Встановлено, що позаклітинний лектин містить 15,0 % білка, 4,6 % вуглеводів та 1,0 % нуклеїнових кислот. Загальний вміст ліпідів в лектині становить 16,14 %. В складі лектину присутні наступні моносахариди: маноза, галактоза, рибоза, глюкоза і рамноза. Встановлено, що як нативний лектин так і його ліпофільна фракція містять жирні кислоти від C_{15} до C_{18} . При жорсткому метанолізі збільшується вміст *anti-iso-C₁₅* жирної кислоти з одночасним зменшенням вмісту всіх типів октадеканових кислот.

Ключові слова: моносахаридний і жирнокислотний склад, лектин *Bacillus subtilis*.

Лектини – білки неіммунної природи, які специфічно і зворотно зв'язують вуглеводи без порушення їх ковалентної структури. Вони присутні в будь-якій живій системі, відіграють провідну роль у процесах вуглевод-білкового впізнавання і мають поліфункціональні властивості (мітогенні, імуномодулюючі, протипухлинні тощо).

Серед лектинів сапрофітних мікроорганізмів найбільш вивченими на сьогодні є лектини сапрофітних штамів бактерій роду *Bacillus*. Встановлено, що вони являють собою термостабільні, металонезалежні глікопротеїни з молекулярною масою 25-50 кДа, стійкі до дії рН, детергентів і тривалого зберігання, мають рідкісну специфічність до сіалових кислот та проявляють різноманітні медико-біологічні активності: інтерфероніндукуючі, імуотропні, протипухлинні, антивірусні. Для впровадження цих біологічно активних речовин в практику необхідно знати їх фізико-хімічні властивості, вивчення яких у продуцента позаклітинного сіалоспецифічного лектину – сапрофітного штаму *Bacillus subtilis* і було метою даної роботи.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження був позаклітинний лектин штаму *B. subtilis* IMB B-7014, одержаний з Української колекції мікроорганізмів IMB НАНУ.

Виділяли лектин за загально прийнятою методикою [3], фракціонування проводили за схемою (рис. 1).

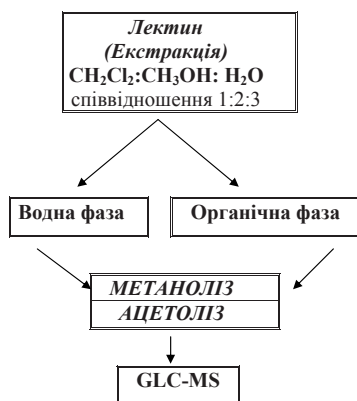


Рис. 1. Схема фракціонування лектину

Визначення кількості вуглеводів здійснювали за Dubois et al. [4]. Метод базується на здатності як вільних сахаридів, так і моносахаридних залишків гомо- і гетерополімерів давати жовто-коричневе забарвлення при реакції з фенолом і сірчаною кислотою. Визначення вмісту білка проводили згідно з методом Lowry et al. з використанням реактиву Фоліна [5]. Вміст нуклеїнових кислот визначали за методом Спіріна [2].

Ідентифікацію нейтральних моносахаридів проводили після гідролізу препаратів у 2 N розчині HCl протягом 5 год при 100°C. Обробку зразків здійснювали за методом Albersheim et al. [6]: після гідролізу проби висушували (під вакуумом) та тричі промивали дистильованою водою, до проби вносили боргідрид натрію та залишали на 10 год при кімнатній тем-

пературі (в захищеному від світла місці). Зразки нейтралізували за допомогою іонообмінної смоли КУ-2 в Н⁺ формі, фільтрували, висушували і тричі обробляли метанолом (по 1 мл) та випаровували. До проби додавали 0,5 мл піридину (перегнаного) та 0,5 мл оцтовокислого ангідриду і гідролізували протягом 20 хв при 100 °С. Потім їх висушували, додавали 2-3 мл перегнаного хлороформу, центрифугували в скляних пробірках при 2500 g, 20 хв. Після цього супернатант, який містив суміш нейтральних моносахаридів у вигляді ацетатів поліолів, розділяли на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert (колонка DB-225 mS 30m × 0,25mm × 0,25µm, газ носій – гелій, потік через колонку 1 мл/хв.; температура випаровування – 250 °С, інтерфейсу – 280 °С, термостата – 220 °С (режим ізотермічний); пробу вводили з діленням потоку 1:100). Ідентифікацію моносахаридів проводили шляхом порівняння часу утримання ацетатів поліолів стандартних і досліджуваних зразків, а також із використанням комп'ютерної бази даних ChemStation. Кількісне співвідношення окремих моносахаридів визначали у відсотках від сумарної їх кількості за співвідношенням площ всіх піків моносахаридів [1]. Аналіз метилглікозидів проводили згідно з методом Corsaro et al. [7].

Для визначення амінокислот 11 мг препарату гідролізували у 6 N розчину HCl (2,2 мл) протягом 20 год при 100 °С. Визначення вмісту амінокислот проводили на аналізаторі амінокислот LC-5001 ("Biotronic" ФРН).

При визначенні жирнокислотного складу, наважку препарату (10 мг) розчиняли у 3 мл 1,5 % розчину хлористого ацетилю в метанолі (попередньо охолоджену) і гідролізували при температурі 100 °С в запаяних ампулах протягом 4 год [1]. Метиллові ефіри жирних кислот екстрагували тричі гексаном (по 3 мл). Фракцію n-гексану відбирали і висушували на вакуумному випаровувачі. Аналіз метилових ефірів жирних кислот проводили на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert (колонка HP-5MS, довжина 30 м, внутрішній діаметр 0,25 мм, товщина фази 0,25 µm; Температурний режим 150–250 °С, градієнт температури 4 °С/хв, газ-носії – гелій, швидкість потоку через колонку 1,2 мл/хв.; Температура випаровувача з поділом потоку 1:100). Обробку результатів проводили за допомогою персонального комп'ютера та стандартної суміші метилових ефірів жирних кислот (виробник Supelco, США).

Результати та їх обговорення. Нами раніше був виділений лектин з *B. subtilis* IMB B-7014 за загальноприйнятою методикою [3].

При вивченні хімічного складу лектину було встановлено наявність білка – 15,0 %, вуглеводів – 4,6 % і нуклеїнових кислот 1,0 %. Аналіз моносахаридного складу лектину показав, що домінуючими моносахаридами були – галактоза (44,5 %), маноза (23,6 %), рибоза (14,2 %), глюкоза (11,0 %) і рамноза (6,7 %). За амінокислотним складом досліджуваний лектин не відрізняється від інших відомих лектинів. В його складі міститься значна кількість гліцину (18,2 %), аспарагінової кислоти (14,4 %), проліну (12,2 %) та лейцину (10,7 %). Інші кислоти, за виключенням аланіну і глутамінової кислоти, виявлені в незначних кількостях.

При виділенні лектину із культуральної рідини одночасно з ним у вигляді супутніх домішок виділяються різні речовини ліпідної природи. Для їх виділення зазвичай використовують метод екстракції зразків органічними розчинниками. У даному випадку був застосований метод Bligh and Dyer, в якому як розчинники використовують системи хлороформ-метанол-вода в різних співвідношеннях, що дає можливість максимально виділити ліпід із досліджуваного зразка бактеріального походження [8]. При екстракції в нижній органічній фазі міститься ліпід (гідрофобні речовини), а у верхній фазі – гідрофільні, і можливо високополярні ліпіди. Фракціонування лектину проводили при інтенсивному перемішуванні системою розчинників (хлористий метилен:метанол) у співвідношенні 2:1, відповідно. До суміші додавали воду і витримували 12 год. Органічну і водну фази розділяли, випаровували на роторному випаровувачі і аналізували вміст жирних кислот і моносахаридів, відповідно.

При вивченні моносахаридного складу водної фази екстракту лектину у вигляді ацетатів поліолів на хроматограмі були ідентифіковані галактоза, глюкоза та рибоза у співвідношенні 2,95:1,0:0,6. При паралельному аналізі моносахаридного складу у вигляді ацетильованих метилглікозидів були ідентифіковані галактоза, глюкоза та рибіт, а також аміноукри: галактозамін і глюкозамін у співвідношенні 2,95:1,0:0,6:0,1:0,083, відповідно (табл. 1, рис. 2, 3). Суперечливі дані щодо моносахаридного складу пояснюються тим, що при одержанні методу повних ацетатів поліолів моносахариди перетворюються у відповідні поліоли на етапі віднов-

лення і рибоза ідентифікується як рибіт. При визначенні моносахаридного складу за методом ацетилювання метилглікозидів рибоза ідентифікується у вигляді моносахариду у відповідній аномерній формі метилглікозиду. Відповідно, вуглеводна частина лектину містить не рибозу, а поліол рибіт, а також моносахариди галактозу, глюкозу, галактозамін і глюкозамін. Причиною одержаного результату може бути те, що при виділенні із культуральної рідини позаклітинного лектину сапрофітного штаму *B. subtilis* IMB В-7014, можливо відбувається виділення домішок рибіттейхоевих кислот, які є компонентами клітинної стінки. При метанолізі з цих компонентів вивільняється рибіт.

Таблиця 1

Вміст моносахаридів у водній фазі позаклітинного лектину штаму *B. subtilis* IMB В-7014

Похідні моносахаридів:	Моносахариди					
	галактоза	глюкоза	рибоза	рибіт	N-ацетил-галактозамін	N-ацетил-глюкозамін
	Відносний вміст моносахаридів щодо глюкози					
ацетати поліолів	2,95	1,0	0,6	-	-	-
метилглікозиди	2,95	1,0	-	0,6	0,1	0,083

Перевага методу метилглікозидів перед методом ацетатів поліолів полягає у тому, що він дає можливість визначати не лише нейтральні моносахариди, але й глюкуронові кислоти та аміноцукри.

Встановлено, що при метанолізі 0,5 N HCl як лектину, так і ліпофільної фракції, в його складі ідентифіковані *anti-iso-C*₁₅, *C*₁₆, *iso-C*₁₇, *anti-iso-C*₁₇, *cis-C*_{18:1} і *C*₁₈ кислоти у співвідношенні 0,25:1,0:0,65:1,15:0,95:0,67, відповідно (рис. 4А). При жорсткому метанолізі (4 N HCl), крім вказаних кислот, виявлені тетрадеканова і *iso*-пентадеканова кислоти. Таким чином у складі лектину було ідентифіковано три типи жирних кислот *C*₁₄, *C*₁₆, *C*₁₈ у співвідношенні 0,1:1,0:0,53, відповідно. Кожний тип поданий наступними кислотами: тетрадеканова кислота одним видом жирної кислоти *C*_{14:0}; гексадеканова трьома видами: *iso-C*_{15:0}, *anti-iso-C*_{15:0}, *C*_{16:0} у співвідношенні 0,34:0,85:1,0; октадеканова кислота представлена чотирма типами: *iso-C*_{17:0}, *anti-iso-C*_{17:0}, *cis-C*_{18:1}, *C*_{18:0} у співвідношенні 0,34:0,63:1,0:0,88.

При жорсткому метанолізі в 3,4 рази збільшується відносний вміст *anti-iso-C*₁₅ з одночасним зменшенням вмісту всіх типів октадеканових кислот (*iso-C*_{17:0}, *anti-iso-C*_{17:0}, *cis-C*_{18:1}, *C*_{18:0}) (табл. 2, рис. 4Б). Одержані дані кінетики виділення жирних кислот свідчать про наявність двох типів зв'язку (N- і O-) жирних кислот в досліджуваному зразку ліпідної частини лектину. Середній вміст ліпідів у складі лектину становить 16,14 %.

Таблиця 2

Жирнокислотний склад позаклітинного лектину штаму *B. subtilis* IMB В-7014

Кислота	Нативний лектин	Ліпідна частина лектину	
		метаноліз 0,5 N HCl	метаноліз 4 N HCl
	Відносний вміст жирних кислот щодо <i>C</i> _{16:0}		
тетрадеканова <i>C</i> _{14:0}	0,09	0	0,23
<i>iso</i> -пентадеканова <i>iso-C</i> _{15:0}	0,42	0	0,34
<i>anti</i> -пентадеканова <i>anti-C</i> _{15:0}	1,89	0,25	0,85
гексадеканова <i>C</i> _{16:0}	1,0	1,0	1,0
X-1	0,12	2,0	0
X-2	1,03	1,71	0,32
<i>iso</i> -гептадеканова <i>iso-C</i> _{17:0}	0,42	0,65	0,14
<i>anti-iso</i> -гептадеканова <i>anti-iso-C</i> _{17:0}	0,56	1,15	0,26
<i>cis</i> -9-октадеценева <i>cis-C</i> _{18:1}	-	0,95	0,41
октадеканова <i>C</i> _{18:0}	0,35	0,67	0,36

При м'якому метанолізі 0,5 N HCl на хроматограмі присутні два неідентифіковані компоненти X1 і X2 (рис. 4А) з часом утримання 15,29 і 27,5 хв, відповідно. При жорсткому метанолізі компонент X1 розпадався на 100 %, а X2 – на 81,3 % (табл. 2). Природа цих компонентів нами не встановлена. Можливо у склад цих компонентів входять жирні кислоти, які при жорсткому метанолізі вивільняються, внаслідок чого змінюється їх співвідношення.

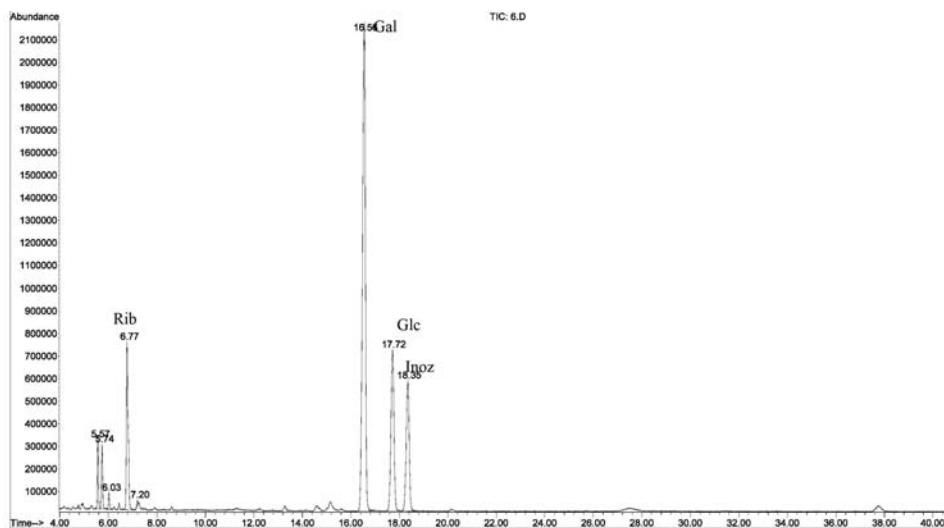


Рис. 2. Ацетати поліолів (ГРХ) водної фази екстракту позаклітинного лектину штаму *B. subtilis* IMB B-7014

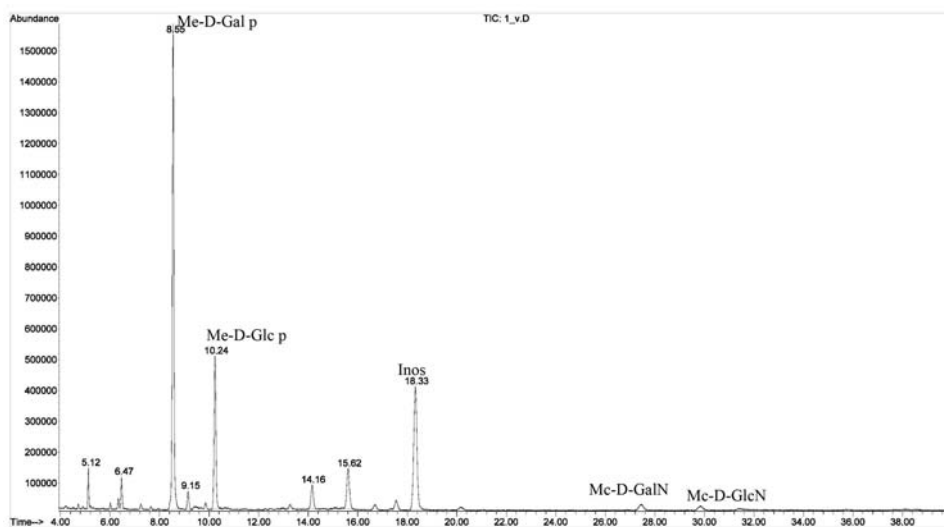


Рис. 3. Метилглікозиди водної фази екстракту позаклітинного лектину штаму *B. subtilis* IMB B-7014

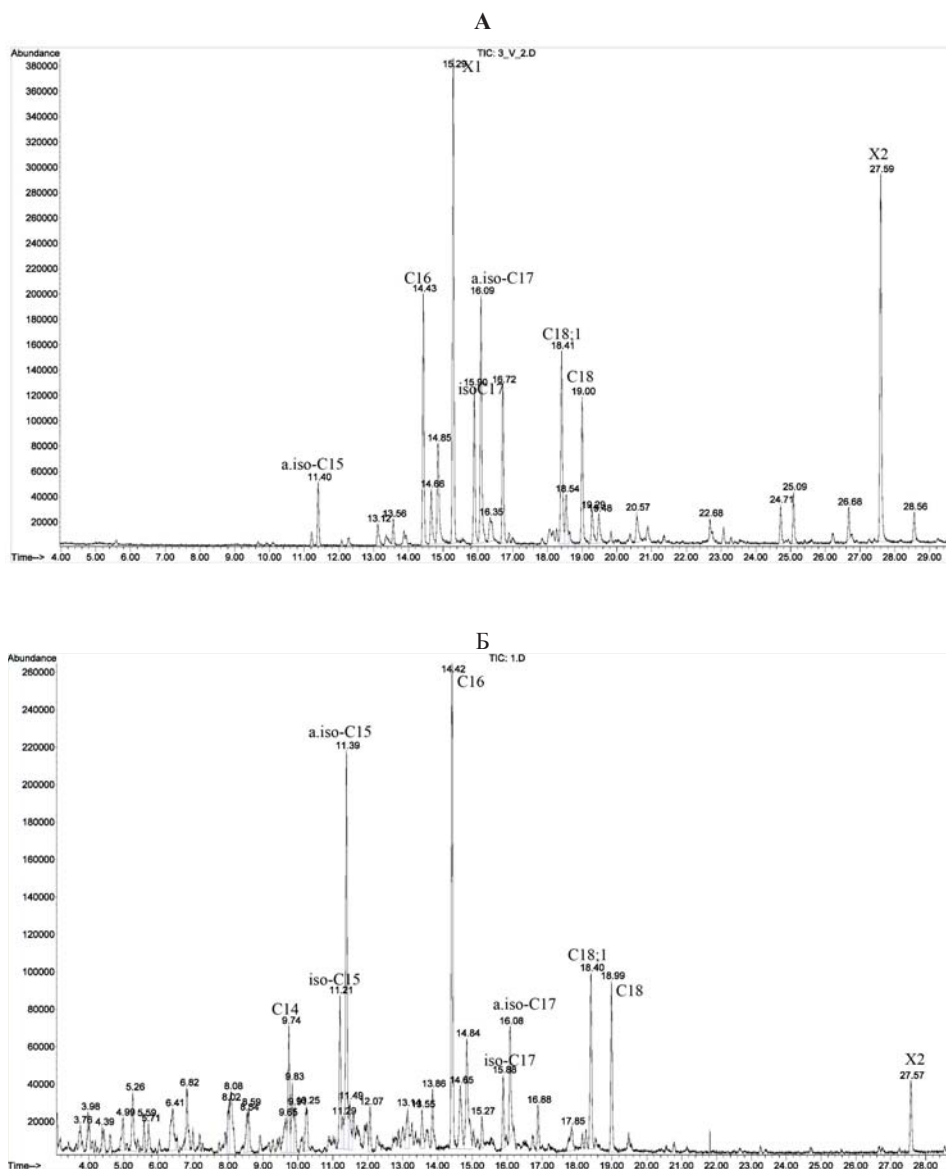


Рис. 4. Спектры жирных кислот ліпофільної фракції позаклітинного лектину штаму *B. subtilis* ИМВ В-7014:

А – метаноліз 0,5 N HCl, Б – метаноліз 4 N HCl

*О.С. Броварская, В.Н. Васильев, А.Н. Остапчук,
Э.А. Коваленко, Е.В. Сащук*

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

**ХАРАКТЕРИСТИКА ВНЕКЛЕТОЧНОГО ЛЕКТИНА
BACILLUS SUBTILIS ИМВ В-7014**

Резюме

Изучено моносахаридный и жирнокислотный состав водной и органической фазы лектина. Выявлено, что внеклеточный лектин содержит 15,0 % белка, 4,6 % углеводов, 1,0 % нуклеиновых кислот и 16,14 % липидов. В составе лектина имеются следующие моносахариды: манноза, галактоза, рибоза,

глюкоза и рамноза. Показано, что как нативный лектин, так и его липофильная фракция содержат жирные кислоты от C₁₅ до C₁₈. При жестком метанолизе увеличивается содержание *anti-iso*-C₁₅ с одновременным уменьшением содержания всех типов октадекановых кислот.

Ключевые слова: моносахаридный и жирнокислотный состав, лектин, *Bacillus subtilis*.

**O.S. Brovarska, V.N. Vasiliev, A.N. Ostapchuk,
E.A. Kovalenko, O.V. Sashchuk**

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

CHARACTERISTIC OF EXTRACELLULAR LECTIN IN *BACILLUS SUBTILIS* IMV B-7014

S u m m a r y

The monosaccharide and fatty acid composition of water and organic phase of lectin was studied. It was established that extracellular lectin contains 15.0 % of protein, 4.6 % of carbohydrates, 1.0 % of nucleic acids and 16.14 % of lipids. The following monosaccharides were presented in the lectins: mannose, ribose, glucose and ramnose. It was established that both native lectin and its lipophylic fraction were composed of fatty acids from C₁₅ to C₁₉. During aggressive methanolysis *anti-iso*-C₁₅ quantity was increased with a synchronous decrease of the content of all octadecanoic acid types.

The paper is presented in Ukrainian.

K e y w o r d s: monosaccharide and fatty acid composition, lectin *Bacillus subtilis*.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: *Brovarska O.S.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. – К.: Наукова думка, 2006. – 237 с.
2. Спиринов А.С. Определение нуклеиновых кислот // Биохимия. – 1958. – **23**, № 5. – С. 562–662.
3. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Симоненко И.А. Лектины бактерий. – К.: Наукова думка. – 1992. – 203 с.
4. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. // Anal. Chem. – 1956. – **28**, №2. – P. 350-356.
5. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin reagent // J.Biol.Chem. – 1951. – **193**, №1. – P. 265-275.
6. Albersheim P., Nevis D.J., English P.D., Karr A. A method for analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gasliquid chromatography // Carboh. Res. – 1976. – **5**, №3. – P. 340-345.
7. Corsaro M., Lanzetta et al. Structural investigation of the LPS portion of psychrophilic *Pseudoalteromonas* TAC 125 bacterium. // Eur. J.Biochem. -2001. – **268**, №9. – P.5092-5097.
8. E.G. Bligh, W.G. Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification. // Canadian J. Biochem. Physiol. 1959, **37**. – P. 911-917.

Отримано 20.04.2010