

ДІЯ ПЕРОКСИДУ ВОДНЮ НА МУТАНТИ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912 З РІЗНОЮ КАРОТИНСИНТЕЗУЮЧОЮ АКТИВНІСТЮ

В дослідженні показана залежність виживання Crt^+ - і Crt^- мутантів *Streptomyces globisporus* 1912 в умовах оксидативного стресу, викликаного пероксидом водню, від рівня біосинтезу бета-каротину і лікопіну – важливих факторів антиоксидативного захисту. Рожеві мутанти 4Crt, 6Crt, 7Crt, RVCrt і R3Crt, які синтезують лікопін, резистентні до пероксиду водню. Червоні мутанти 4Crt, 6Crt, 7Crt, RVCrt і R3Crt – продуценти лікопіну і бета-каротину показали середній рівень резистентності до H_2O_2 , а безпігментні 4W, 4W1, 7W2 і 7Y зберегли рівень чутливості до цього агента, характерний для вихідного Crt^- штаму 1912.

Ключові слова: *Streptomyces globisporus* 1912, Crt^+ - і Crt^- - мутанти, пероксид водню, резистентність.

Пероксид водню (H_2O_2), як одна із активних форм кисню (АФК), оксидує в клітині різноманітні органічні сполуки, викликаючи окислювальний стрес. Його детоксикація відбувається за допомогою дії ферментів – каталази, пероксидази та супероксиддисмутази і зв'язування каротиноїдами завдяки наявності в їхніх молекулах спряжених подвійних зв'язків, яких у лікопіну 11, у бета-каротину – 7, а в безбарвних фітофлуїну і фітоїну відповідно 5 і 3 [1-3]. Особливе місце серед каротиноїдів відводиться лікопіну – потужному антиоксиданту, який активно нейтралізує в клітині дію АФК і знижує вірогідність оксидативного стресу [4, 16]. Значні запаси лікопіну у людини знаходяться в лімфі, шкірі, печінці, простаті і надниркових залозах [13, 14].

Нефотосинтезуючі мікроорганізми, в тому числі стрептоміцети, здатні продукувати каротиноїди [9, 11, 12]. У невеликій частині стрептоміцетів ці речовини починають утворюватися під впливом стресового фактора, наприклад, синього світла [17]. У більшості стрептоміцетів пучки генів біосинтезу каротиноїдів знаходяться в неактивному (мовчазному) стані. Здатність продукувати каротиноїди виявлена і в *Streptomyces globisporus* 1912 – продуцента протипухлинного антибіотика ландоміцину Е. У цього штаму отримані спонтанні і індуквані нітрозогуанідином мутанти, здатні продукувати каротиноїди конститутивно без впливу стресового фактора [7, 8, 10]. Показано, що кольорові і отримані від них безпігментні мутанти *S. globisporus* 1912 набувають значної резистентності до летальної дії ультрафіолету порівняно з вихідним безпігментним штамом 1912, який проявляє нетипову для стрептоміцетів підвищену чутливість до дії цього агента [5].

Метою нашої роботи було дослідження летальної дії пероксиду водню на червоні і рожеві мутанти *Streptomyces globisporus* 1912 – продуценти каротиноїдів і на одержані від них безпігментні мутанти, що втратили здатність продукувати ці речовини.

Матеріали і методи. Середовища. Вихідний штам 1912, мутанти Crt^+ і Crt^- , які від нього походять, зберігали і досліджували на соєво-кукурудзяному середовищі (г/л): кукурудзяне борошно – 20,0, соєве борошно – 10,0, NaCl – 5,0, вода водопровідна 1л, агар-агар – 15,0, рН 7,4. Для підросування міцелію використовували середовище S (г/л): K_2HPO_4 – 2,0, $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5; дріжджовий екстракт – 4,0; пептон – 4,0; глюкоза – 10,0; рН до стерилізації – 7,2; стерилізація при температурі 121°C, 30 хв [10].

Пероксид водню. В реакційній суміші концентрація пероксиду водню становила 0,05, 0,1, 0,15 і 0,2 мМ. Перед внесенням пероксиду культуру пророщували 90 хв в середовищі S. Час дії пероксиду 60 хв. Дію агента припиняли 100-кратним розведенням суміші дистильованою водою, після чого суспензію у відповідних розведеннях висівали на чашки з агаризованим соєво-кукурудзяним середовищем і витримували в термостаті 5-6 діб при 28°C.

Виділення каротиноїдів. Суспензію 7-добових Crt⁺- і Crt⁻-мутантів висівали на агаризоване соєво-кукурудзяне середовище, вирощували 4 доби, після чого поверхневий міцелій знімали з поверхні середовища і висушували при 60°C протягом 4 год. Суху біомасу подрібнювали і розтирали пестиком у фарфоровій ступці з кварцовим піском. Каротиноїди екстрагували ацетоном до повного знебарвлення біомаси. Екстракти очищали від кварцового піску і обривків міцелію центрифугуванням.

Тонкошарова хроматографія. Одержані екстракти каротиноїдів наносили по 30 мкл на стартову лінію пластини Silica gel 60 F₂₅₄ фірми "Merck". Компоненти каротиноїдів розділяли в петролейному ефірі, що містив 1 % діетилового ефіру. Ідентифікацію каротиноїдів здійснювали за хроматографічною рухливістю каротиноїдів томату і спектрофотометрично.

Результати та їх обговорення. Як видно з даних, наведених в таблиці, переважна більшість кольорових мутантів *S. globisporus* 1912, здатних продукувати каротиноїди, виникли спонтанно. Спроби індукувати цей тип мутантів нітрозогуанідом або ультрафіолетом були малоєфективні. Лише мутанти RVCrt і R3Crt – єдині поки у цього об'єкта, індуковані під впливом нітрозогуанідину [10]. У цьому дослідженні у них були виділені два спонтанні рожеві мутанти RVLcp і R3Lcp, які продукують лікопін. Переважна більшість Crt⁺- і Crt⁻ мутантів, за виключенням R3Lcp і RVLcp, описані раніше в наших роботах [5-7, 10]. На хроматограмі (рис. 1) видно, що червоні мутанти 4Crt, 6Crt, 7Crt, RVCrt, R3Crt синтезують два основних каротиноїди з хроматографічною рухливістю 0,5 і 0,8, в той час як рожеві мутанти 4Lcp, RVLcp утворюють один каротиноїд, Rf якого становить 0,5 і збігається з хроматографічною рухливістю лікопіну плодів томатів. Наявність саме цих двох каротиноїдів було підтверджено за допомогою методів спектрофотометрії і високоефективної рідинної хроматографії [8]. Так дані ВЕРХ показали, що червоні мутанти накопичують бета-каротин у кількості 22 %, а лікопін 47 % від суми всіх каротиноїдів клітини, а рожеві утворюють до 80 % лікопіну. Мутант жовтого кольору 7Y продукує дуже низький рівень цих пігментів. У безпігментних мутантах тонкошарова хроматографія і спектрофотометричний аналіз їхніх екстрактів щодо наявності каротиноїдів дали негативну відповідь [5].

Таблиця

Характеристики використаних в роботі Crt⁺ і Crt⁻ мутантів

Мутанти	Фенотип	Колір колоній	Походження
1912	Crt ⁺ LndE ⁺ Spo ⁺	Біло-кремовий	грунт, Вірменія, ІМВ НАНУ
4 Crt	Crt ⁺ LndE ⁺ Spo ⁻	Червоний	1912, спонтанно
6 Crt	Crt ⁺ LndE ⁺ Spo ⁺	Червоний	1912, спонтанно
7 Crt	Crt ⁺ LndE ⁺ Spo ⁻	Червоний	1912, спонтанно
7 Y	Crt ⁺ LndE ⁺ Spo ⁻	Жовтий	7Crt, спонтанно
RV Crt	Crt ⁺ LndE ⁺ Spo ⁻	Червоний	RS2, нітрозогуанідин
R3 Crt	Crt ⁺ LndE ⁺ Spo ⁺	Червоний	3-1, нітрозогуанідин
4 Lcp	Crt ⁺ LndE ⁺ Spo ⁻	Рожевий	4Crt, спонтанно
R3 Lcp	Crt ⁺ LndE ⁺ Spo ⁺	Рожевий	R3, спонтанно
RV Lcp	Crt ⁺ LndE ⁺ Spo ⁻	Рожевий	RV, спонтанно
4 W	Crt ⁻ LndE ⁻ Spo ⁻	Білий	4Crt, спонтанно
4 W1	Crt ⁻ LndE ⁻ Spo ⁻	Кремовий	4Crt, УФ
7 W 2	Crt ⁻ LndE ⁻ Spo ⁻	Білий	7Crt, УФ

Примітка: Crt⁺ - біосинтез каротиноїдів,
LndE⁺ - біосинтез ландоміцину E,
Spo⁺ - споруляція

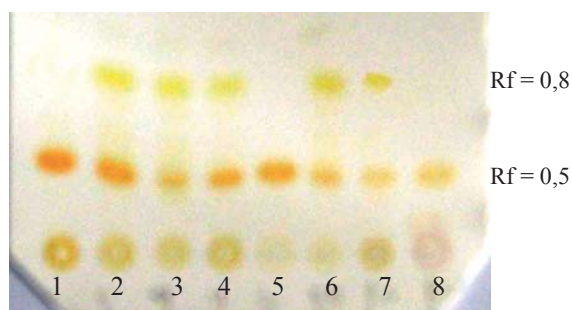


Рис. 1. Результати ТШХ екстрактів, отриманих з клітин Crt^+ -мутантів *S. globisporus* 1912:
Доріжки:

1 – лікопін томату, 2 – 7 Crt , 3 – 6 Crt , 4 – 4 Crt , 5 – 4 Lcp , 6 – $RV\ Crt$, 7 – $R3\ Crt$, 8 – $R3\ Lcp$.

Примітка: хроматограма екстракту мутанта $RV\ Lcp$, що синтезує лікопін не представлена, вона ідентична хроматограмі мутанта $R3Lcp$

За здатністю нейтралізувати негативний вплив перексиду водню Crt^+ - і Crt^- мутанти (рис. 2) розділилися на три групи: резистентні, середнього рівня стійкості і такі, що зберегли рівень чутливості вихідного штаму 1912, який має Crt^- -фенотип. До резистентних належать рожеві мутанти 4 Lcp , $RVLcp$ і $R3Lcp$ – продуценти лікопіну. Вони абсолютно не чутливі до мінімальної дози H_2O_2 0,05мМ, яка викликає значне зниження виживання у безпігментних мутантів. При дії максимальної дози 0,2 мМ ці мутанти інактивуються лише на 10-20 %. У групу мутантів середнього рівня резистентності входять червоні мутанти 4 Crt , 6 Crt , 7 Crt , $RV\ Crt$, $R3Crt$, які продукують лікопін і бета-каротин. Максимальна доза перексиду 0,2 мМ викликає у них зниження виживання на 30-40 %. До третьої групи належать безпігментні мутанти 4 W , 4 $W1$, 7 $W2$, що втратили здатність продукувати каротиноїди і жовтий мутант 7 Y , рівень біосинтезу каротиноїдів у якого дуже низький, а також вихідний Crt^- штаму 1912. Мінімальна доза перексиду водню викликає у цієї групи мутантів зниження виживання на 55-65 %, а після дії максимальної – рівень інактивації досягає 92-98 %.

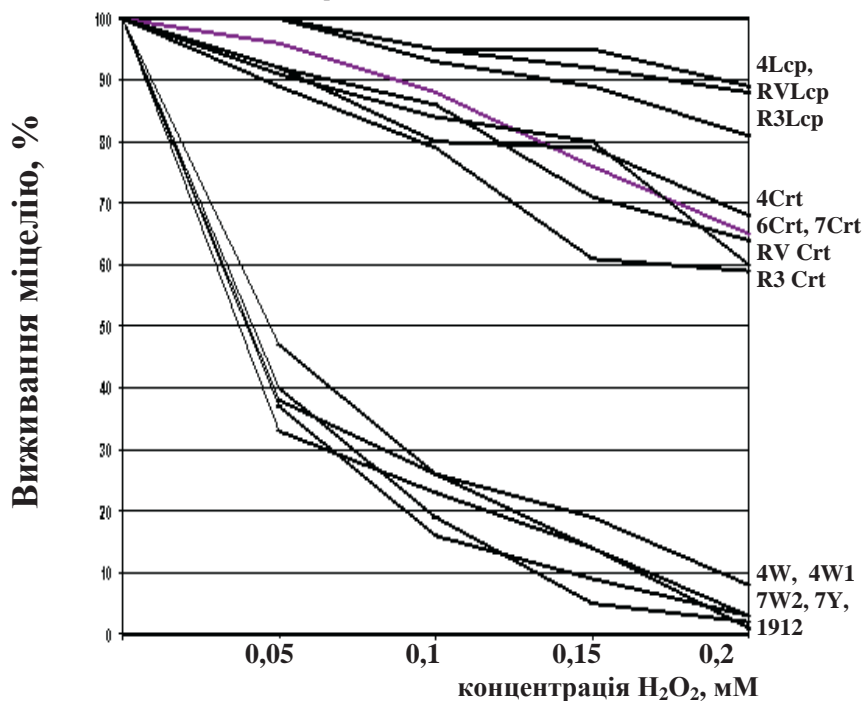


Рис. 2. Залежність виживання Crt^+ - і Crt^- мутантів від концентрації перексиду водню.

Набуття резистентності до дії пероксиду водню Crt^+ -мутантами і втрата цієї ознаки безпигментними мутантами може вказувати на особливу роль каротиноїдів у захисті клітини від активних форм кисню. Аналогічні результати були отримані у 2008 р. Provededі із співавторами на Sig F мутантах *Mycobacterium smegmatis*. Вказані мутанти втрачали здатність продукувати каротиноїди і, на відміну від вихідного штаму, здатного утворювати каротиноїди під впливом світлозалежного фактора Sig F, вони проявляли підвищену чутливість до пероксиду водню [15]. З іншої сторони, розділення Crt^+ -мутантів *S. globisporus* 1912 на резистентні до H_2O_2 і середнього рівня чутливості до цього агента добре узгоджується із кількістю спряжених подвійних зв'язків у молекулі того чи іншого каротиноїда: рожеві мутанти, які утворюють лікопін (в молекулі 11 спряжених подвійних зв'язків), резистентніші від червоних, які продукують лікопін і бета-каротин. Якщо останній проявляє слабшу антиоксидантну дію, маючи меншу кількість спряжених подвійних зв'язків, то сумарна дія цих двох каротиноїдів буде менш ефективна, ніж у мутантів Lcp, в яких превалює лікопін.

Отже, цілком закономірно, що лікопінові мутанти будуть завжди резистентнішими до пероксиду водню від лікопіно-бета-каротинових, а безпигментні відповідно за цією ознакою будуть подібними до вихідного Crt^+ -штаму 1912.

В. Я. Лавринчук, С. Л. Голембиовская, Б. П. Мацелюх

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

ДЕЙСТВИЕ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА МУТАНТЫ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912 С РАЗНОЙ КАРОТИНСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ

Резюме

В исследовании показана зависимость выживания Crt^+ - и Crt^- мутантов *Streptomyces globisporus* 1912 в условиях окислительного стресса, вызванного перекисью водорода, от уровня биосинтеза ликопина и бета-каротина – важных факторов антиоксидантной защиты. Розовые мутанты 4Lcp, RVLcp и R3Lcp, продуцирующие ликопин, резистентны к перекиси водорода. Мутанты красного цвета 4Crt, 6Crt, 7Crt, RVCrt, R3Crt, продуценты ликопина и бета-каротина, имеют средний уровень резистентности к H_2O_2 , а безпигментные мутанты 4W, 4W1, 7W2, 7Y, потерявшие способность к биосинтезу каротиноидов, сохранили уровень чувствительности к этому агенту характерный для исходного Crt^+ штамма 1912.

Ключевые слова: *Streptomyces globisporus* 1912, Crt^+ - и Crt^- мутанты, перекись водорода, резистентность.

V. Ya. Lavrinchuk, S. L. Golembiowska, B. P. Matselyukh

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

THE ACTION OF HYDROGEN PEROXIDE ON MUTANTS OF *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912 WITH DIFFERENT CAROTENE-SYNTHESIZING ACTIVITY

S u m m a r y

The paper deals with dependence of survival of Crt^+ - and Crt^- mutants of *Streptomyces globisporus* 1912 in conditions of oxidizing stress caused by hydrogen peroxide on the level of lycopene and beta-carotene biosynthesis. Pink mutants 4Lcp, RVLcp and R3Lcp, which produce lycopene, are the most resistant to hydrogen peroxide. Red mutants 4Crt, 6Crt, 7Crt, 7Y RVCrt, R3Crt – producers of lycopene and beta-carotene have the average level of resistance to H_2O_2 . Pigmentless mutants (Crt^-) 4W, 4W1, 7W2 and yellow one 7Y have preserved sensitivity to H_2O_2 characteristic of the initial strain 1912.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: *Streptomyces globisporus* 1912, Crt^+ - and Crt^- mutants, hydrogen peroxide, resistance.

The author's address: Lavrinchuk V.Ya., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Белозерская Т.А., Гесслер Н.Н., Аверьянов, Т.А. Окислительный стресс и дифференцировка у грибов. – Микология сегодня. – Т. 1. – М.: Национальная академия микологии, 2007. – С. 30–54.
2. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. – М: Мир, 1986. – 422с.
3. Гесслер Н.Н., Соколов А.В., Быховский В.Я., Белозерская Т.А. Активность супероксиддисмутазы и каталазы у каротинсинтезирующих грибов *Blakeslea trispora* и *Neurospora crassa* у условиях окислительного стресса // Прикл. биохим. и микробиол. – 2002. – **38**, № 3. – С. 237–242.
4. Гесслер Н.Н., Аверьянов А.А., Белозерская Т.А. Активные формы кислорода в регуляции развития грибов // Биохимия. – 2007. – **72**. №10. – С. 1342–1364.
5. Голембіовська С.Л., Лаврінчук В.Я., Мацелюх Б.П. Резистентність до летальної дії УФ – променів кольорових та білих мутантів *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. – 2008. – **70**, № 5. – С. 23–26
6. Голембіовська С.Л., Мацелюх Б.П. Продуктування каротину і лікопіну мутантами *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. – 2008. – **70**, № 4. – С. 45–50
7. Голембіовська С.Л., Мацелюх Б.П. Спонтанна та індукована мінливість ознаки біосинтезу каротиноїдів *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. – 2008. – **70**, № 6. – С. 18–23
8. Голембіовська С.Л., Остапчук А.М., Мацелюх Б.П. Біосинтез каротиноїдів представниками роду *Streptomyces* // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2009. – **6**. – С. 283–287
9. Козырицкая В.Е., Андреев Е.И. Синтез каротиноидов желтыми стрептомицетами // Acta Biotechnol. – 1984. – **4**, № 1. – С. 59–65.
10. Мацелюх Б.П. Лутченко В.А., Полищук Л.В. Синтез каротиноїдів мутантними штамми *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. – 2003. – **4**, № 6. – С. 24–30.
11. Armstrong G.A. Schmidt A., Sandmann G, Hearst J.E. Genetic and biochemical characterization of carotenoid biosynthesis mutants of *Rhodobacter capsulatus* // J. Biol. Chem. – 1990. – **265**, N 14. – P. 8329–8338
12. Cronin J.R. Lycopene: The powerful antioxidant that makes tomatoes red. // Altern. Complement Ther. – 2000. – **6**, N 2 – P.92–94.
13. Kohlmeier L., Kark J.D., Gomez-Gracia E. Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC study // Am. J. Epidemiol. – 1997. – **146**, N12 – P. 618–626.
14. Nguyen M.L., Schwartz S.J. Lycopene: Chemical and biological properties // Food Technol. – 1999. – **53**. – P. 38–45.
15. Provedri R. Kocincová V., Euphrasie D.D., Daffé Etienne M. G., Manganelli R., Reyat J.M. SigF controls carotenoid pigment production, affects transformation efficiency and hydrogen peroxide sensitivity in *Mycobacterium smegmatis* // J. Bacteriol. – 2008. – **10**, N 6 – P. 1128–1136.
16. Stahl W., Heinrich U., Jungmann H. Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans // Am. J. Clin. Nutr. – 2000. – **71**, N 3 – P. 795–798.
17. Takano H., Asker D., Beppu T., Ueda K. Genetic control for light – induced carotenoid production in non – phototrophic bacteria. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – **33**, N 6. – P. 88–93.

Отримано 17.05.2011