

Хархота М.А.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН
Украины, ул. Академика Заболотного 154, Киев, 03143, Украина

БИОСИНТЕЗ БАКТЕРИЯМИ РОДА *BACILLUS* ПОЛИ- γ -ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Обзор посвящен исследованиям закономерностей биосинтеза и возможности применения поли- γ -глутаминовой кислоты в различных отраслях промышленности. Показано, что бактерии рода *Bacillus* наиболее перспективные продуценты поли- γ -глутаминовой кислоты в промышленных условиях. Охарактеризовано строение и физиологическая роль поли- γ -глутаминовой кислоты для продуцентов. Обобщены закономерности биосинтеза исследуемого биополимера штаммами бактерий рода *Bacillus* при их глубинном культивировании. Показано влияние компонентов питательной среды и физико-химических условий выращивания на общий выход и молекулярный вес поли- γ -глутаминовой кислоты. Систематизирована и проанализирована информация о возможности применения поли- γ -глутаминовой кислоты в пищевой и косметической промышленности, для очистки сточных вод, создания нанобиокомпозитных материалов, в том числе медицинского назначения, создания вакцин и конъюгированных химиотерапевтических средств для лечения онкологических заболеваний.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, поли- γ -глутаминовая кислота, разработка лекарственных средств.

Полиглутаминовая кислота (ПГК) – анионный биополимер, мономерами которого является глутаминовая кислота. Впервые ПГК обнаружена в составе капсулы *Bacillus anthracis* более 70 лет назад русским ученым Ивановичем [1]. Синтез γ -ПГК у данного микроорганизма стимулировался повышением CO_2 в среде культивирования, а полимер состоял из поли- γ -D-глутаминовой кислоты (γ -D-ПГК). Однако из-за патогенных свойств вида промышленное производство было невозможным. Позже γ -ПГК была выделена из культуральной жидкости непатогенных представителей бактерий рода *Bacillus*, грамположительных кокков (*Staphylococcus epidermidis*), галофильных эубактерий (*Planococcus halophilus* и *Sporosarcina halophila*) [2] и архебактерий (*Natrialba aegyptiaca*) [3]. Кроме прокариот, γ -ПГК в значительных количествах содержится в нематоцистах *Cnidaria* (Табл. 1).

Таким образом, способность к синтезу γ -ПГК обнаружена у организмов различных систематических групп: грамположительных эубактерий, архей и многоклеточных организмов. Однако наиболее перспективными продуцентами считаются бактерии рода *Bacillus*. В отличие от *B. anthracis* непатогенные штаммы бацилл синтезируют γ -ПГК, состоящую из D- и L-глутаминовой кислоты. Сам полимер экскретируется в среду культивирования в поздней логарифмической и ранней стационарной фазе

развития культуры. Выделение из японских ферментированных соевых бобов большого количества штаммов *B. subtilis* – высокоэффективных продуцентов ПГК – стало важным шагом, открывающим перспективы использования бацилл для промышленного получения ПГК.

Таблица 1

Организмы, синтезирующие γ -ПГК

Продуцент	Изомерная композиция	Примечания	Источник
<i>B. anthracis</i>	D	γ -ПГК в составе капсулы, обеспечивает персистенцию патогена	[9]
<i>B. licheniformis</i>	D и L	Способность расти и синтезировать γ -ПГК в анаэробных условиях	[40]
<i>B. megaterium</i>	D и L	МВ и энантиомерный состав полимера значительно зависит от условий культивирования и состава питательной среды	[40]
<i>B. pumilus</i>			
<i>B. subtilis</i>			
<i>P. halophilus</i>	только D	Для синтеза γ -ПГК требуется высокое содержание соли	[9]
<i>S. halophila</i>	только D	–	[7]
<i>S. epidermidis</i>	D и L	Условно-патогенный микроорганизм	[7]
<i>N. aegyptiaca</i>	только L	Высокие питательные потребности продуцента	[3]
<i>Hydra</i>	не сообщается	Эукариотический организм, способный к синтезу внутриклеточной γ -ПГК	[2]

Примечания: «–» - данные отсутствуют

Штаммы *B. subtilis* и *B. licheniformis* – наиболее перспективны для промышленного получения γ -ПГК. Эти штаммы относятся к безопасным микроорганизмам (GRAS), технологичны в производстве, стабильны при хранении. Тогда как представители других непатогенных микроорганизмов (*N. aegyptiaca*), синтезирующие высокомолекулярную γ -L-ПГК (>1000 кДа), имеют очень высокие питательные потребности и сложные технологии культивирования. Другой «перспективный» для промышленного получения ПГК вид *Natronococcus occultus* синтезирует низкомолекулярную γ -L-ПГК (7,7 кДа), практическое применение которой ограничено.

Физиологическая роль γ -ПГК для продуцентов не совсем ясна. У патогенных микроорганизмов γ -ПГК входит в состав капсул, защищая их от иммунного ответа макроорганизма благодаря крайне слабой иммуногенности полимера. У сапрофитных микроорганизмов γ -ПГК выделяется во внеклеточное пространство и играет важную роль в процессе образования биопленок и адгезии к различным частицам. Почвенные бактерии (в основном бактерии рода *Bacillus*) используют γ -ПГК для защиты от катионов токсичных металлов и в качестве источника экзогенного глутамата для биосинтетических процессов. При росте некоторых алкалофильных штаммов *Bacillus* в щелочной среде γ -ПГК образует с глюкуроновой кислотой кислые полимеры, которые, вероятно, способствуют выживанию микроорганизмов в неблагоприятных для них условиях [4].

Галофильные бактерии *Planococcus halophilus*, *Sporosarcina halophila*

и *Natrialba aegyptica* используют γ -ПГК для локального уменьшения концентрации солей, что позволяет им выживать в экстремальных условиях. Эукариотические микроорганизмы – *Cnidaria* – используют γ -ПГК для обеспечения высвобождения конидий с нематоцист.

Поскольку γ -ПГК или продукты на ее основе перспективны для применения в различных областях промышленности, главные требования, предъявляемые к ним – безопасность и отсутствие токсического эффекта.

На модели клеточных культур В-клеток линии ЕНRV было показано отсутствие токсического влияния γ -ПГК в дозе 20 мг/л и лишь слабый токсический эффект при 100 мг/л. При введении лабораторным мышам γ -ПГК в количестве 1 мг/особь также отсутствовал токсический эффект. Всеми исследователями отмечалось отсутствие какого-либо иммуногенного эффекта γ -ПГК и каких-либо воспалительных реакций даже при многократных ее инъекциях.

Физико-химические свойства γ -ПГК. Согласно данным одних авторов γ -ПГК относится к полиаминокислотам, других – к псевдополиаминокислотам, состоящим из глутаминовых единиц [5]. Однако большинство ученых описывает ПГК как полиаминокислоту. В настоящее время известно о наличии в живой природе всего 3 типов полиаминокислот: поли- γ -глутаминовой кислоты (ПГК), поли- ϵ -лизина и цианофидина, две первые из них синтезируются бактериями рода *Bacillus* [6].

В отличие от белков, аминокислоты которых связаны между собой пептидной связью между α -аминогруппой и α -карбоксильной группой, в ПГК в образовании пептидной связи участвуют α -амино и γ -карбоксильные группы [7]. Благодаря таким особенностям ПГК устойчива к действию протеаз, которые действуют только на α -амидную связь, и способна образовывать окрашенные комплексы с метиленовым синим, а не с Coomassie Blue. В ПГК пептидная связь может быть гидролизована только под действием γ -глутамилтранспептидаз, которые довольно редко встречаются в природе. Поэтому ПГК характеризуется определенной устойчивостью к разложению микроорганизмами. Данное утверждение применимо только к ПГК, полученной биотехнологическим способом, поскольку химическим способом возможно получение только α -ПГК. Причины такого явления будут детально рассмотрены ниже.

Использование специфических меченых антител к γ -ПГК позволило предположить, что γ -ПГК в водных растворах принимает специфическую структурную конформацию. Согласно теоретической модели, построенной Zану и др., γ -ПГК в водном растворе имеет вид левосторонней спирали, стабилизированной внутримолекулярными водородными связями и состоящей из 10-20 глутаматных субъединиц [8]. Другие исследователи сообщают про гибкость конформации в зависимости от концентрации γ -ПГК и реакции среды [9].

Однако на практике молекулярный вес (МВ) γ -ПГК колеблется в широких пределах – 7 - 1000 кДа, конечные значения которого значительно зависят от продолжительности и условий культивирования продуцентов. Из всех физико-химических свойств МВ – ключевое свойство, определяющее возможность практического применения γ -ПГК.

Закономерности биосинтеза γ -ПГК. Как нами было показано выше, большинство бацилл экскретируют ПГК в среду культивирования и не используют ее для образования капсул. Эти штаммы наиболее перспективны с точки зрения промышленного использования. Глубинное культивирование продуцентов более выгодное, чем поверхностное, так как ПГК сначала синтезируется внутриклеточно, а только потом секретируется во внеклеточное пространство.

Образование γ -ПГК происходит нерибосомально в два этапа: на первом происходит синтез L- и D-глутаминовой кислоты, на втором – их полимеризация в γ -ПГК. Генетическая организация синтетического аппарата *B. anthracis* и других непатогенных бацилл различна [10]. У *B. anthracis* синтез γ -ПГК тесно связан с плазмидами pXO1 (180 kb) и pXO2 (95 kb). Определено 4 гена, обеспечивающих синтез γ -ПГК – *capB*, *capC*, *capA* и *capE* [11]. У *B. subtilis* и *B. licheniformis* обнаружено и идентифицировано 4 гена (*pgsB*, *pgsC*, *pgsAA*, и *pgsE*), которые объединены в оперон.

Обнаружено, что все штаммы бацилл-продуцентов ПГК относятся к двум большим группам: первая, глутамат-зависимые продуценты, требует экзогенного L-глутамата для синтеза ПГК. Вторая, которая не требует экзогенного глутамата – глутамат-независимые продуценты. Следует отметить, что первая группа продуцентов способна синтезировать небольшие количества γ -ПГК даже в отсутствии глутаминовой кислоты. Поэтому мы считаем, что более правильно разделять все продуценты по способности использовать экзогенную глутаминовую кислоту для синтеза биополимера. Необходимо учитывать, что закономерности синтеза γ -ПГК у глутамат-зависимых и глутамат-независимых штаммов отличаются. Кроме того, отмечены штаммоспецифические особенности видов *B. subtilis* и *B. licheniformis* [12].

Наиболее изучены закономерности биосинтеза ПГК глутамат-зависимыми штаммами бацилл (*B. anthracis*, *B. licheniformis* ATCC 9945A и *B. subtilis* МФО 3335). В целом схема биосинтеза γ -ПГК у глутамат-зависимых штаммов бацилл представлена на рис. 1.

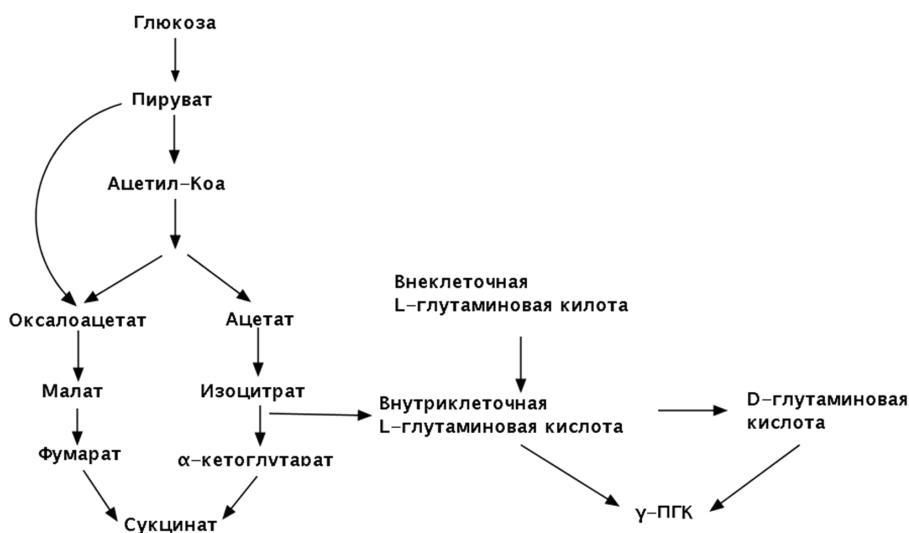


Рис. 1. Схема биосинтеза γ -ПГК у глутамат-зависимых штаммов бацилл.

L-глутаминовая кислота может служить и субстратом, и индуктором ферментов биосинтеза у γ -ПГК-синтезирующих штаммов. Лимонная кислота – важный компонент среды культивирования при получении γ -ПГК, поскольку может служить прекурсором L-глутаминовой кислоты, которая синтезируется в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) путем биохимического превращения изолимонной и α -кетоглутаровой кислоты [13].

Поскольку ЦТК играет ключевую роль в биосинтезе γ -ПГК, то очень важным является подбор источников углерода, обеспечивающих максимальный выход биополимера. Глюкоза и глицерол обеспечивают высокий синтез γ -ПГК у большинства штаммов бацилл. Однако необходимо отметить, что часто при выращивании на глюкозе ко-продуктами биосинтеза γ -ПГК являются полисахариды (фруктаны, леваны) [9]. Глицерол, напротив, способствует синтезу преимущественно γ -ПГК. Это явление объясняется стимулирующим эффектом глицерола на активность глутамилсинтетазы, которая катализирует полимеризацию глутаминовой кислоты в γ -ПГК. Однако при этом происходит уменьшение МВ γ -ПГК у штамма *B. subtilis* NX-2. Данное свойство глицерина можно использовать при регуляции МВ γ -ПГК у различных штаммов.

Использование ^{13}C -меченой глюкозы при культивировании глутамат-зависимых продуцентов γ -ПГК позволило определить, что глюкоза в первую очередь используется для роста и получения энергии при синтезе биополимера, а L-глутаминовая кислота – для его образования.

Оптимальным источником азотного питания для биосинтеза γ -ПГК является неорганический азот. На продукцию и стереохимический состав γ -ПГК также влияют катионы металлов [14]. Так, CaCl_2 и MnSO_4 существенно повышали выход γ -ПГК (на 11% по сравнению с контролем) [15, 16]. Показано, что указанные катионы металлов повышали активность ключевых ферментов биосинтеза γ -ПГК: изоцитратдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы и 2-оксоглутаратдегидрогеназного комплекса. Добавление 0,15 мкМ/л ионов Mn^{2+} приводило к максимальному накоплению биомассы продуцентов γ -ПГК, а дальнейшее увеличение концентрации катионов Mn^{2+} улучшало жизнеспособность клеток в поздней стационарной стадии, что приводило к повышению конечной концентрации биополимера. Также было отмечено изменение в энантиомерном составе полимера – при увеличении концентрации катионов Mn^{2+} от 0,154 мкМ/л до 2,46 мМ/л содержание D-глутаминовой кислоты в полимере увеличивалось с 38% до 86%.

Известно, что использование прекурсоров γ -ПГК позволяет значительно увеличить выход последней. Считается, что лимонная кислота наилучший предшественник данного полимера. Bajaj и Singhal было показано, что добавление 10 мМ α -кетоглутаровой кислоты в среду культивирования штамма *B. licheniformis* NCIM 2324 увеличивало продукцию γ -ПГК с 26 до 35 г/л. Имеются данные о положительном влиянии на синтез γ -ПГК аминокислот глутаматной группы (глутамина, аргинина, орнитина и пролина) и аминокислот, участвующих в процессах биосинтеза исследуемого полимера (аланин и аспарагиновая кислота). Использование веществ, повышающих проницаемость мембраны микробной клетки, позволило значительно увеличить выход γ -ПГК. Наиболее часто с этой целью используют глицерол, Твин-80 или ДМСО [17].

Кроме компонентного состава питательной среды на продукцию γ -ПГК значительно влияют физико-химические условия: длительность культивирования, оксигенация и скорость перемешивания среды [18]. Это связано с тем, что при биосинтезе полимера происходит резкое и значительное повышение вязкости среды, снижение уровня растворенного кислорода, что отрицательно влияет на эффективность биосинтеза γ -ПГК [19]. В связи с этим перспективным считается использование штаммов *B. licheniformis*, способных к росту в анаэробных условиях.

Применение γ -ПГК. Благодаря своей безопасности для животных и окружающей среды γ -ПГК нашла различное применение (табл.2).

Таблица 2

Сферы применения γ -ПГК

Отрасль	Сфера применения
Очистка воды	Очистка воды от тяжелых металлов и радионуклидов
	Заменитель полиакриламидов
Пищевая промышленность	Криопротектор для замораживания пищевых продуктов
	Кормовая добавка в животноводстве для улучшения минерального и аминокислотного обменов
	Загуститель и желирующий агент
Медицина	Повышение иммуногенности вакцин
	Создание конъюгированных химиопрепаратов для лечения онкологических и инфекционных заболеваний
	Создание перевязочных материалов и покрытий для раневых поверхностей
Косметология	Создание увлажняющих и питательных препаратов для кожи
Сельское хозяйство	Влагоудерживающие агенты для регионов с засушливым климатом
Другие отрасли	Создание биоразлагаемого пластика и упаковочных материалов

Известно, что для предотвращения утраты пищевыми продуктами внешнего вида и питательной ценности при их замораживании широко используются криопротекторы. Было показано, что натриевые соли пептидов, состоящие из кислых аминокислотных остатков, проявляют высокую антифризную активность [20]. Также следует отметить, что, в отличие от сахаридов, неорганических солей и аминокислот, ПГК не имеет вкуса и не изменяет вкусовые качества продуктов [21]. Кроме того, ПГК и/или ее олигопептиды улучшают биодоступность минералов, особенно катионов Ca^{2+} , что может использоваться при создании продуктов для лечения и профилактики остеопорозов.

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии Mitsuiki с соавт. были изучены антифризные свойства олиго- и поли- γ -глутаминовой

кислоты, синтезируемой штаммом *B. licheniformis* [22]. Результаты показали, что наибольшую активность проявляла ПГК с молекулярной массой ниже 20 кДа. Криопротекторные свойства незначительно зависели от оптической изомерии и типа пептидной связи.

Добавление γ -ПГК в хлебобулочные и макаронные изделия способствовало улучшению структуры и формы изделий. Имеются сообщения об использовании ПГК в качестве стабилизатора мороженого и загустителя фруктовых соков. Для этой цели лучше всего подходит высокомолекулярная γ -ПГК.

Добавления γ -ПГК в корм животным (домашний скот, птица, рыба) способствовало усвоению минералов, повышало прочность яичной скорлупы, уменьшало накопление жира в организме и потери фосфора животными с экскрементами.

Имеются сообщения о возможности использования этерифицированной γ -ПГК для создания биоразлагаемых волокон и пленок. Такие подходы позволят заменить широко используемые в настоящее время синтетические полимеры. Показано, что бензиловый эфир γ -ПГК чрезвычайно термопластичен и может быть использован для получения волокон или мембран с прочностью, прозрачностью и эластичностью, сопоставимой с широко используемыми искусственными пластиками [23].

Показана возможность создания на основе γ -ПГК гидрогелей с высокими влагопоглощающими свойствами. Это позволит создавать технологии контролируемого поглощения и/или высвобождения различных веществ, в том числе ферментов, медикаментов или катионов металлов. На основе γ -ПГК штамма *B. subtilis* IFO 3335 уже создан гидрогель, один объем которого способен поглотить 3500 объемов воды (!). Технологическая схема получения гидрогеля состоит в обработке 5% раствора γ -ПГК γ -излучением в дозе 20 кГр. Показано, что влагопоглощающая способность гидрогелей на основе γ -ПГК сильно зависит от pH раствора и концентрации γ -ПГК в нем [24].

Благодаря своей влагоудерживающей способности γ -ПГК может применяться в сельском хозяйстве [25] для увеличения количества доступной влаги для растений в районах с засушливым климатом, в косметологии для создания увлажняющих кремов и масок. Также возможно использование γ -ПГК в косметологии и пищевой промышленности в качестве диспергирующего вещества или матрикса для иммобилизации косметических средств [26].

В последнее время появились данные о возможности инкапсулирования пробиотических штаммов микроорганизмов с помощью γ -ПГК, что значительно повышает выживаемость последних при прохождении сквозь желудочно-кишечный тракт. Также на основе γ -ПГК и хитозана разработаны высокоэффективные перевязочные материалы с высокими влагопоглощающими и кровоостанавливающими свойствами.

В промышленности для очистки питьевой и сточных вод широко используют флокулянты, которые делятся на три большие группы: неорганические флокулянты, такие, как сульфат алюминия и полихлорид железа; органические синтетические (производные полиакриламида и полиэтиленimina); природные биофлокулянты (хитозан, альгинат и микробные флокулянты). В настоящее время благодаря своей дешевизне

и высокой эффективности широкое распространение получили синтетические флокулянты. Однако они практически не разрушаются в природе, а их мономеры проявляют высокие канцерогенные и нейротоксические свойства. Биофлокулянты этих недостатков лишены.

Среди всех разновидностей биофлокулянтов γ -ПГК и полиаминные флокулянты считаются наилучшими благодаря высокому уровню синтеза и высокой флокулирующей активности (ФА) по отношению к широкому спектру органических и неорганических веществ [27]. Так, γ -ПГК, синтезируемая *Bacillus* sp. PY-90, *B. subtilis* IFO 3335, *B. licheniformis* CCRC 12826, проявляет высокую флокулирующую активность. А γ -ПГК *Bacillus* sp. PY-90 в концентрации 20 мг/л проявляла максимальные значения ФА, которая увеличивалась в присутствии катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} и при кислых значениях pH среды (3,0 – 5,0). γ -ПГК штаммов *B. subtilis* IFO 3335, *B. licheniformis* CCRC 12826 проявляла ФА к различным неорганическим и органическим веществам, а также к клеткам микроорганизмов. Однако в сравнении с γ -ПГК штамма *Bacillus* sp. PY-90 pH оптимум ее ФА находился в нейтральных значениях.

γ -ПГК способна адсорбировать тяжелые металлы, что позволяет использование ее для очистки воды не только от механических взвесей, но и от тяжелых металлов [28]. Имеются сообщения о создании мембран для микрофильтрации с ковалентно связанной γ -ПГК, которая имела высокое сродство к катионам Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} и Al^{3+} . γ -ПГК штаммов бацилл, кроме высокой способности к адсорбции катионов Hg^{2+} , была способна к связыванию красителей (основные BB9 и BG4).

Довольно высокая стоимость полиаминных флокулянтов препятствует их широкому применению, поэтому актуален поиск продуцентов новых более рентабельных или более активных флокулянтов.

Интересным является использование γ -ПГК в качестве носителя лекарственных веществ, основы для создания перевязочных материалов и биоклеев [29 — 31]. Особенно перспективным считается создание на основе ПГК конъюгатов для лечения онкологических заболеваний, поскольку она является биосовместимой и биodeградебельной [33]. Свободные карбоксильные группы в боковых ответвлениях могут выступать в качестве точек связывания с лекарственными веществами, делая, таким образом, последние более растворимыми и легче транспортируемыми к целевым тканям. Комплекс γ -ПГК - лекарственное вещество может с легкостью попадать к местам локализации опухолей и высвобождать действующее вещество периодически с распадом полимера. Продукт распада последнего – глутаминовая кислота – может легко вступать в обычный метаболизм клеток и не оказывает токсической нагрузки на печень.

Комплексы γ -ПГК - лекарственное вещество имеют ряд преимуществ по сравнению с классическими химиопрепаратами: улучшение растворимости в воде препаратов, направленный транспорт веществ в ткани опухоли, увеличение времени действия препаратов с постепенным высвобождением действующего вещества [34]. Сводные данные о созданных комплексах γ -ПГК и химиопрепаратов представлены в табл. 3.

Так, уже создан и проходит клинические испытания конъюгат паклитаксела с γ -ПГК Xyotax (Paclitaxel Polyglumex, Opxio, CT2103, Cell Therapeutics, США). Накопление этого макромолекулярного комплекса

в опухолевой ткани обусловлено EPR-эффектом (Enhanced permeability and retention effect, EPR-эффект). Механизмом, обуславливающим тропность коллоидных частиц к опухолевой ткани, считают так называемый эффект повышенной проницаемости кровеносных капилляров. В норме частицы с МВ 30–60 кДа не могут проникать сквозь стенки капилляров. Однако при наличии некоторых патологических состояний (воспалительные, инфекционные и опухолевые процессы) проницаемость сосудов увеличивается и конъюгаты γ -ПГК с химиопрепаратами могут избирательно накапливаться в патологических тканях.

Кроме наличия EPR-эффекта эффективность конъюгатов на основе γ -ПГК обеспечивается внутриклеточным транспортом в опухолевую клетку – эффективным эндоцитозом «в обход» *p*-гликопротеина. В силу высокой молекулярной массы (40–50 кДа) комплекс не элиминирован почками и длительно циркулирует в кровотоке, причем большая часть паклитаксела находится в конъюгированной форме (в условиях *in vitro* в течение суток высвободилось только 14% паклитаксела). Связанная форма не обладает цитостатической активностью и противоопухолевый эффект проявляется по мере протеолитического гидролиза полиглутаминовой кислоты с образованием свободного паклитаксела непосредственно в опухолевой клетке. Накопление паклитаксела в опухолевой ткани животных с меланомой B16 было на порядок выше при введении конъюгированного паклитаксела по сравнению со свободным. Конъюгированная форма была более эффективна и в лечении ряда экспериментальных моделей опухолевых заболеваний (табл. 3). Полиглутаминовая кислота водорастворима и поэтому инфузионное введение Хуотак занимает не более 10–20 мин. Препарат находится в 3 фазе клинических испытаний для лечения рака легких и рака яичников.

Представленные результаты свидетельствуют о возможности создания эффективных конъюгатов γ -ПГК с химиопрепаратами, отличающимися по своей химической природе и механизмом действия. Как нами ранее уже отмечалось, молекулярный вес определяет сферу применения ПГК, поэтому эффективные комплексы могут создаваться только с ПГК, молекулярный вес которой не превышает 60 кДа. Очень часто созданные конъюгаты γ -ПГК и химиопрепараты в опытах *in vitro* менее эффективны по сравнению с исходным веществом, но более активны в опытах *in vivo*, что объясняется повышенной тропностью конъюгатов к опухолевой ткани [36 - 37].

При проведении некоторых типов операций (операции на легких или торакальной полости) используются вещества для дополнительной герметизации хирургических швов. С этой целью применяются препараты на основе фибрина, фибриногена или протромбина, что значительно увеличивает риск развития вирусных инфекций (СПИД, гепатит), а также препараты на основе синтетических или полусинтетических веществ, например, форполимеров цианакрилатов или уританов. Однако последние часто оказывают цитотоксический эффект, обладают низкой разлагаемостью, а продукты их деградации вызывают воспалительные процессы в тканях с которыми они контактируют. Перспективным считается использование биоклеев на основе композиций γ -ПГК с желатином или карбоимидом, которые характеризуются более высокой адгезив-

Таблица 3

Конъюгированные препараты на основе γ -ППК и веществ с противоопухолевой активностью

Вещество	Механизм действия	Тип связи в конъюгате	Активность <i>in vitro</i>	Активность <i>in vivo</i>	Источ- ник
1	2	3	4	5	6
Доксорубин	Интеркаляция в ДНК	Амидные	Менее активны, чем исходное вещество в отношении клеток лейкемии (L1210) и меланомы (B16)	Комплекс γ -ППК-доксорубин неактивен	[41, 42]
		Олигопептидными мостиками	Менее активны, чем исходное вещество в отношении клеток лейкемии (L1210) и меланомы (B16)	Комплекс γ -ППК - олигопептид -доксорубин проявлял активность на уровне исходного вещества	[32]
		Эстерная	Данные отсутствуют	Комплекс активен по отношению к лейкозу, активность увеличивается с увеличением МВ комплекса	[43]
Даунорубин	Интеркаляция в ДНК	Гидразон	В отношении линий клеток Υ ас лейкемии, комплекс менее активен, чем исходное вещество	Комплекс более активен, чем исходное вещество	[44]
Ага-С	Антиметаболиты	Амидная, в N4 или C5 положении амино-алкил-формил боковой цепи Ара-С	Менее активны, чем исходное вещество	Конъюгат, образованный в N4-положении, более активен, чем исходное вещество	[45]
Мелфалан	Ковалентная сшивка ДНК	Амидная	Конъюгат менее активен, чем исходное вещество	Конъюгат более активен, чем исходное вещество (модель саркомы Yoshida)	[36]
Митоминин С	Ковалентная сшивка ДНК	Амидная	Конъюгат менее активен, чем исходное вещество	Конъюгат более активен, чем исходное вещество (модель лейкемии P388)	[37]
Паклитаксел	Нарушение сборки микротрубочек	Эстерная	Конъюгат менее активен, чем исходное вещество	Конъюгат более активен, чем исходное вещество. Проводятся клинические испытания препарата	[35]

ной активностью по сравнению с препаратами на основе фибрина [38].

γ -ПГК может быть использована для улучшения существующих или создания новых средств для ухода за кожей в качестве увлажнителя, эксфолианта или средства борьбы с морщинами. Химические свойства γ -ПГК позволяют ей гомогенно смешиваться с большинством компонентов кремов и быть химически стабильной. Также γ -ПГК может образовывать на поверхности кожи гладкую, эластичную, мягкую пленку. Последняя является прекрасным увлажняющим агентом и может повышать продукцию естественных факторов увлажнения: пироглутаминовой, молочной и урокановой кислот. γ -ПГК способна ингибировать активность гиалуронидазы, которая вызывает деградацию гиалуроновой кислоты (компонента соединительной ткани кожи), таким образом поддерживая эластичность кожи.

Микроскопическое исследование гидрогеля γ -ПГК показало, что последний имеет мультитягучую структуру. Это позволяет ему абсорбировать в 5000 раз больше влаги, чем его собственная масса. Количество влаги, которое может удерживаться полимером, зависит от уровня pH и солевого состава гидрогеля.

Это позволяет косметологам повышать увлажняющую способность средств для волос или кожи, добавляя определенное количество электролитов и регулируя уровень pH. Выделение влаги является очень важным для таких средств, как маски для лица, которые должны увлажнять кожу и уменьшать возникновение морщин.

Использование γ -ПГК повышает устойчивость волос к обесцвечиванию путем повышения их водоудерживающей способности и уменьшает отрицательное воздействия средств для окраски волос, формируя на поверхности волос барьер [39].

Таким образом, данные литературы свидетельствуют, что γ -ПГК – биополимер, который, благодаря своим физико-химическим и биологическим свойствам, может быть использован в медицине, ветеринарии, производстве упаковочных материалов, очистке воды, сельскохозяйственном растениеводстве, животноводстве, косметологии. Наиболее перспективными для промышленного получения γ -ПГК являются бактерии рода *Bacillus* благодаря своей технологичности и высокому уровню синтеза конечного продукта.

Хархота М.А

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

БІОСИНТЕЗ БАКТЕРІЯМИ РОДУ *BACILLUS* ПОЛІ- γ - ГЛУТАМІНОВОЇ КИСЛОТИ ТА ЇЇ БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

Резюме

Огляд присвячений останнім дослідженням закономірностей біосинтезу та можливості застосування полі- γ -глутамінової кислоти в різних галузях народного господарства. Показано, що бактерії роду *Bacillus* найбільш перспективні продуценти полі- γ -глутамінової кислоти в промислових умовах. Охарактеризовано будову і фізіологічну роль полі- γ -глутамінової кислоти для продуцентів. Узагальнено закономірності біосинтезу досліджуваного біополімеру штамами бактерій роду *Bacillus* за їх глибинного культивування. Показано вплив компонентів живильного середовища і фізико-хімічних умов вирощування на загальний вихід і молекулярну вагу полі- γ -глутамінової кислоти. Систематизована та проаналізована інформація щодо можливості застосування полі- γ -глутамінової кислоти в харчовій і косметичній промисловості, для очищення стічних вод, створення нанобіокompозитних матеріалів, в тому числі медичного призначення, створення вакцин і кон'югованих хіміотерапевтичних засобів для лікування онкологічних захворювань.

Ключові слова: бактерії роду *Bacillus*, полі- γ -глутамінова кислота, розробка лікарських засобів.

Kharkhota M.A.

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine,
154 Zabolotnogo str., Kyiv, 03143, Ukraine*

BIOLOGICAL ACTIVITY AND BIOSYNTHESIS OF POLY - γ - GLUTAMIC ACID BY BACTERIA OF *BACILLUS* GENUS

Summary

This review focuses on the studies of biosynthesis and application of poly- γ -glutamic acid in industries. It was characterized the structure and physiological role of poly- γ -glutamic acid for producers. It was summarized the behaviour of biosynthesis of the biopolymer of studied *Bacillus* strains at their submerged cultivation. It was shown the influence of components of nutrient medium and physic-chemical conditions of cultivation on yield of poly- γ -glutamic acid and its molecular weight. It was summarized information on the possibility of applying poly- γ -glutamic acid in food and cosmetic industries, for sewage treatment, creating nanobiocomposite materials, including medical devices, vaccines and conjugated chemotherapeutic agents for the treatment of cancer.

Keywords: bacteria of the *Bacillus* genus, poly- γ -glutamic acid, drug development.

1. Ivanovics G., Bruckner V. et al. Chemical and immuno-logical studies on the mechanism of infection and immunity in anthrax. The chemical structure of the capsular substance of *B. anthracis* and of the serologically identical substance in *B. mesentericus*. Z Immun exp ther. 1937; 90: 304—18.
2. Ashiuchi, M., Misono H. Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis. Appl Microbiol Biotechnol. 2002; 1: 9 – 14.
3. Hezayen, F. F., Rehm B.H, Tindall B.J. Transfer of *Natrialba asiatica* b1t to *Natrialba taiwanensis* sp. Nov. and description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, non-pigmented member of the archaea from egypt that produces extracellular poly (glutamic acid). Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 3: 1133 – 1142.
4. Rikizo Aono. Characterization of cell wall components of the alkalophilic *Bacillus* strain C-125: identification of a polymer composed of polyglutamate and polyglucuronate. Microbiology. 1989; 135: 265—271.
5. Oppermann-Sanio F.B., Steinbüchel A. Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. Naturwissenschaften. 2002; 89: 11—22.
6. Kunioka, M. Biosynthesis and chemical reactions of poly (amino acid) s from microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol. 1997; 5: 469 – 475.
7. Candela T., Fouet A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. Molecular microbiology. 2006; 5: 1091– 1098.
8. Zanuy D., Alem'an C., Muñoz-Guerra S. On the helical conformation of unionized poly (γ -D-glutamic acid). Int J Biol Macromol. 1998; 23: 175—184.
9. Najar I., Das S. Poly-glutamic acid (pga)-structure, synthesis, genomic organization and its application: a review. Int J Pharm Sci Res. 2015; 6: 2258.
10. Wei Zhang, Yulian He, Weixia Gao et al. Deletion of genes involved in glutamate metabolism to improve poly-gamma-glutamic acid production in *B. amyloliquefaciens* Il3. J Ind microbiology & biotechnology. 2015; 2: 297–305.
11. Candela T., Mock M., Fouet A. Cape, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. J. Bacteriol. 2005; 22: 7765– 7772.
12. Mitsunaga H., Meissner L., Palmen T. et al. Metabolome analysis reveals the effect of carbon catabolite control on the poly (γ -glutamic acid) biosynthesis of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. J Biosci Bioeng. 2016; 121(4): 413–419.
13. Wilming A., Begemann J., Kuhne S. et al. Metabolic studies of γ -polyglutamic acid production in *Bacillus licheniformis* by small-scale continuous cultivations. Biochemical engineering j. 2013; 73: 29–37.
14. Qun Wu, Hong Xu, Lin Xu, Pingkai Ouyang. Biosynthesis of poly (γ -glutamic acid) in *Bacillus subtilis* NX-2: regulation of stereochemical composition of poly (γ -glutamic acid). Process Biochem. 2006; 7: 1650–1655.
15. Yonghong Meng, Guiru Dong, Chen Zhang et al. Calcium regulates glutamate dehydrogenase and poly- γ -glutamic acid synthesis in *Bacillus natto*. Biotechnology letters. 2015: 1–7.
16. Baiqi Huang, Peiyong Qin, Zhiwen Xu et al. Effects of CaCl_2 on viscosity of culture broth, and on activities of enzymes around the 2-oxoglutarate branch, in *Bacillus subtilis* ATCC 2108 producing poly-(γ -glutamic acid). Bioresource technology. 2011; 3: 3595–3598.

17. Qun Wu, Hong Xu, Jinfeng Liang, Jun Yao. Contribution of glycerol on production of poly (γ -glutamic acid) in *Bacillus subtilis* NX-2. Appl Biochem Biotechnol. 2010; 2: 386–392.
18. Bajaj I.B., Singhal R.S. Effect of aeration and agitation on synthesis of poly (γ -glutamic acid) in batch cultures of *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. Biotechnol Bioprocess Engin. 2010; 4: 635–640.
19. Dan Zhang, Xiaohai Feng, Sha Li et al. Effects of oxygen vectors on the synthesis and molecular weight of poly (γ - glutamic acid) and the metabolic characterization of *Bacillus subtilis* NX-2. Process Biochemistry. 2012; 12: 2103–2109.
20. Shih, L., Yi-Tsong Van, Yi-Yuan Sau. Antifreeze activities of poly (γ -glutamic acid) produced by *Bacillus licheniformis*. Biotechnology letters. 2003; 20: 1709–1712.
21. Shyu, Y.-S., Hwang J.Y., Hsu C.-K. Improving the rheological and thermal properties of wheat dough by the addition of γ -polyglutamic acid. LWT-food science and technology. 2008; 6: 982–987.
22. Mitsuiki M. et all. Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of oligo-and poly (glutamic acid) s. J Agric Food Chem. 1998; 3: 891—895.
23. Kubota, H., Nambu Y., Endo T. Convenient and quantitative esterification of poly (γ -glutamic acid) produced by microorganism. J Polymer Science Part A: Polymer Chemistry. 1993; 11: 2877–2878.
24. Kunioka M. Biodegradable water absorbent synthesized from bacterial poly (amino acid) s. Macromolecular bioscience. 2004; 3: 324–329.
25. Zongqi Xu, Peng Lei, Xiaohai Feng et al. Effect of poly (γ -glutamic acid) on microbial community and nitrogen pools of soil. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science. 2013; 8: 657–668.
26. Bajaj I., Singhal R. Poly (glutamic acid)—an emerging biopolymer of commercial interest. Bioresour Technol. 2011; 10: 5551–5561.
27. Jane-Yii Wu, Hsiu-Feng Ye. Characterization and flocculating properties of an extracellular biopolymer produced from a *Bacillus subtilis* DYU1 isolate. Process Biochemistry. 2007; 7: 1114– 1123.
28. Chunhachart O., Kotabin N., Yadee N. et al. Effect of lead and γ -polyglutamic acid produced from *Bacillus subtilis* on growth of *Brassica chinensis*. APCBEE Procedia. 2014; 10: 269–274.
29. Ching Ting Tsao, Chih Hao Chang, Yu Yung Lin et al. Evaluation of chitosan/ γ -poly (glutamic acid) polyelectrolyte complex for wound dressing materials. Carbohydr Polym. 2011; 2: 812–819.
30. Lalatsa A., Schätzlein A. G., Mazza M. et al. Amphiphilic poly (l-amino acids) – new materials for drug delivery. J Control Release. 2012; 2: 523–536.
31. Manocha, B., Margaritis A. Production and characterization of γ -polyglutamic acid nanoparticles for controlled anticancer drug release. Crit Rev Biotechnol. 2008; 2: 83–99.
32. Dutta, S., Ray S., Nagarajan K. Glutamic acid as anticancer agent: An overview. Saudi Pharmaceutical J. 2013; 4: 337–343.
33. Xiaoguang Liu, Shishuai Su, Fengxiang Wei et al. Construction of nanoparticles based on amphiphilic copolymers of poly (γ -glutamic acid co-l-lactide)-1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine as a potential drug delivery carrier. J Colloid Interface Sci. 2014; 413: 54–64.

34. *Haihua Xiao, Ruogu Qi, Shi Liu et al.* Biodegradable polymer- cisplatin (iv) conjugate as a pro-drug of cisplatin (ii). *Biomaterials*. 2011; 30: 7732–7739.
35. *Huanli Sun, Ru Cheng, Chao Deng et al.* Enzymatically and reductively degradable α -amino acid-based poly (ester amide) s: synthesis, cell compatibility, and intracellular anticancer drug delivery. *Biomacromolecules*. 2015; 2: 597–605.
36. *Yasunori Morimoto, Kenji Sugibayashi, Satoshi Sugihara et al.* Antitumor agent poly (amino acid) conjugates as a drug carrier in cancer chemotherapy. *J Pharmacobiodyn*. 1984; 9: 688– 698.
37. *CF Roos, Matsumoto Satoshi, Takakura Yoshinobu et al.* Physicochemical and antitumor characteristics of some polyamino acid prodrugs of mitomycin c. *Int J Pharm*. 1984; 1: 75–87.
38. *Richard A., Margaritis A.* Poly (glutamic acid) for biomedical applications. *Critical reviews in biotechnology*. 2001; 4: 219–232.
39. *Choi J. C., Lee C. H.* In vivo hair growth promotion effects of ultra-high molecular weight poly- γ -glutamic acid from *Bacillus subtilis* (*chungkookjang*). *J Microbiol Biotechnol*. 2015; 3: 407–412.
40. *Kambourova M., Tangney M., Priest F. G.* Regulation of polyglutamic acid synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 2: 1004–1007.
41. *Hoes C., Potman W., Heeswijk V.* Optimization of macromolecular prodrugs of the antitumor antibiotic Adriamycin. *Journal of Controlled Release*. 1985; 2: 205–213.
42. *Hoes C., Grooten J., Duncan R.* Biological properties of adriamycin bound to biodegradable polymeric carriers. *Journal of controlled release*. 1993; 1: 37–53.
43. *Zunino F., Pratesi G., Micheloni A.* Poly (carboxylic acid) polymers as carriers for anthracyclines. *Journal of controlled release*. 1989; 1: 65–73.
44. *Hurwitz E., Wilchek M., Pitha J.* Soluble macromolecules as carriers for daunorubicin. *J Appl Biochem*. 1980; 2: 25–35.
45. *Yoshinori Kato, Masahiko Saito, Hisashi Fukushima et al.* Antitumor activity of 1- β -d-arabinofuranosylecytosine conjugated with polyglutamic acid and its derivative. *Cancer research*. 1984; 1: 25–30.

Отримано 5.12.2016