

МІКРОБНІ ГЛІКОПОЛІМЕРИ: БУДОВА, ФУНКЦІОНАЛЬНА ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

Л.Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail: varbanets_imv@ukr.net

У відділі біохімії мікроорганізмів дослідження розвиваються за двома напрямками: 1) ліпополісахариди представників *Enterobacteriaceae*: *Rahnella aquatilis*, *Pragia fontium*, *Budviviva aquatica*, *Pantoea agglomerans*, *Escherichia coli*, їх хімічна ідентифікація, структурні дослідження, функціональна та біологічна активність; 2) ферменти гліколітичної (α -L-рамнозидаза, α -галактозидаза, α -амілаза) і протеолітичної (пептидази) дії у *Cryptococcus albidus*, *Eupenicillium erubescens*, *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus oryzae*, *Yarrowia lipolytica*, представників роду *Bacillus*. Вперше описані структури O-специфічних полісахаридів (ОПС) *R. aquatilis*, *P. fontium* і *B. aquatica*, які побудовані з ланцюгів, що представлені лінійними або розгалуженими три-, тетра-, пента- та гексасахаридами. ОПС ряду штамів є гетерогенними і містять по два типи олігосахаридів, які відрізняються структурою. Більшість ОПС досліджених штамів представлені гетерополісахаридами, в той час як одного штаму *R. aquatilis* 3-95 – гомополісахаридами манози або глюкози. Серологічними методами показана імунохімічна гетерогенність видів *P. fontium*, *R. aquatilis* і *B. aquatica*. Дослідження O-антигена *E. coli* L-19 показало, що він характеризується унікальною структурою ОПС, не споріднений ні з одним із охарактеризованих на сьогодні клонів *E. coli* і є представником нової, ще не описаної в літературі, серогрупи. З використанням інгібіторного аналізу каталітичної реакції групоспецифічними хімічними реагентами та іонами металів встановлено деякі функціональні групи, що приймають участь у каталізі. Так, встановлено, що штаму *B. thuringiensis* IMB B-7324 синтезує пептидазу з еластолітичною і фібринолітичною активністю, яка є сериноювою лужною пептидазою. Аналіз кінетичних кривих залежності швидкості α -галактозидазної та α -L-рамнозидазної активності від величини рН дозволив знайти значення констант іонізації груп, які включаються у ферментативний каталіз, і показати, що в активному центрі α -галактозидаз трьох продуцентів *A. niger*, *P. canescens*, *C. cladosporioides*, а також α -L-рамнозидази *C. albidus* і *E. erubescens* присутні дві групи, які іонізуються і відповідають карбоксильній групі C-кінцевої кислоти та імідазольній групі гістидину. Наявність імідазольної групи була підтверджена також специфічною реакцією – фотоокисненням в присутності метиленового синього. Розрахована величина теплоти іонізації відповідає теплоті іонізації імідазольної групи. Показана важлива роль вуглеводної складової досліджуваних глікозидаз у формуванні олігомерної структури, в секреції, стійкості до дії високих температур та інших факторів агресивного середовища, а також до протеолізу. Дослідження субстратної специфічності ферментів дають можливість прогнозувати їх майбутнє практичне використання.

Ключові слова: ліпополісахарид, протеази, α -галактозидаза, α -амілаза, α -L-рамнозидаза, мікробні продуценти.

В 1928 році в Академії наук України був створений Інститут мікробіології і епідеміології. Його першим директором було призначено Данила Кириловича Заболотного, який запропонував створити два відділи: медичної мікробіології і епідеміології та загальної і ґрунтової мікробіології. Вже восени 1932 року був організований відділ біохімії мікроорганізмів, тобто він відноситься до одного із старіших відділів інституту. До 1951 року відділом керували Б.І. Каган, Е.М. Кондратьєв, Е.Т. Сорені. В 1951 році для керівництва була запрошена О.Я. Рашба – доктор медичних наук, професор, яка керувала відділом до 1973 року, а з 1975 по 1996 р. відділ очолювала І.Я. Захарова – доктор біологічних наук, професор. О.Я. Рашба і І.Я. Захарова були не тільки талановитими вченими, але й прекрасними організаторами науки. Започатковані ними напрямки, присвячені дослідженням глікополімерів мікроорганізмів, і зараз розвиваються у відділі під керівництвом доктора біологічних наук, професора Л.Д. Варбанець.

На сьогодні у вивченні глікополімерів є декілька пріоритетних напрямків, в епіцентрі одного з них знаходяться ліпополісахариди грамнегативних бактерій, другого – мікробні глікополімери з активністю ферментів, вуглеводна складова яких відіграє важливу роль у формуванні олігомерної структури, в секреції, стійкості до дії високих температур та інших факторів агресивного середовища, а також до протеолізу. В останні 10 років дослідження у відділі проводились за цими двома напрямками, а саме: вивчали ліпополісахариди представників *Enterobacteriaceae*: *Rahnella aquatilis*, *Pragia fontium*, *Budvivia aquatica*, *Pantoea agglomerans*, *Escherichia coli*, їх хімічну ідентифікацію, структурні дослідження, функціональну та біологічну активність, а також ферменти гліколітичної (α -L-рамнозидаза, α -галактозидаза, α -амілаза) і протеолітичної (пептидази) дії у *Cryptococcus albidus*, *Eupenicillium erubescens*, *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus oryzae*, *Yarrowia lipolytica*, представників роду *Bacillus*.

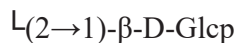
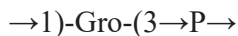
Незважаючи на те, що ліпополісахариди (ендотоксини) були відкриті більш, ніж 100 років тому, вони і на сьогодні представляють собою надзвичайно загадкову макромолекулу, структура і біологічна активність якої широко досліджується вченими різних спеціальностей. Вони, як ніякі інші біополімери клітини, є надзвичайно поліфункціональними: виконують загальну біологічну захисну функцію, беруть участь в адгезії клітин, володіють мітогенною активністю, протипухлинною дією, є маркерами при ідентифікації штамів бактерій. Проявляючи антигенну активність, вони є компонентами біологічного пізнання, носіями специфічної інформації, яка визначає взаємовідносини бактерій з макро- і мікроорганізмами. Одним із механізмів, який визначає такі різноманітні властивості, є гетерогенність як самої молекули ліпополісахариду, так і наявність в бактеріальній клітині декількох ліпополісахаридів, які різняться складом, структурою та функціями. Дослідження ліпополісахаридів мають метою вирішення таких фундаментальних питань, як класифікація бактерій, визначення взаємозв'язків між структурою і функцією ліпополісахаридів, механізмів імунної відповіді, створення серологічних класифікаційних схем, молекулярною основою яких є варіації в структурі їх O-специфічних ланцюгів.

До недавнього часу механізми біологічної дії ЛПС були досліджені вкрай обмежено. Але відкриття Брюсом Бетлером в 1998 році у мишей рецептора для ЛПС – Толл-подібний рецептор (TLR4), за яке йому разом з двома іншими вченими в 2011 р. було присуджено Нобелівську премію в галузі медицини і фізіології, сприяло широкомасштабним дослідженням щодо встановлення механізмів біологічної дії ЛПС. Сучасними дослідженнями, крім TLR4, встановлено ще ряд специфічних для ЛПС рецепторів (рСД14, мСД14) на поверхні клітин імунної системи, а також білків крові (ліпополісахаридзв'язуючий білок, ЛЗБ), які дозволяють розпізнавати незначні відмінності в структурі ЛПС і формувати оптимальну відповідь організму. Ймовірно, що біологічна активність ЛПС визначається її структурою. Аналізу складу ЛПС із різних джерел присвячено багато робіт. Сучасні біохімічні та біофізичні дослідження дозволили охарактеризувати нові структури ЛПС у представників різних родів і видів бактерій. Значний вклад в ці дослідження внесли Здоровенко Г.М. та Варбанець Л.Д., які вивчали ЛПС двох таких гетерогенних видів фітопатогенних бактерій, як *Pseudomonas syringae* та *Ralstonia solanacearum*, за результатами яких було захищено декілька кандидатських дисертацій (Москаленко Н.В., Вінарська Н.В.). Але найбільш масштабні дослідження в світі на сьогодні проведено на представниках родини *Enterobacteriaceae*, в яких брали участь і співробітники відділу біохімії мікроорганізмів. Так, нами вперше виділені і на молекулярному рівні охарактеризовані ЛПС представників *Pragia fontium* (Шубчинський В.В.), *Rahnella aquatilis* (Остапчук А.М., Скоклюк Л.Б.), *Budvicia aquatica* (Броварська О.С.), а також *E. coli* (Броварська О.С.). Встановлено, що жирнокислотний склад ліпідів А ЛПС всіх досліджених штамів виявився подібним і представлений тільки однією диференціюючою 3-оксикислотою - 3-окситетрадеканою. Оскільки відомо, що для ентеробактерій характерна присутність в ліпіді А тільки однієї 3-оксикислоти - 3-окситетрадеканої, одержані дані є додатковим показником, який підтверджує правильність віднесення досліджених штамів до ентеробактерій.

Раніше нами було показано, що досліджувані ЛПС є індукторами утворення ряду цитокінів: гама-інтерферону, інтерлейкінів, фактору некрозу пухлин, а також здатні проявляти антиметастатичну, антилейкозну дію. Але їх впровадження в медичну практику гальмувалось такими їх властивостями, як токсичність і пірогенність. Вивчення токсичності і пірогенності ЛПС *P. fontium*, *R. aquatilis*, *B. aquatica* свідчить про те, що вони менш токсичні, ніж ЛПС ряду штамів *E. coli*, однак деякі з них більш пірогенні, ніж фармацевтичний препарат пірогенал.

При спільній роботі із вченими Інституту органічної хімії ім. Н.Д. Зелінського РАН нами встановлено структури О-специфічних полісахаридів ЛПС багатьох штамів бактерій. Зокрема, в останні роки вперше описані структури О-специфічних полісахаридів (ОПС) *R. aquatilis*, *P. fontium* і *B. aquatica*, які побудовані з ланцюгів, що представлені лінійними або розгалуженими три-, тетра-, пента- та гексасахаридами (таблиця). ОПС ряду штамів є гетерогенними і містять по два типи олігосахаридів, які відрізняються структурою. Більшість ОПС досліджених штамів представлені гетерополісахаридами, в той час як одного штаму *R. aquatilis* 3-95 – гомополісахаридами манози або глюкози.

Структура ОПС ЛПС одного із штамів *B. aquatica* 97U124 представлена гліцеринтейхоєвою кислотою, в якій до другого атому вуглецю приєднана β -D-глюкопіраноза:

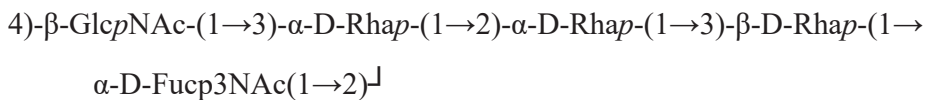


Структури ОПС різних штамів *E. coli* на сьогодні дуже добре вивчені. Разом з тим дослідження двох штамів *E. coli*: М-17 (який входить до складу препаратів пробіотиків «Біфікол» та «Колібактерин») з Української колекції мікроорганізмів і штаму L-19, ізолюваного від здорового пацієнта, показали, що структури їх ОПС на сьогодні не встановлені. Порівняльне вивчення ЯМР-спектрів ОПС *E. coli* М-17 з результатами бази даних всіх відомих структур дозволило встановити, що вона

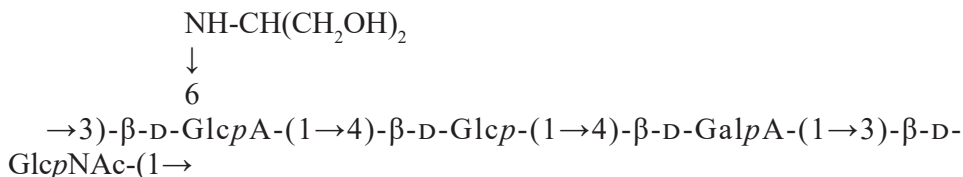
Таблиця
Структури ОПС *R. aquatilis*, *P. fontium*, *B. aquatica*

Штам	Структура ОПС <i>R. aquatilis</i>
33071 типовий 95U003 95U004 3-88	$4\alpha\text{Rha-}3\alpha\text{Rha-}3\beta\text{Man}$ $\text{---}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-d-Galp1-(1}\rightarrow 3)\alpha\text{-d-Manp}^{\parallel}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-d-Manp}^{\parallel}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-d-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-d-Galp}^{\parallel}\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-d-GlcpA}$
2-87	$\text{---}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-d-Galp1-(1}\rightarrow 3)\alpha\text{-d-Manp}^{\parallel}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-d-Manp}^{\parallel}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-d-Glcp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-d-Galp}^{\parallel}\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-d-GlcpA}$ $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 2)$ $\text{---}\rightarrow 3)\alpha\text{-D-Fucp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{GalF-(1}\rightarrow 3)$
1-95 = 2-95	$\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 2)$ $\text{---}\rightarrow 3)\alpha\text{-D-Fucp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{GalF-(1}\rightarrow 3)$
3-95	$\text{---}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-Man(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-Man-(1}\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Glc-(1}\rightarrow 2)$ $\text{---}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-Glc-(1}\rightarrow 2)$
Структури ОПС <i>P. fontium</i>	
97U116	$\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Galf-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap2Ac-(1}\rightarrow 4)\text{-}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow 2)$
27480	$\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-ManpNAc3NAcA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow 2)$
97U124	$\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucpNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-FucpNAc-(1}\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-QuipNAc4NAcyl-(1}\rightarrow 2)$
Структура ОПС <i>B. aquatica</i>	
DRL 20186	$\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 2)\text{-}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Yerp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalpNAc-(1}\rightarrow 2)$

є аналогічною зі структурою ОПС штамів, які належать до серогрупи O2. Вона представлена розгалуженим пентасахаридом, який включає 3 залишки α - і β -рамнози в L-конфігурації, що рідко зустрічається в природних глікополімерах, одного залишку N-ацетилглюкозаміну та одного залишку N-ацетилфукозаміну:



Дослідження структури O-специфічного полісахариду ЛПС *E. coli* L-19 свідчить про те, що вона є унікальною серед відомих структур бактеріальних полісахаридів і представлена лінійним тетрасахаридом, який включає N-ацетилглюкозамін, галактуронову кислоту, глюкозу, а також амід глюкуронової кислоти з 2-аміно-2-дезоксигліцеролом. Останній визначає особливість цієї структури. Цей компонент не був вставлений раніше в жодній з відомих структур ОПС.



Для чого вивчаються структури ОПС? Вони представляють молекулярну основу серологічних класифікаційних схем мікроорганізмів, які необхідні для епідеміологічних цілей, зокрема, для ідентифікації штамів, які викликають інфекції. Оскільки на сьогодні для досліджуваних видів *R. aquatilis*, *P. fontium* і *B. aquatica* не розроблені внутрішньовидові серологічні схеми, які засновані на O-антигенності їх ЛПС, були проведені дослідження щодо їх серотипування. Вони свідчать про те, що ЛПС всіх досліджених штамів є серологічно активними в гомологічній системі, тобто виконують роль антигенів мікробної клітини. Показано, що досліджувані штами *R. aquatilis*, які характеризуються 6 типами структур ОПС, можна віднести до трьох серогруп. На основі O-антигенності ЛПС досліджувані штами *P. fontium* були віднесені до 7 серогруп. ЛПС тільки одного штаму 29671 проявляв серологічну спорідненість з ЛПС типового штаму 20125, що свідчить про наявність у них загальних антигенних детермінант. Вивчення серологічних взаємозв'язків у представників *B. aquatica* свідчить про відсутність в їх ЛПС загальних антигенних детермінант: всі 6 досліджуваних штамів належать до різних серогруп, проявляють активність антигена тільки в гомологічній системі і не дають перехресних серологічних реакцій з гетерологічними антисироватками. Таким чином, серологічними методами показана імунохімічна гетерогенність видів *P. fontium*, *R. aquatilis* і *B. aquatica*.

Для встановлення серогрупи, до якої може належати *E. coli* L-19, були проведені серологічні дослідження, які показали, що він не взаємодіє ні з однією з відомих поліштамових сироваток, які включали O-антигенні форми *E. coli*, позначені як серогрупи від O1 до O181. Більш того,

E. coli L-19 не взаємодіє з індивідуальною антисироваткою до *E. coli* 043, яка найбільш споріднена до *E. coli* L-19. Це свідчить про те, що досліджений штам є представником нової, ще не описаної в літературі, серогрупи *E. coli*. Цей висновок був підтверджений також і генетичними дослідженнями. О-антигенний генний кластер *E. coli* L-19 між консервативними генами *galF* і *gnd* був секвенований та генні функції були експериментально визначені шляхом порівняння з послідовностями у доступній базі даних. Показано, що вони узгоджуються зі встановленою нами структурою О-специфічного полісахариду. Жодна з послідовностей не показала значної гомології з послідовностями *E. coli* L-19, окрім передбачених генів синтезу і трансферу 2-аміно-2-дезоксигліцеролу, який є гомологічним в *E. coli* L-19 та *E. coli* 043/S. *voydii* тип 8. Більш того, послідовності в О-антигенному кластері *E. coli* L-19 були мало спорідненими з генними кластерами референтних штамів 174 відомих на сьогодні О-серогруп *E. coli*. Таким чином, серологічні, хімічні та генетичні дослідження О-антигену *E. coli* L-19 свідчать про те, що він не є споріднений ні з одним із охарактеризованих на сьогодні клонів *E. coli*, а є представником нової, ще не описаної в літературі, серогрупи.

Аспірант відділу Булигіна Т.В. розпочала в останні роки дослідження ЛПС ще одного представника родини *Enterobacteriaceae* – *Pantoea agglomerans*, ще одного гетерогенного за своїми властивостями виду. Результати цієї роботи будуть оформлені нею у вигляді дисертаційної роботи.

Інформація щодо хімічної будови О-антигенних полісахаридів відкриває перспективи для практичної медицини. Вона дозволяє за допомогою хімічного синтезу одержувати фрагменти полісахаридів і на їх основі – діагностичні препарати, а також профілактичні та лікарські вакцини. Відомо, що на основі природних ЛПС важко створювати глікокон'югатні вакцини проти збудників інфекційних хвороб. Тому зараз розвивається новий, дуже важливий напрямок медичних досліджень – створення глікокон'югатних вакцин на основі хімічно синтезованих олігосахаридів. В 2011 році індійські дослідники на основі встановленої нами структури О-ПС ЛПС *Rahnella aquatilis* 2-95 здійснили хімічний синтез трисахаридного олігосахариду, який може бути використаний для конструювання глікокон'югатної вакцини, що містить вуглеводний антиген у вигляді 2-аміноетилглікозиду, в якому 2-аміноетильна група служить лінкером при кон'югації з білковим носієм.

Другим напрямком досліджень відділу є ферменти – перші біополімери, які людство почало використовувати, навіть не знаючи про їх існування. У відділі біохімії мікроорганізмів займаються вивченням гідролітичних ферментів, зокрема, протеаз з фібринолітичною, еластазою, колагеназою активністю, а також глікозидаз з галактозидазою, рамнозидазою та амілолітичною активністю.

Завдяки унікальній колекції мікроорганізмів нашого Інституту внаслідок скринінгу більш, ніж 6000 штамів представників різних таксономічних груп мікроорганізмів нами відібрано високоефективні продуценти глікозидаз: α -галактозидази *A. niger*, *Penicillium canescens*, *Cladosporium cladosporioides* (Маланчук В.М., Борзова Н.В.), α -L-рамнозидази *Penicillium commune*, *Eupenicillium erubescens*, *Cryptococcus albidus* (Рзаєва О.М., Гудзенко О.В.), α -амілази *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*

(Авдіюк К.В.), а також протеази (*Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*) (Мацелюх О.В., Левішко А.С., Нідялкова Н.А.) зі специфічністю до колагену, кератину, фібрину, еластину, гемоглобіну, желатину і казеїну.

Оскільки біосинтез ензимів у мікроорганізмів є контрольованим, його підвищення здійснювали оптимізацією складу середовища культивування, відбором найбільш активних морфологічних варіантів, а також застосуванням індукторів як природного, так і синтетичного походження. Це дало можливість на порядок підвищити активність ензимів в культуральній рідині. Оскільки в супернатантах культуральних рідин, крім цільового, були присутні активності й інших ферментів, було підібрано методи очистки, які включали осадження сірчанокислим амонієм, іонообмінну та гел'єхромографію. Це дало можливість підвищити активність α -галактозидаз *A. niger*, *P. canescens*, *C. cladosporioides* в 600 разів, α -L-рамнозидази *C. albidus* і *E. erubescens* на 30 і 50% відповідно, α -амілази в 20 і 37 разів відповідно для *B. subtilis* і *A. oryzae*, пептидаз *B. thuringiensis* в 19,9 і 22,9 рази для фібринолітичної і еластазної активності відповідно.

Одним із методів селекції промислово важливих мікроорганізмів є відбір мутантів із зміненими спадковими ознаками. Відбір за максимальною зоною гідролізу желатини було проведено серед 1000 варіантів, оброблених N-метил-N-нітрозогуанідом. Рівень еластазної активності у мутантів *B. thuringiensis* був підвищений на 31-100%. При цьому рівень казеїнолітичної активності у них був знижений на 8-50%. Якщо для вихідної культури характерний максимальний синтез ферментів з еластолітичною дією десь ближче до другої доби культивування, то для мутанта максимальний синтез еластази відбувається на першу добу культивування, а на другу знижується на 87,5%. При цьому синтез казеїнолітичних ферментів на 2 добу культивування залишається майже незмінним в порівнянні з вихідною культурою, у якої йде зниження цього показника на 40%.

Одним із підходів для визначення механізму дії ферментів є ідентифікація функціональних груп їх активного центру, які безпосередньо беруть участь у каталізі. Для цього проводили аналіз кінетичних кривих залежності швидкості ферментативної реакції від величин рН, що дає можливість визначити значення констант іонізації груп, які приймають участь у ферментативному каталізі, а також використовували інгібіторний аналіз каталітичної реакції групоспецифічними хімічними реагентами і іонами металів. Встановлено, що активність пептидази *B. thuringiensis* на 100% необернено інгібує фенолметилсульфонілфторид (ФМСФ). Оскільки він є інгібітором практично всіх серинових протеаз з трипсиноподібною специфічністю і ковалентно зв'язується з гістидином або серином активного центру, то логічно припустити, що досліджувана протеаза належить до групи протеаз серинового типу. Також необернено активність інгібувалася 1-етил-3-[3-диметиламінопропіл]карбодіімідом (ЕДК), який здатний зв'язувати каталітично активні карбоксильні групи ензимів, частіше за все це карбоксильні групи аспарагінової або глутамінової кислот. Вивчення дії на активність пептидази сильного відновлюючого реагента дитіотреїтола, який здатний відновлювати внутрішньомолекулярні і міжмолекулярні дисульфідні зв'язки між залишками цистеїну, показало його незначну інгібуючу (на 10–20%) дію як на еластазну, так і на фібринолітичну активність. Оскільки в умовах досліду

(рН 7,5, відсутність денатуруючих умов) можна було дослідити лише наявність дисульфідних зв'язків на поверхні білкової молекули, то можна зробити висновок, що в даній пептидазі на поверхні молекули є певна кількість тілових груп, утворення дисульфідних зв'язків між якими призводить скоріше до зміни конформації молекули, що робить менш доступним каталітичний центр ензиму. Лише конформаційну, а не каталітичну роль поверхневих тілових груп підтверджує і відсутність інгібуючої дії на пептидазу N-етилмалеїміду (НЕМ), здатного блокувати вільні каталітично активні SH-групи ензиму. Також встановлено, що активність пептидази на 40–65% інгібує ЕДТА. Ця взаємодія має обернений характер, тобто після 2 год експозиції активність поступово відновлюється. Отже, можна зробити висновок, що іони металів не входять до складу активного центру пептидази, а скоріше необхідні для підтримання певної конформації молекули або ж для зв'язування субстрату. Таким чином, показано, що штам *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 синтезує пептидазу з еластолітичною і фібринолітичною активністю, яка є сериною лужною пептидазою.

Аналіз кінетичних кривих залежності швидкості α -галактозидазної та α -L-рамнозидазної активностей від величини рН дозволив знайти значення констант іонізації груп, які включаються у ферментативний каталіз, і показати, що в активному центрі α -галактозидаз трьох продуцентів *A. niger*, *P. canescens*, *C. cladosporioides*, а також α -L-рамнозидази *C. albidus* і *E. erubescens* присутні дві групи, що іонізуються і відповідають карбоксильній групі С-кінцевої кислоти та імідазольній групі гістидину. Наявність імідазольної групи була підтверджена специфічною реакцією – фотоокисненням в присутності метиленового синього. Розрахована величина теплоти іонізації відповідала теплоті іонізації імідазольної групи.

Важливою характеристикою ферментів є їх субстратна специфічність, на основі якої можна прогнозувати їх практичне використання. Встановлено, що α -L-рамнозидази *C. albidus* і *E. erubescens* проявляють вузьку субстратну специфічність до *n*-нітрофенільних похідних і здатні гідролізувати тільки *n*-нітрофеніл- α -L-рамнопіранозид та *n*-нітрофеніл- β -D-глюкозид. Досліджені ферменти виявили специфічність до природних субстратів: нарингину та неогесперидину. Здатність α -L-рамнозидаз *C. albidus* і *E. erubescens* гідролізувати біофлавоноїди може бути використана: а) для гідролізу рамнозильних залишків, наявних у флавоноїдних глікозидах, що поліпшує якість продуктів, які їх містять; б) для вивільнення з терпенових глікозидів - рутинозидів, ароматичних сполук, які сприяють підсиленню аромату виноградних соків, вин та отриманих з них напоїв; в) для попередження та лікування геморагічних діатезів, капіляротоксикозів, крововиливів.

Порівняльний аналіз субстратної специфічності α -галактозидаз *A. niger*, *C. cladosporioides* і *P. canescens* свідчить про те, що ферментний препарат *A. niger* проявляв вузьку субстратну специфічність і відщеплював від нітрофенільних субстратів тільки α -1,3-зв'язану D-галактозу. Здатність гідролізувати тільки α -галактозиди проявляла і α -галактозидаза *P. canescens*, яка, як і α -галактозидаза *A. niger*, не здатна була гідролізувати такі природні субстрати, як мелібіоза, рафіноза та стахіоза, що містять α -1,6-зв'язані залишки D-галактози. В той час як ферментний препарат

C. cladosporioides характеризувався широкою субстратною специфічністю: крім α -D-галактозидів він гідролізував β -D-галактози, а також природні субстрати, що містять α -1,6-зв'язані залишки D-галактози.

Дослідження специфічності глікозидаз до природних і синтетичних субстратів, які відрізняються типом зв'язку, дає можливість припустити сфери їх практичного використання. Так, α -галактозидаза, яка здатна гідролізувати термінальні α -1,6-зв'язані залишки D-галактози, може бути використана для гідролізу вуглеводів в соєвому молоці, що покращує якість соєвих продуктів, а також здатна підвищувати вихід цукру з меляси. α -Галактозидаза, специфічна до α -1,3-зв'язаних залишків D-галактози, може бути використана для трансформації еритроцитів II групи крові.

Ще одним напрямком роботи відділу в останні роки є розробка методів одержання високостабільних ензимів, перспективних для використання в різних біотехнологічних процесах, а також ліпополісахаридів, перспективних терапевтичних агентів внаслідок їх хімічної модифікації. Так, дріжджові α -L-рамнозидази, які на сьогодні, поряд з грибовими, є перспективною групою ензимів для використання в харчовій промисловості, зокрема у виробництві соків та вин, були модифіковані ацилюванням аміногруп лізіна і гліцина діамінопімеліновою кислотою і янтарним альдегідом, а також обробкою целюлозою, декстранами, поліетиленгліколями. Порівняльне вивчення термостабільності нативних і модифікованих α -L-рамнозидаз *E. erubescens* і *C. albidus* показало, що у випадку модифікації ПЕГ 1500, декстранами 70 Т і 500 Т термостабільність досліджених α -L-рамнозидаз знижується, тоді як модифікація ПЕГ 20000 приводить до підвищення термостабільності ензиму *E. erubescens* на 280 %, а *C. albidus* на 150 % (протягом 180 хв інкубації). Одержано захисний ефект при модифікації досліджених α -L-рамнозидаз препаратами целюлози. Гідрофобна модифікація за допомогою 2,6-діамінопімелінової кислоти і янтарного ангідриду також уповільнює термоденатурацію α -L-рамнозидаз в умовах досліду. Отримані модифіковані α -L-рамнозидази *C. albidus* і *E. erubescens* характеризувались підвищеною активністю і термостабільністю, що дає можливість припустити можливість їх подальшого використання в біотехнологічних процесах різної спрямованості.

Порівняльні дослідження активності і стабільності нативної та модифікованої шляхом окиснення періодатом натрію α -галактозидази *C. cladosporioides* свідчать про те, що така модифікація проявляє значний вплив на каталітичні властивості ензима. Так, відмічалось зниження як V_{max} , так і спорідненості ензиму щодо природних і синтетичних субстратів. Нативний ензим зберігає більш, ніж 50% від максимальної активності в діапазоні 20–60°C, в той час як для модифікованого ензиму в тих же умовах цей діапазон звужується і складає 30–50°C. Модифікована α -галактозидаза характеризується більш високою термостабільністю в нейтральній зоні рН. Залишкова активність модифікованої α -галактозидази при обробці 70% (v/v) метанолом, етанолом і пропанолом складала біля 30%. При використанні 40% етанолу та пропанолу, а також 50% метанолу було зареєстровано біля 50% від вихідної активності.

Модифікацію пептидаз 1 і 2 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465 здійснювали їх витримуванням з координаційними сполуками стануму (IV) та германію (IV) і визначенням залишкової активності щодо

колагену, еластину і фібрину. Виявлені закономірності впливу комплексних сполук різної структури на активність пептидаз *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465. Комплекси Sn(IV) з саліцилоїлгідрозонами ароматичних альдегідів підвищують колагеназну та еластазну активності. Заміна замісників в альдегідному фрагменті комплексів Sn(IV) з ізонікотиноїлгідрозонами ароматичних альдегідів на менш полярні приводила до збільшення еластазної активності обох ензимів, в той час як відсутність замісників дозволяє збільшити фібринолітичну активність пептидази 2. Різнометальні комплекси германію з ізонікотиноїлгідрозоном саліцилового альдегіду, до складу яких входить цинк і кобальт, підвищували колагеназну активність пептидази 1, а також еластазну і фібринолітичну активність пептидази 2. Загалом всі досліджені комплекси можна розглядати як ефектори пептидаз *B. thuringiensis* var. *israelensis* ІМВ В-7465. Відмінність у впливі комплексів на активність обох ензимів зумовлена особливостями будови координаційних сполук.

Однією з важливих посттрансляційних модифікацій, якій піддаються як інтегровані в мембрани, так і секреторні білки, зокрема і ензими, є їх глікозилювання. Відомо, що вуглеводний компонент відіграє суттєву роль у формуванні четвертинної структури протеїна, відповідає за захист від деградуючого впливу протеолітичних ензимів під час синтезу білка. Наявність N-глікозилюваних сайтів в поліпептиді може визначати стабільність ензиму і створювати можливість утворення надмолекулярних структур. Відомо, що N-зв'язані вуглеводи відіграють важливу роль в секреції, оскільки переважно вони характерні для екстрацелюлярних ензимів в складі лінкерної ділянки молекули ензиму. O-глікозилювання попереджає накопичення молекул субстрату в зв'язуючих центрах ензиму і забезпечує їх стехіометричне зв'язування. Високоглікозилювані ензими, як правило, відрізняються стійкістю до дії високих температур та інших факторів агресивного середовища. Для виявлення характеру глікозилювання (N-, O- або змішаного типу) α -галактозидаз трьох мікроміцетів *A. niger*, *C. cladosporioides*, *P. canescens* було досліджено, як інгібітори N- або O-глікозилювання (тунікаміцин та 2-дезоксид-D-глюкоза відповідно) впливають на їх активність, стабільність і продукцію. Показано, що інгібування N-глікозилювання не впливало на секрецію α -галактозидази *A. niger*, однак знижувало вихід α -галактозидаз *C. cladosporioides* і *P. canescens*. Зміни в ступені O-глікозилювання приводили до зниження активності і стабільності α -галактозидаз трьох продуцентів. Активність модифікованих ензимів була значно нижчою в порівнянні з нативними і складала відповідно 0,33 і 2,6 Е/мг для α -галактозидази *A. niger*, 3,3 і 32,5 Е/мг для α -галактозидази *C. cladosporioides*, 11,66 і 31,1 Е/мг для α -галактозидази *P. canescens*. α -Галактозидаза *A. niger* повністю інактивувалась в процесі очистки і зберігання. Для α -галактозидаз *C. cladosporioides* і *P. canescens* показано зниження на 20% термостабільності при 55°C. Також було відмічено, що O-деглікозилювання приводило до зниження стійкості досліджених ензимів до дії протеаз.

Модифікація є також одним із підходів до зміни властивостей ЛПС. Як модифікатори були використані комплексні сполуки германію і олова з різними гідрозонами саліцилового альдегіду. Результати порівняльних досліджень токсичності нативних і модифікованих ЛПС *R. aquatilis* свідчать

про те, що внаслідок модифікації ЛПС комплексом германія з нікотиноїл-гідразоном саліцилового альдегіду спостерігалось зниження токсичності всіх досліджених ЛПС. При вивченні пірогенної дії нативних і модифікованих ЛПС не встановлено певної закономірності в дії модифікуючих речовин, більшість з яких викликало зниження пірогенної дії.

Подальші дослідження співробітників відділу біохімії мікроорганізмів будуть спрямовані на встановлення залежності функціональних, біологічних та фізико-хімічних властивостей мембранних та позаклітинних глікополімерів мікроорганізмів від особливостей первинної структури або її модифікованих похідних. Сподіваємось, що одержані результати дадуть можливість встановити певні закономірності в структурно-функціональних дослідженнях, які будуть мати не тільки фундаментальне значення, але й розширять перспективи застосування глікополімерів мікробної клітини в практичних цілях.

Хочу відмітити, що за останні 10 років у відділ біохімії мікроорганізмів прийшла потужна творча молодь. Результати роботи були захищені у вигляді восьми кандидатських дисертацій: Броварська О.С. (2007 р.), Рзаєва О.М. (2007 р.), Шубчинський В.В. (2008 р.), Левішко А.С. (2009 р.), Скоклюк Л.Б. (2011 р.), Нідялкова Н.А. (2013 р.), Авдіюк К.В. (2013 р.), Гудзенко О.В. (2013 р.), а також висвітлені у публікаціях. За цей період вийшло з друку 241 публікація, в тому числі 9 патентів, 135 статей, з них 22 у закордонних виданнях, 4 монографії: 1) Варбанець Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. Проект «Наукова книга». Киев. Наукова думка. 2006. 237 с. 2) Варбанець Л.Д., Мацелюх О.В. Протеолітичні ферменти мікроорганізмів та методи їх дослідження. ISBN 978-2214-01-8. Київ. 2008. 108 с. 3) Варбанець Л.Д., Борзова Н.В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. Проект «Наукова книга». Київ. Наукова думка. 2010. 438 с. 4) Варбанець Л.Д., Мацелюх Е.В. Пептидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. Проект «Наукова книга». Киев. Наукова думка. 2014. 322 с.; а також 93 тези доповідей на вітчизняних і закордонних конференціях і з'їздах.

За цикл робіт «Глікополімери бактерій: закономірності структурної організації макромолекул, функціонально-біологічна активність і аспекти практичного використання» співробітникам відділу Л.Д. Варбанець, Г.М. Здоровенко, І.Я. Захаровій була присуджена Державна премія України в галузі науки та техніки (2009 р.).

Необхідно відмітити, що досягнення, які були здобуті молодими дослідниками, ґрунтуються на роботах тих, хто працював до них. Це – докт. біол. наук Здоровенко Г.М. і Косенко Л.В., канд. біол. наук – Новікова С.І., Галкіна Т.О., Каганська М.Б., Бондарчук А.О., Павлова І.М., Буглова Т.Т., Мацюк В.М., Васильєв В.М., Коваленко Е.О., Скрипнік С.І., Касянчук Н.В., Колтукова Н.В., Жолнер Л.Г., Солдаткіна М.О., Кічакова Н.О.

Оскільки відділ біохімії мікроорганізмів не володіє власною колекцією мікроорганізмів, на протязі всього періоду його існування відділ успішно співпрацює з іншими відділами Інституту: фізіології промислових мікроорганізмів, фітопатогенних бактерій, фізіології і систематики мікроміцетів, антибіотиків, біології екстремофілних мікроорганізмів.

Співробітники відділу біохімії мікроорганізмів дуже вдячні керівникам і співробітникам цих відділів за надання культур мікроорганізмів і співпрацю.



Відділ біохімії мікроорганізмів (2008 р.). Зліва направо: Варбанець Л.Д. (зав. відділу), Гудзенко О.В., Мацелюх О.В., Борзова Н.В., Левішко А.С., Рзасва О.М., Скоклюк Л.Б.



Відділ біохімії мікроорганізмів (2009 р.). Справа наліво: Гудзенко О.В., Левішко А.С., Кокоша В.М., Грачова Г.В., Варбанець Л.Д. (зав. відділу), Шубчинський В.В., Броварська О.С., Авдіюк К.В.



Відділ біохімії мікроорганізмів (2012 р.). Справа наліво: Нідялкова Н.А., Авдіюк К.В., Мацелюх О.В., Варбанець Л.Д. (зав. відділу), Броварська О.С., Гудзенко О.В., Булігіна Т.В.

МИКРОБНЫЕ ГЛИКОПОЛИМЕРЫ: СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Л.Д. Варбанец

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

Резюме

В отделе исследования развиваются по двум направлениям: 1) липосахариды представителей *Enterobacteriaceae*: *Rahnella aquatilis*, *Pragia fontium*, *Budvivia aquatica*, *Pantoea agglomerans*, *Escherichia coli*, их химическая идентификация, структурные исследования, функциональная и биологическая активность; 2) ферменты гликолитического (α -L-рамнозидаза, α -галактозидаза, α -амилаза) протеолитического (пептидазы) действия у *Cryptococcus albidus*, *Eupenicillium erubescens*, *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus oryzae*, *Yarrowia lipolytica*, представителей рода *Bacillus*. Впервые описаны структуры O-специфических полисахаридов (ОПС) *R. aquatilis*, *P. fontium* и *B. aquatica*, которые построены из цепей, представленных линейными или разветвленными три-, тетра-, пента- и гексасахаридами. ОПС ряда штаммов являются гетерогенными и содержат по два типа олигосахаридов, которые отличаются структурой. Большинство ОПС исследованных штаммов представлено гетерополисахаридами, в то время как одного штамма *R. aquatilis* 3-95 – гомополисахаридами маннозы или глюкозы. Серологическими методами показана иммунохимическая гетерогенность видов *P. fontium*, *R. aquatilis* и *B. aquatica*. Исследования O-антигена *E. coli* L-19 показали, что он характеризуется уникальной структурой ОПС, не родственной ни с одним из охарактеризованных на сегодня клонов *E. coli*, и является представителем новой, еще не описанной в литературе, серогруппы. Используя ингибиторный анализ каталитической реакции группоспецифическими химическими реагентами и ионами металлов, установлены некоторые функциональные группы, которые принимают участие в катализе. Так, установлено, что штамм *B. thuringiensis* IMB B-7324 синтезирует пептидазу с эластолитической и фибринолитической активностью, ко-

торая представляет собой сериновую щелочную пептидазу. Анализ кинетических кривых зависимости скорости α -галактозидазной и α -L-рамнозидазной активности от величины рН позволил найти значения констант ионизации групп, которые включаются в ферментативный катализ, и показать, что в активном центре α -галактозидаз трех продуцентов *A. niger*, *P. canescens*, *C. cladosporioides*, а также α -L-рамнозидазы *C. albidus* и *E. erubescens* присутствуют две группы, которые ионизируются и отвечают карбоксильной группе С-концевой кислоты и имидазольной группе гистидина. Наличие имидазольной группы было подтверждено также специфической реакцией – фотоокислением в присутствии метиленового синего. Рассчитанная величина теплоты ионизации соответствовала теплоте ионизации имидазольной группы. Показана важная роль углеводной части исследуемых гликозидаз в формировании олигомерной структуры, в секреции, устойчивости к действию высоких температур и других факторов агрессивной среды, а также к протеолизу. Исследования субстратной специфичности ферментов дают возможность прогнозировать их практическое использование в будущем.

Ключевые слова: липополисахарид, протеазы, α -галактозидаза, α -амилаза, α -L-рамнозидаза, микробные продуценты.

MICROBIAL GLYCOPOLYMERS: STRUCTURE, FUNCTIONAL AND BIOLOGICAL ACTIVITY

L.D. Varbanets

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine,
Acad. Zabolotny str. 154, Kyiv, 03143, Ukraine,
e-mail: varbanets_imv@ukr.net*

Summary

In the department of biochemistry of microorganisms, the research is developing in two directions: 1) lipopolysaccharides of the representatives of *Enterobacteriaceae*: *Rahnella aquatilis*, *Pragia fontium*, *Budviviva aquatica*, *Pantoea agglomerans*, *Escherichia coli*, their chemical identification, structural studies, functional and biological activity, 2) enzymes of glycolytic (α -L-rhamnosidase, α -galactosidase, α -amylase) and proteolytic (peptidase) action in *Cryptococcus albidus*, *Eupenicillium erubescens*, *Aspergillus niger*, *Penicillium canescens*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus oryzae*, *Yarrowia lipolytica*, representatives of the genus *Bacillus*. The structures of the O-specific polysaccharides (OPS) of *R. aquatilis*, *P. fontium* and *B. aquatica* are described for the first time. They are constructed from chains represented by linear or branched tri-, tetra-, penta- and hexasaccharides. OPS of a number of strains are heterogeneous and contain two types of oligosaccharides, which differ in structure. Most OPS of the strains studied are heteropolysaccharides, while one strain of *R. aquatilis* 3-95 is represented by homopolysaccharides of mannose or glucose. Serological methods show the immunochemical heterogeneity of *P. fontium*, *R. aquatilis* and *B. aquatica* species. Studies of the *E. coli* L-19 O-antigen showed that it is characterized by a unique OPS structure that is not related to any of the *E. coli* clones described today and is the representative of a new serogroup not yet described in the literature. Using inhibitor analysis of the catalytic reaction by group chemical reagents and metal ions, certain functional groups have been established that take part in catalysis. Thus, it has been established that *B. thuringiensis*

strain IMB B-7324 synthesizes peptidase with elastolytic and fibrinolytic activity, which is a serine alkaline peptidase. Analysis of the kinetic curves of the dependence of the rate of α -galactosidase and α -L-rhamnosidase activity on the pH allowed us to find the values of ionization constants of the groups that are involved in enzymatic catalysis and show that in the active center of *A. niger*, *P. canescens*, *C. Cladosporioides* α -galactosidases, and *C. albidus* and *E. erubescens* α -L-rhamnosidases, there are two groups that are ionized and that correspond to the carboxyl group of the C-terminal acid and the imidazole group of histidine. The presence of an imidazole group was also confirmed by a specific reaction-photooxidation in the presence of methylene blue. The calculated value of the ionization heat corresponded to the heat of the ionization of the imidazole group. The important role of the carbohydrate part of the glycosidases studied in the formation of the oligomeric structure, in secretion, resistance to high temperatures and other factors of the aggressive environment, as well as to proteolysis is shown. Studies of substrate specific enzymes make it possible to predict their practical use in the future.

Keywords: lipopolysaccharide, proteases, α -galactosidase, α -amylase, α -L-rhamnosidase, microbial producers.

Отримано 23.01.2017