

На правах рукописи

ВАРЮХИНА Светлана Юрьевна

**АНТИСТРЕССОВЫЕ И АНТИМУТАГЕННЫЕ
СВОЙСТВА ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

Специальность 03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2004

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор **Л.И. Воробьева.**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор **В.К. Шильникова;**
доктор биологических наук **С.К. Абилев.**

Ведущая организация: ФГУП «ГосНИИ Синтезбелок».

Защита состоится « 26 » мая 2004 г. в « 16 » часов « 00 » минут на заседании диссертационного совета Д 220.043.04 при Московской сельскохозяйственной академии им. К.А. Тимирязева по адресу: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49. Ученый совет МСХА.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНБ МСХА.

Автореферат разослан « 05 » апреля 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета —
кандидат сельскохозяйственных наук,
профессор



В.А. Калинин

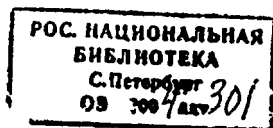
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Человек является частью природы. Влияние человека на среду обитания всегда зависело от этапа развития цивилизации, исторической и географической ситуации.

На данном этапе прогресс сопровождается глобальными экологическими нарушениями и изменениями. Особое внимание вызывает загрязнение окружающей среды факторами, не свойственными биосфере в норме, что не только испытывает компенсаторные возможности природы, но влияет на здоровье людей и уже сейчас может нанести ущерб будущим поколениям. Антропогенное загрязнение мутагенами окружающей среды приводит к увеличению частоты мутаций у микроорганизмов, растений, животных и человека. Предотвратить увеличение мутационного груза, способного вызвать «взрыв» мутабельности и тем самым сохранить наследственность - актуальная и сложная задача стоящая перед человечеством.

Существует несколько подходов к решению проблемы. Предотвращение загрязнения среды а также идентификация и изъятие мутагенов окружающей среды, весьма эффективны, но их реализация является весьма проблематичной. Другим подходом является повышение устойчивости организмов к действию экстремальных факторов. Для этих целей возможно использование антимуtagenов - веществ, способных снижать частоту спонтанной и индуцированной мутации (Алекперов У.К., 1989).

Прокариоты как потенциальные источники антимуtagenов почти не изучались, хотя учитывая общность фундаментальных реакций прокариот и эукариот, а также способность прокариот осуществлять реакции некоторых уникальных синтезов, позволяют предположить, что бактерии могут быть источниками ценных антимуtagenов. Использование бактерий, как источников антимуtagenов, имеет ряд преимуществ перед другими источниками. Бактерии способны к эффективному наращиванию биомассы на дешевых средах (например, на отходах некоторых производств) и за довольно короткий промежуток времени. Кроме того, существуют возможности воздействия на бактериальный метаболизм, позволяющие стимулировать преимущественную выработку необходимого человеку продукта и его дальнейшую экскрецию из клеток. Бактерии являются облигатными составляющими нормальной микрофлоры человека и широко применяются в медицине и биотехнологии. Эти полезные бактерии должны быть защищены от неизбежных стрессов, возникающих в условиях микробиологических производств и возможного присутствия мутагенов в пище и в желудочно-кишечном тракте человека.



Кроме антимутагенного действия в отношении мутагенеза, индуцированного химическими соединениями, бактерии привлекли к себе внимание исследователей способностью к реактивирующему действию в ответ на стрессовые ситуации. Стресс- это ситуация, при которой параметры окружающей среды резко отличаются от обычных условий существования организма. Ганс Селье определял стрессовый ответ как запрограммированную реакцию организма на резкое изменение условий окружающей среды. Со времен Г. Селье этот термин стал очень популярен и в настоящее время приобрел более широкий смысл, включая действие экстремальных факторов на биообъект и противодействие им.

Удивительная общность стрессовых ответов у исследованных про- и эукариотных организмов позволила выявить высокую консервативность фундаментальных механизмов их клеточной регуляции. Поэтому микроорганизмы служат хорошими моделями для изучения стрессовых ответов у высших организмов.

Цель и задачи исследования. Целью работы было изучение антистрессовых и антимутагенных свойств пропионовокислых бактерий (ПКБ).

В ходе работы решались следующие задачи:

- выделение и очистка внутриклеточного белка пропионовокислых бактерий, обладающего защитными и реактивирующими свойствами в отношении бактерий, подвергнутых стрессорным воздействиям;
- частичная физико-химическая характеристика очищенного белкового препарата;
- изучение АМ активности представителей различных видов и штаммов ПКБ с использованием культуральной жидкости (к.ж.), «живых» и «мертвых» клеток в качестве источников антимутагенных факторов;
- исследование наиболее перспективных с точки зрения АМ активности штаммов в отношении мутагенеза, индуцируемого мутагенами различного химического строения и механизма действия;
- установление свойств этих антимутагенов и анализ возможного механизма их действия.

Научная новизна работы. В ходе работы был получен в очищенном состоянии белок из клеточного экстракта пропионовокислых бактерий с молекулярной массой 35.0 kDa, обладающий реактивирующей и защитной активностью. Изоэлектрическая точка очищенного фермента определена как 4.95.

Определение аминокислотной последовательности N-терминального и двух интернальных участков молекулы белка позволило охарактеризовать его как **цистеинсинтазу, фермент, ответственный** за синтез цистеина из O-ацетил-серина и

сульфида водорода и контролируемый *cysK*-геном; установлена высокая степень гомологии с цистеинсинтазами других бактерий: *Staphylococcus haemolyticus*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*.

При использовании метода двумерного электрофореза внутриклеточного белок-содержащего экстракта *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* показана индукция синтеза фермента, который, видимо, играет важную роль в адаптации бактерий к действию детергентов и к нагреванию.

Впервые показано реактивирующее действие белка в отношении клеток *E. coli* подвергнутых тепловому шоку и действию желчных кислот и защитное действие в отношении УФ-облученных клеток. Установлена зависимость защитного эффекта белка от его концентрации.

Изучена антимуtagenная активность 17 штаммов бактерий, при этом особое внимание уделено изучению антимутагенеза пропионовокислых бактерий, которые имеют широкое практическое применение.

Исследовалась антимуtagenная активность культуральной жидкости, а также «живых» и «убитых» клеток бактерий.

Установлено, что антимутагенный фактор культуральной жидкости представлен веществом белковой природы, относительно термоустойчивым, с молекулярной массой более 2,0, но менее 12,0 kDa.

В качестве источников мутагенов использовали как прямые мутагены, не требующие метаболической активации, так и промутагены, активирование которых проводили путем добавления микросомальной активирующей смеси. Всего было изучено мутагенное действие 8 различных мутагенов, часть из которых обладает канцерогенным действием: 4-нитрохиолин-1-оксид (4-НХО), N-метил N-нитро N-нитрозогуанидин (МННГ), 2-нитрофлуорен (2-НФ), 9-амиоакридин (9-АА), перекись водорода (H_2O_2), азид натрия (**NaN₃**), 2-амино-1метил-5-фенилимидазопиридин (**PhiP**), **бенз(а)пирен (BaP)**. В качестве тест-культуры применяли 4 тестерных штамма *Salmonella typhimurium*, регистрирующих различные типы мутаций у бактерий: TA 100, TA 98, TA 97, TA 102.

Практическая значимость. В настоящей работе представлены новые данные о дополнительных ранее неисследованных свойствах пропионовокислых бактерий как пробиотиков, источников антимутагенов, а также факторов протекции и реактивации микроорганизмов, подвергнутых различным стрессовым факторам.

Апробация работы Результаты исследований были представлены на Международной конференции «Predictive modeling in foods» (Бельгия, Лейвен, сентябрь 2000), на Международном симпозиуме «Propionibacteria» (Швейцария, Цюрих, июнь

2001), на заседании кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им М.В. Ломоносова (17 февраля 2004).

Публикации. Результаты диссертации представлены в 4 работах.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов, обсуждения результатов исследований, выводов и списка литературы (88 работ). Работа изложена на 127 страницах, иллюстрирована 24 таблицами и 35 рисунками.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основными объектами исследования служили классические пропионовокислые бактерии, полученные из коллекции кафедры микробиологии МГУ и из коллекции «Centre National de la Recherche en Zootechnie», Франция. Бактерии выращивали на минимальной глюкозной среде следующего состава (%): глюкоза-1.5, триптон («Difco») - 0.1, дрожжевой экстракт («Difco») - **0.05**, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - **0.3**, KH_2PO_4 - **0.2**, CaCl_2 - **0.002**, MgSO_4 - **0.002**, NaCl - **0.002**, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - **0.001**, дистиллированная вода, **pH 6.8-7.0**. Культивирование проводили при 30°C в стационарных условиях. Для получения бесклеточных экстрактов в целях выделения внутриклеточного белка бактерии культивировали в течение 72 ч. Экстракты получали, разрушая клетки ультразвуком с последующим центрифугированием для осаждения крупных обломков и клеточных стенок. Для удаления присутствующих в экстракте нуклеиновых кислот в полученный супернатант вносили протаминсульфат.

Дробное фракционирование клеточного экстракта сульфатом аммония осуществляли согласно общепринятой методике (Долсон и др., 1991). В качестве ингибитора сериновых протеаз, использовали фенилметансульфонилфторид (ФМСФ).

Для разделения белковых смесей использовали следующие варианты колонной хроматографии: ионообменная хроматография на анионитах DEAE-сефароза, гель-фильтрация на сефадексе G-75. Хроматографическое разделение проводили при помощи стандартных приемов (Остерман Л.А., 1984). Для анализа гомогенности белковых фракций и определения молекулярной массы белков использовали метод SDS-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия. Степень гомогенности полученного очищенного белка определяли методом эксклюзивной ВЭЖХ. Для экспресс-определения концентрации белка использовали спектрофотометрический метод Кристиана-Варбурга.

Концентрацию белка подсчитывали по эмпирической формуле

$$C \text{ (мг/мл)} = 1.55 A_{280} - 0.76 A_{260}$$

Процент нуклеиновых кислот от массы белка определяли исходя из отношения A_{280}/A_{260} при помощи эмпирической таблицы - (Долсон, и др., 1991).

Для определения концентрации белка использовали также метод Лоури.

Для определения изоэлектрической точки белка, а также в целях изучения биосинтеза у этих бактерий цистеинсинтазы под действием стрессовых факторов суспензия клеток *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* в контрольном (не подвергнутому стрессу) и в различных стрессовых состояниях была подвергнута двумерному электрофоретическому разделению.

Клетки предварительно метили смесью [^{35}S] метионина и цистеина.

Для секвенирования N-концевого участка белка использовали «ProSorb sample preparation cartridge» («Applied Biosystem», Foster city, CA) и автоматический «Beckman/Porton LF3000 protein sequencer» («Beckman Instruments», Inc, Fullerton, CA). Обработку данных проводили с использованием «FASTA program» согласно (Pearson and Lipman, 1988).

Белковые фракции, полученные при помощи описанных хроматографических методов фракционирования, испытывались на биологическую активность. Биологическую активность определяли путем подсчета колонийобразующих единиц образованных клетками *E. coli* AB 1157 в чашке Петри с питательным агаром фирмы «Oxoid» (США) после облучения бактерий УФ-светом. Активность выражали с помощью индекса деления (ИД), то есть отношения числа КОЕ в опытном варианте к количеству КОЕ в контроле. Протекторное действие очищенного белка на клетки *E. coli* AB 1157 испытывали также в условиях УФ-облучения, а реактивирующее - в условиях теплового шока и действия желчных кислот.

Для изучения антимутагенного действия применяли модифицированный метод Эймса с использованием в качестве тест-культуры *S. typhimurium*. Принцип метода состоит в том, что после обработки клеток тест-штамма мутагеном на селективной среде вырастают ревертанты по гистидину (без внешних воздействий реверсии к прототрофности происходят с низкой частотой, что отражает спонтанный фон). В соответствии с этим, обрабатывая те же самые клетки антимутагеном или проводя предынкубацию мутагена с исследуемым антимутагенным агентом, ожидают снижение числа индуцированных ревертантов и определяют степень антимутагенного эффекта.

Антимутагенный эффект модулятора определяли по формуле:

$$\text{Ингибирование (\%)} = \frac{(a - b) \cdot 100\%}{(a - c)}$$

где a - число гистидиновых ревертантов, индуцированных под действием мутагена (позитивный контроль); b - число гистидиновых ревертантов, индуцированных под действием мутагена в присутствии антимутагена; c - число ревертантов, вырастающих в результате спонтанного мутирования. Антимутагены не оказывали влияния на уровень спонтанного мутагенеза, поэтому в формуле не учитывали так называемый негативный контроль - число ревертантов, вырастающих в присутствии только антимутагена,

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Антистрессовые свойства пропионовокислых бактерий.

Л.И. Воробьевой с соавторами (Vorobjeva et al, 1999) была показана реактивация инактивированных УФ-светом клеток *E. coli*, *S. cerevisiae*, *S. typhimurium*, *C. guelliermondii* и целого ряда других микроорганизмов с использованием экстракта клеток *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*.

Показано, что защитная и реактивирующая активность сосредоточены в белковых фракциях диализата экстракта, осаждаемых при солевом фракционировании клеточного экстракта сульфатом аммония в интервалах 20-40% и 60-80% насыщения. Было продемонстрировано, что защитная активность связана с нуклеопротеидным комплексом, а реактивирующая активность нуклеопротеидных комплексов напрямую связана с наличием белковых молекул в активных фракциях, и при этом доказан нековалентный характер взаимодействия белка и нуклеотидной составляющей активного комплекса. Из экстракта клеток пропионовокислых бактерий был выделен и частично охарактеризован белок, проявляющий реактивирующую и протекторную активность. Однако, описанные ранее способы выделения белка не всегда воспроизводились, что не позволяло получить в руки очищенный белковый препарат, необходимый как инструмент исследования механизма реактивирующего действия и антистрессовых ответов клетки.

В результате поставленных экспериментов по фракционированию белков клеточного экстракта *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* получен гомогенный белковый препарат, обладающий защитной и реактивирующей активностью.

Для получения препарата использовали фракцию, полученную при насыщении клеточного экстракта *P.freudenreichii* subsp. *shermanii* сульфатом аммония в интервале 60-80% насыщения.

Перед сульфатным осаждением экстракт предварительно обрабатывали протаминсульфатом, чем достигалось значительное освобождение от примесей нуклеотидной природы, а после растворения полученного осадка, белковый раствор инкубировали с ФМСФ для ингибирования протеиназ с целью ослабить или предотвратить протеолиз в процессе выделения белка. Затем было проанализировано хроматографическое поведение белкового материала на сорбентах: DEAE-сефарозе FF и сефадексе G-75.

После разделения фракции 60-80% на анионите DEAE-сефарозе, было получено пять активных фракций, свойства которых представлены в таблице 1. Дальнейшую работу проводили с фракцией II (**ИД пред. 1.7**, содержание нуклеотидного материала 0.715 %), поскольку по данным электрофореза эта фракция была единственной, которая содержала значительное количество белка с молекулярной массой 35 kDa.

Для дальнейшей очистки полученной белковой фракции использовали метод гель-фильтрации на сорбенте сефадекс G-75. В результате разделения было получено пять активных фракций, свойства которых представлены в таблице 1, однако лишь фракция III (**ИД пред. 2.3, НК ~ 0%**) обладала высокой степенью очистки (95 %) (рисунок 1).

Таблица 1. Свойства фракций, полученных при разделении на сорбентах.

Фракция	Конц-я белка мг/мл, В.	НК, % от белка	Масса фракций, мг	Активность, ИД (пред)
DEAE-сефароза				
I	0.15	8.9	2.6	1.4
II	1.12	0.715	23.0	1.7
III	3.53	0.5	72.0	1.0
IV	0.44	13.65	7.7	1.3
V	0.33	21.0	4.5	1.7
VI	<0.1	22.0	<0.5	3.4
Сефадекс G-75				
I	0.238	0.7	38	15
II	0.461	—	3.0	1.8
III	0.468	—	8.0	2.3
IV	0.185	0.1	4.4	1.2
V	0.095	0.3	3.0	1.3

Таким образом, в результате проделанной работы был получен в очищенном состоянии белок, обладающий защитной активностью с молекулярной массой 35 кДа.

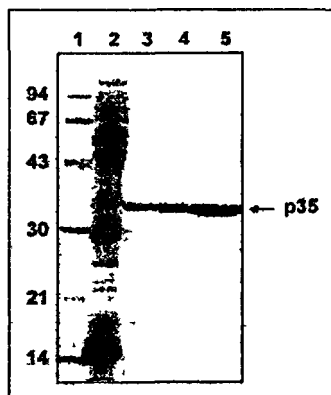


Рисунок 1. Электрофореграмма фракции III, полученной при разделении на сорбенте Сефадекс - G 75. 1,2 - стандарты, 3,4,5 - реактивирующий белок *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*.

Высокая степень очистки полученного белкового препарата была подтверждена с использованием метода ВЭЖХ.

В дальнейшем было проведено определение аминокислотной последовательности N-терминального и двух интернальных участков молекулы белка, что позволило охарактеризовать его как цистеинсинтазу: фермент, ответственный за синтез цистеина из O-ацетил-серина и сульфида водорода и контролируемый *cysK*-геном; полученные данные продемонстрировали высокую степень гомологии с цистеинсинтазами других бактерий: *S. haemoliticus*, *L. lactis*, *B. subtilis* (результаты представлены в таблице 2).

Таблица 2. Аминокислотные последовательности, характерные для антистрессового белка р35 выделенного из клеток *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* (a).

Белковое секвенирование	Наиболее близкий белок	Микроорганизм	pI	MM (kDa)	% степень гомологии	Номер наиболее близкого образца (b)
SAPIIDSITEILFNTPIVR (c)	цистеин синтаза	<i>Bacillus subtilis</i>	5.6	33	68	sw/P37887
LEUFNPAQSVK (d)	цистеин синтаза	<i>Lactococcus lactis</i>	5.2	33	90	sw/Q9CHF0
QGLGTGFV (e)	цистеин синтаза	<i>Staphylococcus haemoliticus</i>	фрагмент		88	sw/Q59918

- (a) pI = 4.95; MM = 35.0 kDa.
- (b) Данные по цистеинсинтазам других микроорганизмов получены из протеомной библиотеки (SwissProt library) с использованием программы FASTA.
- (c) Секвенирование N-концевого участка молекулы белка осуществлено с использованием реакции Эдмана.
- (d) Секвенирование внутреннего участка молекулы белка осуществлено с использованием масс - спектрометрии.
- (e) Представлен только фрагмент белка.

Двумерный электрофорез с использованием радиоактивной метки клеточного белоксодержащего экстракта *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, подвергнутого действию

различных стрессорных факторов, позволил проанализировать синтез полученного фермента в контрольном варианте и под действием различных стрессов. Полученные результаты показали индукцию синтеза цистеинсинтазы пропионовокислых бактерий под действием детергентов и нагревания (рис. 2). Была определена изоэлектрическая точка очищенного фермента, которая составила 4.95.

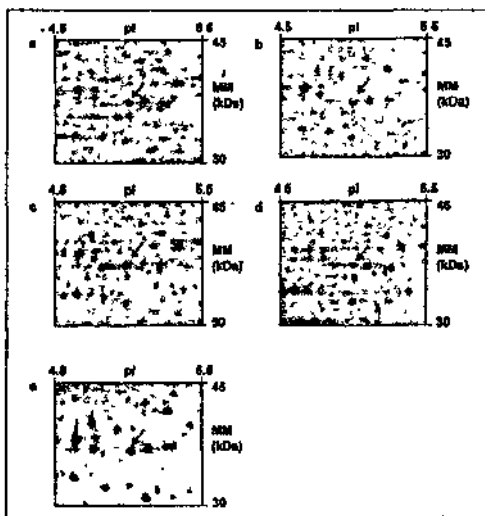


Рисунок 2. Результаты, полученные при двумерном электрофоретическом разделении суспензии клеток *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, содержащей белок, обладающий реактивирующей активностью, (а) Клетки не подвергнутые стрессу, (б) клетки подвергнутые кислотному шоку, (с) действию желчных кислот, (d) нагреванию, (е) УФ-облучению.

Реактивирующий эффект очищенного белкового препарата с молекулярной массой 35.0 kDa был продемонстрирован в отношении клеток *E. coli*, подвергнутых тепловому шоку и действию желчных кислот. Как следует из данных, представленных в таблице 3, постинкубация клеток *E. coli*, подвергнутых действию желчных кислот с реактивирующим белком, увеличивало их выживаемость почти в 9 раз. Постинкубация с реактивирующим белком клеток *E. coli*, подвергнутых термоинактивации увеличивало их выживаемость в 4 раза.

Таблица 3. Реактивирующий эффект белка с молекулярной массой 3S kDa в отношении действия желчных кислот и теплового стресса.

Стрессовые факторы	Инкубация с белком р35 (а) (пост)	Выживаемость клеток <i>E.coli</i> , (%) (b)
Контроль (с)	нет	100
Желчные кислоты (d)	нет	4.2
Желчные кислоты	да	30.2
Нагревание (е)	нет	22.6
Нагревание	да	84.9

- а) Клетки *E. coli* инкубировали 10 мин с белком р35 в концентрации 20 мг·л⁻¹.
- (b) Для каждой экспериментальной точки ставили три независимых эксперимента.
- (с) Клетки *E. coli*, не подвергнутые стрессу.
- (d) Клетки *E. coli* инкубировали 10 мин с желчными кислотами в концентрации 6 г·л⁻¹.
- (е) Клетки *E. coli* нагревали в течение 90 мин при 45°C.

Защитный эффект белкового препарата с использованием его различных концентраций был также продемонстрирован в отношении клеток *E. coli*, подвергнутых действию УФ-света. Полученные данные показали зависимость протекторного эффекта белка от его концентрации (рисунок 3).

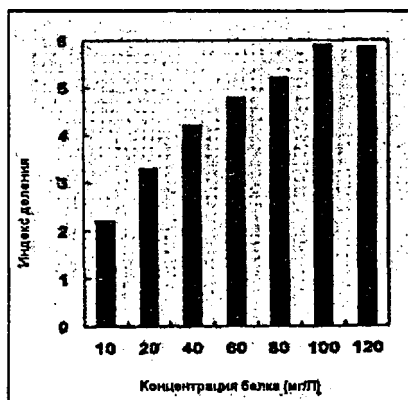


Рисунок 3. Зависимость протекторной активности белка от его концентрации в отношении клеток *E.coli*, инактивированных УФ-светом.

Возникает естественный вопрос о том, каким образом внутриклеточный белок, идентифицированный как цистеинсинтаза, может проявлять защитные и реактивирующие свойства в естественных условиях существования бактерий. Культуральная жидкость ПКБ указанные свойства не проявляла, следовательно, активный белок локализован только в клетках и во внешнюю среду не экскретируется. Видимо, этот белок проявляет свои защитные функции в стрессовых условиях, в которых часть, или большая часть клеток погибает и, подвергаясь дизису, выделяет свое содержимое наружу. В этом случае часть популяции, потенциально способная к репликации, но находящаяся в состоянии шока, получает сигнал, выраженный в присутствии в среде цистеинсинтазы, вероятно способной к связыванию с определенными мембранными рецепторами. Сигнал далее по каскадному механизму поступает в клетку, в которой активизируются естественные репарационные системы. Иными словами, обнаруженный нами внутриклеточный реактивирующий белок может выполнять жизненно важную роль для клеточной популяции в целом, обеспечивая существование вида в неблагоприятных условиях.

Антимутагенные свойства пропионовокислых бактерий.

Ранее Л.И. Воробьевой с соавторами (Воробьева и др., 1996; Vorobjeva 1999) с использованием модифицированного метода Эймса, было показано, что культуральная жидкость и клетки логарифмической фазы роста пропионовокислых бактерий обладают антимутагенным (АМ) действием, в отношении мутагенов, вызывающих как мутации замены пар оснований, так и мутации сдвига рамки считывания у бактерий. Было установлено, что антимутагенный фактор представлен относительно термоустойчивым веществом (веществами) пептидной природы с молекулярной массой менее 12 kDa.

Работы проводились главным образом с одним штаммом пропионовокислых бактерий — *Propionibacterium Jreudenreichii* subsp. *shermanii* ВКМ 101. а также с ограниченным набором веществ, обладающих мутагенной активностью. Широкого скринингового исследования различных видов и штаммов ПКБ не проводилось.

Настоящая работа представляет собой наиболее полное исследование АМ-свойств пропионовокислых бактерий, а также ряда представителей других видов бактерий, в отношении мутагенеза, индуцируемого соединениями различной химической природы и механизма действия.

Пропионовокислые бактерии, а также бифидобактерии и *Enterococcus faecalis* являются постоянными обитателями желудочно-кишечного тракта человека. Поэтому именно эти бактерии были выбраны нами в качестве объектов изучения их АМ-свойств. Дело в том, что почти все продукты как растительного, так и животного

происхождения (особенно при их процессинге), содержат то или иное количество мутагенов и канцерогенов. Мутагены образуют также некоторые бактерии (например, бактерии рода *Bacteroides*), обитающие в толстом кишечнике человека и животных. Поэтому возможность снижения количества мутагенов с использованием бактерий в качестве АМ-факторов имеет важное значение для улучшения здоровья людей и широкие перспективы их использования в биотехнологии.

В результате поставленных экспериментов была изучена антимутагенная активность 17 штаммов бактерий, при этом особое внимание уделялось изучению антимутагенеза пропионовокислых бактерий. В качестве источников антимутагенов использовали культуральную жидкость, а также «живые» и «убитые» клетки бактерий. Ранее (Lankaputhra, Shah, 1998) была показана АМ-активность «живых» и «убитых» клеток бифидобактерий и молочнокислых бактерий. В настоящей работе также определялась АМ-активность к.ж., «живых» и «убитых» клеток *B. bifidum* и *E. faecalis*, однако она не превышала антимутагенеза ПКБ. Было обнаружено, что не всегда «живые» бактериальные клетки проявляют антимутагенный эффект. Это показывает, что антимутагенная активность клеток не ограничивается лишь их сорбционными свойствами, но может включать дополнительные, пока неустановленные механизмы антимутагенеза. Было изучено мутагенное действие 8 различных мутагенов, часть из которых обладает канцерогенным действием. В качестве тест-культур применяли 4 тестерных штамма. 51 *typhimurium*, регистрирующих различные типы мутаций у бактерий: ТА 100, ТА 98, ТА 97, ТА 102. При этом удалось показать неодинаковую способность мутагенов индуцировать различные типы мутаций у тестерных штаммов. Для изучения влияния мутагенов на проявление АМ активности различными культурами пропионовокислых бактерий, использовали бенз(а)пирен и PhiP и два тестерных штамма *S. typhimurium*, дефектные по синтезу гистидина - ТА 98 и ТА 100, реагирующих на мутации сдвига рамки считывания и замены пар оснований соответственно. Результаты представлены на рисунках 4 и 5.

Так, мутагенная активность ВАР в отношении тестерного штамма *S. typhimurium* ТА 98 при использовании к.ж. в качестве антимутагенного фактора всех исследованных бактерий ниже, чем при исследовании активности вещества на штамм ТА 100, однако, при использовании в качестве АМ фактора клеток *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* КМ 133 активность ВАР ниже в отношении штамма ТА 100. Клетки *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* КМ 103 и *P. acidipropionici* CNRZ 86 не проявляют защитного эффекта в отношении мутагенеза, индуцированного ВАР. На основании полученных данных можно предположить, что способность вызывать мутации сдвига рамки считывания у

бенз(а)пирена ниже, чем его способность вызывать мутации замены пар оснований в молекуле ДНК.

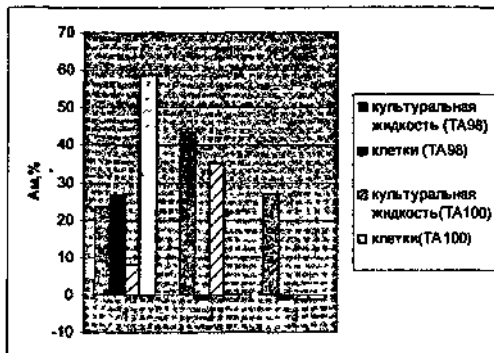


Рисунок 4. Влияние типа регистрируемой мутации на выражение антимутагенного эффекта при работе с бенз(а)пиреном.

1. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* KM 133
2. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* KM 103
3. *P. acidipropionici* CNRZ 86

Мутагенная активность PhiP в отношении штаммов *S. typhimurium* TA 98 и TA 100 при использовании КЖК. И клеток *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* KM 103 и *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* KM 133 в качестве АМ факторов различается незначительно. Это позволяет предположить, что PhiP обладает примерно одинаковой способностью вызывать мутации замены пар оснований и сдвига рамки считывания у бактерий.

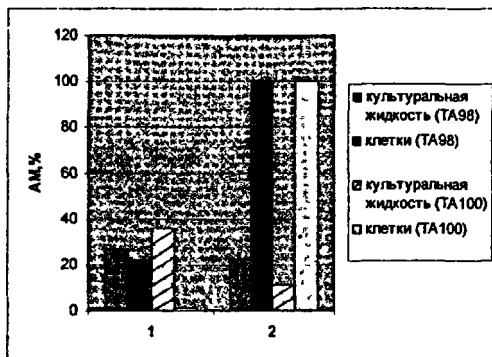


Рисунок 5. Влияние типа регистрируемой мутации на выражение антимуtagenного эффекта при работе с PhiP.

1. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* KM 103
2. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* KM 133

В ходе работы было изучено влияние на AM-активность бактерий компонентов различных сред, используемых для их выращивания. Как видно из данных, представленных в таблице 4, максимальный AM-эффект обнаруживается в случае использования к.ж., полученной при росте бактерий на синтетической среде (1). Эта среда почти не проявляла собственного антимуtagenного действия. В то время, как в случае двух других сред, AM-активность культуральной жидкости бактерий была почти в два раза ниже, а AM-действие самих сред достаточно высоким, особенно при использовании кукурузно-глюкозной среды. Поэтому в основных экспериментах мы использовали стандартную синтетическую среду, как наиболее подходящую.

Таблица 4. Влияние на АМ-активность ПКБ сред, используемых для их выращивания.

№	Варианты	Белок, мг/мл	Число ревертангов в чашке (X±SE)	АМ, %
1	синт. среда (1)		2097±123.3	0.5
2	к.ж. на среде (1)	0.4	465±24.9	89.5
3	синт.среда (2)+витамины		2099±87.3	27.2
4	к.ж. на среде (2)	0.1	1255±72.9	46.2
5	кук-глюк. среда (3)		1453±50.9	36.6
6	к.ж. на среде (3)	1.54	1296±46.9	44.2

*Примечание: спонтанный фон = 273 ±10.4 колоний; негативный контроль = 2106±224.8 колоний.

Было проведено исследование зависимости АМ-эффекта от возраста бактериальных культур. Исследовали 7,17,24,48 и 72 - часовые культуры (рис. 6,7, 8,9). Наибольшую АМ-активность проявляли культуры в ранней и поздней логарифмической фазе роста. На основании полученных данных в основных экспериментах использовали 24 и 48 - часовые культуры бактерий.

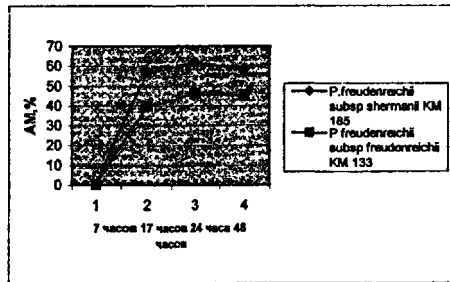


Рисунок 6. Антимутагенный эффект культуральной жидкости в отношении мутагенеза, индуцируемого 4-НХО, в зависимости от возраста культуры.

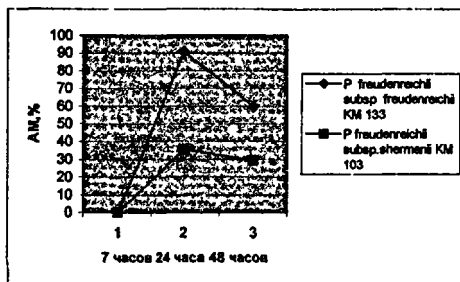


Рисунок 7. Антимутагенный эффект культуральной жидкости в отношении мутагена, индуцируемого H_2O_2 , в зависимости от возраста культуры.

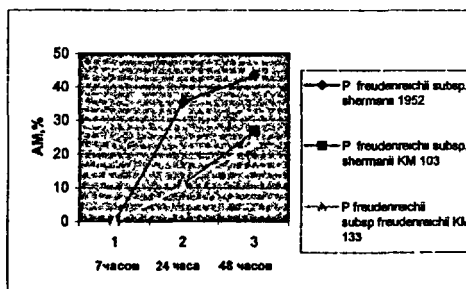


Рисунок 8. Антимутагенный эффект культуральной жидкости в отношении мутагена, индуцированного бенз(а)пиреном, в зависимости от возраста культуры.

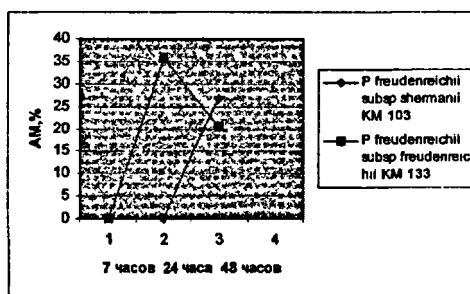


Рисунок 9. Антимутагенный эффект культуральной жидкости в отношении мутагена, индуцированного PhiP, в зависимости от возраста культуры.

В случае работы с мутагенами, требующими метаболической активации, были подобраны оптимальные концентрации микросомальной активирующей смеси для каждого из мутагенов (табл. 5,6).

Таблица 5. Влияние концентрации S9 mix на мутагенность ВАР, индуцирующего мутации у *S. typhimurium* TA 98.

Конц-я S9 mix	Конц-я ВАР (мкг/на чашку)	Среднее число ревертантов на чашку, X±SE
5%, 100 мкл/ на чашку	0.5	58.0±11.3
	2.0	72.0±9.9
	5.0	109.0±3.6
10%, 100 мкл/на чашку	0.5	88.7±14.2
	2.0	186.3±31.6
	5.0	206.7±38.6
10%, 500 мкл/на чашку	0.5	82.7±7.5
	2.0	197.7±7.5
	5.0	316.3±11.9

*Примечание: спонтанный фон = 18.0±1.4

Таблица 6. Влияние концентрации S9 mix на мутагенность PhiP, индуцирующего мутации у *S. typhimurium* TA 98.

Конц-я S9mix	Конц-я PhiP (мкг/на чашку)	Среднее число ревертантов на чашку, X±SE
5%, 100 мкл/на чашку	0.05	95.0±7.5
	0.125	224±19.8
	0.25	283±50.5
10%, 100 мкл/на чашку	0.05	119.3±0.6
	0.125	265.3±50.5
	0.25	605.7±45.5

*Примечание: спонтанный фон = 12.7±4.2

Изначально использовали 5% S9 mix в количестве 100 мкл/на чашку как для ВАР, так и для PhiP. Однако, при данной концентрации смеси не наблюдалось ярко выраженного ответа. Поэтому в дальнейшей работе мы увеличили концентрацию микросомальной смеси и использовали 10% S9 mix в количестве 500 мкл/на чашку при

работе с бенз(а)пиреном и 10% S9 mix в количестве 100 мкл/на чашку при работе с 2-амино-1-метил-5-фениоимидазопиридином. Это показывает, что содержание микросомальной фракции имеет неодинаковое действие на проявление мутагенности исследуемых веществ.

Концентрацию мутагенов подбирали путем изучения их влияния на рост тест-культур и использовали концентрации не вызывающие подавления роста бактерий.

Среди штаммов пропионовокислых бактерий, полученных из различных источников обитания, был проведен скрининг, целью которого явилось изучение их антимутагенной активности в отношении мутагена 4-НХО и отбор наиболее перспективных штаммов с точки зрения их АМ-эффекта. 4-НХО был выбран на начальном этапе исследования в связи с тем, что представляет собой стабильное химическое соединение, обладает сильным канцерогенным действием, не требует метаболической активации, а также в связи с высокой воспроизводимостью результатов. Со штаммами, проявляющими выраженный антимутагенный эффект были проведены дальнейшие исследования. Их АМ-активность тестировали в отношении мутагенов, вызывающих различные типы мутаций. Особое внимание было уделено изучению АМ-активности двух близкородственных штаммов: *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* КМ 103, *P. freudenreichii* subsp. *freuuknreichii* КМ 133, поскольку они проявляли высокую антимутагенную активность, а также, потому что именно эти виды бактерий имеют наибольшее практическое применение. Результаты исследований представлены на рисунках 10 и 11.

Как видно из рисунка 10, что к.ж. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* КМ 103 и *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* КМ 133 полностью снимали мутагенность NaN₃. К.Ж. других исследуемых штаммов также обладали значительным антимутагенным эффектом. Наиболее ярко выраженный АМ-эффект проявляли клетки *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* КМ 103 и *P. globosum* КМ 38. Антимутагенность клеток других исследуемых штаммов также была весьма высокой (>60%).

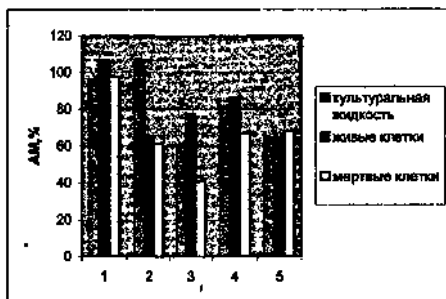


Рисунок 10. Антимутагенное действие культуральной жидкости и клеток пропионовых бактерий в отношении мутагена, индуцируемого азидом натрия у *S. typhimurium* TA 100.

*Примечание: пропионовые бактерии выращивали в течение 48 ч., время предынкубации с мутагеном составило 30 мин.

1. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* KM 103
2. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* KM 133
3. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* KM 54
4. *P. globosum* KM 38
5. *P. petersonii* KM 6

Из данных, представленных на рисунке 11, видно, что юж. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* KM 103 практически полностью снимала мутагенный эффект 4-НХО (AM эффект 99.0%). К.Ж. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* KM 54 снижает мутагенный эффект 4-НХО на 59.9% Ингибиторный эффект к.ж других исследуемых бактерий был несколько ниже. Защитный эффект живых клеток довольно высок во всех исследуемых штаммах. Значительное снижение AM эффекта у мертвых клеток наблюдалось лишь в случае. *P. globosum* KM 38 и *P. petersonii* KM 6.

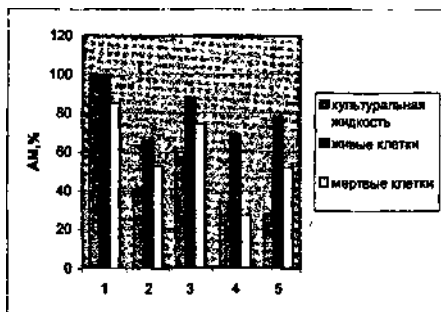


Рисунок П. Антимутагенное действие культуральной жидкости и клеток пропионовокислых бактерий в отношении мутагенеза, индуцируемого 4-НХО у *S. typhimurium* TA 100.

Примечание: пропионовые бактерии выращивали в течение 48 ч., время предынкубации с мутагеном составило 15 часа.

1. *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* KM 103
2. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* KM 133
3. *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* KM 54
4. *P. globosum* KM 38
5. *P. petersonii* KM 6

Для идентификации природы антимутагенного фактора было изучено влияние диализа, нагревания (92°C, 15 мин.) и протеолиза на АМ-активность культуральной жидкости. Как видно из данных, представленных на рисунке 12, антимутагенный фактор представлен относительно термоустойчивым соединением белковой природы с молекулярной массой более 2.0 но менее 12.0 kDa (рис. 12).

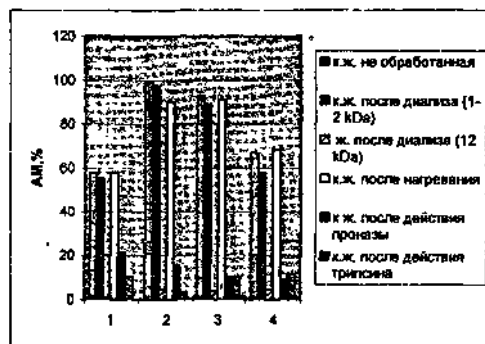


Рисунок 12. Влияние диализа, нагревания и протеолиза на антимуtagenное действие культуральной жидкости в случае мутагенеза, индуцируемого МННГ, 4-НХО, NaN_3 , 9-AA.

Впервые данные об антимуtagenном действии внеклеточного пептида *Streptomyces griseus* были представлены в работе японских исследователей (Osawa et al, 1986).

Хотя эксперименты ставились по схеме дисмутагенеза (предынкубация мутагена с антимуtagenом), тем не менее, мы не можем утверждать, что АМ-действие бактерий ограничивается только дисмутагенезом. Поскольку инкубационная смесь вносилась в чашки Петри с тест-культурой и инкубировалась в течение 48 часов, можно предположить функционирование двойственного механизма АМ-действия, то есть наряду со способностью бактерий к дисмутагенезу, не исключена их способность выступать в роли источников биоантимутагенов.

Таким образом, в настоящей работе представлены новые дополнительные факты, обуславливающие полезные свойства пропионовокислых бактерий, которые открывают дальнейшие перспективы их практического использования.

ВЫВОДЫ

1. Из клеток *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* выделен и очищен до гомогенного состояния внутриклеточный белок обладающий защитной и реативирующей активностью в отношении *E. coli*, подвергнутой УФ-облучению, нагреванию, действию желчных кислот. Молекулярная масса активного белка 35.0 kDa.
2. Очищенный белок охарактеризован как цистеинсинтаза. Установлена высокая степень гомологии активного белка с цистеинсинтазами других бактерий.

3. Показана АМ-активность к.ж., «живых» и «мертвых» клеток ПКБ при изучении широкого спектра мутагенных веществ, вызывающих мутации замены пар оснований и сдвига рамки считывания у бактерий.
4. Показано, что «живые» клетки ПКБ проявляют более высокий АМ-эффект, чем «мертвые», что не исключает участия дополнительных механизмов антимутагенеза наряду с физической сорбцией.
5. Антимутагенез связан с дисмутагенной активностью бактерий, хотя не исключен механизм биоантимутагенеза.
6. Установлено, что основной ингибитор мутаций представлен относительно термоустойчивым веществом белковой природы.
7. Полученные результаты демонстрируют, новые дополнительные свойства пропионовокислых бактерий как пробиотиков и как новых источников антимутагенных веществ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Пономарева Г.М., Варюхина С.Ю. Антимутагенность как дополнительное свойство пропионовокислых бактерий для использования в пище и в процессинге пища // 3rd International Conference on Predictive Modelling in Foods. Leuven, Belgium. September 2000. P. 182-184.
2. Воробьева Л.И., Ходжаев Е.Ю., Пономарева Г.М., Варюхина С.Ю., Новые применения пропионовокислых бактерий. // International Symposium "Propionibacteria". Zurich, Switzerland. June 2001. P. 12.
3. Воробьева Л.И., Ильясова О.В., Ходжаев Е.Ю., Пономарева Г.М. и Варюхина С.Ю. Ингибирование индуцированного мутагенеза у *Salmonella typhimurium* белком *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. Анаеробе. 2001. V. 7. P. 37-44.
4. Воробьева Л., Леве́рриер П., Зинченко А., Боявал П., Ходжаев Е., Варюхина С., Пономарева Г., Гордеева Е., Ян Г. // Антистрессовая активность *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*: идентификация реактивирующего белка. Antonie Van Leeuwenhoek. 2004. V 85. № 1. P. 53-62.

Подписано в печать 29.03.2004
Формат 60x84^{1/6} Объем 1,5 п. л.
Тираж 50 экз. Зак. 159

АНО «Издательство МСХА»
127550, Москва, ул. Тимирязевская, 44

№ - 75 14