

**СУПРУН С.М., ДОНЧЕНКО Г.В., ПАРХОМЕНКО Ю.М., \*КУРЧЕНКО И.Н., \*ХАРКЕВИЧ Е.С., \*НОГИНА Т.М., КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М.**

*Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Украина, 01601, Киев, ул. Леонтовича, 9, e-mail: sst @biochem.kiev.ua*

*\*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАНУ, Украина, Киев, ул. Заболотного, 154.*

## **БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОФЕРМЕНТА А (СОА)**

Кофермент А (СоА) является одним из важнейших коферментов осуществляющих перенос ацильных групп чрезвычайно необходимых в процессах клеточного метаболизме, особенно в биосинтезе жирных кислот. Учитывая его важную роль в обмене веществ, внимание исследователей привлекает СоА, в качестве потенциального препарата, который может обладать корригирующими при нарушениях клеточного метаболизма, вызванных различными заболеваниями (ишемическая болезнь сердца, острые нарушения мозгового кровообращения, атеросклероз, сахарный диабет и т.п.). Экспериментальными исследованиями было показано, что дисульфид СоА и его предшественники могут использоваться в лечебных целях [1]. Однако, получение кофермента А с применением химического синтеза в промышленном масштабе достаточно сложный и не эффективный процес. Не исключено, что хорошей альтернативой ему может быть биотехнологический способ получения препарата, который является более рентабельным и широко используется у высоко развитых странах. При этом наиболее эффективными с точки зрения биотехнологии получения СоА оказались штаммы *Brevibacterium* обладающие высокой биосинтетической активностью, которые начали широко использовать [2, 3]. В качестве потенциального источника СоА в последние годы большое внимание уделяется грибам, которые богаты на разнообразные биологически активные вещества, многие из которых нашли применения для получения лекарственных средств. [4–6]. В связи с эти поиск новых продуцентов сверхпродуцентов СоА, пантотеновой кислоты (ПАК) и других биологически-активных соединений остается актуальным. Преимущество грибов состоит в том, что они нетребовательны к субстрату для культивирования, устойчивы к изменениям природных условий и достаточно технологичны. Цель данного исследования — разработка биотехнологии получения СоА на основе селекционированных штаммов-продуцентов.

### **Материалы и методы**

Нами был проведен скрининг штаммов-продуцентов СоА и его предшественников среди различных таксономических групп микромицетов и бактерий коллекции культур микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии. Для определения СоА микромицеты выращивали глубинным способом на синтетической среде Чапека на качалках при 240 об/мин в течение 3-х суток, в то время как бактерии выращивали в течении двух суток на среде Хоттингера с 1,5% пептона и 1% дрожжевого экстракта. Селекцию штамма продуцента *Corynebacterium ammoniagenes B-6* — прово-

дили с использованием различных методов мутагенеза (обработка клеток нитрозогуанидином, 2% раствором 2-дезоксид-Д-глюкозы, ультрафиолетом в разных дозах), с последующим применением метода тотального отбора. Содержание биологически активных веществ в грибах и в препарате определяли на основании отработанных методов, приведенных в справочнике по микологии [7]. Пантотеновую кислоту, тиамин, биотин определяли микробиологическим методом, никотиновую кислоту и витамин Е — спектрофотометрическим [8]. Кофермент А определяли спектрофотометрически по модифицированному методу Garland [9] в сопряженной реакции с изолированным из печени свиньи  $\alpha$ -кетоглутарат — дегидрогеназным комплексом. Для приготовления полиферментного препарата в виде микробиальных сухих клеток *Corynebacterium ammoniagenes* культивировали в течение 48 час при температуре 28–32 °С на среде следующего состава (%): глюкоза-1, пептон-1,  $K_2HPO_4$  — 0,3, NaCl — 0,2,  $MgSO_4$  — 0,02, дрожжевой экстракт — 0,1, pH 7,0–7,5. Накопление биомассы оценивали с помощью взвешивания или нефелометрическим методом с последующим пересчетом на абсолютно сухую массу. Полученную путем центрифугирования влажную биомассу промывали физиологическим раствором, затем обрабатывали охлажденным уксусом (в соотношении 1:10). Клетки подсушивали в эксикаторе. Сухие клетки хранили в морозильной камере при –18 °С. Инкубирование клеток (150–200 мг/мл) осуществляли согласно стандартного метода при постоянном перемешивании (140 об/мин) при температуре 30–32 °С в течение 15–17 час в реакционной среде следующего состава: ПАК-5 мкМ, АТФ-Na-15 мкМ,  $MgSO_4$  7 H<sub>2</sub>O-10 мкМ, L-цистеин 10 мкМ в 0,1 М калий фосфатном буфере, pH 6,5–7,0. Выделение и очистку CoA-дисульфида осуществляли с использованием хроматографии на анионообменниках типа DEAE-целлюлозы.

### Результаты и обсуждение

Способность микромицетов синтезировать CoA была изучена на основе отобранных ранее штаммов сверсинтетиков пантотеновой кислоты. Среди представителей микромицетов принадлежащих к роду *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mycelia* селекционирован штамм *Fusarium sambucinum* ИМВ F-10011 с сверхсинтезом CoA. Отобранный штамм также обладал способностью сверхсинтеза некоторых витаминов, значительным образованием ненасыщенных жирных кислот (арахидоновой, олеиновой) и других биологически активных веществ, табл. 1.

Изучен экзо- и эндоцеллюлярный синтез CoA в процессе роста гриба-продуцента. Значительный биосинтез CoA отмечен в экспоненциальной фазе роста, максимальная скорость роста гриба ( $\mu$ -02 час<sup>-1</sup>). Установлено, что внесение добавок (пептона, дрожжевого экстракта, зернового экстракта) в 1,5–2 раза увеличивало биосинтез CoA. Среди коллекционных культур бактерий (*Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*) отобран штамм *Corynebacterium ammoniagenes*, синтезирующий значительные количества CoA. Проведена селекция штамма позволила отобрать 120 вариантов для

Таблица 1

**Биосинтез CoA и других биологически активных веществ штаммом *Fusarium sambucinum* при культивировании на среде Чапека**

Витамины, мкг/г							Хитин, %
Тиамин	Никотиновая кислота	Пантотеновая кислота	Биотин	$\alpha$ -токоферол	CoA	NAD	
4,0–4,5	280–360	420–600	5,6–6,1	7,8–10,0	420	400	12,9

Таблица 2

**Влияние ПАК и ее производных на биосинтез CoA**

№ п/п	Наименование предшественника	Содержание CoA г/л
1	D-ПАК, Са-соль	3,7
2	D-пантолактон	0
3	Бета-аланин	0
4	D-пантотениловый спирт	0
5	ФПК	8,0
6	Циклофосфо-ПАК	1,7
7	D-пантетин	2,8
8	S-сульфопантетин	1,4

выявления среди них таковых с повышенным синтезом CoA. Выявлен активный вариант, который продуцировал кофермента А на 40% больше по сравнению с исходным. Штамм *Corynebacterium ammoniagenes B-6* депонирован и хранится в коллекции промышленных микроорганизмов ВНИИ генетики (Москва, Россия), а также в коллекции культур микроорганизмов Украины (Институт микробиологии и вирусологии НАНУ) Известно, что для повышения выхода витаминов, ферментов и других биологически активных веществ, а также улучшения технологических показателей используют совместное культивирование. В наших исследованиях для совместного культивирования *Brevibacterium ammoniagenes* использован штамм *Fusarium sambucinum* как источник пантотеновой кислоты, АТР и других биологически активных веществ. Культивирование проводили на среде Чапека с внесением 1,5% пептона и 1% дрожжевого экстракта, после 24 часов культивирования к *Fusarium sambucinum* подсеивали *Corynebacterium ammoniagenes* с последующим культивированием до 48 часов. Выход CoA увеличился в 1,5 раза.

Было изучено влияние ПАК и ее производных на биосинтез CoA, табл. 2. Как видно из результатов опыта, только использование ПАК, 4-фосфопантотената кальция (ФПК) вместо ПАК способствовало повышению концентрации CoA в инкубационной среде по сравнению с ПАК. Другие производные, такие как D-пактолактон, D-пантотениловый спирт не являлись субстратами для данной полиферментной системы.

Проведенные исследования позволили разработать биотехнологический способ получения СоА на основе штамма *Corynebacterium ammoniagenes* с внесением в культуральную среду экзогенных химически синтезированных предшественников. Образцы клеток, в которых концентрация СоА была не менее 2,0–2,5 мг/мл объединяли и после инкубации клетки отделяли центрифугированием после чего определяли СоА. В результате биосинтетической реакции получали смесь, состоящую из СоА, его предшественников или продуктов их трансформации, неорганических солей. Разработанный метод позволил получить препараты СоА с содержанием кофермента до 90%. Селекционированные штаммы могут быть использованы для получения СоА в промышленных условиях, что же касается штамма *Fusarium sambucinum*, то он может найти применение для получения различных пищевых добавок.

### Выводы

Таким образом нами выявлены штаммы-продуценты СоА среди различных таксономических групп микроорганизмов. Наиболее активные биосинтетики СоА найдены среди *Corynebacterium*. Получен сверхсинтетик *Corynebacterium ammoniagenes*. Проведенная селекция с использованием методов мутагенеза штамма *Corynebacterium ammoniagenes* позволила получить вариант кофермента А на 40% более активный по сравнению с исходным. Изучение влияния ПАК и ее производных на биосинтез СоА у *Corynebacterium ammoniagenes* показало, что ФПК способствовало повышению концентрации СоА в инкубационной среде в 2–3 раза. Разработан биотехнологический способ получения СоА на основе микробных клеток продуцента в сочетании с химически синтезированными предшественниками.

### Литература

1. Копелевич В.М., Цибульская М.И., Ковлер М.А., Гунар В.И. Кофермент А. Методы получения и применения в медицине // Лек. Средства. Эк. Техн. Перспективы получения.— М.: 1989.— В.5.— С. 1–30.
2. Копелевич В.М., Гунар В.И. Химия природных соединений.— 1989.— №4.— С. 477–492.
3. Поморцева Н.В. Перспективы получения витаминов и коферментов с помощью микроорганизмов // Химико-фармацевтический журнал.— 1986.— В.8.— С. 965–974.
4. Shimizu S., Yamada H. 3-Eur. Congr. Biotechnol. Munchen.— 1984.— V.1.— P. 10–14.
5. Wainwright M. Novel use of fungi in biotechnology // Chem.— 1990.— №2.— P. 131–134.
6. Hoobs Ch. Medicinal mushrooms an exploration of tradition healing and culture.— Botanica press. Santa Cruz, С.А.— 1995.— 251 p.
7. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии.— К.: Наукова думка, 1982.— С. 261–268.
8. Островский Ю.М. Экспериментальная витаминология.— Минск, Наука и техника.— 1979.— 546 с.
9. Клинов С.В., Клинова Н.И., Цибульская М.И., Суворова Е.Е. и др. // Биотехнология.— 1990.— №6.— С. 94–96.

## Резюме

Среди различных таксономических групп микроорганизмов — митоспоровых грибов и бактерий были селекционированы штаммы продуценты CoA *Fusarium sambucinum* и *Corynebacterium ammoniagenes*. С применением методов мутагенеза получен сверхсинтетик *Corynebacterium ammoniagenes B-6*. Разработан биотехнологический способ получения CoA на основе микробных клеток-продуцента в сочетании с химически синтезированными предшественниками, что позволит получать препараты CoA с высоким его содержанием.

Серед різних таксономічних груп мікроорганізмів — мітоспорових грибів та бактерій були селекціоновані штами продуценти CoA *Fusarium sambucinum* і *Corynebacterium ammoniagenes*. З використанням методів мутагенезу одержано надсинтетик *Corynebacterium ammoniagenes B-6*. Розроблено біотехнологічний засіб одержання CoA на основі мікробних клітин-продуценту в поєднанні з хімічно синтезованими попередниками, що дозволить отримувати препарати CoA з його високим вмістом.

We have selected CoA producers strains *Fusarium sambucinum* and *Corynebacterium ammoniagenes* among different taxonomic groups of microorganisms — mitospore fungi and bacteria. It was obtained CoA supersynthetic strain *Corynebacterium ammoniagenes B-6* using mutagenic methods. The biotechnological method of CoA production was developed based on microbial producer cells in cooperation with chemically synthesized precursors. This method will allow to produce CoA preparations with its high content.

## ТРЕТЬЯКОВА И.Н.

Учреждение академии наук, Институт леса им.В.Н.Сукачева

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, e-mail: culture@rsc.krasn.ru

## ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ РЕПРОДУКТИВНОГО ПРОЦЕССА ХВОЙНЫХ *IN VIVO* И В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

У представителей хвойных растений потенциально заложены множественные пути реализации их репродуктивного потенциала: наличие полиархегониальности, кливажа и полиэмбрионии, а также возможность асексуального возникновения зародыша (Минина, Ларионова, 1979; Третьякова, 1990). В развитии гаметофита от архегоният к *Coniferales* в филогенезе прослеживаются следующие тенденции: 1 — постепенная ликвидация заростка; 2 — акселерация генеративного цикла; 3 — акселерация гаметофитогенеза; 4 — усиление физиологической активности гаметофита; 5 — проявление апомиксиса. Последний наиболее часто встречается у прогрессивных и высокоорганизованных семейств покрытосеменных растений (Хохлов, 1970; Минина, Ларионова, 1979).

Цель данной работы — проанализировать особенность репродуктивного процесса у хвойных видов *in vivo* и в культуре *in vitro* и обсудить возмож-