

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ  
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

**МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ**

**Microbiology & Biotechnology**

**№ 3(15)**

**2011**

# MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL  
№ 3(15) 2011



## EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsia

## CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova

## EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka

## EDITORIAL BOARD MEMBERS

I.V. Dovgal, V.O. Fedorenko, B.M. Galkin, P.I. Gvozdyak, R.I. Gvozdyak, S.P. Gudz, G.O. Iutynska, L.V. Kapreliants, O.A. Kiprianova, N.K. Kovalenko, I.K. Kurdish, B.P. Matselyukh, B.N. Milkus, G.G. Minicheva, M. Niemialtowsky, V.P. Patyka, V.S. Pidgorskyi, V.P. Polishuk, V.K. Pozur, I.S. Sherbatenko, I.G. Skrypal, M. Ya. Spivak, A.A. Sybirny, Yu.M. Sivolap, V.M. Totsky, F.I. Tovkach, L.D. Varbanets, A.I. Vinnikov, Yu.L. Volyanskiy, Yu.P. Zaytsev, N.M. Zhdanova

## Scientific editor V.O. Ivanytsia

*Accepted for publishing articles are reviewed*

The journal is established by Odesa National Mechnykov University.  
Registration certificate: KV № 11462-335R. Date of issue 07.07.2006.

**The journal was included to the list of Ukrainian scientific editions by the Presidium of High Attestation Commission (№ 1-05/2 from 27.05.2009).**

## PUBLISHERS

Odesa National Mechnykov University  
Society of Microbiologists of Ukraine named after S.M. Vinogradsky  
Odesa Society of Biologists and Biotechnologists

Approved for publishing by Academic Council  
of Odesa National Mechnykov University

Publishing editor N.G. Yurgelaitis  
Editors: I.M. Omelchenko, L.B. Kotlyarova, I.V. Rayko

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University  
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine  
Tel.: 723-28-39, 748-11-01  
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

[www.mbt.onu.edu.ua](http://www.mbt.onu.edu.ua)

# МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ  
№ 3(15) 2011



**ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР**

В.О. Іваниця

**ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА**

Т.О. Філіпова

**ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР**

Т.В. Бурлака

**РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:**

Л.Д. Варбанець, А.І. Вінніков, Ю.Л. Волянський, Б.М. Галкін, П.І. Гвоздяк, Р.І. Гвоздяк, С.П. Гудзь, І.В. Довгаль, Н.М. Жданова, Ю.П. Зайцев, Г.О. Іутинська, Л.В. Кап-рельянци, О.А. Кіпріанова, Н.К. Коваленко, І.К. Курдиш, Б.П. Мацелюх, Б.Н. Міл-кус, Г.Г. Мінічева, М. Немялтовський, В.П. Патика, В.С. Підгорський, В.К. Позур, В.П. Поліщук, А.А. Сибірний, Ю.М. Сиволап, І.Г. Скрипаль, М.Я. Співак, Ф.І. Товкач, В.М. Тоцький, В.О. Федоренко, І.С. Щербатенко

**Науковий редактор випуску В.О. Іваниця**

*Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються*

*Журнал заснований*

*Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова*

*Свідоцтво: серія КВ № 11462-335Р від 07.07.2006 р.*

**Постановою Президії ВАК від 27.05.2009 № 1-05/2 журнал внесено до переліку наукових фахових видань України**

**ВИДАВЦІ**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова  
Товариство мікробіологів України імені С.М. Виноградського  
Товариство біологів і біотехнологів м. Одеси

Затверджено до друку Вченою радою  
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова

Завідувач редакцією Н.Г. Юргелайтіс

Редактори: І.М. Омельченко, Л.Б. Котлярова, І.В. Райко

Адреса редакції:

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

Тел.: 723-28-39, 748-11-01

e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

[www.mbt.onu.edu.ua](http://www.mbt.onu.edu.ua)

## CONTENTS

### OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

<b>B.M. Galkin, V.O. Ivanytsia, M.B. Galkin</b> BACTERIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE .....	6
--	---

### EXPERIMENTAL WORKS

<b>V.S. Pidgorskyi, L.N. Shynkarenko-Sichel, N.A. Timoshok,</b> <b>A.V. Cheipesh, N.Y. Spivak</b> EFFECTS OF DRY ENZYMATIC LYSATE DEL-IMMUNE V <sup>®</sup> ON CYTOKINE PRODUCTION IN THE EXPERIMENTAL MODELS .....	23
--	----

<b>N.A. Matvieieva, A.O. Potrokhov, Yu.I. Kudriavets,</b> <b>O.Yu. Kvasko, A.M. Shakhovsky</b> SENSITIVITY OF TRANSGENIC CHICORY PLANTS WITH HUMAN INTERFERON ALPHA 2B GENE TO DAMAGE BY TOBACCO MOSAIC VIRUS .....	37
---	----

<b>R.V. Mikhailova</b> PROTEOLYTIC ENZYMES OF MYCELIAL FUNGI .....	47
---	----

<b>K.V. Lystvan, V.O. Prykhodko, N.P. Rybalchenko,</b> <b>N.M. Volynets, A.M. Ostapchuk, M.V. Kuchuk</b> ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF CALLUS CULTURES AND ASEPTIC PLANTS OF <i>PSORALEA DRUPACEA</i> BUNGE .....	63
--	----

<b>I.I. Gulyiaeva, O.V. Shevchenko, G.O. Snigur, A.S. Bisov,</b> <b>B.N. Milkus</b> SPREAD OF WHEAT DWARF VIRUS (WDV) ON THE SOUTH OF UKRAINE .....	71
--	----

<b>T.A. Krupodiorova, V.Yu. Barshteyn, N.A. Bisko, T.S. Ivanova</b> CONTENT OF MYCELIAL BIOMASS AND CULTURE LIQUID OF <i>CORDYCEPS SINENSIS</i> (BERK.) SACC. (ASCOMYCETES) .....	78
---	----

<b>O.V. Chaika, O.V. Fedotov</b> GROWTH AND INTENSITY OF LIPID PEROXIDATION PROCESSES OF <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> P-107 STRAIN ON TWO NUTRIENT MEDIA .....	88
---	----

<b>V.Yu. Barshteyn</b> FIRST STEPS OF VIROLOGY IN THE MONUMENTS OF PHILATELY AND NUMISMATICS .....	96
--	----

INFORMATION FOR THE AUTHORS .....	112
-----------------------------------	-----

## З М І С Т

### ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

<b>Б.М. Галкін, В.О. Іваниця, М.Б. Галкін</b> БАКТЕРІАЛЬНІ СИНТЕТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ .....	6
--	---

### Е К С П Е Р И М Е Н Т А Л Ь Н І П Р А Ц І

<b>В.С. Підгорський, Л.М. Шинкаренко-Сішел, Н.О. Тимошок, А.В. Чейпеш, М.Я. Співак</b> ЕФЕКТ СУХОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО ЛІЗАТУ DEL-IMMUNE V <sup>®</sup> НА ПРОДУКЦІЮ ЦИТОКИНІВ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ МОДЕЛЯХ .....	23
--	----

<b>Н.А. Матвєєва, А.О. Потрохов, Ю.Й. Кудрявець, О.Ю. Кваско, А.М. Шаховський</b> ЧУТЛИВІСТЬ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ЦИКОРІЮ З ГЕНОМ ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА 2В ЛЮДИНИ ДО УРАЖЕННЯ ВІРУСОМ ТЮТЮНОВОЇ МОЗАЇКИ .....	37
--	----

<b>Р.В. Міхайлова</b> ПРОТЕОЛІТИЧНІ ФЕРМЕНТИ МІЦЕЛІАЛЬНИХ ГРИБІВ.....	47
--	----

<b>К.В. Листван, В.О. Приходько, Н.П. Рибальченко, Н.М. Волинець, А.М. Остапчук, М.В. Кучук</b> АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТІВ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР ТА АСЕПТИЧНИХ РОСЛИН <i>PSORALEA DRUPACEA</i> <i>BUNGE</i> .....	63
---	----

<b>І.І. Гуляєва, О.В. Шевченко, Г.О. Снігур, А.С. Бісов, Б.Н. Мілкус</b> ПОШИРЕННЯ ВІРУСУ КАРЛИКОВОСТІ ПШЕНИЦІ НА ПІВДНІ УКРАЇНИ .....	71
--	----

<b>Т.А. Круподьорова, В.Ю. Барштейн, Н.А. Бісько, Т.С. Іванова</b> СКЛАД МІЦЕЛІАЛЬНОЇ МАСИ ТА КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ <i>CORDYCEPS SINENSIS</i> (BERK.) SACC. (ASCOMYCETES).....	78
---	----

<b>О.В. Чайка, О.В. Федотов</b> РІСТ ТА ІНТЕНСИВНІСТЬ ПРОЦЕСІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ШТАМУ <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> P-107 .....	88
---	----

<b>В.Ю. Барштейн</b> ПЕРШІ КРОКИ ВІРУСОЛОГІЇ В ПАМ'ЯТКАХ ФІЛАТЕЛІЇ І НУМІЗМАТИКИ .....	96
--	----

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ .....	108
---	-----

УДК 579.017.7: 577.151.3

Б.М. Галкін, В.О. Іваниця, М.Б. Галкін

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: bgalkin@ukr.net

## БАКТЕРІАЛЬНІ СИНТЕТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ

У статті представлено огляд сучасних наукових публікацій про молекулярну структуру, механізми синтезу, молекулярну біологію, генетику і біологічні функції бактеріальних синтетаз оксиду азоту.

Ключові слова: бактеріальні синтетази оксиду азоту, гени NO-синтез, регуляторна та сигнальна функції.

У ссавців оксид азоту (NO) бере участь у багатьох біологічних процесах. Він регулює кров'яний тиск і здійснює захист від патогенних мікроорганізмів, виконує сигнальну функцію та ін. [3]. Синтетази оксиду азоту ссавців (mNOSs) є строго регульованими комплексами ферментів, які каталізують окиснення L-аргініну до цитруліну і NO (рис. 1).

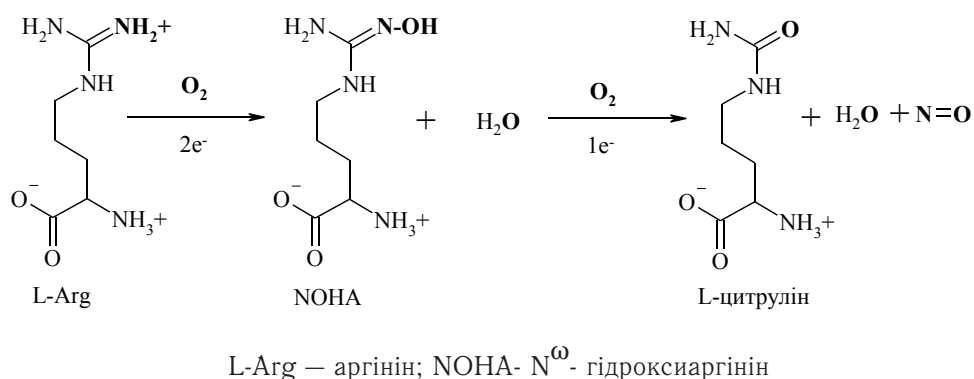


Рис. 1. Окиснення L-аргініну до цитруліну і оксиду азоту за допомогою синтетази оксиду азоту [48]

Fig. 1. Oxidation of L-arginine to citrulline and nitric oxide by nitric oxide synthase

У бактеріальних геномах були знайдені гени, що кодують гомологи синтетази оксиду азоту [50], вивчена ферментна активність у лізатах різних бактеріальних клітин, виділені окремі ферменти, які відповідають за синтез оксиду азоту та вивчена їх молекулярна структура [14]. Виявилось, що бактеріальні NO-синтетази (bNOS) виконують у прокариотів різноманітні функції, які відрізняються від функцій цих ферментів у багатоклітинних організмів. Проведення рентгеноструктурного аналізу деяких бактеріальних ферментів синтезу оксиду азоту дозволило визначити їх схожість та відмінності від синтетаз оксиду азоту багатоклітинних організмів. Бактеріальні NOS відрізняються від mNOSs коротшою доменною структурою. Крім того, ця ферментна система бактерій є розчинною, тому її легко виділити та очистити. У деяких прокариотів bNOS є термостабільною.

### Біохімія і геноміка бактеріальних синтетаз оксиду азоту

Дослідження з пошуку синтетаз оксиду азоту у бактерій почалися більше десяти років тому. На початку у деяких бактерій, таких як *Nocardia species* та *Lactobacillus fermentum*, було показано, що у них утворюється нітрит при додаванні у живильне середовище L-аргініну, а також при дії інгібіторів синтетаз оксиду азоту відбувається зниження рівня оксиду азоту [13,35]. Проте, багато бактерій здатні синтезувати оксид азоту не тільки за допомоги NOS. Наприклад, фермент нітратредуктаза може перетворити нітриту у NO при низькій концентрації нітратів [57]. Крім того, в циклі сечовини при деімінізації аргініну також може утворюватися цитрулін [55], або за допомоги аргінази, або орнітинкарбамоїлтрансферази [23, 52].

Тим не менше, у даний час немає сумнівів, що бактерії і археї містять NOS-подібні білки [40]. Було показано, що нуклеотидна послідовність у гені, що кодує bNOS, подібна з такою ж ділянкою гена, який кодує mNOSs. Білки мають схожість у N-кінцевій амінокислотній послідовності оксигеназного домену (NOSox) [29, 56]. NOS-подібні білки в основному знайдені у грампозитивних бактерій, хоча вони також були виявлені й у грамнегативних бактерій і архей. У всіх прокариотних NOS схожі амінокислотні послідовності, в геновому і активному сайтах. Для вивчення еволюції цих білків був проведений філогенетичний аналіз амінокислотних послідовностей синтетаз оксиду азоту з різних організмів. Філогенетичне древо припускає можливість горизонтального переносу генів NOS. На підставі отриманих результатів філогенетичного аналізу можна простежити еволюцію цих ферментних систем.

У прокариотів простіша будова синтетази оксиду азоту, а саме відсутній редуктазний домен, за винятком архей, у яких є редуктазний домен, але він розташовується в N-кінцевій частині ферментної системи [18]. У бактерій положення гена в хромосомі може часто дати уявлення про функції цього білка. Гени NOS розташовуються в таких ділянках



хромосоми, що функція сусідніх генів невідома, хоча є і виключення. Наприклад, у деяких штамів *Streptomyces* ген, який кодує NO-синтетазу, розташовується в так званому, «острівці патогенності» і бере участь у біосинтезі такстомінів. Ці фітотоксини викликають паршу картоплі.

### Структура і каталітичні властивості бактеріальних синтетаз оксиду азоту

Спектральні властивості, структура та каталітичні профілі bNOS більшою мірою схожі з mNOS [1, 2, 14]. NO-синтетаза ссавців є гомодимером, який містить N-кінцевий фрагмент NOS<sub>ox</sub> і C-кінцевий фрагмент, що виконує редуктазну функцію за допомоги флавопротеїдів (NOSred). NOS<sub>ox</sub> зв'язує L-аргінін, гем і відновний редокс-активний кофактор 6R-тетрагідроптерин (H<sub>4</sub>B) і в цій ділянці знаходиться каталітичний центр ферменту. NOSred має сайти зв'язування для ФАД, ФМН, НАДФН і діє як джерело відновлювальних еквівалентів для зв'язування кисню і його активації. Білок кальмодулін сполучає оксигеназну і редуктазну області NOS. Він так само регулює перехід окисненої форми ферменту у відновлену за допомогою кальцій-залежних механізмів [3]. З участю mNOS з L-аргініну утворюється стійкий проміжний продукт N<sup>ω</sup>-гідрокси-L-аргінін (NOHA). Надалі він перетворюється на NO і L-цитрулін (рис. 1) [48]. При цьому активація кисню вимагає відновного кофактору H<sub>4</sub>B [48]. Бактеріальні NOS<sub>ox</sub> області NO-синтетази схожі з такими областями в mNOS, але у bNOS відсутній NOSred (відновний фрагмент), а в N-кінцевій області відсутній фрагмент, який за допомогою водневих зв'язків координує цинк. Незважаючи на це NO-синтетази системи у бактерій, все ж схожі з mNOS<sub>ox</sub>. По-перше, у димерів гема нормальні спектральні властивості, по-друге, геми зв'язують L-аргінін і з нього утворюється оксид азоту, по-третє, використовуються біоптерини (естер Hb) або тетрагідрофолат (ТГФ). Тим не менше, існують невеликі відмінності в спектральних властивостях гемових центрів. Зокрема, у *Bacillus subtilis* NOS (bsNOS) і у *Bacillus anthracis* NOS (baNOS) дещо відмінна структура гемової кишені. Ці відмінності призводять до змін активності ферменту та його функцій [25]. За винятком деяких відсутніх фрагментів в N-термінальній області bNOS, все ж вони є структурними аналогами mNOS (рис. 2). Це було підтверджено при з'ясуванні структури комплексу bsNOS з L-аргініном та ТГФ [36]. NOS *Staphylococcus aureus* (saNOS) пов'язані з НАД і S-етил-ізотіосечовиною (аналог L-аргініну) [5] і NOS *Geobacillus stearothermophilus* (gsNOS) в комплексі з L-аргініном [49].

Цікаво, що у NOS *Streptomyces* може міститися N-термінальний сайт цинку, але в цьому фрагменті один з двох Cys, які присутні в mNOS замінюються на амінокислотний залишок His [26]. Таким чином, збереження всіх основних каталітичних центрів серед бактеріальних і тваринних NOS дає можливість зробити припущення, що оксид азоту утворюється з аргініну через N<sup>ω</sup>-гідрокси-L-аргінін (NOHA) [36]. Синтез NO за допомоги





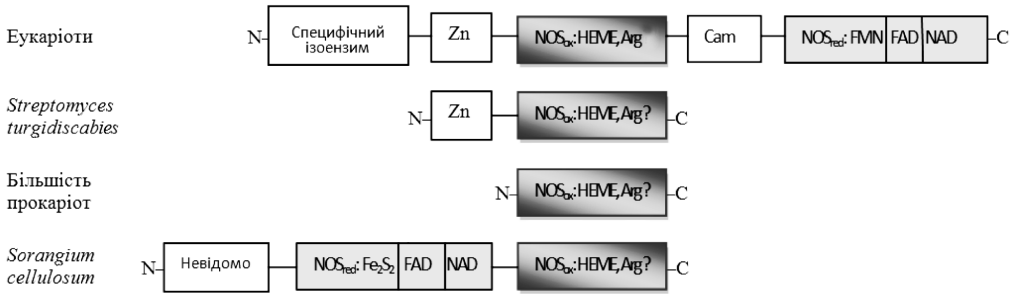


Рис 2. Будова синтетаз оксиду азоту у різних організмів [50]

Fig 2. Structure of nitric oxide synthase in various organisms [50]

конститутивної форми NO-синтетази був продемонстрований у *Bacillus subtilis* (bsNOS) [1], у *Deinococcus radiodurans* (drNOS) [2] і у *Geobacillus stearothermophilus* (gsNOS) [49]. У всіх трьох випадках, утворення оксиду азоту відбувається тільки за присутності або естеру  $H_4B$ , або ТГФ, хоча у bsNOS і drNOS вища спорідненість до  $H_4B$  [1,2,49]. Схоже, що відсутність N-термінальної цинк-зв'язуючої ділянки дозволяє бактеріальним NOS зв'язувати більші кількості птеринових кофакторів або ТГФ, ніж mNOSs [2,36]. Однак, не ясно, чи можуть бактерії, які виробляють ТГФ, синтезувати  $H_4B$ . Більшість прокаріотів, у яких присутня NOS, містять деякі з генів біосинтезу  $H_4B$ , але тільки бактерії роду *Bacillus* мають гомолог ферменту сепіаптеринредуктази — кінцевого ферменту у біосинтезі  $H_4B$ . Бактеріальні NOS служать хорошим інструментом для досліджень механізмів каталізу даної групи ферментів. Для цього як модель гем-кисневих комплексів використовують гем-нітрозильні комплекси bsNOS, які здатні окиснювати L-аргінін [37]. Ці структури дають можливість дослідити утворення субстрат-відновлений гем-кисневий комплекс, простежити хід реакції та встановити продукти каталізу. Використання спектроскопії комбінаційного розсіювання (рамановської спектроскопії), яка дозволяє отримати інформацію щодо зіткнення фотонів з молекулами або іонами, в ході яких вони обмінюються енергією. За зміною енергії фотона можна судити про зміну енергії молекули, тобто про перехід її на новий енергетичний рівень. Цей метод доволі часто використовується для вивчення механізмів каталізу оксидоредуктазних ферментів, у яких в активному центрі знаходяться метали зі змінною валентністю. Він дозволив вивчити стійкі гем-кисневі комплекси з L-аргініном і N-гідрокси-L-аргініном та з'ясувати частку проміжних форм кисню в saNOS каталізі [12]. Встановлено, що звільнення оксиду азоту з гемового активного центру є значно нижчим при каталізі bNOS, ніж при каталізі mNOS [1]. Ці каталітичні відмінності можна пояснити тим, що в активному центрі ферменту mNOS розташовується амінокислотний залишок валіну, а у bNOS в цьому місці розташований ізолейцин [36]. Дійсно, заміна цих

амінокислотних залишків у бактеріальних і тваринних NOS змінює ступінь дисоціації гем-лігандного комплексу [53]. Бактеріальні NOS можуть бути використані для характеристики структурних елементів, які є однаковими для бактеріальних і тваринних NO-синтеаз. Ці елементи беруть участь в утворенні та регулюванні ферментів NOS. За відсутності НВ і субстрату відмічено часткове розкриття оксигеназного домену mNOSox [30]. Такі структурні стани активного центру ферменту сприйнятливіші до протеолізу. При цьому гем має нижчий окисно-відновний потенціал, ніж фермент, зв'язаний з НВ і субстратом [30]. Ці структурні зміни поширюються не тільки на інші області ферменту, але і на його активний центр, що впливає на його здатність зв'язуватися з субстратом. Таким чином, механізми каталізу синтетази оксиду азоту є такими (рис. 3).

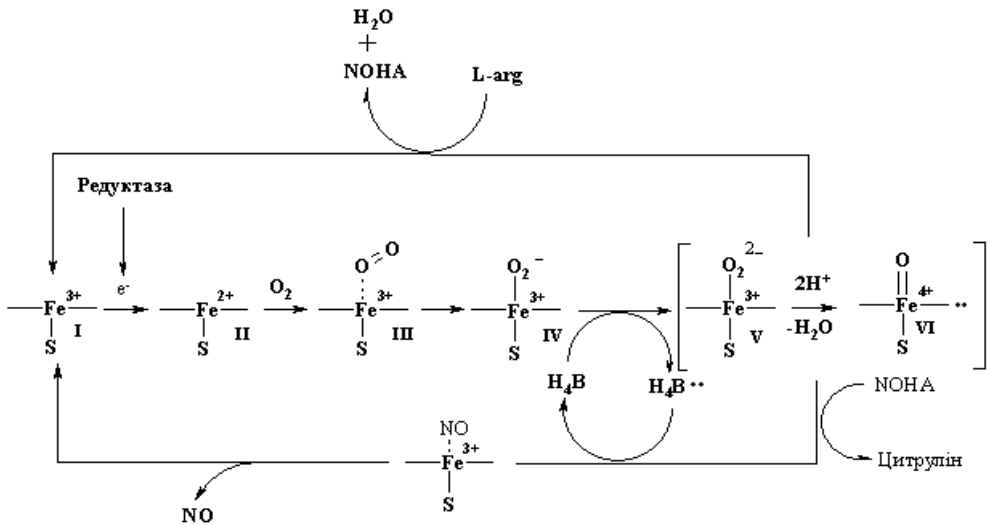


Рис. 3. Механізм каталітичного циклу синтетази оксиду азоту [14]

Fig. 3. The mechanism of the catalytic cycle of nitric oxide synthase [14]

Синтез оксиду азоту NO-синтетазами грамположитивних і грамнегативних бактерій аналогічний синтезу NO ферментом mNOS, за винятком того, що у них відсутня редуктазна область. Ефективним донором електронів для bsNOS *B. subtilis* може виступати флаводоксин (YkuN) [54]. Однак, при видаленні гену *yku* N-синтез оксиду азоту у *B. subtilis* не припиняється. Бактеріальна NOS *E. coli* в природних умовах використовує свої редуктази [18]. Таким чином, на відміну від ферментної системи ссавців, які містять спеціальний редуктазний модуль, бактеріальна ферментна система, скоріше за все, може приймати електрони від декількох різних редуктаз [18]. Розшифровка геному представника архей *Sorangium (Polyangium) cellulosum* [43] показала, що їх NOS система



має ковалентно приєднаний редуказний модуль. Але на відміну від mNOS він розташований в N-кінцевій області (рис. 2). Синтетаза оксиду азоту *Sorangium cellulosum* (scNOS) містить в N-кінцевій області ділянку з невідомою функцією, а потім Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> кластер, ФАД- і НАД-зв'язуючі домени і, нарешті, в С-кінцевій ділянці розташовується NOS<sub>ox</sub>. Крім того, флаводоксинава ділянка в mNOS замінюється в scNOS кластером Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, який здатний переносити один електрон. Значний інтерес викликає те, що у mNOS є ділянка в області ФМН, яка зв'язана з відновленням NOS<sub>ox</sub> і регулюється Ca<sup>2+</sup>-кальмодуліном [16,41]. Подальше вивчення scNOS ферментної системи може пролити світло на механізми взаємодії між двома ділянками (NOS<sub>ox</sub> і NOS<sub>red</sub>) синтетази оксиду азоту.

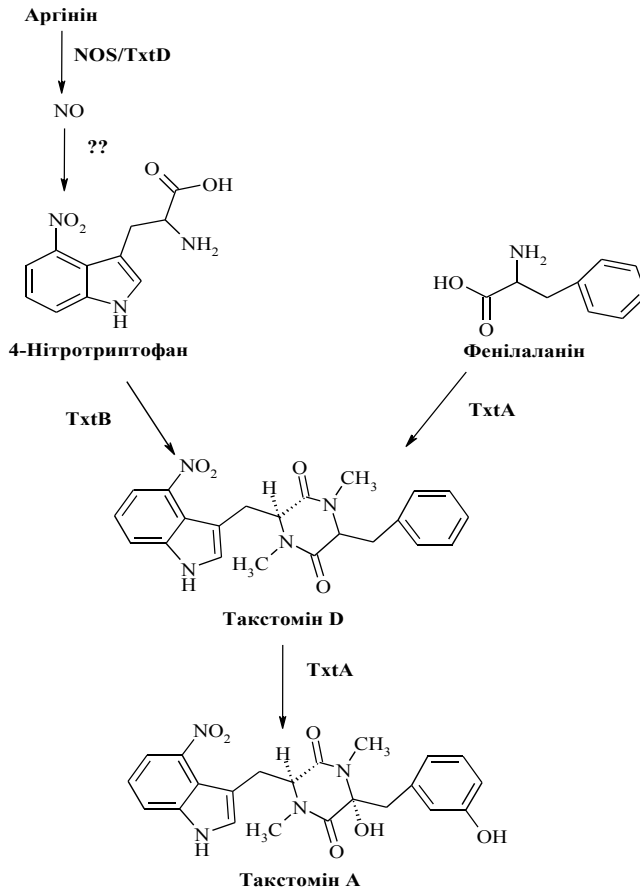
### Функції бактеріальних синтетаз оксиду азоту

Оксид азоту може виступати важливою сигнальною молекулою у бактерій в незалежності від джерела походження [10, 46]. Поки ще не у всіх прокариотів знайдено синтетазу оксиду азоту, але у бактерій, у яких вона є, ця ферментна система здатна виконувати дуже важливі регуляторні функції.

Однією з основних функцій NOS *Streptomyces turgidiscabies* це синтез такстомінів — фітотоксинів, що викликають захворювання парші картоплі. Ген цього ферменту був знайдений у *Streptomyces turgidiscabies* в так званому «острівці патогенності» [26]. Механізм патогенності такстомінів насамперед пов'язаний з порушенням синтезу клітинної стінки у картоплі. Так, стомін — це незвичайний дипептид (похідне цикло-[L-триптофану-L-фенілаланіну]), який утворюється без участі рибосом [20]. Він представляє собою триптофеніловий фрагмент, нітрований по четвертому положенню дипептиду [20]. Розташування гену NOS на «острівці патогенності», який є відповідальним за біосинтез такстоміну і його перебування в безпосередній близькості від генів, що кодуєть нерибосомні пептидсинтетази (*txtA* і *txtB*) переконливо показують, що відповідний фермент (stNOS) може бути залучений до нітрування такстомінів (рис. 4).

Порушення гену *nos* значно зменшувало виробництво такстоміну. Після додавання NOS синтез фітотоксинів був частково відновлений [26]. Однак, не нітровані такстоміни не були виявлені у живильному середовищі у нокаутних по гену *nos* штамів *Streptomyces turgidiscabies*. Інгібітори mNOSs, які були додані у живильне середовище для росту *Streptomyces turgidiscabies* штаму дикого типу призвели до зменшення синтезу такстоміну без будь-якого ефекту на ріст цих бактерій [26]. Це пояснюється зменшенням синтезу токсину, так як інгібітори знижують активність NOS. Крім того, експресія гену stNOS, введеного у *E. coli*, показала, що нітрит утворюється з NOHA і він є кінцевим продуктом реакції NO з киснем. Було показано, що при використанні <sup>15</sup>N-L-аргініну, нітрування такстоміну відбувається завдяки гуанідиновому радикалу L-аргініну. NOS є єдино відомим ферментом, який окиснює азот гуа-



Рис. 4. Синтез такстоміну А у *Streptomyces turgidiscabies* [24]Fig. 4. Synthesis of thaxtomine A in *Streptomyces turgidiscabies* [24]

нідину L-аргініну з утворенням NO. Таким чином, зроблено висновок, що NOS є одним з ключових ферментів, який бере участь у нітруванні триптофанового (Trp) фрагменту [26]. Біосинтетичні реакції нітрування в основному протікають при окисненні амінів [11]. Хімічні механізми NOS-залежного нітрування, ймовірно, дуже складні і можуть включати в себе й інші реакції, оскільки дуже складно собі уявити, що індольний замісник триптофану може безпосередньо взаємодіяти з оксидом азоту, хоча вільнорадикальні форми оксиду азоту, такі, як нітрозіум ( $\text{NO}^+$ ), пероксинітрил ( $\text{ONOO}^-$ ), нітроніум ( $\text{NO}^{+2}$ ), або діоксид азоту ( $\text{NO}_2$ ), як відомо, здатні нітрувати ароматичні радикали [27]. Цікаво, що штами *Streptomyces* починають нітрувати токсин у місці інфікування, коли відбувається розвиток коренів [24]. У рослинах NO, як відомо, виступає як сигнальна молекула, яка активує численні процеси: тропізми, цвітіння, утворення ксилеми, ріст коренів, адаптацію і стрес-відповідь, тощо [51].

Цікаво відзначити, що патогенна продукція NO також сприяє зростанню тканин і їх колонізації.

Після доказу причетності stNOS до біосинтетичних реакцій нітрування було проведено дослідження пошуку подібних біосинтетичних реакцій NOS у інших бактерій. Подібну властивість виявила тільки синтетаза оксиду азоту *Deinococcus radiodurans* (drNOS). Вона здатна каталізувати синтез невеликих кількостей 4-нітро-L-триптофану *in vitro*, у разі використання чужої NOSred як відновника [6]. До того ж, drNOS спільно виділялася та очищалася з незвичайною триптофан-транспортною РНК синтетазою, тим самим забезпечуючи зв'язок з метаболізмом триптофану [6, 7]. Наявність такого незвичайного центру зв'язування триптофану у TrpRS II означає, що аналоги триптофану з замісниками в індольному кільці можуть розпізнаватися і з'єднуються з tРНК за допомогою цього ферменту [8].

Дійсно, TrpRS II приєднує до триптофан-специфічної tРНК триптофан, 4-нітро-триптофан або 5-гідрокси-триптофан з майже однаковою специфічністю *in vitro*, тоді як TrpRS I приєднує тільки триптофан [9]. Тому, комплекс drNOS-TrpRS II може синтезувати 4-нітро-триптофан-tРНК. Призначення цього незвичайного продукту незрозуміло і на даний час немає доказів того, що 4-нітро-триптофан може входити до складу білків. Можливо 4-нітро-триптофан-tРНК використовується *D. radiodurans* для продукції ще не відкритих вторинних метаболітів.

При делеції гена NOS ( $\Delta nos$ ) у штаму *Deinococcus radiodurans* різко знижена здатність до відновлення після УФ-випромінювання [38]. *D. radiodurans* може виживати в досить жорстких умовах, таких як висушування, окиснювальне пошкодження і радіаційні впливи у порівнянні з іншими організмами [4]. При делеції  $\Delta nos$  відбувається незначне уповільнення росту у рідкій культурі за відсутності стресу у порівнянні з диким типом, але при дії УФ-випромінювання відмінності між штамами великі. Швидше за все роль оксиду азоту при УФ-випромінюванні не в захисті, а в сигналі, який відновлює проліферацію клітин. Проведення експериментів зі специфічними мРНК показало, що деякі гени диференційно регулюються геном *nos* після опромінення. Зокрема, активується ген *obg*, що кодує малі ГТФ-зв'язувальні білки, які беруть участь у відновленні клітин після УФ-опромінення у штаму дикого типу, на відміну від штаму, у якого вилучено ген  $\Delta nos$  [38]. Отримані дані дозволяють припустити важливу регуляторну роль оксиду азоту.

На відміну від функцій stNOS та drNOS синтетаза оксиду азоту різних видів *Bacillus* (bsNOS і baNOS) використовується для захисту бактерій від оксидантного стресу [17, 44]. Вплив на клітини мілімолярних концентрацій  $H_2O_2$  призводить до утворення гідроксильних радикалів, які з'являються завдяки реакції Фентона (рис. 5), при цьому відбувається пошкодження ДНК і загибель клітин.

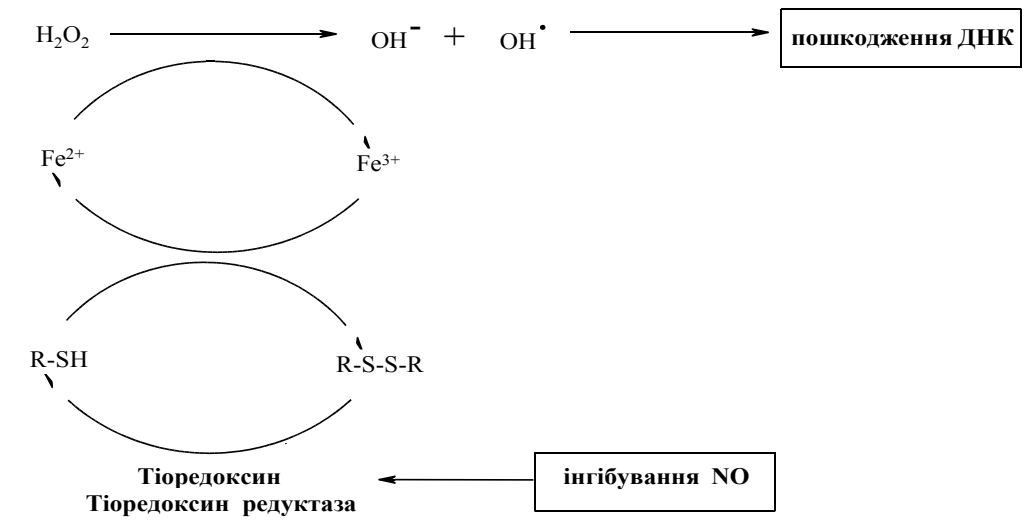


Рис. 5. Інгібування оксидом азоту ферменту тіоредоксин редуктази у *B. subtilis* та *B. anthracis* [17]

Fig. 5. Inhibition of thioredoxin reductase enzyme in *B. subtilis*, *B. anthracis* by nitric oxide [17]

Проте, коли до *B. subtilis* попередньо, за 5 секунд до впливу  $H_2O_2$ , додавали оксид азоту, виживання клітин збільшувалося в 10 разів [17]. Додавання NO або одночасно з  $H_2O_2$ , або після  $H_2O_2$  не викликає подібного ефекту [17]. Крім того, оксид азоту може активувати певні гени у *B. subtilis* і *E. coli* для захисту від оксидантного і нітрозативного стресів [17]. Цей ефект не пов'язаний з експресією захисних генів, так як захист клітин стався відразу після додавання в середовище оксиду азоту. Штам *B. subtilis* з дефектним геном *nos* став чутливішим до окиснювального пошкодження насамперед через збільшення рівня відновлених тіолів [17]. Тому і виникла гіпотеза, що оксид азоту, який утворюється в NO-синтезних реакціях, зменшує окисні пошкодження шляхом інгібування ферменту тіоредоксин редуктази. Цей ензим відновлює тіоредоксин. Тіоредоксин необхідний для відновлення заліза, а завдяки йому і утворюються  $OH^\cdot$  радикали, що ушкоджують ДНК (рис. 5). Крім того, оксид азоту активує каталазу *B. subtilis*. Аналогічні функції були знайдені у baNOS [44]. Значну роль у процесах виживання *B. anthracis* відіграє її NO-синтезаза. Відомо, що фагоцити утворюють великі кількості оксиду азоту, а також вільнорадикальні форми кисню та азоту у відповідь на дію патогенів. На моделі системної інфекції показано, що спори мутантного NOS-штаму *B. anthracis* втрачають вірулентність [44]. NOS-залежний захист *B. anthracis* від вільних радикалів макрофагів такий самий як у *B. subtilis*. За допомогою NO активується бактеріальна каталаза і блокується реакція Фентона. Крім того, відмічено індукцію синтезу NO у



патогенних штамів у відповідь на «дихальний вибух» фагоцитів, який є захисним механізмом хазяїна. Таким чином, NO захищає бактерію на ранніх стадіях інфекції. У *S. aureus* також є подібна захисна система, яка залежить від синтезу оксиду азоту NO синтетазою [17].

**Участь синтетази оксиду азоту в захисті бактерій від антибіотиків**

Антибіотики, такі як похідні лактамів, аміноглікозидів, хінолонів та фенозинів частково проявляють свою токсичність за рахунок генерації активних форм кисню. Оксид азоту захищає грамположитивні бактерії від оксидантного стресу [17]. Тому було зроблено припущення, що оксид азоту може брати участь у формуванні бактеріями резистентності до антибіотиків [19]. Для перевірки цієї гіпотези були вибрані різні антимикробні препарати, такі як, акрифлавін, піоціанін і цефуроксим, які були додані до  $\Delta nos$  мутантів бактерій.

Акрифлавін виявився найбільш сильним інгібітором росту  $\Delta nos$  мутантів серед антибіотиків, що інтеркалюють у ДНК. Акрифлавін містить дві ароматичні аміногрупи, які необхідні для прояву токсичності. Крім того, було показано, що акрифлавін здатний генерувати активні радикали, які пошкоджують ДНК бактерій [19]. При хімічній взаємодії акрифлавіну та оксиду азоту було встановлено, що продукти окиснення NO призводять до нітрування ариламинових груп.

В результаті цього катіони арилдіазонію швидко гідролізуються з вивільненням молекулярного азоту і формуванням менш токсичних похідних дигідроксиарцидину (рис. 6). При попередньому змішуванні акрифлавіну і NO у поживному середовищі до інокуляції бактерій було відмічено зниження інгібування росту *Bacillus subtilis* і *Staphylococcus aureus* акрифлавіном.

Сам NO у використаній концентрації не пригнічував ріст бактерій. Таким чином, NO, синтезований за участю синтетази оксиду азоту, модифікує акрифлавін і це призводить до зниження його активності *in vivo* (рис. 6) [19]. Акридиновий помаранчевий, який також є похідним феназину, виявляє нижчу анти-

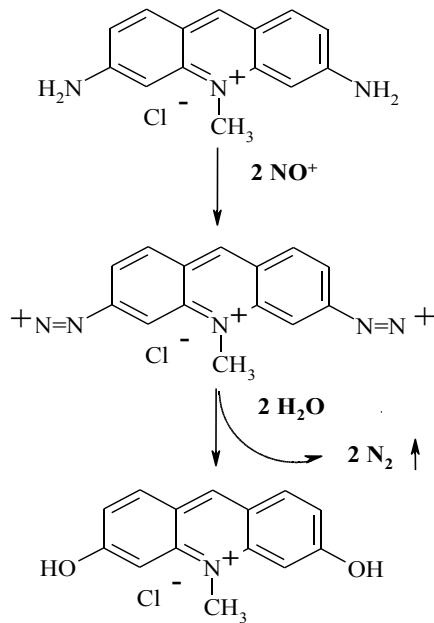


Рис. 6. Механізм перетворення акрифлавіну за допомогою бактеріальної синтетази оксиду азоту [19]

Fig. 6. Mechanism of acriflavine conversion by bacterial nitric oxide synthase

мікробну дію, оскільки містить метильовані  $\text{NH}_2$ -групи, які не здатні взаємодіяти з  $\text{NO}^+$ .

Природний токсин піоціанін (1-гідрокси-5-метил-феназин), який синтезується *Pseudomonas aeruginosa* є структурним аналогом акрифлавіну і він використовується для конкуренції з іншими прокаріотами за екологічну нішу. Тому штами *Bacillus subtilis*, у яких є делеція в гені *nos* чутливіші до дії піоціаніну ніж штами дикого типу. Додавання оксиду азоту до штамів *Bacillus subtilis*  $\Delta nos$  відновлює ріст цих бактерій у присутності піоціаніну. Піоціанін відрізняється за своєю структурою від акрифлавіну відсутністю ариламінових груп, і тому він не реагує з  $\text{NO}^+$ . Встановлено, що при дії піоціаніну у стаціонарній фазі росту бактерії  $\Delta nos$  у клітинах накопичується у великій кількості супероксиданіон, а штами *Bacillus subtilis* з делецією в гені  $\Delta sod$  ще чутливіші до піоціаніну. Крім того, активація синтезу оксиду азоту підсилює експресію гену *sodA*. Таким чином, оксид азоту підвищує концентрацію супероксиддисмутази у *Bacillus subtilis*, яка захищає бактерію від дії піоціаніну [19].

Оксид азоту ефективно запобігає також токсичній дії лактамних антибіотиків на *Bacillus subtilis*. Основною мішенню лактамних антибіотиків є процес біосинтезу компонентів клітинної стінки, хоча є і інші механізми дії. Наприклад, ампіцилін пригнічує ріст *E. coli* шляхом індукції оксидативного стресу. На користь цього свідчить зниження бактерицидного ефекту лактамів за присутності хелатора заліза біпіридилу або гасника реактивних форм кисню тіосечовини. Так як  $\text{NO}/\text{NO}^+$  захищають бацили від оксидативного стресу і не реагують з лактамами безпосередньо, автори зробили припущення, що активність в NOS забезпечує захист бактерій від лактамів шляхом супресії оксидативного стресу [19].

### Регуляторні функції оксиду азоту у бактерій

У прокаріотів оксид азоту також бере участь у регуляторних процесах. Ця функція реалізується через пряму взаємодію з металокофакторами, або шляхом S-нітрозування залишків цистеїну. У ссавців  $\text{NO}$ , як відомо, регулює активність фосфатаз, кіназ і транскрипційних факторів, таких як  $\text{NIF-1}$ ,  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , і  $\text{RHP-Keap1}$  за допомоги S-нітрозилування [32, 33]. У бактерій також були знайдені деякі  $\text{NO}$ -залежні транскрипційні фактори:  $\text{NogR}$ , який активує три різних фермента, що беруть участь у метаболізмі  $\text{NO}$  ( $\text{NO}$  редуктаза, флаворубредоксин, флавогемоглобін);  $\text{NsrR}$  — сенсор  $\text{NO}$  і/або нітритів, який активує залежні від  $\text{NO}$  захисні механізми клітини;  $\text{NngR}$ , що активує транскрипцію генів денітрифікації у присутності  $\text{NO}$  [47]. Крім того, були знайдені ще кілька інших транскрипційних регуляторів. Це  $\text{SoxR}$ ,  $\text{OxyR}$ ,  $\text{FNR}$ ,  $\text{MetR}$ , і  $\text{Fur}$ , хоча основна функція кожного з них полягає у реагуванні на інші сигнали (супероксид, перекис водню, кисень, гомоцистеїн і залізо, відповідно) [47]. Деякі бактеріальні сенсорні кінази характерні тільки для *Mycobacterium tuberculosis*, наприклад,  $\text{DosS}/\text{DosT}$ , які є редокс та гіпоксичними сен-





сорами [28] і Н-NOX-гістидинкіназа, яка є датчиком зв'язування NO [39]. У бактерій багато різних систем, чутливих до оксиду азоту, тому і відповідь регуляторних систем на цей агент може бути різноманітною. Продукція NO синтетазою оксиду азоту у *Bacillus subtilis* активує ген *bmp*, який кодує флавогемоглобін. Він бере участь у детоксикації оксиду азоту. Цей ген також регулює транскрипційні фактори, що містять Fe<sup>2+</sup>, та  $\sigma^B$  – основний стрес-регулятор бактеріальних клітин [34, 42]. В свою чергу оксид азоту регулює білки, які контролюються Fur, PerR, OhrR, Spx, та  $\sigma^B$  регулонами [22]. Транскрипційний фактор PerR контролює систему антиоксидантного захисту у *B. subtilis*, у тому числі ген каталази *katA* [21]. Вірогідно, що NO-залежна індукція PerR пов'язана із захистним ефектом синтетази оксиду азоту у *Bacillus* від окиснювального стресу. У *D. radiodurans* оксид азоту, який утворюється за допомоги синтетази оксиду азоту, є сигнальною молекулою, яка регулює гени, що відповідають за відновлення та проліферацію клітин після радіаційного пошкодження. За це відповідають деякі транскрипційні фактори, такі як *obg* [38]. Подібні аналоги існують і у ссавців. УФ-опромінення індукуює специфічну синтетазу азоту, що приводить до S-нітрозилування і активації транскрипційного фактору HIF-1 $\alpha$  [31].

Таким чином, бактеріальні синтетази оксиду азоту є аналогами цих ферментів у ссавців, хоча існують деякі відмінності у будові цього ензиму. У прокаріотів синтетаза оксиду азоту виконує захисну та регуляторні функції.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Adak S., Aulak K.S., Stuehr D.J. Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis* // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 227, № 18. – P. 16167–16171.
2. Adak S, Bilwes A.M., Panda K. Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2002. – V. 99, № 1. – P. 107–112.
3. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. // Biochem. J. – 2001. – V. 357, № 3. – P. 593–615.
4. Battista J.R. Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans* // Annu. Rev. Microbiol. – 1997. – V. 51, № 2. – P. 203–224.
5. Bird L.E., Ren J., Zhang J., Foxwell N., Hawkins A.R., Charles I.G., Stammers D.K. Crystal structure of SANOS, a bacterial nitric oxide synthase oxygenase protein from *Staphylococcus aureus*. // Structure. – 2002. – V. 10, № 12. – P. 1687–1696.
6. Buddha M.R., Tao-Tao, Parry R.J., Crane B.R. Regioselective nitration of tryptophan by a complex between bacterial nitric-oxide synthase

and tryptophanyl-tRNA synthetase. // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, № 48. — P. 49567–49570.

7. *Buddha M.R., Keery K.M., Crane B.R.* An unusual tryptophanyl tRNA synthetase interacts with nitric oxide synthase in *Deinococcus radiodurans*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2004. — V. 101, № 45. — P. 15881–15886.

8. *Buddha M.R., Crane B.R.* Structures of tryptophanyl-tRNA synthetase II from *Deinococcus radiodurans* bound to ATP and tryptophan: Insight into subunit cooperativity and domain motions linked to catalysis. // *J. Biol. Chem.* — 2005. — V. 280, № 36. — P. 31965–31973.

9. *Buddha M.R., Crane B.R.* Structure and activity of an aminoacyl-tRNA synthetase that charges tRNA with nitro-tryptophan. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2005. — V. 12, № 3. — P. 274–275.

10. *Cabello P., Roldan M.D., Moreno-Vivian C.* Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. // *Microbiol.* — 2004. — V. 150, № 11. — P. 3527–3546.

11. *Carter G.T.* Direct biochemical nitration in the biosynthesis of dioxapyrrolomycin — a unique mechanism for the introduction of nitro-groups in microbial products. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* — 1989. — V. 404, № 11. — P. 1271–1273.

12. *Chartier F.J.M., Couture M.* Resonance Raman spectra of the nitric oxide complexes of the nitric oxide synthase from *Staphylococcus aureus* reveal pterin-induced structural modifications of the heme. // *Biophys. J.* — 2005. — v. 88, № 1. — P. 390A–400A.

13. *Chen Y.J., Rosazza J.P.N.* A bacterial, nitric oxide synthase from a *Nocardia* species. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* — 1994. — V. 203, № 2. — P. 1251–1258.

14. *Crane B.R., Sudhamsu J., Patel B.A.* Bacterial nitric oxide synthases. // *Annu. Rev. Biochem.* — 2010. — V. 79, № 4. — P. 445–470.

15. *Fawcett P., Paddon C.* The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors. // *J. Bacteriol.* — 2003. — V. 185, № 1. — P. 243–253.

16. *Feng Ch., Roman L.G., Hazzard J.T., Ghosh D.K., Tollin G., Masters B.S.S.* Deletion of the autoregulatory insert modulates intraprotein electron transfer in rat neuronal nitric oxide synthase. // *FEBS Lett.* — 2008. — V. 582, № 18. — P. 2768–2772.

17. *Gusarov I., Nudler E.* NO-mediated cytoprotection: Instant adaptation to oxidative stress in bacteria. // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* — 2005. — V. 102, № 39. — P. 13855–13860.

18. *Gusarov I., Starodubtseva M., Wang Z.Q., McQuade L., Lippard S.J., Stuehr D.J., Nudler E.* Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner. // *J. Biol. Chem.* — 2008. — V. 283, № 19. — P. 13140–13147.

19. *Gusarov I., Shatalin K., Starodubtseva M., Nudler E.* Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. // *Science.* — 2009. — V. 325, № 5946. — P. 1380–1384.



20. Healy F.G., Wach M., Krasnoff S.B., Gibson D.M., Loria R. The *txtA,B* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. // *Mol. Microbiol.* — 2000. — V. 38, № 4. — P. 794–804.

21. Helmann J.D., Wu M.F.W., Gaballa A., Kobel P.A., Morshedi M.M., Fawcett P., Paddon C. The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors // *J. Bacteriol.* — 2003. — V. 185, № 1. — P. 243–253.

22. Hochgröf F., Wolf C., Fuchs S., Liebeke M., Lalk M., Engelmann S., Hecker M. Nitric oxide stress induces different responses but mediates comparable protein thiol protection in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. // *J. Bacteriol.* — 2008. — V. 190, № 14. — P. 4997–5008.

23. Jansson E., Lindblad P. Cloning and molecular characterization of a presumptive *argF*, a structural gene encoding ornithine carbamoyl transferase (OCT), in the cyanobacterium *Nostoc* sp. PCC 73102. // *Physiol. Plant.* — 1998. — V. 103, № 3. — P. 347–353.

24. Johnson E.G., Krasnoff S.B., Bignell D.R.D., Chung W.-C., Tao T., Parry R.J. 4-Nitrotryptophan is a substrate for the non-ribosomal peptide synthetase *TxtB* in the thaxtomin. A biosynthetic pathway *mmi* 6780. // *Mol. Microbiol.* — 2009. — V. 73, № 3. — P. 409–418.

25. Jung Ch., Stuehr D.J., Ghosh D.K. FT-infrared spectroscopic studies of the iron ligand CO stretch mode of iNOS oxygenase domain: Effect of arginine and tetrahydrobiopterin. // *Biochem.* — 2006. — V. 45, № 5. — P. 1480–1489.

26. Kers J.A., Wach M.J., Krasnoff S.B., Widom J., Cameron K.D., Bukhalid R.A., Gibson D.M., Crane B.R., Loria R. Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. // *Nature.* — 2004. — V. 429, № 6987. — P. 79–82.

27. Koppenol W.H. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxyxynitrite. // *Free Radic. Biol. Med.* — 1998. — V. 25, № 4–5. — P. 385–391.

28. Kumar A., Toledo J.C., Patel R.P., Lancaster J.R.Jr., Steyn A.J.C. *Mycobacterium tuberculosis* *DosS* is a redox sensor and *DosT* is a hypoxia sensor. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2007. — V. 104, № 28. — P. 11568–11573.

29. Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., et. al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. // *Nature.* — 1997. — V. 390, № 6657. — P. 249–256.

30. Li D., Hayden E.J., Panda K., Stuehr D.J., Deng H., Rousseau L., Yeh S.N. Regulation of the monomer-dimer equilibrium in inducible nitric-oxide synthase by nitric oxide. // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281, № 12. — P. 8197–8204.



31. Li F., Sonveaux P., Rabbani Z.N., Liu S., Huang Q., Li C-Yu. Regulation of HIF-1 $\alpha$  stability through S-nitrosylation // *Mol. Cell.* — 2007. — V. 26, № 1. — P. 63–74.
32. Lia C-Q, Kima M.Y Godoya L.C., Thiantanawata A., Trudela L.J., Wogan G.N. Nitric oxide activation of Keap1/Nrf2 signaling in human colon carcinoma cells. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2009. — V. 106, № 34. — P. 14547–14551.
33. Marshall H.E., Merchant K, Stamler J.S. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. // *FASEB J.* — 2000. — V. 14, № 13. — P. 1889–1900.
34. Moore C.M., Nakano M.M., Wang T., Ye R.W., Helmann J.D. Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. // *J. Bacteriol.* — 2004. — V. 186, № 14. — P. 4655–4664.
35. Morita H., Yoshikawa H., Sakata R., Nagata Y., Tanaka H. Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidino nitrogens of L-arginine by *Lactobacillus fermentum*. // *J. Bacteriol.* — 1997. — V. 179, № 24. — P. 7812–7815.
36. Pant K., Bilwes A.L., Adak S., Stuehr D.J., Crane B.R. Structure of a nitric oxide synthase heme protein from *Bacillus subtilis*. // *Biochem.* — 2002. — V. 41, № 37. — P. 11071–11079.
37. Pant K., Crane B.R. Nitrosyl—heme structures of *Bacillus subtilis* nitric oxide synthase have implications for understanding substrate oxidation. // *Biochem.* — 2006. — V. 45, № 8. — P. 2537–2544.
38. Patel B.A., Moreau M., Widom J., Chen H., Yin L., Hua Y., Crane B.R. Endogenous nitric oxide regulates the recovery of the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* from exposure to UV light. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2009. — V. 106, № 43. — P. 18183–18188.
39. Price M.S., Chao L.Y., Marletta M.A. *Shewanella oneidensis* MR-1 H-NOX regulation of a histidine kinase by nitric oxide. // *Biochem.* — 2007. — V. 46, № 48. — P. 13677–13683.
40. Raman C.S., Martasek P., Masters B.S.S. Structural themes determining function in nitric oxide synthases. // In: *The Porphyrin Handbook*. Eds. Kadish K. M., Smith K. M., Guilard R. N.Y.: 2000. — Acad. Press. — P. 293–339.
41. Roman L.J., Masters B.S.S. Electron transfer by neuronal nitric-oxide synthase is regulated by concerted interaction of calmodulin and two intrinsic regulatory elements. // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281, № 32. — P. 23111–23118.
42. Rogstam A., Larsson J.T., Kjelgaard P., von Wachenfeldt C. Mechanisms of adaptation to nitrosative stress in *Bacillus subtilis*. // *J. Bacteriol.* — 2007. — V. 189, № 8. — P. 3063–3071.
43. Schneiker S., Perlova O., Kaizer O., Gerth K. et al. Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. // *Nat. Biotech.* — 2007. — V. 25, № 11. — P. 1281–1289.



44. *Shatalin K., Gusarov I., Avetisova E., Shatalina Y., McQuade L.E., Lippard S.J., Nudler E.* *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. // *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* — 2008. — V. 105, № 3. — P. 1009–1013.

45. *Sparks J.P., Dzikovski B., Crane B.R., Gibson D.M., Loria R.* Plant-pathogenic *Streptomyces* species produce nitric oxide synthase-derived nitric oxide in response to host signals. // *Chem. Biol.* — 2008. — V. 15, № 1. — P. 43–50.

46. *Spiro S.* The nitric oxide response of *Escherichia coli*. // *Nitric Oxide.* — 2006. — V. 14, № 2. — P. A20–A12.

47. *Spiro S.* Regulators of bacterial responses to nitric oxide. // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2007. — V. 31, № 2. — P. 193–211.

48. *Stuehr D.J., Santolini J., Adak S.* Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, № 35. — P. 3616–3617.

49. *Sudhamsu J., Crane B.R.* Structure and reactivity of a thermostable prokaryotic nitric-oxide synthase that forms a long-lived oxy-heme complex. // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281, № 14. — P. 9623–9632.

50. *Sudhamsu J., Crane B.R.* Bacterial nitric oxide synthases: what are they good for? // *Trends Microbiol.* — 2009. — V. 17, № 5. — P. 212–218.

51. *Tewari R.K., Hahn E.J., Paek K.Y.* Uction of nitric oxide and superoxide anion in the adventitious root development and antioxidant defence in *Panax ginseng*. // *Plant Cell. Rep.* — 2008. — V. 27, № 3. — P. 563–573.

52. *Viator R.J., Rest R.F., Hildebrandt E., McGee D.J.* Characterization of *Bacillus anthracis* arginase: effects of pH, temperature, and cell viability on metal preference. // *BMC Biochem.* — 2008. — V. 9, № 1. — P. 1–15.

53. *Wang Z-Q., Wei Ch., Sharma T., Pant K., Crane B.R., Stuehr D.J.* A conserved val to ile switch near the heme pocket of animal and bacterial nitric-oxide synthases helps determine their distinct catalytic profiles. // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, № 18. — P. 19018–19025.

54. *Wang Z-Q., Lawson R.J., Buddha M.R., Crane B.R.* Bacterial *flavodoxins* support nitric oxide production by *Bacillus subtilis* nitric-oxide synthase. // *J. Biol. Chem.* — 2007. — V. 282, № 4. — P. 2196–2202.

55. *Wei Y., Zhou H., Sun Y., He Y., Luo Y.* Insight into the catalytic mechanism of arginine deiminase: Functional studies on the crucial sites. // *Proteins.* — 2007. — V. 66, № 3. — P. 740–750.

56. *White O., Eisen J.A., Heidelberg J.F., et al.* Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. // *Science.* — 1999. — V. 286, № 5444. — P. 1571–1577.

57. *Yamasaki H., Sakihama Y.* Simultaneous production of nitric oxide and peroxy-nitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. // *FEBS Lett.* — 2000. — V. 486, № 1. — P. 89–92.



**Б.Н. Галкин, В.А. Иваница, Н.Б. Галкин**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: bgalkin@ukr.net

## **БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СИНТЕТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА**

### **Реферат**

В статье представлен обзор современных научных публикаций о молекулярной структуре, механизмах синтеза NO, молекулярной биологии, генетики и биологических функциях бактериальных синтетаз оксида азота.

Ключевые слова: бактериальные синтетазы оксида азота, гены NO-синтетаз, регуляторная и сигнальная функция.

**B.M. Galkin, V.O. Ivanytsia, M.B. Galkin**

Odesa Mechnykov National University,  
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: bgalkin@ukr.net

## **BACTERIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE**

### **Summary**

The article provides the overview of modern scientific publications on the molecular structure, the mechanisms of synthesis of NO, molecular biology, genetics and biological function of bacterial nitric oxide synthase.

Key words: bacterial nitric oxide synthase, NO-synthase genes, regulation and signaling function.





УДК 579.24:615:33:636.2.035+57.083.3

V.S. Pidgorskyi<sup>1</sup>, L.N. Shynkarenko-Sichel<sup>2</sup>, N.A. Timoshok<sup>1</sup>,  
A.V. Cheipesh<sup>1</sup>, N.Y. Spivak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154,  
Zabolotny str., 03143, Kyiv, Ukraine,

<sup>2</sup>Pure Research Products, LLC, 6107, Chelsea Manor Court, Boulder, Colorado, 80301, USA,  
e-mail: lshynkarenko@ecentral.com, lsichel1@gmail.com

## EFFECTS OF DRY ENZYMATIC LYSATE DEL-IMMUNE V<sup>®</sup> ON CYTOKINE PRODUCTION IN THE EXPERIMENTAL MODELS

*Prior testing of Del-Immune V<sup>®</sup> has indicated effectiveness for immune system support; however, mechanisms of action and optimal doses have not been researched yet. It is shown that the drug Del-Immune V<sup>®</sup>, a dry enzyme lysate of the strain Lactobacillus rhamnosus V, containing muramyl peptides and DNA fragments in the range of doses of 5–500 mg/mouse (optimum 50 mg/mouse) is an active inducer of IFN, it affects the production factor of tumor necrosis (TNF) in systems in vivo and in vitro. Its inducing activity is comparable with the data obtained while using complex probiotic Bifidim, but the live cells of bifidobacteria, being a part of the drug more efficiently stimulated production of TNF in vitro in comparison with Del-ImmuneV<sup>®</sup>. The levels of cytokine production under the influence of drugs in the in vivo correlated with the production of cytokines in the system in vitro. The highest serum IFN level was reported 24 hours after the drugs administration. The control group remained unchanged. Maintenance of elevated circulating IFN was possible only through repeated administration.*

*Key words: Del-Immune V<sup>®</sup>, Lactobacillus rhamnosus V, probiotic Bifidim, interferon, tumor necrosis factor, immune system.*

Among a large number of presently known therapeutic products utilizing lactobacilli, cell wall peptidoglycan is enjoying growing popularity as an immunomodulator which contains, among the other things, the fragments of DNA and cell peptidoglycan of the lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus V* (DV Strain). Del-Immune V<sup>®</sup> (manufactured by Pure Research Products, LLC, Boulder, Colorado) was registered by the US Food and

Drug Administration in 2002 as a food supplement for immediate immune system support.

The biochemical structure of Del-Immune V<sup>®</sup> and preliminary experimental and clinical data indicate that Del-Immune V<sup>®</sup> may be highly effective in infectious diseases of viral (flu, hepatitis C), bacterial (bronchitis), and fungal etiology, allergies of all severity levels, asthma, chronic fatigue, and fibromyalgia [10, 24]. The mechanism of such a wide scope of biological activity of the formulation is still unclear. The goal of our research, therefore, was to study the mechanisms of the immunomodulating effects of Del-Immune V<sup>®</sup> and to describe their dose-dependent effects on production of immunoregulatory cytokines in vivo and in vitro.

Last 5 years and previous investigations have been marked by increasingly active study of the mechanisms of the immunobiological effects of probiotics and bacterial medications [8, 9, 12, 25, 26]. As a result, bacterial medications such as liastenum (blasten), deodan, licopid, prodigiosanum, salmosanum, sodium nucleinate, MC (molecular composition – yeast DNA and Tilorone), biostim, BCG, rumurtide, ribomunyl, and lactolin are being used, in both trials and clinical practice, for different pathologies [10, 17, 23, 24]. The adjuvant effect of BCG and the immunomodulating activity of formulations containing the derivatives of lactobacilli, such as liastenum (blasten, *Lactobacillus delbrueckii*) and deodan (*Lactobacillus bulgaricus*), have been associated with peptidoglycans and their structural components, muramyl dipeptides (MDP). The most active analog of MDP, MurNac-L-Ala-D-Glu-NH<sub>2</sub>, has demonstrated the adjuvant and pleiotropic effects and is capable of inducing a number of cytokines: IL-1, tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) [9, 12].

These cytokines in turn stimulate nonspecific cytotoxicity of normal and effector lymphocytes and natural killer cells (NK), and coordinate the body's immune response, depending on the nature of the aggressive agent and the T-helper differentiation (Th1 or Th2) [2, 9, 12, 26].

These properties of peptidoglycans indicate the basis for creating immunomodulating formulations for clinical use. Lactobacilli generally recognized as safe (GRAS) group are good sources of peptidoglycans. Toll-like receptors TLR4 and TLR2 for MDP and peptidoglycans have been identified on the surface of lymphocytes and macrophages [25]. The fragments of probiotic bacterial DNA are interesting because of their capacity to stimulate production of cytotoxic lymphocytes and NK cells, activate the complement system, heighten cytostatic and cytotoxic activity of macrophages, and regulate production of immunoregulatory cytokines [25].

Owing to the TTTCGTTT DNA pattern of the strain, *Lactobacillus rhamnosus GG* was found to be a factor preconditioning immunobiological activity of the probiotic producer [8]. Thus, CpG DNA are identified with the help of TLR9 and TLR10 expressed in the intercellular (endosomes) cell compartments. CpG DNA identification with TLR9 and TLR10 results in activation of neutrophils and cytokine production [6, 15, 25].





## Materials and methods

The study examined the dose-dependent effect of Del-Immune V® on production of immunoregulatory cytokines in nondescript mice with body mass of 14–16 g. One hundred forty animals were selected on the basis of the analogue principle, and were divided into 7 groups of 20. The animals were fed balanced rodent food and water ad libitum. Group I, II, and III of mice received 0.5 ml of aqueous solution of Del-Immune V orally in doses of 5, 50, 100 and 500 µg/mouse respectively for 5 days at 24-hour intervals. Group IV of mice were administered 0.5 ml Bifidim suspension (control probiotic medication) orally in the dose of 50 µg/mouse on the same schedule. The Bifidim was a dry mass of antagonistic bifidus bacteria immobilized on enterosorbent in combination with ascorbic acid (Intervetmed Ltd., Kiev, Ukraine). Group V of mice were administered 0.15 M NaCl. Group VI and VII mice were used to study the interferonogenous activity of a single administration of 50 µg/mouse of Del-Immune V® (Group VI) or Bifidim (Group VII). Cytokine production by IFN and TNF was examined in intact and treated mice in 8 hours after initial administration and then every 24 hours for the next 5 days. For this purpose, several mice from each group were killed by cervical dislocation; blood serum, [13] peritoneal exudate macrophages (PEM) [13] and spleen [16], from which splenocytes were harvested [16] from each group of mice for testing.

The optimal dose of Del-Immune V® was also tested via in vitro induction of immunoregulatory cytokines in splenocytes and PEM ( $1 \times 10^7$  cell/ml) of treated and intact mice by culturing cells with the formulation in final concentrations of 5, 50, 100 and 500 µg/ml. Interferonogenous activity of the tested formulations was assessed in comparison with Bifidim 50 µg/ml and standard inductors (IFN-α; Newcastle Disease Virus, NDV–10 TCD<sub>50</sub>/cell; IFN-γ; phytohemagglutinin, PHA–20 µg/ml; *Difco*; TNF, LPS *E. Coli* 0111–4 µg/ml—*Sigma* USA). The levels of cytokine production (IFN and TNF) were determined in 6, 24, and 48 hours after incubation of the cell with the formulations.

Biological activity of TNF was assessed by cytotoxicity in the passaged culture of murine fibroblasts L-929 [13]. The result was recorded on a multiscanner (Dynatech, Switzerland) with a wavelength of 540 nm. The cytotoxicity index was calculated using the formula  $CI = K-O/K \times 100\%$ , where K and O represent optical density values for the cell in the culture medium (RPMI 1640 with 10% FCS). The calibration curve based on standard recombinant TNF formulation *Sigma* was used for standardization of the cytotoxicity index [7].

IFN levels in cell cultures and serum were measured using standard microtitration in the passaged cell culture L-929 against 100 TCD 50 indicator virus (vesicular stomatitis virus, Indiana VSV) with constant CO<sub>2</sub> level [13]. The significance of the results was analyzed by Student-Fisher t-test. Differences of  $P < 0.05$  were considered to be significant [11].



## Results and discussion

Daily oral administration of Del-Immune V<sup>®</sup> or Bifidim to Groups I-III in the course of 5 days in doses of 5, 50, or 500 µg/mouse resulted in marked increase in IFN levels in blood serum (Figure 1). The optimal interferonogenous dose was found to be 50 µg/mouse (Group II). After 24 hours of observation, circulating IFN levels in Group II reached  $4.5 \pm 0.5 \log_2$  U/ml. After repeated administrations, levels reached  $5.5 \pm 0.7 \log_2$  U/ml, in comparison with  $2.0 \pm 0.7 \log_2$  U/ml in the control group (Group V). Further administration of Del-Immune V<sup>®</sup> in a dose of 50 µg/mouse on day 3 allowed for maintenance of the  $5.5 \pm 0.5 \log_2$  U/ml level. Administration of the formulation on days 4 and 5 resulted in nonsignificant decreases in circulating IFN levels. When Del-Immune V<sup>®</sup> was administered in doses of 5 and 500 µg/mouse (Groups II and III), findings were similar, although maximum interferon levels were not as high.

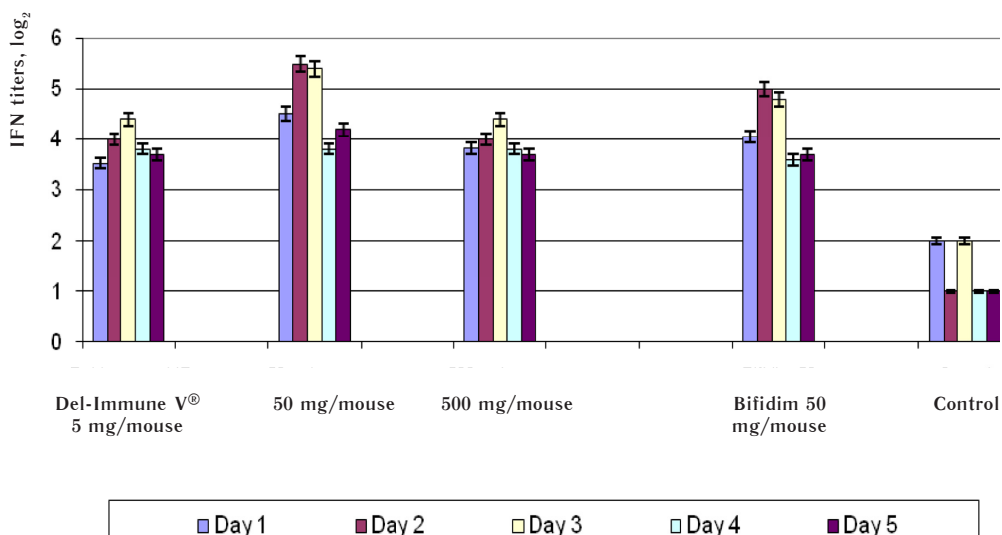


Fig. 1. Interferon activity of Del-Immune V and Bifidim *in vivo*

One-time oral administration of Del-Immune V<sup>®</sup> or Bifidim to mice in a dose of 50 µg/ml resulted in increased circulating IFN level 8 hours after administration. The highest serum IFN level was reported 24 hours after administration, while levels in control group animals remained unchanged (Table).

Forty-eight hours after administration of Del-Immune V<sup>®</sup>, serum IFN levels in all active groups remained reliably enhanced in comparison with the control group, but IFN was later eliminated from the body. The maintenance of circulating IFN levels was possible only through repeated administration.

Table

**Murine Serum IFN Titers after One-Time Administration  
of Del-Immune V or Bifidim**

Studied formulations; doses of 50 µg/ml	Serum IFN titers, log <sub>2</sub>		
	8 h	24 h	48 h
Del-Immune V	4.00 ±0,03*	4.40 ±0,03*	3.41±0,03*
Bifidim	3.60 ±0,01*	4.00 ±0,03*	2.70 ±0,03
Control	2.00 ±0,02	2.00 ±0,03	2.00 ±0,03

\* p ≤ 0,05

The comparative analysis of interferonogenous activity induced by formulations made on the basis of living bifidus bacteria cells (Bifidim) or structural components of *Lactobacillus rhamnosus V* (Del-Immune V®) was performed by testing the interferon-synthesis activity of leukocytes. Splenocytes of the mice receiving experimental formulations were cultured with NDV and TNF inducers, resulting in 2-fold increase of interferon response in comparison with intact animal cells (Figure 2), indicating that the experimental formulations positively affected immune response status. Interferon status was determined by assessing circulating IFN titers (serum IFN), IFN-α and IFN-α production by immunocompetent cells as a response to adequate in vitro stimulation, and spontaneous IFN production.

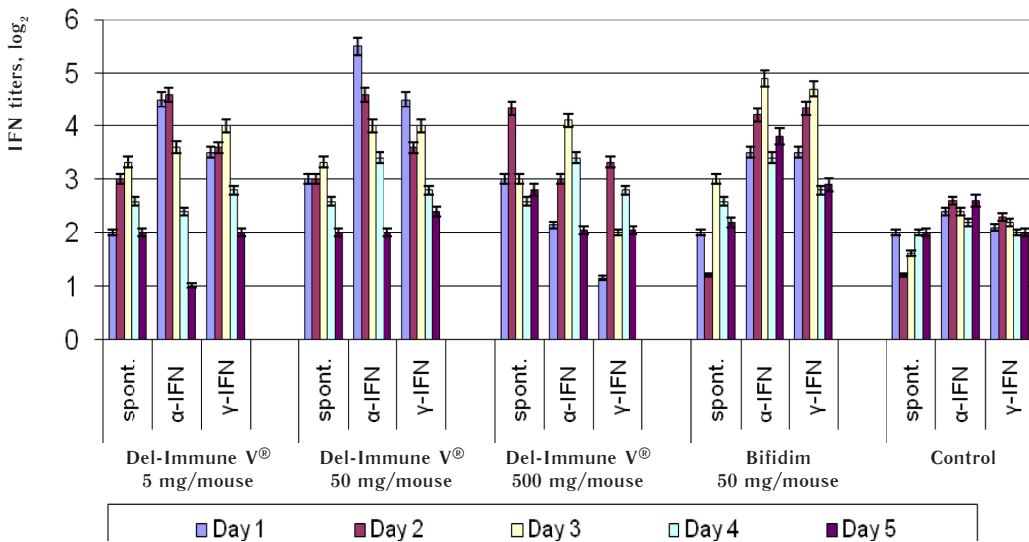


Fig. 2. Interferon activity in splenocytes cultured with NDV and PHA inducers following administration of Del-Immune V or Bifidim

After administration of certain IFN inducers, capacity for enhanced production of IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  was seen in splenocytes in 24, 48, and 72 hours after administration of the experimental formulations. One of the contraindications for IFN inducer use is development of hyporeactivity— inhibition of IFN production after repeated administration of the formulation. Refractoriness of animals was determined by assessing INF- $\alpha$ - and - $\gamma$  levels in response to adequate stimulation. Decreases in IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  production were reported on day 4 after the initial administration and reached the control levels on day 5. In the Bifidim group, it was possible to observe restoration of the interferon-producing capacity of immunocytes on day 5, when activation of the interferon-synthesis capacity of splenocytes was noted. These findings indicate that administration to mice of optimal doses of the probiotic formulations Del-Immune V<sup>®</sup> and Bifidim on the appropriate schedule stimulates IFN production and increases efficacy of other interferonogenous inducers.

Preincubation of PEM cultures of experimental and intact animal cells with Del-Immune V<sup>®</sup> and Bifidim resulted in cytokine synthesis stimulation, as measured by IFN titers (Figure 3) and TNF concentrations (Figure 5). Adding Del-Immune V<sup>®</sup> or Bifidim in the doses of 5, 50, or 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  to PEM cultures of experimental and intact mice resulted in IFN synthesis (Figure 3). It should be noted that the interferon activity of supernatants depended on the concentration of experimental formulations added to PEM. Thus, when the concentration was 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , IFN production was much lower than when it was 50 or 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , although it was still almost 6 times higher than the control level. At the same time, concentrations of 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  resulted in an accumulation of stimulated IFN titers with similar values, indicating that the optimal dose for Del-Immune V<sup>®</sup> is more likely to be close to 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

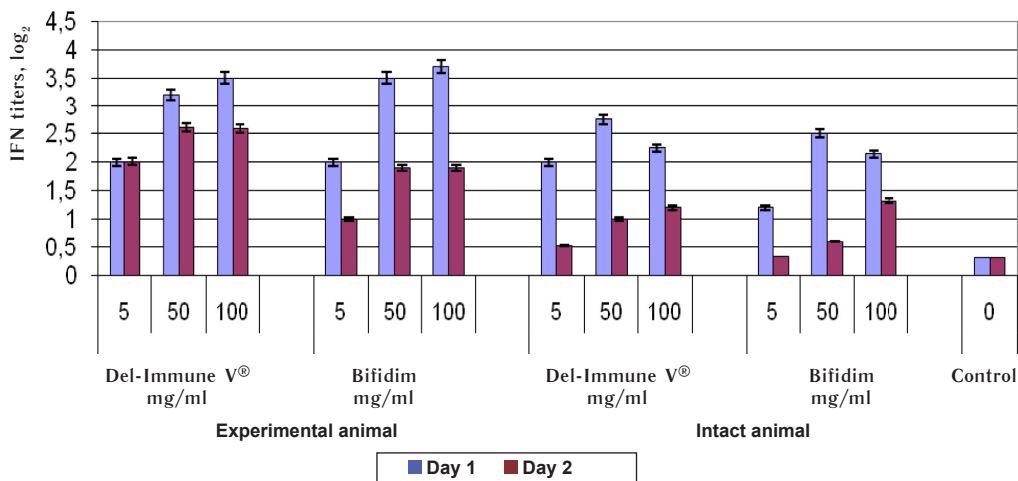


Fig. 3. Interferonogenous impact of Del-Immune V and Bifidim on peritoneal macrophages; comparison of cultures of intact and experimental animal cells



The highest IFN levels in supernatants were reported on day 1 of cell culturing with experimental formulations. However, the levels of IFN in the control group remained lower than in the experimental groups on both days. Heating serum samples of the animals receiving Del-Immune V<sup>®</sup> or Bifidim for 30 minutes at the temperature of 60 °C decreased their capacity to inhibit reproduction of vesicular stomatitis virus in cell culture L<sub>929</sub>. The physical and chemical properties of the IFN produced were characteristic of IFN- $\alpha/\beta$ - and - $\gamma$  [13].

IFN- $\gamma$  is produced by sensitized T-lymphocytes CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> and NK cells. IFN- $\gamma$  demonstrates a wide range of immunotropic effects, provides for Th1 differentiation of T-helpers, and stimulates expression on membranes of HLA-DR antigens; without these functions, identification of bacterial antigens or further activation of T-lymphocytes (including T-helpers stimulating maturation of NK-cells as well as some subpopulations of B-lymphocytes) is impossible [13].

IFN- $\gamma$  also participates in the immune response of macrophage cells, inducing production of TNF and IL-1[13] and modulating their functions. Therefore, the level of TNF, a pleiotropic cytokine produced by primed monocytes and macrophages, lymphocytes, and NKC, was assessed in murine serum (Figure 4) [14, 21, 22, 27].

Oral administration of Del-Immune V<sup>®</sup> or Bifidim in doses of 5, 50, or 500  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  resulted in endogenous TNF production. After administration of Del-Immune V<sup>®</sup> or Bifidim in the dose of 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , serum TNF was 0.6 ng/ml ( $P < 0.05$ ) and 0.8 ng/ml ( $P < 0.05$ ), respectively, while in the control group it did not exceed 0.3 ng/ml. Maximum production of this cytokine was reported 8 hours after administration of these formulations.

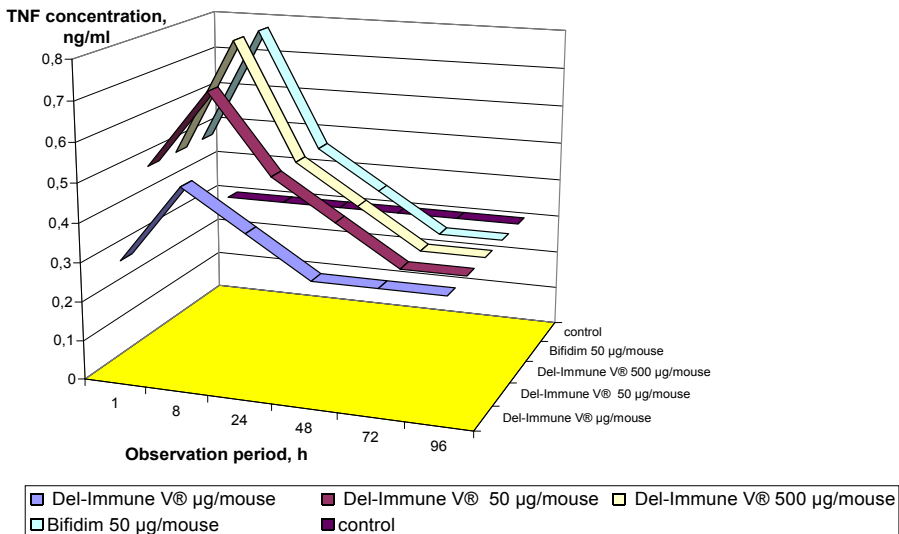


Fig. 4. Murine serum TNF dynamics after administration of Del-Immune V and Bifidim

Del-Immune V<sup>®</sup> administered in the dose of 5 µg/mouse resulted in insignificant increase in circulating TNF concentration to 0.4 ng/ml ( $P > 0.05$ ), in comparison with 0.3 ng/ml in the control group. It should be noted that oral administration of Del-Immune V<sup>®</sup> in the doses of 50 and 500 µg/ml resulted in practically equal circulating TNF indices (0.6 ng/ml and 0.7 ng/ml, respectively). This TNF production in vivo calls for further studies since TNF mobilizes leukocytes, terminates inflammatory processes, and plays an important role in the effector and regulatory networks of body immune response. Enhanced TNF production leads to activation of neutrophils, macrophages, and lymphocytes, thus strengthening anti-infection immunity [14, 27].

TNF-induced cascade of induction signals results in gradual production of IL-1 and IL-2, activation of T-lymphocytes, and generation of anti-tumor effector cells—lymphokine-activated killers lysing different tumor target cells. TNF intensifies the proliferative response in mixed culture lymphocytes and tumor cells, and demonstrates adjuvant activity for T- and B-lymphocytes. It should be noted that circulating TNF was quickly eliminated from the body.

In vitro trials showed that adding Del-Immune V<sup>®</sup> or Bifidim in concentrations of 5, 50, or 100 µg/ml to macrophages of experimental and intact mice resulted in TNF production peaking 8 hours after adding these formulations (Figure 5). TNF production potential of PEM was dose-dependent. The optimal in vitro concentration of Del-Immune V<sup>®</sup> and Bifidim was 50 µg/ml.

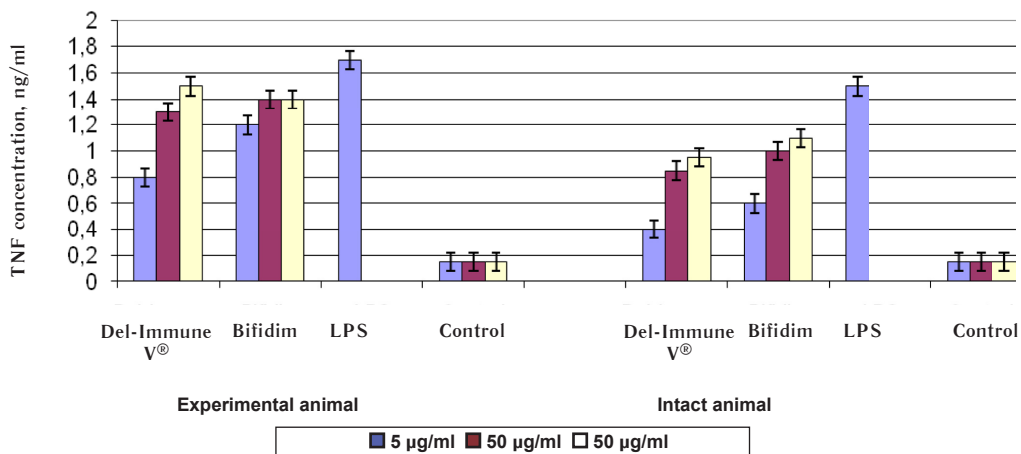


Fig. 5. TNF production 8 hours after adding Del-Immune V, Bifidim, or LPS to peritoneal macrophages of experimental or intact mice

TNF production by the macrophages of the experimental mice after administration of a specific LPS inductor, Del-Immune V<sup>®</sup>, or Bifidim was

more intensive than by PEM of the intact mice. Both Del-Immune V<sup>®</sup> and Bifidim induced a higher immune response in macrophage cells of experimental mice, resulting in enhanced production of IFN and TNF. Cell-mediated immune regulation and stimulation of effector function by macrophages are the indicators of the immunomodulating activity of the above formulations. The dose-dependent responses of mice to these immunomodulators should be tested in human subjects to determine whether similar effects will be found.

Derivatives of microbial origin, including lipopolysaccharides (LPS), MDP, and CpG DNA, are identified by immunocompetent cells with TLR receptors [6, 25].

Thus, LPS *E. coli* stimulates mainly monocytes and macrophages [23]. The receptor for LPS is the antigen CD14, which is protein in the family and it first interacts with microbial components ahead of TLR activation.

It can be found on monocytes, macrophages, neutrophils, lymphocytes, and bowel epithelial cells. Fixation of microbial derivatives with receptors results in signal change in the given biological system, which stimulates the synthesis and release of different immunity mediators or cytokines. It should be noted that gram-positive bacteria, including lactobacilli, activate the major class II histocompatibility complex, which induces IFN- $\gamma$  and IL-12 necessary for Th1 differentiation of T-helpers. Gram-negative bacteria and LPS (a major component of the cell wall of gram-negative bacteria; lipopolysaccharides are endotoxins and important antigens) induce monocytic production of IL-10, inhibiting cytotoxicity activation of IFN- $\gamma$  and secretion by T- and NK-cells [5]. Since clinical applications of LPS and gram-negative bacteria are limited because of high toxicity, finding selective immunomodulators is one of the main conditions for improving the efficacy of immunostimulating therapy.

In this study, Del-Immune V<sup>®</sup> stimulated the functional activity of monocyte-macrophagal murine cells. However, higher dosages did not always result in higher efficacy. The success of immune active therapy can be enhanced not only by new medications but also by their rational use.

The living cells of Bifidim stimulated *in vitro* TNF production more intensively than Del-Immune V<sup>®</sup>. Cytokine production *in vitro* induced by Del-Immune V<sup>®</sup> and Bifidim was compared with cytokine production *in vivo* [3]. Induction of pro-inflammatory cytokines IFN and TNF by Del-Immune V<sup>®</sup> and Bifidim *in vitro* suggests that these formulations stimulated a nonspecific immune response *in vivo*. On the basis of these results documenting the potential of oral Del-Immune V<sup>®</sup> and Bifidim to stimulate synthesis of IFN- $\alpha/\beta$ - and - $\gamma$  as well as TNF, it should also be noted that IFN- $\gamma$  can induce expression of TNF- $\alpha$  receptors on macrophages [4]. These cytokines synergistically stimulate macrophage cells that, in turn, intensify killing activity. IFN-gamma increases the expression of class II MHC proteins on professional antigen presenting cells, and so





promotes antigen presentation to helper T cells as well. It also enhances the expression of important signaling receptors — Toll-like receptors, important for the development of protection against viral infections and hypersensitivity, as some of the ligands of these receptors regulate the function of adhesion molecules such as CD11b and L-selectin [25]. The synergistic activity of cytokine (IFN and TNF) production induced by Del-Immune V<sup>®</sup> and Bifidim helps to demonstrate some therapeutic effects of these formulations. The comparative study of Del-Immune V<sup>®</sup> and Bifidim demonstrated that both formulations had a stimulating effect on cytokine secretion activity of the splenocytes and macrophages necessary for production of IFN and TNF. Bifidim contains living cells of bifidus bacteria, while active substances of Del-Immune V<sup>®</sup> are MP (muramyl peptides) and nucleoproteids of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* V. Del-Immune V<sup>®</sup> demonstrated higher interferonogenous activity in vivo and in vitro than Bifidim (Figures 1 and 3). However, in vitro, Bifidim stimulated higher levels of TNF in comparison with Del-Immune V<sup>®</sup> (Figure 5).

The choice of probiotic formulation (live probiotics cells or structural derivatives of probiotic cells) depends on a large number of factors, including potential, mechanism, mode of administration and desired immune response. The mechanisms of action of this group of formulations are most likely multifactorial and include a number of signals, cell types, and receptors. One characteristic of probiotic activity is selective effects on the immune system of the macro-organism, whereby only those parts of the natural immune response that require correction are altered [1, 27].

Probiotics demonstrate a variety of influences on immunological processes, depending on the type and strain of the bacteria. For example, bacteria *L. fermentum* and *L. plantarum* stimulate B-cell proliferation, while *L. acidophilus* mainly causes induction of T-cell immune response [19]. Incubation of different strains of lactobacilli with human peripheral blood mononuclears showed that *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. lactis*, *L. casei* and *L. plantarum* stimulate, to varying degrees, production of IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ .<sup>66</sup> Similar findings show that *L. plantarum*, *L. rhamnosus* and *L. paracasei* ssp. *paracasei*, when cultured with peripheral blood mononuclears, intensify secretion of IL-12 [18].

Certain structural components of lactobacilli, including peptidoglycans and DNA fragments, can also influence the secretion activity of human monocytes in vitro through intensified production of IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ ; in vivo they can activate synthesis of E2 prostaglandin and activate the system of complement and maturation of T-cell precursors [20].

In this study there were shown that the dry enzymatic lysate powder of a special lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (DV Strain) Del-Immune V<sup>®</sup> in the dose of 50  $\mu$ g/mouse could actively induce IFN and moderately stimulate the production of tumor necrosis factor, showing significant promise as an immunomodulating preparation. Its natural





origin, interferonogenous activity, safety, usability, and the possibility of oral administration allow us to consider Del-Immune V<sup>®</sup> as modern immunomodulating medications.

## REFERENCES

1. *Christensen H.R., Frokier H., Pestka J.J.* Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *The Journal of Immunology*. — 2002. — 168. — P. 171–178.
2. *Drannik G.M., Mosienko V.S.* Blasten — stimulator of production IL-1 on patients with chronic obstructive bronchitis. *Galytsky Medical News*. — 1998. — 5(3). — P. 34–42. (in Ukraine)
3. *Foligne F., Nutten S., Grangette C., Dennin V., Goudercourt D., Poiret S., et al.* Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J.Gastroenterol*. — 2007. — 13(2). — P. 236–234.
4. *Gomes-Flores R., Tucker S.D., Kansal R., Tamez-Guerra R., Mehta R.T.* Enhancement of antibacterial activity of clofazimine against *Mycobacterium avium-Micobacterium intracellulare* complex infection induced by IFN-gamma is mediated by TNF-alpha. *J Antimicrob Chemother*. — 1997. — 39(2). — P. 189–97.
5. *Hessle C., Andersson B., Wold A.E.* Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect Immun*. — 2000. — 68(6). — P. 3581–86.
6. *Hoarau C., Gerard B., Lescanne E., et al.* TLR9 activation induces normal neutrophil responses in a child with IRAK-4 deficiency: involvement of the direct PI3K pathway. *J Immunol*. — 2007. — 179(7). — P. 4754–65.
7. *Houde M., Arora D.J.* Application of the 'area under the curve' method to measure the tumor necrosis factor activity. *J.Immunol Methods*. — 1990. — 132(2). — P. 297–8.
8. *Iliev I.D., Kitazawa H., Shimosato T., et al.* Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern. *Cell Microbiol*. — 2005. — 7930. — P. 403–414.
9. *Kaliuzhin O.V.* Muramil peptide's derivatives in experiment and in clinic. *Journal of Microbiology (Russia)*. — 1998. — 1. — P. 104–8. (in Russian)
10. *Karsonova M.I., Andronova T.M., Pinegin B.V., Khaitov R.M.* Immunostimulating activity of muramyl dipeptide and its derivatives. *Journal of Microbiology, Moscow*. — 1999. — 3. — P. 104–110. (in Russian)
11. *Lakyn T.F.* *Biometry. M: Vischaya skola.*, 1990. — 351 p. (in Russian)
12. *Lammers K.M., Brigidi P., Vitali B., et al.* Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human pe-



ripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* — 2003. — 38(2) — P. 165–72.

13. *Lasarenko L.N., Spivak N.Y., Michaylenko O.M., Suchych O.M.* Papilloma virus infection and interferon. System-K: Phytocociocenter. 2005. — 288 p. (in Russian)

14. *Lei L., Xiong Y., Chen J., Yang J-B., Wang Y., Yang X-Y., et al.* TNF-alpha stimulates the ACAT1 expression in differentiating monocytes to promote the CE-laden cell formation. *Journal of Lipid Research.* — 2009. — 50. — P. 1057–1067.

15. *Leifer C.A., Kennedy M.N., Mazzone A., Lee C., Kruhlak M.J., Segal D.M.* TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol.* — 2004. — 173(2). — P. 1179–83.

16. *Lymphocytes.* Methods: J.Clauth. — M: Mir, 1990. — 395 p.

17. *Mosienko V.S., Mosienko M.D., Savtsova Z.D., et al.* Blasten — new domestic immunomodulator of the biological origin. *Magazine AMS Ukraine.* — 1999. — 5(1). — P. 79–86. (in Russian)

18. *Muller-Alouf H., Gragette C., Gounder court D., et al.* Comparative cytokine inducing pattern of lactic acid bacteria used for mucosal vaccine development. *Immunol. Letters.* — 1999. — 69(1) — Abstr. 6.6.

19. *Nikolaeva T.N., Soryna V.V., Votryn S.V.* Analysis of influence of probiotic strains for support of immune homeostaze of human organism. In Abstracts of International Congress «Probiotics, Prebiotics, Synbiotics and Functional Food: Scientific and Clinical Aspects.» *Clinical Nutrition.* — 2007. — 1–2. — 56. (in Russian)

20. *Prokop'ev A.A., Kalinina N.M., Andreev S.V.* Peptidoglycan isolated from *Lactobacillus bulgaricus*: its effect, mediated by the complement system, on pre-T-cell maturation. *Biull Eksp Biol Med.* — 1987. — 104(10). — P. 492–4. (in Russian)

21. *Qin Y., Auh S., Blokh L., Long C., Gagnon I., Hamann K.J.* TNF-alpha induces transient resistance to Fas-induced apoptosis in eosinophilic acute myeloid leukemia cells. *Cell Mol Immunol.* — 2007. — 4(1) — P. 43–52.

22. *Scheurich P., Thoma B., Ucer U., Pfizenmaier K.* Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)-alpha: induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha mediated enhancement of T cell responses. *The Journal of Immunology.* — 1987. — vol. 138, 6 — P. 1786–1790.

23. *Shirinskii V.S., Zhuk E.A.* Characteristics and clinical use of immunostimulants. *Ter.Arkh.* — 1990. — 62(12). — P. 125–32. (in Russian)

24. *Spivak N.Y., Pidgorsky V., Timoshok N., Lasarenko L., Shynkarenko-Sichel L.* Immune regulatory cytokines Del-Immune V<sup>®</sup> induction and its impact on cytotoxicity of natural killer cells. II European Conference on Probiotics and their Applications, Cracow, Oct.15–17, 2008. Conference publication. — P. 21.



25. Takeda K., Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* — 2005. — 17(1). — P. 1–14.
26. Tracey K., Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annual Review of Medicine.* 1994. — 45. — P. 491–503.
27. Winkler P., Ghadimi D., Schezenmeir J., Kraehenbuhl J-P. Molecular and Cellular Basis of Microflora-Host Interactions. *The Journal of Nutrition.* — 2007. — 137. — P. 756S–772S.

**В.С. Подгорский<sup>1</sup>, Л.Н. Шинкаренко-Сишел<sup>2</sup>, Н.А. Тимошок<sup>1</sup>,  
А.В. Чейпеш<sup>1</sup>, Н.Я. Спивак<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАНУ,  
ул. Заболотного, 154, Киев, МСП, Д03680, Украина

<sup>2</sup>Компания Pure Research Products, LLC, 6107, Боулдер, Колорадо, 80301, США,  
тел.: (303) 530 77 61, e-mail: lshynkarenko@ecentral.com, lsichell@gmail.com

## **ВЛИЯНИЕ СУХОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО ЛИЗАТА DEL-IMMUNE V<sup>®</sup> НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ**

### **Реферат**

Del-Immune V<sup>®</sup>, как препарат сопровождения, проявил высокую эффективность для поддержки иммунной системы, однако, механизмы действия и оптимальные дозы еще не исследованы. Показано, что препарат Del-Immune V<sup>®</sup>, сухой ферментативный лизат штамма *Lactobacillus rhamnosus V*, содержащий мурамил пептиды и фрагменты ДНК, в диапазоне доз 5–500 мг/мышь (оптимум 50 мкг/мышь) является активным индуктором ИФН, влияет на продукцию фактора некроза опухоли (ФНО) в системах *in vivo* и *in vitro*. Его индуцирующая активность сопоставима с показателями, полученными при использовании комплексного пробиотика Бифидим, однако живые клетки бифидобактерий, что входят в состав препарата, более интенсивно стимулировали продукцию ФНО *in vitro* сравнительно с Del-Immune V<sup>®</sup>. Уровни продукции цитокинов под влиянием препаратов в системе *in vivo* коррелировали с продукцией цитокинов в системе *in vitro*. Наиболее высокие уровни ИФН после приема препаратов выявлены на 1 сутки эксперимента. В контрольной группе уровни ИФН оставались неизменными. Обеспечение повышенного уровня циркулирующих ИФН было возможно только повторным введением препаратов.

Ключевые слова: Del-Immune V<sup>®</sup>, *Lactobacillus rhamnosus V*, пробиотик Бифидим, интерферон, фактор некроза опухоли, иммунная система.



**В.С. Підгорський<sup>1</sup>, Л.М. Шинкаренко-Сишел<sup>2</sup>, Н.О. Тимошок<sup>1</sup>,  
А.В. Чейпеш<sup>1</sup>, М.Я. Співак<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ, вул. Заболотного, 154,  
Київ, МСП, Д03680, Україна

<sup>2</sup>Компанія Pure Research Products, LLC, 6107, Боулдер, Колорадо, 80301, США,  
тел.: (303) 530 77 61,

e-mail: lshynkarenko@ecentral.com, lsichel1@gmail.com

## **ВПЛИВ СУХОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО ЛІЗАТУ DEL-IMMUNE V<sup>®</sup> НА ПРОДУКЦІЮ ЦИТОКІНІВ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ МОДЕЛЯХ**

### **Реферат**

Del-Immune V<sup>®</sup>, як препарат супроводу, виявив високу ефективність для підтримки імунної системи, однак, механізми дії та оптимальні дози ще не досліджені. Показано, що препарат Del-Immune V<sup>®</sup>, сухий ферментативний лізат штаму *Lactobacillus rhamnosus V*, що містить мураміл пептиди і фрагменти ДНК, в діапазоні доз 5–500 мг/мишу (оптимум 50 мкг/мишу) є активним індуктором ІФН, впливає на продукцію фактора некрозу пухлини (ФНП) в системах *in vivo* та *in vitro*. Його індукуюча активність близька до показників, одержаних при використанні комплексного пробіотику Біфідим, проте живі клітини біфідобактерій, що входять до складу препарату, більш інтенсивно стимулювали продукцію ФНП *in vitro* порівняно з Del-Immune V<sup>®</sup>. Рівні продукції цитокінів під впливом препаратів в системі *in vivo* корелювали з продукцією цитокінів в системі *in vitro*. Найбільш високі рівні ІФН після прийому препаратів виявлені на 1 добу експерименту. У контрольній групі рівні ІФН залишалися незмінними. Забезпечення підвищеного рівня циркулюючих ІФН було можливо тільки через повторне введення препаратів.

Ключові слова: Del-Immune V<sup>®</sup>, *Lactobacillus rhamnosus V*, пробіотик Біфідим, інтерферон, фактор некрозу пухлини, імунна система.



Н.А. Матвеева<sup>1</sup>, А.О. Потрохов<sup>1</sup>, Ю.Й. Кудрявец<sup>2</sup>, О.Ю. Кваско<sup>1</sup>,  
А.М. Шаховський<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,  
вул. Заболотного, 148, Київ, 03680, Україна, тел.: +38 (044) 526 71 04

<sup>2</sup> Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології  
ім. Р.Е. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна,  
тел.: +38 (044) 455 91 50, e-mail: joyna56@gmail.com

## ЧУТЛИВІСТЬ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ЦИКОРІЮ З ГЕНОМ ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА-2В ЛЮДИНИ ДО УРАЖЕННЯ ВІРУСОМ ТЮТЮНОВОЇ МОЗАЇКИ

*Проведено порівняння стійкості до вірусу тютюнової мозаїки трансгенних рослин цикорію *Cichorium intybus* L. з геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини та вихідних нетрансформованих рослин. Показано, що перенесення гена *inf- $\alpha 2b$*  до рослин цикорію супроводжується синтезом фактору з високою інтерферон-специфічною активністю проти вірусу везикулярного стоматиту. Однак, це не призводить до збільшення стійкості рослин цикорію до вірусу тютюнової мозаїки, більше того, синтез інтерферону супроводжується підвищенням вірусного врожаю в трансгенних рослинах.*

*Ключові слова: *Cichorium intybus* L., трансгенні рослини, ген *inf- $\alpha 2b$* , вірус тютюнової мозаїки.*

Сучасні біотехнологічні методи, зокрема, генетична інженерія, в останні десятиліття активно використовуються для створення рослин з новими корисними ознаками — стійких до гербіцидів, бактеріальних та вірусних інфекцій, таких, що не вражаються комахами, з покращеними смаковими якостями та ін. Одним з провідних напрямків є створення трансгенних рослин, що продукують фармакологічно активні білки, включаючи антитіла, гормони тощо [3]. До рослин, що можуть бути використані з лікувальною та профілактичною метою, належать такі, що продукують  $\alpha$ ,  $\beta$  та  $\gamma$ -інтерферони людини. Інтерферони являють собою природні білки, які мають противірусну активність та є сигналами, що активізують захист при вірусному ураженні.

Показано, що інтерферони синтезуються у трансгенних рослинах, до геному яких перенесено гени інтерферонів людини, причому інтерферон рослинного походження може мати противірусну активність [6, 8, 13].



Ще у 1982 р. було з'ясовано, що інтерферон людини є активним проти вірусних інфекцій ряду рослин [11]. Проведені у подальшому дослідження показали, що у різних рослинних системах людський інтерферон може бути активним [14], однак можлива і відсутність захисного ефекту інтерферону у рослинах при їх ураженні фітовірусами [5, 7, 15]. Оскільки вказані дослідження проведено на різних видах рослин, становить інтерес розширити їх коло з метою визначення того, чи є видоспецифічним позитивний або негативний противірусний ефект інтерферону. Нами раніше [1, 2] було створено трансгенні рослини цикорію з геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини.

Метою даної роботи було дослідження того, чи спричинює перенесений до цих рослин ген *ifn- $\alpha 2b$*  стійкість до вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) та співставлення стійкості або чутливості трансгенних рослин до ВТМ з наявністю/відсутністю противірусної активності рослинних екстрактів щодо вірусу везикулярного стоматиту.

### Матеріали та методи досліджень

Матеріалом для досліджень слугували отримані нами раніше трансгенні рослини цикорію *Cichorium intybus* L. сорту Пала росса [1, 2]. Для створення цих рослин використовували метод *Agrobacterium rhizogenes*-або *A. tumefaciens*-опосередкованої трансформації. Бактерії містили векторні конструкції рСВ161 та рСВ124 з селективним геном *nptII* та цільовим геном *inf- $\alpha 2b$*  (відповідно у *A. rhizogenes* та *A. tumefaciens*). Конструкції відрізнялися промоторами гена *inf- $\alpha 2b$*  – коренеспецифічним промотором цукрового буряку M11 або 35S промотором вірусу мозаїки цвітної капусти. Отримані після трансформації рослини культивували у стерильних умовах на агаризованому середовищі Мурасіге та Скуга [10] при температурі 24 °С, 16-годинному світловому періоді. Рослини розмножували живцюванням на тому ж середовищі та пересаджували у ґрунт (в умовах теплиці).

Присутність генів *nptII* та *ifn- $\alpha 2b$*  в трансформованих рослинах визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з використанням відповідних праймерів (5'-ССТГААТГААСТССАГГАСГАСГАС-3' та 5'-GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG-3', 622 п.н.; 5'-TTGAT-GCTCCTGGCACAG-3' та 5'-TTCTGCTCTGACAACCTC-3', 396 п.н.) за методикою, описаною нами раніше [2]. Для доведення транскрибування перенесених генів проводили полімеразну ланцюгову реакцію, поєднану зі зворотною транскрипцією, ЗТ-ПЛР [1].

Для приготування білкових екстрактів корені або листки рослин зважували, додавали 100 мМ Tris/HCl, рН 8,0 (5 мМ Na<sub>2</sub>EDTA, 100 мМ NaCl, 10 мМ меркаптоетанолу, 2,5% полівінілпірролідону, 1% сахарози) і розтирали на холоді. Матеріал переносили в центрифужні пробірки та центрифугували 5 хв при 10000g (+4 °С). Надосадову рідину відбирали, переносили в чисту пробірку і центрифугували 25 хв при 16000g (+4 °С).





Аліквоту отриманого супернатанту використовували для визначення концентрації білку за методом Бредфорда [4].

Противірусну активність екстрактів трансгенних рослин визначали за стандартною методикою [12] за зниженням цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) у клітинах нирки бика лінії MDBK, високочутливих до антивірусної дії альфа-інтерферону людини. Клітинна лінія MDBK та ВВС штам Індіана були отримані з Клітинного банку ліній з тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Е. Кавецького НАН України. Субстратзалежні клітини MDBK культивували в живильному середовищі DMEM (Сігма, США) з 10% інактивованої сироватки новонародженого теляти (СНТ) (Сігма, США), 40 мкг/мл гентаміцину у зволоженій атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С. Пересівання клітин здійснювали за допомогою розчину версена. У лунки 96-лункового планшету (СантеЛаб, Україна) вносили по 200 мкл суспензії клітин MDBK у середовищі DMEM з 5% СНТ із розрахунку 2x10<sup>4</sup> клітин /лунку. Через 24 години на лунки планшета вносили вихідний розчин зразків і титрували 5- або 2-кратними розведеннями, використовуючи 4 ряди паралелей для кожного зразка. Через 24 години до лунок вносили 100 ЦТД/50 ВВС у середовищі DMEM з 2% СНТ. Результати реєстрували через 24 години при 100% ЦПД у контролі вірусу шляхом забарвлення клітин кристалічним фіолетовим. За одну одиницю активності ІФН приймали розведення зразків, при якому 50% клітинного моношару було захищено від цитопатичної дії ВВС. Середній титр ІФН визначали за Ридом і Менчем та виражали в міжнародних одиницях (МО/г маси рослини або МО/мг загального розчинного білку). Як стандарт використовували міжнародний стандарт інтерферону-альфа, отриманий з ВОЗ (2<sup>nd</sup> WHO International Standard 1999. Interferon alpha 2b Human, rDNA E.Coli derived 95/566, 70000 IU per ampoule).

Дослідні рослини інфікували вірусом тютюнової мозаїки з колекції кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Концентрація вірусного препарату становила 200 мкг/мл у 0,1М PBS, рН 7,4. Вірусомістний матеріал був інокулюваний в рослину механічним втиранням в нижню листкову пластинку дослідних рослин. Контролями слугували інфіковані нетрансформовані рослини та рослини, які не інфікували вірусом.

Для кількісного визначення вірусу ВТМ у рослинах цикорію застосовували метод імуноферментного аналізу (ІФА) у модифікації «сендвіч». Було використано комерційну тест-систему («Loewe», Німеччина). Для приготування екстрактів листки або корені розтирали у 0,1М фосфатному буфері (8 г/л NaCl, 0,2 г/л KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,8 г/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0,2 г/л KCl, рН7,4), центрифугували (центрифуга Бекхем, 5 тис. об/хв., 20 хв.), супернатант відбирали. Отримані екстракти використовували як антиген. ІФА проводили за стандартною методикою [9]. Результати реєстрували на автоматичному ELISA-рідері («Dyplex Technologies», Німеччина) при



довжині хвилі 405 нм. За позитивний результат приймався показник  $E_{405}$ , що вдвічі перевищував показник негативного контролю.

Статистичний аналіз експериментальних даних проводили з використанням ліцензованого пакету прикладних програм STATISTICA-6,0 (StatSoft).

### Результати та їх обговорення

Перед визначенням чутливості трансгенних рослин цикорію з геном *ifn- $\alpha$ 2b* до ВТМ проводили: ПЛР та ЗТ-ПЛР аналізи; аналіз екстрактів трансгенних рослин на наявність інтерференоподібної активності по відношенню до ВВС. Для підтвердження перенесення генів до рослин цикорію проводили ПЛР. Аналіз тотальної ДНК рослин, отриманих після трансформації *A. rhizogenes* з вектором рСВ161, та рослин, отриманих з використанням *A. tumefaciens* (вектор рСВ124), виявив присутність як селективного гена *nptII*, так і цільового гена *ifn- $\alpha$ 2b*. Для рослин, трансформованих векторами рСВ161 та рСВ124, було проведено вибіркового ПЛР-аналіз зворотних транскриптів селективного та цільового генів. Показано, що в усіх чотирьох аналізованих лініях рСВ161-трансформованих рослин відбувалася транскрипція селективного та цільового генів (рис. 1), а для трьох рСВ124-трансформованих ліній (з чотирьох досліджуваних) спостерігалось явище «мовчання» гена *ifn- $\alpha$ 2b*.

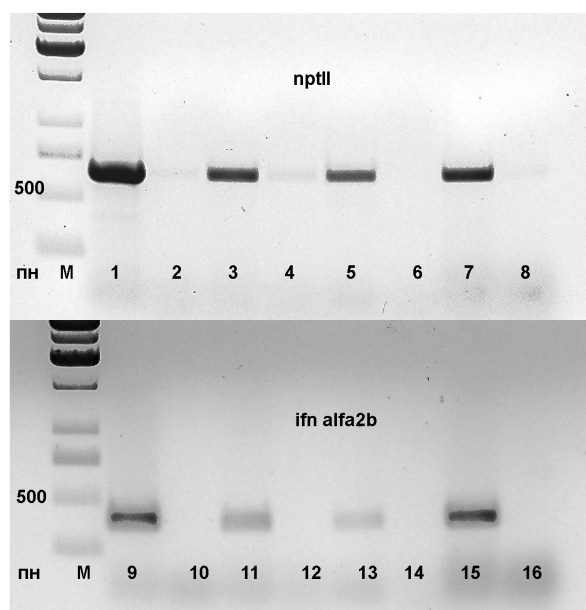


Рис. 1. — ПЛР аналіз зворотних транскриптів генів *nptII* (1–8) та *ifn- $\alpha$ 2b* (9-16), рСВ161: парні треки — синтез зворотних транскриптів у присутності ревертази, непарні — ЗТ-ПЛР без ревертази.

Fig. 1. — PCR analysis of reverse transcripts of genes *nptII* (1–8) and *ifn- $\alpha$ 2b* (9-16), рСВ161: even tracks — the synthesis of reverse transcripts in the presence of revertase, odd — RT-PCR without revertase.



Для визначення наявності або відсутності антивірусної активності в екстрактах трансгенних рослин з геном інтерферону, створених при використанні різних векторів, було проведено тестування екстрактів на клітинах нирки бика лінії MDBK у присутності цитопатогенного вірусу ВВС. Екстракти нетрансформованих рослин (контроль) не виявили інтерфероподібної активності. Екстракти з ряду трансгенних рослин також не мали противірусної активності (табл. 1), хоча результати ЗТ-ПЛР були позитивними. У той же час, у декількох ліній виявлено досить високу антивірусну активність – до 9327 МО/г маси рослин. Противірусна активність кореневих екстрактів рослин, трансформованих вектором рСВ161 з геном інтерферону під коренеспецифічним промотором, була значно вищою, ніж активність листових екстрактів тих самих рослин (табл. 1).

Таблиця 1  
Противірусна активність по відношенню до вірусу везикулярного стоматиту білкових екстрактів трансгенних рослин цикорію

Table 1  
Vesicular stomatitis virus antiviral activity of protein extracts of transgenic chicory plants

Лінія	Вектор	Зразок	Активність	
			МО/г маси	МО/мг загального білку
161/6	pCB161(Mll::HuINFa-2b)	корені	2250	358,34
		листя	288	262,69
161/13	pCB161(Mll::HuINFa-2b)	корені	1620	1203,56
		листя	0	0
161/21	pCB161(Mll::HuINFa-2b)	корені	0	0
		листя	0	0
161/14	pCB161(Mll::HuINFa-2b)	корені	2160	587,72
124/22	pCB124(35S::HuINFa-2b)	листя	0	0
124/8	pCB124(35S::HuINFa-2b)	листя	0	0
124/8/6	pCB124(35S::HuINFa-2b)	листя	0	0
124/7	pCB124(35S::HuINFa-2b)	листя	0	0
124/5	pCB124(35S::HuINFa-2b)	листя	9327	3291,44
К	Контроль (нетрансформовані рослини)	листя	0	0

Для дослідження чутливості трансгенних рослин до фітовірусу ВТМ були взяті лінії рослин, трансформовані двома векторами з генами ІФН — рСВ161 та рСВ124. Як позитивний контроль використовувалися інфіковані вірусом нетрансформовані рослини цикорію. Негативним контролем слугували рослини дикого типу, які не заражали вірусом.

Симптоми вірусного ураження спостерігали як на інфікованих нетрансформованих рослинах (позитивний контроль), так і на трансгенних. Усі інфіковані ВТМ рослини мали характерні симптоми ураження, які з'являлися через 3 тижні та візуально проявлялися хлоротичним пожовтінням та деформаціями листових пластинок. Вірусом уражалися як рослини, екстракти з яких мали інтерференоподібну активність щодо ВВС (наприклад, лінії № 161/6, 161/13), так і ті, які такої активності не мали.

Для визначення у дослідних рослинах вмісту вірусу відбирали листки та корені рослин, розтирали у фосфатному буфері та готували витяжки. Відповідно до результатів ІФА, контрольні (нетрансформовані) рослини уражувалися ВТМ. Дві з досліджуваних трансгенних ліній цикорію (№ 1, вектор рСВ161 та № 5, вектор рСВ124, рис. 2) містили кількість ВТМ, співставну з такою у рослинах позитивного контролю. Інші лінії (№ 2, 3, 4, рСВ161 та № 6, рСВ124) містили значно більшу кількість вірусу, ніж контрольні (рис. 2).

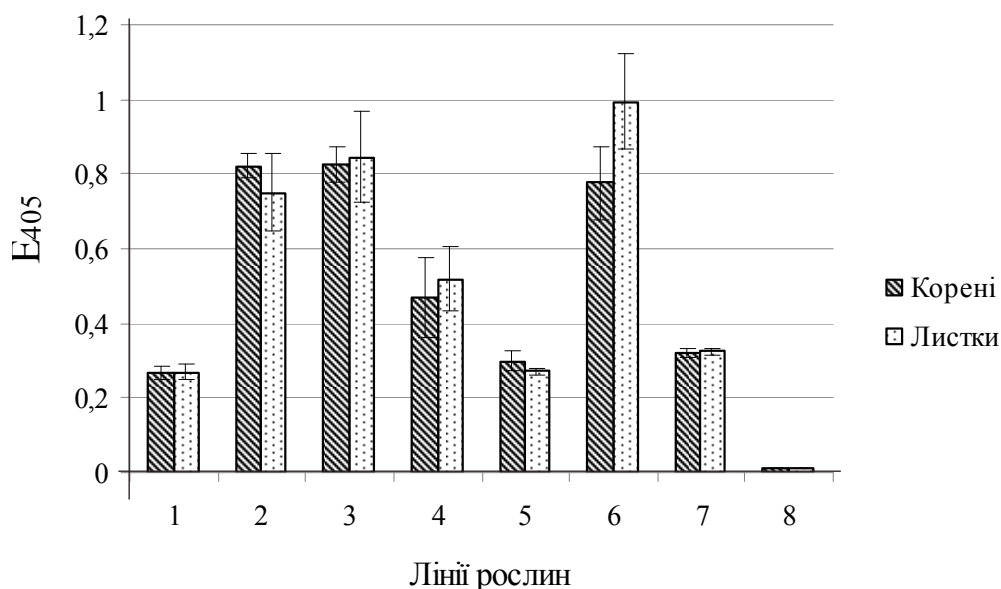


Рис. 2. Імуноферментний аналіз рівня реплікації вірусу ВТМ в контрольних та трансгенних рослинах цикорію з геном інтерферону- $\alpha 2b$  людини: 1–6 — трансгенні рослини, 7 — контроль позитивний; 8 — контроль негативний.

Fig. 2. ELISA analysis of TMV level replication in control and transgenic chicory plants with interferon- $\alpha 2b$  gene: 1–6 — transgenic plants, 7 — positive control, 8 — negative control.

Отже, перенесення гена *ifn- $\alpha$ 2b* людини у рослини цикорію не тільки не призводило до підвищення стійкості рослин до ВТМ, але й для ряду ліній — до збільшення симптомів ураження вірусом та значного зростання вірусного врожаю за даними ІФА. Такі результати співпадають з дослідженнями інших авторів [5, 7, 15], в яких було показано можливість відсутності захисної дії інтерферону. Очевидно, що синтезування інтерферону- $\alpha$ 2b людини у рослинах цикорію, незважаючи на наявність інтерфероподібної активності щодо ВВС, не надавало цим рослинам підвищеної стійкості до фітовірусу. На цей час невідомі механізми активації антивірусного стану в деяких рослинах, наприклад, у тютюні, інтерфероном- $\alpha$ 2b людини, який виконує свої функції в клітинах через взаємодію з специфічним поверхневим рецептором. Разом з тим, було показано, що екстракти нетрансформованих рослин тютюну виявляють противірусну активність [15]. Можливо, клітини рослин цикорію не мають рецепторних поверхневих структур, подібних до таких у рослинах тютюну, що забезпечили б запуск відповідних противірусних сигнальних шляхів при їх взаємодії з гетерологічним ІФН. Не виключено, що в рослинах тютюну, на відміну від цикорію, існують внутрішньоклітинні фактори, які у взаємодії з ІФН людини, що синтезується у цитоплазмі, проявляють захисну анти-ВТМ активність. Відсутність противірусної анти-ВТМ активності та зростання врожаю ВТМ при інфекції трансгенного цикорію може бути пов'язано і з тим, що рослини продукували неспецифічний їм продукт, що переобтяжило синтетичний апарат і у відсутності противірусної дії цитокіну призвело до розвитку більш продуктивної вірусної інфекції, ніж у контрольних рослинах. Разом з тим, досить неоднозначна реакція різних ліній трансгенних рослин до дії ВТМ потребує продовження досліджень з використанням більшої кількості дослідних рослин, а також тестування як додаткового контролю трансгенних рослин цикорію, що мають інші трансгени.

В результаті досліджень було показано, що рослини *Cichorium intybus* L. з геном *ifn- $\alpha$ 2b* людини синтезують фактор, що проявляє специфічну для інтерферону противірусну активність в клітинах MDBK щодо ВВС, яка становила 262,69–3291,44 МО/мг загального білку. В той же час, ці трансгенні рослини не мали стійкості до фітовірусу — вірусу тютюнової мозаїки, причому вірусом уражалися усі досліджувані рослини цикорію незалежно від використаного для трансформації виду агробактерій (*A. rhizogenes* або *A. tumefaciens*) та векторів, що відрізнялися промоторами гена інтерферону (вектор рСВ161, коренеспецифічний промотор MII або вектор рСВ124, 35S промотор). Не виявлено прямої залежності між синтезом ІФН у рослинах цикорію з геном *ifn- $\alpha$ 2b* людини та стійкістю до ВТМ, більше того, перенесення гена *ifn- $\alpha$ 2b* людини до рослин цикорію призводило у ряді випадків до підвищення врожаю фітовірусу в трансгенних рослинах.



## ЛІТЕРАТУРА

1. Матвеева Н.А., Кищенко О.М., Шаховський А.М., Кучук М.В. Синтез інуліну в «бородатих коренях» цикорію, трансформованого за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* // Біотехнологія. — 2011. — 4, № 3. — С. 56–63.
2. Матвеева Н.А., Шаховський А.М., Герасименко І.М., Кваско О.Ю., Кучук М.В. Перенесення гена біосинтезу інтерферону- $\alpha 2b$  в рослини цикорію (*Cichorium intybus* L.) методом агробактеріальної трансформації // Біополімери і клітина. — 2009. — 25, № 2. — С. 120–125.
3. Aziz M.A., Singh S., Anand Kumar P., Bhatnagar R. Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2002. — 299, № 3. — P. 345–351.
4. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. — 1976. — 72, № 1-2. — P. 248–254.
5. Huisman M.J., Broxterman H.J.G., Schellekens H., van Vloten-Doting L. Human interferon does not protect cowpea plant cell protoplasts against infection with alfalfa mosaic virus // Virology . — 1985. — 143, № 2 . — P. 622–625.
6. Leede De L.G., Humphries J.E., Bechet A.C., Van Hoogdaem E.J., Verrijck R., Spencer D.G. Novel controlled-release *Lemna*-derived IFN- $\alpha 2b$  (Locteron): pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability in a phase I clinical trial // J. Interferon Cytokine Res. — 2008. — 28, № 2. — P. 113–122.
7. Loesch-Fries L. Sue, Halk E.L., Nelson S.E., Krahn K.J. Human leukocyte interferon does not inhibit alfalfa mosaic virus in protoplasts or tobacco tissue // Virology . — 1985. — 143, № 2. — P. 626–629.
8. Luchakivskaya Y., Kishchenko O., Gerasymenko I., Olevinskaya Z., Simonenko Y., Spivak M., Kuchuk M. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants // Plant Cell Rep. — 2011. — 30, № 3. — P. 407–415.
9. Dijkstra J., DeJager C.P. Practical Plant Virology, Protocols and Exercises — Berlin; Heidelberg: New York Springer lab manual, 1998 — P. 354.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. — 1962. — 15, № 3. — P. 473–497.
11. Orchansky P., Rubinstein M., Sela I. Human interferons protect plants from virus infection // Proc Natl Acad Sci U S A. — 1982. — 79, № 7. — P. 2278–2280.
12. Rubinstein S., Familletti Ph., Petska S. Convenient assay for interferons // J. Virol. — 1981. — 37, 5. — P. 755–758.



13. Takehiro Masumura, Satoshi Morita, Yoshiyuki Miki et al. Production of biologically active human interferon- $\alpha$  in transgenic rice // Plant Biotechnol. — 2006. — 23, № 1, P. 91–97.

14. Vicente M., De Fazio G., Menezes M.E., Golgher R.R. Inhibition of Plant Viruses by Human Gamma Interferon // J. Phytopathol. — 1987. — 119, № 1. — P. 25–31.

15. Спивак Н.Я., Синдаровская Я.Р., Лозовая О.И., Сахно Л.А., Герасименко И.М., Олевинская З.М., Диденко Л.Ф., Шелудько Ю.В., Кучук Н.В. Исследование репродукции вируса ожога гречихи в трансгенных растениях табака, экспрессирующих ген интерферона альфа2в человека// Фактори експериментальної еволюції організмів. — 2010. — Т. 9. — С. 336–340.

Н.А. Матвеева<sup>1</sup>, А.А. Потрохов<sup>1</sup>, Ю.И. Кудрявец<sup>2</sup>, Е.Ю. Кваско<sup>1</sup>,  
А.М. Шаховский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,  
ул. Заболотного, 148, Киев, 03680, Украина, тел.: +38 (044) 526 71 04

<sup>2</sup>Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого  
НАН Украины, ул. Васильковская, 45, Киев, 03022, Украина,  
тел.: +38 (044) 455 91 50, e-mail: joyna56@gmail.com

## ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЦИКОРИЯ С ГЕНОМ ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА-2В ЧЕЛОВЕКА К ЗАРАЖЕНИЮ ВИРУСОМ ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ

### Реферат

Проведено сравнение чувствительности к вирусу табачной мозаики трансгенных растений цикория *Cichorium intybus* L. с геном интерферона- $\alpha 2b$  человека и исходных нетрансформированных растений. Показано, что перенесение гена *inf- $\alpha 2b$*  в растения цикория сопровождается синтезом фактора с высокой интерферон-специфической активностью против вируса везикулярного стоматита. Однако, это не приводит к увеличению устойчивости растений цикория к вирусу табачной мозаики, более того, синтез интерферона сопровождается повышением вирусного урожая в трансгенных растениях.

Ключевые слова: *Cichorium intybus* L., трансгенные растения, ген *inf- $\alpha 2b$* , вирус табачной мозаики.



**N.A. Matvieieva<sup>1</sup>, A.O. Potrokhov<sup>1</sup>, Yu.I. Kudriavets<sup>2</sup>, O.Yu. Kvasko<sup>1</sup>,  
A.M. Shakhovsky<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NASU, 148, Academ. Zabolotny str.,  
Kyiv, 03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 71 04

<sup>2</sup> R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NASU, 45,  
Vasylkivska str., Kyiv, 03022, Ukraine, tel.: +38 (044) 455 91 50,  
e-mail: joyna56@gmail.com

## **SENSITIVITY OF TRANSGENIC CHICORY PLANTS WITH HUMAN INTERFERON ALPHA-2B GENE TO DAMAGE BY TOBACCO MOSAIC VIRUS**

### **Summary**

The sensitivity to tobacco mosaic virus of transgenic chicory *Cichorium intybus* L. with interferon- $\alpha 2b$  gene was compared with non-transformed chicory plants. There were proved that transfer of *inf- $\alpha 2b$*  gene in chicory plants was accompanied by synthesis of the factors with high interferon-specific activity against vesicular stomatitis virus. However, *inf- $\alpha 2b$*  gene expression did not lead to increasing of chicory plants resistance to tobacco mosaic virus infection, moreover, IFN synthesis was accompanied by increased viral yield in transgenic plants.

Key words: *Cichorium intybus* L., transgenic plants, *inf- $\alpha 2b$*  gene, tobacco mosaic virus.



**R.V. Mikhailova**

Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, 2, Kuprevich str., Minsk, 220141, Belarus, tel.: +375 (17) 267 62 09,  
e-mail: enzyme@mbio.bas-net.by

## PROTEOLYTIC ENZYMES OF MYCELIAL FUNGI

*The literature and the original experimental data on the synthesis of proteolytic enzymes by mycelial fungi, properties and application of proteases were analyzed. The wide distribution of the ability to produce proteases was demonstrated among fungi of various genera. Fungal proteases are distinguished by substrate specificity and broad range of optimal values for substrate hydrolysis, pH- and thermal stability. The multiple application aspects of fungal proteases and their catalytic characteristics determine the commercial prospects of fungi as the industrial enzyme producers.*

*Key words: mycelial fungi-producers, proteolytic enzymes, properties, hydrolysis, application.*

Proteolytic enzymes affiliated to hydrolases catalyze reaction of protein hydrolysis to peptides or free amino acids. Proteases are involved in the normal physiological processes of protein and cellular peptide biogenesis in the living species and in abnormal pathological processes. They can be applied in diverse industries, medicine, agriculture and are indispensable as research tools. Proteases originating from plants (papain, bromeline) and animals (trypsin, chymotrypsin, pepsin, rennin) are well-known and thoroughly examined [47]. Microorganisms are the most attractive sources of proteolytic enzymes, hardly limited by scale of production.

Proteolytic enzymes are synthesized by various microbial cultures — bacteria, yeasts, streptomycetes, fungi [7, 12, 20, 37, 40, 47]. Bacteria of genera *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Fervidobacterium*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Yersinia* are recognized as producers of serine, cysteine and metal proteases, aminopeptidases [20, 47]. Bacteria of genus *Bacillus* are applied for industrial production of neutral and alkaline proteases. Representatives of genera *Candida* and *Trichophyton* synthesize aspartyl proteases, aminopeptidases, carboxypeptidases, dipeptidylpeptidases, *Streptomyces* — serine proteases [7, 37].

Mycelial fungi are the most promising cultures for large-scale manufacturing of proteolytic enzymes. They synthesize extracellular proteases belonging to various families and subfamilies, showing activity





and stability in wide pH spectrum, displaying enhanced substrate specificity and polyfunctionality.

The aim of this review is to sum up and analyze the literature and the original experimental findings on biosynthesis, properties and application of proteolytic enzymes from mycelial fungi.

### Synthesis of proteolytic enzymes by mycelial fungi

The results of studies on the ability of fungi to synthesize proteolytic enzymes testify to wide distribution of this property among cultures of various genera belonging to different ecological groups. 2-stage screening of protease producers conducted at the Lab of enzymes, Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus demonstrated that among 97 fungal strains representing genera *Aspergillus* (39 strains), *Penicillium* (56 strains) and *Paecilomyces* (2 strains) 30% of tested cultures were able to liquefy gelatin, 40% – to yield clarified zones on agar media with defatted milk and 25% – on media with haemoglobin [53]. Seventeen fungal strains hydrolyzing at least 2 substrates were selected, and 11 of those synthesized extracellular proteases in submerged culture. The Indian researchers screened 221 isolate of deep-water fungi and sorted out 105 cultures (48%) distinguished by presence of protease activity [12]. Proteases were found out in fruit bodies of 18 species of basidial fungi, except *Polyporus* (*Coriolus versicolor* (Fr.) Karst) and *Hydnum* (*Hericium epinaceus* (Fr.) Quel) [21]. Fungi of the families *Boletaceae* and *Agaricaceae* may be pointed out due to increased enzyme activity. The production of examined enzymes was revealed in nematode-, entomo-, phytopathogenic fungi and fungi pathogenic for humans and animals.

Mycelial fungi synthesize alkaline, acid and neutral proteases. Extracellular alkaline proteases are produced by *Aspergillus clavatus* [23, 52], *A. fumigatus* [60], *Penicillium chrysogenum* [10], *Paecilomyces lilacinus* F-2 [54], *Conidiobolus coronatus* [44], *Arthrotrichum olgospora* [57], *Fusarium culmorum* [43], *Trichoderma harzianum* [16], *Cephalosporium* sp. KM388 [55], etc.

Synthesis of acid proteases is typical for *Aspergillus niger* [27], *Sporotrichum pulverulentum* [17], *Penicillium griseoroseum* [24], *Trichoderma reesei* [22], *Trichoderma harzianum* [13], *Thermomyces lanuginosus* [32], etc.

Neutral proteases were detected in *Aspergillus carneus* [5], *A. sojae* [50], *Tricholoma columbetta* [29], *Fusarium culmorum* [60], etc.

Fungal proteases are the enzymes referred to diverse families and subfamilies. Pepsin-like aspartyl proteases were described in *T. reesei* [22], *T. harzianum* [13] and basidial fungi [21]. Trypsin-like protease was also produced by *Cordiceps militaris* [25]. Serine proteases were revealed in *T. lanuginosus* P<sub>134</sub> [32] and *Conidiobolus* SP [51], while the enzyme of *Tricholoma columbetta* was classified as metal protease [29].



Fungi pathogenic for humans represented by 400 out of 10 000 described fungal species produce both endo- and exoproteases [37]. Aminopeptidases, carboxypeptidases and dipeptidylpeptidases were found in pathogenic fungi of genus *Aspergillus* – *A. fumigatus*, *A. flavus/oryzae*, *A. niger* [37]. *A. fumigatus* was also characterized by synthesis of aspartyl, serine and metal protease [28, 38, 48]. Proteolytic enzymes of dermatophytes were mainly described as keratinases and *Microsporum canis* was also shown to generate serine- [35] and metal proteases [9]. Proteases of pathogenic fungi are one of virulence factors and they play a key role in progress of certain pathologies.

Mycelial fungi are heterogenous eucaryotic heterotrophs and their structural-functional peculiarities determine lability of growth and metabolism depending on the components of nutrient media, the type and conditions of culture fermentation. The analysis of impact caused by carbon and nitrogen sources appears especially crucial for studies on protease biosynthesis by fungal strains. In nutrient media used for culturing producers of proteolytic enzymes the following substrates are used as C and N sources: sugars, biopolymers, mineral salts and organic compounds.

Maximal synthesis of *Thermomyces lanuginosus* P<sub>134</sub> protease was reached in submerged culture on medium containing 4% casein, 4% glucose, 4% yeast extract [32]. *Conodiobolus* SP also produced extracellular protease during submerged fermentation on nutrient medium comprising glycerol, casein, peptone, soluble starch [51]. The application of Chapek medium with 1.0% casein ensured the synthesis of proteases in submerged culture by thermophilic fungi *Paecilomyces variotii* and *Aspergillus carneus*, isolated from the thermal springs of Bargusin valley [5].

The effect of nutrients, duration and temperature of fermentation (20–55 °C, 1–10 days), pH 4.0–8.0 on protease formation by *A. fumigatus* и *Penicillium sp.* was studied [42]. Medium composed of (g/l): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 2.0; glucose – 1.0; peptone – 5.0; gelatin – 15.0 was used as basal. The maximal production of protease was achieved for *A. fumigatus* grown on glucose-peptone-gelatin medium for 4 days at pH 5.0, temperature 30 °C and for *Penicillium sp.* cultured on the same medium for 5 days at pH 6.0 and temperature 25 °C. Sucrose, ribose, raffinose stimulated protease generation in fungi.

The optimal composition of nutrient medium was established for synthesis of protease by *Botrytis cinerea* (g/l): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.0; Mg (SO<sub>4</sub>) – 0.3; molasses – 5.0; peptone – 5.0 ; yeast extract – 5.0; *Spirulina* algae – 2.0; KCl – 1.0; trace elements; pH 6.5 [1]. Fermentation was carried out for 9 days at 28 °C and agitation rate 150 rpm.

The comparative analysis of protease production by *Aspergillus clavatus* as a function of supplied sources of carbon (sucrose, glucose) and nitrogen (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub>, casein, gelatin) indicated that the peak level of enzyme synthesis was observed in 6-day submerged culture at 25 °C on media with

glucose and casein [52]. Starch (5 g/l) and yeast extract (2 g/l) proved the optimal carbon and nitrogen sources for strain *A. clavatus* ES1 [23].

The enzyme production is significantly influenced by the fermentation method. The solid-state technique of culturing fungal strains is frequently used to obtain proteolytic enzymes. Barley, rice, maize, soya, various food-processing wastes (fruit-berry pomace, bran, beet and potato pulp) mixed with the mineral salts and additives serve as appropriate substrates. Solid-state fermentation of microbial enzyme producers on media with above-mentioned substrates allows both to synthesize enzymes and to utilize vegetable wastes.

Screening of 30 *Penicillium griseoroseum* strains for protease production resulted in selection of the most active variant *P. griseoroseum* HHV-21 [24]. To optimize protease biosynthesis conditions effect of the following substrates on enzyme production there were tested: sunflower calathides, soya beans, rice hull, wheat bran. Soya cake proved the best carbon source.

During the solid-state culture of *Rhizopus oryzae* maximum enzyme yield (341 U/g wheat bran) was achieved at fermentation temperature 32 °C, pH 5.5, relative humidity – 90–95%, inoculation density –  $2.10^5$  spores/g wheat bran and 140% contents of solid substrate [56]. The medium containing wheat bran or wheat bran plus casein (humidity – 60%) was optimal for protease generation by thermophilic fungus *Thermoascus auranticus* [34].

The provided examples illustrate that mycelial fungi produce proteolytic enzymes in presence of protein substrates which may be evidence of the inducible type of enzyme synthesis.

In addition to nutrient sources and fermentation type the significant effect on fungal protease production is displayed by such factors as pH of the media and growth temperature.

The optimal conditions for protease biosynthesis are created in fungal culture on the media with initial pH lying in a broad range and at temperatures 28–30 °C [1, 19]. For instance, optimal growth temperature for production of alkaline protease in solid-state culture by fungus *Rhizopus oryzae* is 32 °C and pH 5.5 [56], whereas for *Penicillium griseoroseum* HUV-21 the optimal parameter is 30 °C [24]. The same temperature value and pH 6.0 are essential for formation of alkaline protease in *Aspergillus clavatus* ES 1 [23]. The other representatives of genus *Aspergillus* – *A. fumigatus* TKU003 and *A. fumigatus* Fresenius show the highest protease productivity when they are grown at temperatures 37 °C and 42 °C, respectively [49, 60].

### Physical-chemical properties of proteases of mycelial fungi

Proteolytic enzymes synthesized by mycelial fungi differ in physical-chemical and catalytic properties defining application aspects of protease preparations.



The table presents physical-chemical characteristics of proteases from mycelial fungi of different genera. Acid proteases are the most active at pH 4.0–4.5, neutral proteases and metal proteases – at pH 7.0, while the best conditions for alkaline protease catalysis are created in pH range 7.0–11.0.

Proteases with similar and distinct properties have also been described in literature. For instance, *A. candidus* enzyme is able to hydrolyze casein at pH 11.0–11.5 and temperature 30 °C, whereas at 47 °C pH optimum is shifted to 7.0 [47]. Protease of *Trichoderma* spp. 5011 displays maximum activity at pH 6.5 and temperature 40 °C, stability in the range of pH values 3.0–10.0 and temperatures 30–80 °C [36]. The unique protease of *Fusarium culmorum* retaining activity in a broad temperature range 10–100 °C and pH zone from 4.5 to 8.5 was reported [60]. Maximal catalytic action was expressed by the enzyme at 50 °C and pH span 6.0–8.0.

The optimal conditions for serine protease of *Penicillium citrinum* are established at 45 °C and pH 6.5 [19]. The enzyme retains stability in pH range 6.0–9.0 and temperature span – 35–45 °C. It was found that ions of  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  inhibit activity of the enzyme, while ions of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  – stimulate its activity. Protease displays stability in the presence of oxidants, like  $\text{H}_2\text{O}_2$  and it is compatible with commercial detergents.

Maximum catalytic activity of *Trichoderma lanuginosus* P134 crude protease is expressed at temperature 70 °C and pH 5.0 and 9.0. The enzyme maintains stability in pH range 4.0–11.0 [32]. Protease retains 100% activity at 50 °C, and its half-life at 60 °C and 70 °C is 160 and 60 min, respectively.

Two acid proteases of fungus *Sporotrichum pulverulentum* causing wood white rot were purified and characterized [17]. It was demonstrated that molecular weight and isoelectric point of protease I (152-fold purification) constituted 28 kDa and 4.7, while similar parameters of protease II (127-fold purification) equaled 26 kDa and 4.2. The peak activity of the enzymes was recorded at pH 5.0 and 5.2, respectively. Both enzymes were inhibited by ions of  $\text{Ag}^{+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  and partially by  $\text{Cu}^{2+}$ .

Alkaline protease of *Aspergillus flavus* shows maximal catalytic activity at pH 7.5 and retains stability in pH span 8.0–11.0 [33] whereas protease of *A. tamaris* displays activity and stability in pH range 5.0–9.5 [8].

Protease of *Aspergillus clavatus* was purified by combination of ultrafiltration, alcohol precipitation and fractionation on DEAE cellulose and Sephadex-G 200. The enzyme showed maximal activity at 37 °C and pH 7.8 [41].

Extracellular protease of *Scytalidium thermophilum* hydrolyzes the substrate at pH 6.5–8.0 and temperature 37–45 °C [26]. The inhibitory analysis with *p*-chloromercurybenzoate, phenylmethyl sulphonyl fluoride, antipain, EDTA and pepstatin A led us to assume presence of thiol-containing serine protease.

Serine subtilysine-like protease of *Conidiobolus* SP was characterized by molecular weight (MW) 22 kDa, pI 8.2 and optimum pH 9.7 [51], while

Table  
Properties of proteolytic enzymes of mycelial fungi

Microbial producer	Protease	MW, kDa	pI	Substrate used	Major inhibitor(s)	Optimum		Stability		Literature source
						pH	t, °C	pH	t, °C	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Aspergillus clavatus</i> ESI	serine	32	ND*	casein	phenylmethylsulphonylfluoride, CoSO <sub>4</sub>	8.5	50	8.0–9.0	30	[23]
<i>Aspergillus flavus</i>	metalloprotease	23	9.0	elastin, collagen, ovalbumin, albumin	1,10- <i>o</i> -phenanthroline, EDTA	7.5	ND	8.0–11.0	<70	[33]
<i>Aspergillus oryzae</i>	chymotrypsin-like	41	ND	hemoglobin	pepstatin, HgCl <sub>2</sub>	3.0	60	3.0–6.0	<40	[45]
<i>Aspergillus oryzae</i>	keratinase	60	ND	bovine serum albumin, casein, keratin	EDTA, Pb	8.0	50	ND	<70	[18]
<i>Aspergillus ustus</i> (NIOCC #20)	alkaline serine	32	6.6 6.9	azocasein	phenylmethylsulphonylfluoride, CuCl <sub>2</sub>	9.0	45	4.5	40	[12]
<i>Aspergillus niger</i> Z1	alkaline	68	ND	azocasein	phenylmethylsulphonylfluoride	9.0	40	35	<90	[11]



Continued

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Cordyceps militaris</i>	trypsin-type serine protease	23.4	ND	benzyloxycarbonyl- n-benzoyl-phe-val- arg-p-nitroanilide	leupeptin, diisopropylfluorophosphate	8.5–12.0	ND	ND	ND	[25]
<i>Chryso sporium keratinophilum</i>	alkaline	69	ND	casein	1,10 <i>o</i> -phenanthroline	9.0	90	7.0–10.0	ND	[15]
<i>Penicillium sp. LPB-5</i>	serine	ND	ND	azocasein	phenylmethyl- sulphonyl fluo-ride	6.5	45	6.0–9.0	35– 45	[19]
<i>Fusarium culmorum</i>	alkaline serine	28.7	ND	n-succinyl-ala- ala-pro-phep- <i>p</i> - nitroanilide, n-succinyl-ala-ala- pro-leup- <i>p</i> - nitroanilide, azogelatin	phenylmethane- sulfonyl fluoride; chymostatin,	8.3–9.6	40	4.1–7.7	ND	[43]
<i>Sporotrichum pulverulentum</i>	acidic endoprotease 1 acidic protease 2 chymotrypsin- type	28 26	4.7 4.2	azocoll	AgNO <sub>3</sub> , HgCl <sub>2</sub> , <i>p</i> -chloromercuri- ribenzoat	5.0 5.2	ND	ND	ND	[17]
<i>Thermomyces aurantiacus</i>	protease	ND	ND	casein	ND	5.5	60	3.0-9.5	<50	[34]
<i>Trichoderma reesei</i> QM9414	trypsin like serine	25	7.3	azocasein, benzoyl-arginyl- <i>p</i> - nitroanilide	ND	8.0	50	ND	ND	[14]

\* ND — no date.





protease of isolate (NIOCC # 20) isolated from the sea water (MW 32 kDa, pI 6.6–6.9) was active in broad pH spectrum 6.0–10.0, with optimas at pH 9.0 and temperature 45 °C [12].

Thermostable alkaline protease of *Chrysosporium keratinophilum* was partially purified by acetone precipitation followed by gel filtration on Sephadex G-75 [15]. The optimal conditions for enzyme activity were set at pH 9.0 and temperature 90 °C and protease did not lose activity at pH values from 7.0 to 10.0. The enzyme distinguished by MW 69 kDa was activated by Fe<sup>2+</sup> and inhibited by 1,10-*o*-phenanthroline.

*Myrothecium verrucaria* produces protease with atypical for phytopathogenic fungi keratinolytic activity [39]. Crude protease hydrolyzes keratin substrates at pH 9.0 and temperature 40 °C in the following sequence: keratin of fowl feather > keratin of ovine wool > keratin of human hair. Protease activity is sensitive to phenylmethylsulfonylfluoride, allowing to refer it to serine proteases.

Purified keratinase of *Aspergillus oryzae* is a monomeric enzyme having MW 60 kDa [18]. The enzyme hydrolyzed various substrates showing affinity to bovine albumin, casein, keratin, poultry feather keratin, collagen, duck feather, ovine wool. The distinctions in action of immobilized and free enzyme were revealed under the optimal conditions: for immobilized enzyme pH the optimum was lying in the range 7.0–7.4, temperature 60 °C, for free enzyme the optimas were 8.0 and 50 °C, respectively. Keratinase was activated by Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> ions and inhibited by EDTA.

Extracellular keratinase-protease of *Scopulariopsis brevicaulis* was purified by sedimentation with ammonium sulfate, chromatography on DEAE-cellulose and Sephadex G-100 [2]. Purified enzyme is a monomeric protein with molecular weight 39 and 36 kDa according to SDS-PAGE and gel-filtration data, respectively. The best conditions for catalysis were established at pH 8.0 and 40 °C.

The analysis of literature reports indicates that fungal proteases differ in substrate specificity, optimal conditions for substrate hydrolysis, pH and thermal stability. Molecular weight of fungal proteases ranges from 15 to 30 kDa, but more heavy-weight enzymes were described: 33 kDa (*Scedosporium apiospermum* protease [30]), 41 kDa (*Aspergillus oryzae* protease [45]), 62 kDa (*Aspergillus oryzae* protease [18]), 68 kDa (*Aspergillus niger* Z1 protease [11]), 69 kDa (*Chrysosporium keratinophilum* protease [15]). The variations in optimal conditions for catalysis of degradation of proteinaceous substrates determine broad application scope of fungal proteases.

### Applications of fungal proteases

Considering applications of proteolytic enzymes, it should be noted that they have been introduced in commercial flow sheets for manufacturing detergents and cleansing agents, they are widely used in food processing (cheese making, bread baking, beer clarifying, meat tenderizing, producing



protein hydrolyzates), textile and leather industries, medicine, veterinary practice, fodder provision.

Nowadays proteases are the indispensable and traditional components of laundering and cleaning formulas – from domestic washing solutions to the reagents for polishing lenses and dental prostheses [47]. 25% of global enzyme output is channelled to fabrication of detergents. The first enzyme-based product of this type “Burnus”, containing crude pancreatic extract was launched in 1913, while the first detergent BIO-40 with microbial (bacterial) protease was produced on a large-scale in 1956. In 1960 Novo Industry A/S company started its alkalase project (trade name BIOTEX) and now the market is flooded with various proteolytic preparations. Ideally detergent protease should be distinguished by a broad substrate specificity, activity at elevated pH and temperature values, pH and thermal stability, compatibility with other constituents of cleaning and washing aids. Stringent reality of world economic crisis urges to refocus the emphasis on proteases active at low temperatures. The investigations are currently under way on fungal alkaline proteases for detergents – originating from *Spilosoma obliqua* [4], *Botrytis cinerea* [1], while *Conidiobolus coronatus* serves as a source of detergent protease in India [44].

In leather industry fungal proteases are engaged in 2 processes: hair depilation and skin softening [3, 47].

As to food processing, microbial proteases are the indispensable agents in cheese making, bread baking, brewing, producing hydrolyzates from vegetable and animal materials, meat tenderizing. Proteases of *Mucor michei* and *Endothia parasitica* are manufactured on industrial scale for cheese fermentation [40, 47]. Endo- and exoproteinases of *Aspergillus oryzae* carry out limited proteolytic modification of wheat gluten defining properties and taste of bread [40, 47]. It ensures standardization of baking process and reduces duration of technological cycle. Proteases are widely used to derive diverse products from soya which proved to be an excellent nutrient owing to high protein content. Alkaline and neutral proteases of fungi *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae* play a key role in production of soya sauce [46, 47]. Efficiency of protease application was demonstrated for fish sauce cooking technology. The procedure of preparing this flavour, extremely popular in South-Eastern Asia, usually takes from 6 to 12 months. A vital characteristic of proteolytic enzyme intended to accelerate and upgrade the process is its resistance to increased salt concentrations (10–20%) required in soya sauce recipe. The vietnamese researchers have shown that application of *Aspergillus oryzae* protease guarantees yield of soya sauce in just 2–6 days depending on biopreparation level [31]. The increased ratio of free amino acids was recorded in the end product. The attractive prospects were outlined for enzyme preparation of *P. lilacinus* F-2 applied to obtain low-molecular-weight protein hydrolyzates of milk whey as ingredients of enteral and parenteral nutrition products and complex food additives [54].



Correlation of proteolysis degree of major serum proteins:  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, bovine serum albumin – with concentration of biopreparation was established. At 0.2% enzyme concentration about 72% of  $\beta$ -lactoglobulin and 86% of  $\alpha$ -lactalbumin were subjected to proteolysis and bovine serum albumin was efficiently hydrolyzed. Rise in enzyme concentration to 1% resulted in complete splitting of  $\alpha$ -lactalbumin to peptides with MW less than 14.2 kDa and only 5% of uncleaved  $\beta$ -lactoglobulin remained in hydrolyzate.

Lately special interest has been focused on the synthesis of proteolytic enzyme preparations due to the problem of utilization of secondary protein resources. Manufacturing of combined and artificial products based on food protein is essential to meet the challenge. Protein hydrolyzates find use as the ingredients of dietetic or therapeutic diets and baby mixes. Hydrolyzate composition largely depends on feedstock preconditioning and type of enzyme preparation. Combination of protein supplements of animal origin with collagen enzymatic hydrolyzate allows to upgrade end products with peptides, amino acids and reduce expense of animal proteins in recipes of preserves and sausages. The balanced protein additives and the products derived from collagen hydrolyzate and vegetable materials have been developed and marketed [6]. The studies were completed on production of hydrolyzates from heads and feet of overland birds [3]. The enzyme preparations from *Penicillium wortmannii* BKM-2091 and *Streptomyces chromogenes* s. *graecus* 0832 possessing collagenase and keratinolytic activities were recommended for enzymatic treatment yielding protein- lipid emulsion.

Medicine is a vital application sphere for proteolytic enzymes. Neutral protease is essential for therapy of gastrointestinal and cardiovascular diseases, in surgery for treatment of purulent wounds, burns and congealed tissues, in antitumor courses. Proteases of *Aspergillus oryzae* (Luizym and Nortase commercial preparations) are applied in substitution therapy as digestive enzymes [47], while proteases from *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus flavus* are the antithrombic agents [40].

Proteolytic enzymes are in great demand by the researchers in the area of physiology, phytopathology and enzymology.

The analysis of presented data evidences prove high theoretical and practical significance of fungal proteolytic enzymes. The wide variety of fungal proteases, their broad substrate specificity, resistance to extreme environmental conditions and multifunctionality point out these enzymes as important objects for further investigations and stress the priority status of mycelial fungi for large-scale production of proteolytic enzymes.

## REFERENCES

1. Abidi F., Limam F., Nejib M.M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent // Process Biochem. – 2008. – Vol. 43. – N. 11. – P. 1202–1208.



2. Anbu P., Gopinath S.C.B., Hilda A., Lakshmipriya T., Annadurai G. Purification of keratinase from poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity // Enzyme Microb. Technol. – 2005. – Vol. 36. – N 5-6. – P.639–647.
3. Antipova L.V., Glotova I.A., Rogov I.A. Methods of analyzing meat and meat products / Moscow, Kolos Press, 2001. – 376 pp.
4. Anwar A., Saleemuddin M. Alkaline pH acting digestive enzymes of the polyphagous insect pest *Spilosoma obliqua*: stability and potential as detergent additives // Biotechnol. Appl. Biochem. – 1997. – Vol. 25. – N 1. – P. 43–46.
5. Bazarzhapov B.B., Lavrent'eva E.V., Dunaevskii Ya.E., Bilanenko E.N., Namsaraev B.B. Extracellular proteolytic enzymes of microscopic fungi from thermal springs of Barguzin valley (Northern Baikal region) // Appl. Biochem. Microbiol. – 2006. – Vol. 42. – N 2. – P.186–190.
6. Belousova S.V., Zaporozhsky A.A. Processing of low-value fish by enzymatic methods // Izvestia vuzov. Pishchevaya technologia. – 2007. – N 3. – P. 48–49.
7. Böckle B., Galunsky D., Müller R. Characterization of keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530// Appl. Env. Microbiol. – 1995. – Vol. 61. – N 10. – P. 3705–3710.
8. Boer C.G., Peralta R.M. Production of extracellular proteases by *Aspergillus tamaris* // J. Basic Microbiol. – 2000. – Vol. 40. – N 2. – P. 75–81.
9. Brouta F., Descamps F., Fett T., Losson B., Gerday C., Mignon B. Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis* // Med. Mycol. – 2001. – Vol. 39. – N 3. – P. 269–275.
10. Chou H., Lai H.Y., Tam M.F., Chou M.Y., Wang S.R., Han S.H., Shen H.D. cDNA cloning, biological and immunological characterization of the alkaline serine protease major allergen from *Penicillium chrysogenum* // Int. Arch. Allergy Immunol. – 2002. – Vol. 127. – N 1. – P. 15–26.
11. Coral G., Arican B., Unaldi M.N., Guvenmez H. Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain // Ann. Microbiol. – 2003. – Vol. 53. – N 4. – P. 491–498.
12. Damare S., Raghukumar Ch., Muraleedharan D.U., Raghukumar S. Deep-sea fungi as a source of alkaline and cold-tolerant proteases // Enzym. Microb. Technol. – 2006. – Vol. 39. – N 2. – P. 172–181.
13. Delgado-Jarana J., Pintor-Toro J.A., Benitez T. Overproduction of  $\beta$ -1,6-glucanase in *Trichoderma harzianum* is controlled by extracellular acidic proteases and pH // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – Vol. 1481. – N 2. – P. 289–296.
14. Dienes D., Börjesson J., Häggglund P., Tjerneld F., Lidén G., Réeczey K., Stelbrand H. Identification of a trypsin-like serine protease

from *Trichoderma reesei* QM9414 // Enzyme Microb. Technol. –2007. –Vol. 40. – N 5. – P. 1087–1094.

15. Dozie I.N.S., Okeke C.N., Unaeze N.C. A thermostable, alkaline-active, keratinolytic proteinase from *Chrysosporium keratinophilum* // World J. Microbiol. Biotechnol. – 1994. – Vol. 10. – N 5. – P. 563–567.

16. Dunaevsky Y.E., Gruban T.N., Beliakova G.A., Belozersky M.A. Enzymes secreted by filamentous fungi: regulation of secretion and purification of an extracellular protease of *Trichoderma harzianum* // Biochemistry (Mosc). – 2000. – Vol. 65. – N 6. – P. 723–727.

17. Eriksson K.E., Pettersson B. Acid proteases from *Sporotrichum pulverulentum* // Methods Enzymol. – 1988. – Vol. 160. – P. 500–508.

18. Farag A.M., Hassan M.A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae* // Enzyme Microb. Technol. – 2004. – Vol. 34. – N 2. – P. 85–93.

19. Germano S., Pandey A., Osaku C.A., Rocha S.N., Soccol C.R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium sp.* produced by solid-state fermentation // Enzyme Microb. Technol. – 2003. – Vol. 32. – N 2. – P. 246–251.

20. Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 59. – N 1. – P. 15–32.

21. Gzogyan L.A., Proskuryakov M.T., Ievleva E.V., Valueva T.A. Trypsin-like proteinases and trypsin inhibitors in fruiting bodies of higher fungi // Appl. Biochem. Microbiol. – 2005. – V. 41. – N 6. – P. 538–542.

22. Haab D., Hagspiel K., Szakmary K., Kubicek C.P. Formation of the extracellular proteases from *Trichoderma reesei* QM9414 involved in cellulose degradation // J. Biotechnol. – 1990. – Vol. 16. – N 3-4. – P. 187–188.

23. Hajji M., Rebai A., Gharsallah N., Nasri M. Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol. 79. – N 6. – P. 915–923.

24. Haq I., Mukhtar H., Ali Z., Riaz N. Protease biosynthesis by mutant strain of *Penicillium griseoroseum* and cheese formation // Pak. J. Biol. Sci. – 2004. – Vol. 7. – N 9. – P. 1473–1476.

25. Hattori M., Isomura S., Yokoyama E., Ujita M., Hara A. Extracellular trypsin-like proteases produced by *Cordyceps militaris* // J. Biosci. Bioeng. – 2005. – Vol. 100. – N 6. – P. 631–636.

26. Ífrij Í.H., Ögel Z.B. Production of neutral and alkaline extracellular proteases by the thermophilic fungus, *Scytalidium thermophilum*, grown on microcrystalline cellulose // Biotechnol. Lett. – 2002. – Vol. 24. – N 13. –P. 1107–1110.





27. Jarai G., Buxton F. Nitrogen, carbon, and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger* // Curr. Genet. – 1994. – Vol. 26. – N 3. – P. 238–244.

28. Kolattukudy P.E., Lee J.D., Rogers L.M., Zimmerman P., Ceselski S., Fox B., Stein B., Copelan E.A. Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis // Infect. Immun. – 1993. – Vol. 61. – N 6. – P. 2357-2368.

29. Lamaison J.L., Pourrat H., Pourratt A. Purification et propriétés d'une protéase neutre de *Tricholoma columbetta* // Phytochemistry. – 1980. – Vol. 19, N 6. – P. 1021–1023.

30. Larcher G., Bouchara J.P., Annaix V., Symoens F., Chabasse F., Tronchin G. Purification and characterization of a fibrinogenolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate // FEBS Lett. – 1992. – Vol. 308. – N 1. P. 65–69.

31. Le Van Viet Man, Tran Thi Anh Tuyet. Characterization of protease from *Aspergillus oryzae* surface culture and application in fish sauce processing // Sci. Technol. Devel. – 2006. – Vol. 9. – N 5. – P. 53–58.

32. Li D.-Ch., Yang Y.-J., Shen Ch.-Y. Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* // Mycol. Res. – 1997. – Vol. 101. – N 1. – P. 18–22.

33. Mellon J.E., Cotty P.J. Purification and partial characterization of an elastinolytic protease from *Aspergillus flavus* culture filtrates // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1996. – Vol. 46. – N 2. – P. 138–142.

34. Merheb C.W., Cabral H.; Gomes E., Da-Silva R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein // Food Chem. – 2007. – Vol. 104. – N 1. – P. 127–131.

35. Mignon B.R., Nikkels A.F., Pierard G.E., Losson B.J. The in vitro and in vivo production of a 31.5 kD keratinolytic subtilase from *Microsporum canis* and the clinical status in naturally infected cats // Dermatology. – 1998. – Vol. 196. – N 4. – P. 438–441.

36. Mikhailova I.M., Tazetdinova D.I., Shishkin A.V., Alimova F.K., Skvortsov E.V. Investigation of protease activity in micromycetes of genus *Trichoderma* // Postgenome era in biology and problems of biotechnology: Proc. II Int. Conf. Kazan, September 15-16, 2008. Kazan, 2008. – P. 86–87.

37. Monod M., Capoccia S., Léchenne B., Zaugg C., Holdom M., Jousson O. Secreted proteases from pathogenic fungi // Int. J. Med. Microbiol. – 2002. – Vol. 292. – N 5-6. – P. 405–419.

38. Monod M., Paris S., Sanglard D., Jatton-Ogay K., Bille J., Latgé J.P. Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus* // Infect. Immun. – 1993. – Vol. 61. – N 10. – P. 4099–4104.

39. Moreira F.G., de Souza C.G.M., Costa M.A.F., Reis S., Peralta R.M. Degradation of keratinous materials by the plant pathogenic fungus





*Myrothecium verrucaria* // Mycopatologia. – 2007. – Vol. 163. – N 3. – P. 153–160.

40. North M.J. Comparative biochemistry of the proteinases of eucariotic microorganisms // Microbiol. Rev. – 1982. – Vol. 46. – N 3. – P. 308–340.

41. Ogundero V.W., Osunlaja S.O. The purification and activities of an alkaline protease of *Aspergillus clavatus* from Nigerian poultry feeds // J. Basic Microbiol. – 1986. – Vol.26. – N 4. – P. 241–248.

42. Omkolthoum A.G.A. Formation of proteases by *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium sp.* // J. King Saud University. Science. – 1992. – Vol. 4. – N 2. – P. 127–136.

43. Pekkarinen A.I., Jones B.L., Niku-Paavola M.L. Purification and properties of an alkaline protease of *Fusarium culmorum* // Eur. J. Biochem. – 2002. – Vol. 269. – N 3. – P. 798–807.

44. Phadatare S.U., Deshpande V.V., Srinivasan M.C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): enzyme production and compatibility with commercial detergents // Enzyme Microb. Biotechnol. – 1993. – Vol. 15. – N 1. – P. 72–76.

45. Pong C.-Y., Chou Y.-H., Nieh F.-P., Jiang S.-T. Purification and characterization of acidic protease from *Aspergillus oryzae* // J. Fish. Soc. Taiwan. – 2005. – Vol. 32. – N 3. – P. 253–264.

46. Priest F. Extracellular enzymes / F. Priest / Moscow, Mir Publ., 1987. 117pp.

47. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1998. – Vol. 62. – N 3. – P. 597–635.

48. Reichard U., Büttner S., Eiffert H., Staib F., Rüchel R. Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue // J. Med. Microbiol. – 1990. – Vol. 33. – N 4. – P.243–251.

49. Santos R.M.D.B., Firmino A.A.P., de Sá C.M., Felix C.R. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius // Curr. Microbiol. – 1996. – Vol. 33. – N 6. – P. 364–370.

50. Sekine H. Neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae*: some enzymatic properties // Agric. Biol. Chem. – 1972. – Vol. 36. – N 2. – P. 207–216.

51. Shrinivasan M.C., Vartak H.G., Powar V.K., Sutar I.I. High activity alkaline protease production by a *Conidiobolus* SP // Biotechnol. Lett. – 1983. – Vol. 5. – N 5. – P. 285–288.

52. Tremacoldi C.R., Carmona E.C. Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus* // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – Vol. 21. – N 2. – P. 169–172.

53. Tsirkunova Zh.F., Chikhaeva O.V., Mikhailova R.V., Lobanok A.G. Screening of mycelial fungi producing proteolytic enzymes // Proc. VI Int Conf. «Contemporary state and development prospects of microbiology and



biotechnology», Minsk, June 2-6, 2008. – Minsk, Loginov Press, 2008. – V. 1. – P. 276–278.

54. *Tsirkunova Zh.F., Mikhailova R.V., Lobanok A.G.* Properties of extracellular proteases from *Penicillium lilacinum* F-2 // XII Congress microbiol. Ukraine: Abstr. reports / Uzhgorod, Patent Publ. 2009. – P. 412.

55. *Tsuchiya K., Arai T., Seki K., Kimura T.* Purification and some properties of alkaline proteinase from *Cephalosporium* sp. KM388 // Agric. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 51. – N 11. – P. 2959–2965.

56. *Tunga R., Banerjee R., Bhattacharyya B.* Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation // Bioprocess Eng. – 1998. – Vol. 19. – N 3. – P. 187–190.

57. *Tunlid A., Rosén S., Ek B., Rask L.* Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* // Microbiol. – 1994. – Vol. 140. – No.pt 7. – P. 1687–1695.

58. *Wang L., Ridgway D., Gu T., Moo-Young M.* Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations // Biotechnol. Advances. – 2005. – Vol. 23. – N 2. – P. 115–129.

59. *Wang S-L., Chen Y-H., Wang C-L., Yen Y-H., Chern M-K.* Purification and characterization of serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium // Enzyme Microb. Technol. – 2005. – Vol. 36. – N 5-6. – P. 660–665.



**Р.В. Міхайлова**

Інститут мікробіології НАН Білорусі, вул. Купрэвіча, 2, Мінськ, 220141, Білорусь,  
тел.: +375 (17) 267 62 09, e-mail: enzyme@mbio.bas-net.by

**ПРОТЕОЛИТИЧНІ ФЕРМЕНТИ МІЦЕЛІАЛЬНИХ ГРИБІВ****Реферат**

Наведені літературні і власні експериментальні дані з утворення протеолітичних ферментів міцеліальними грибами, властивостей протеаз і їх застосування. Показана широка розповсюдженість здатності синтезувати протеази серед грибів різних родів. Грибні протеази відрізняються субстратною специфічністю, мають широкий діапазон значень оптимальних умов гідролізу субстрату, рН- і термостабільності. Множинні аспекти застосування грибних протеаз та їх каталітичні властивості обумовлюють перспективність грибів як промислових продуцентів зазначених ферментів.

**Ключові слова:** міцеліальні гриби-продуценти, протеолітичні ферменти, властивості, гідроліз, застосування.

**Р.В. Михайлова**

Інститут мікробіології НАН Беларусі, ул. Купрэвіча, 2, Минск, 220141, Беларусь,  
тел.: +375 (17) 267 62 09, e-mail: enzyme@mbio.bas-net.by

**ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ****Реферат**

Приведены литературные и собственные экспериментальные данные по образованию протеолитических ферментов мицелиальными грибами, свойствам протеаз и их применению. Показана широкая распространенность способности синтезировать протеазы среди грибов различных родов. Грибные протеазы отличаются субстратной специфичностью, имеют широкий диапазон значений оптимальных условий гидролиза субстрата, рН- и термостабильности. Множественные аспекты применения грибных протеаз и их каталитические свойства обуславливают перспективность грибов как промышленных продуцентов указанных ферментов.

**Ключевые слова:** мицелиальные грибы-продуценты, протеолитические ферменты, свойства, гидролиз, применение.



К.В. Листван<sup>1</sup>, В.О. Приходько<sup>2</sup>, Н.П. Рибальченко<sup>2</sup>,  
Н.М. Волинець<sup>2</sup>, А.М. Остапчук<sup>2</sup>, М.В. Кучук<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03680, Україна,  
тел. +38 (044) 526 71 04, e-mail: lystvan@ukr.net

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03680, Україна

## АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТІВ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР ТА АСЕПТИЧНИХ РОСЛИН *PSORALEA DRUPACEA* BUNGE

Досліджено антимікробну активність екстрактів культур *Psoralea drupacea* Bunge (псоралеї кістянкової), отриманих в умовах *in vitro*: калюсів сім'ядольного походження та асептичних рослин (надземної частини та коренів). Калюсні культури *P. drupacea* виявляли слабку антимікробну активність або були неактивними. Антимікробну речовину бакуціол в них не виявлено. Показано, що асептичні рослини *P. drupacea* не відрізнялися від рослин, зібраних у природі, за місцем локалізації, спектром, ступенем та характером дії антимікробних речовин. За допомогою ВЕРХ-УФ-аналізу в екстрактах з надземних органів усіх досліджених рослин, вирощених *in vitro*, ідентифіковано меротерпеновий фенол бакуціол, вміст якого в більшості випадків був близьким до його вмісту у рослинах, зібраних у природі.

*Ключові слова:* *Psoralea drupacea*, бакуціол, антимікробна активність, калюсні культури, асептичні рослини.

Меротерпеновий фенол бакуціол, отриманий з рослин роду *Psoralea* — *P. corylifolia* L. [15] та *P. drupacea* Bunge [2], є однією з найбільш активних антибактеріальних та антигрибкових сполук рослинного походження. Він діє на різні види грамположитивних бактерій та грибів-дерматофітів у концентраціях від 1 до 10, рідше до 20 мкг/мл [5, 4, 13]. Крім того, виявляє противірусні [6] та протипухлинні властивості, протизапальну та антиоксидантну активності тощо [8, 7].

Культури клітин рослин, як і інші типи культур *in vitro* використовуються для прикладних і фундаментальних досліджень в різних галузях біології, а також для розробки біотехнологій отримання ферментів, продуктів вторинного метаболізму та інших біологічно активних речовин рослин і встановлення закономірностей їх біосинтезу. Так, що стосується роду *Psoralea*, встановлено здатність калюсних та інших типів культури *in*



*in vitro* деяких видів роду продукувати низку біологічно активних речовин: ізофлавоноїди дайдзеїн та геністеїн, фурокумарини псорален та ангеліцин (ізопсорален) тощо [11, 12, 10]. Можливості синтезу антимікробної речовини бакучіолу культурами рослин роду *Psoralea*, отриманими *in vitro*, вперше було досліджено нами [14] на прикладі виду *P. drupacea* (псоралея кістянкова).

Метою даної роботи було вивчення антимікробної активності екстрактів калюсних культур та асептичних рослин *P. drupacea*.

### Матеріали і методи

Об'єктами даного дослідження були отримані *in vitro* асептичні рослини (коренева та надземна частини), а також калюсні культури *P. drupacea* сім'ядольного походження, котрі культивувалися на агаризованому середовищі Мурашіге-Скуга, в яке додавали різні за якісним та кількісним складом комбінації фітогормонів (ауксини 2,4-дихлорфеноксіоцтову кислоту (2,4-Д) та 1-нафтилоцтову кислоту (НОК), цитокініни 6-бензиламінопурин (БАП) та кінетин (К). Частину калюсної біомаси, культивованої на окремих варіантах середовища, додатково культивували у рідкому середовищі в присутності елісатора метилжасмонату (МЖ). Більш детально умови обробки калюсних культур фітогормонами та метилжасмонатом описано раніше [14].

Для дослідження протимікробної активності та кількісного вмісту бакучіолу висушені ліофілізацією калюсні культури та повітряно-сухі надземні та кореневі частини асептичних рослин *P. drupacea* екстрагували хлороформом (деякі калюсні культури — диетиловим ефіром). Для порівняльних досліджень отримували також хлороформні екстракти з повітряно-сухих надземних органів рослин *P. drupacea*, що росли в природних умовах (зібрані в околицях м. Ашгабад у фазі початку цвітіння). Після екстрагування хлороформ відганяли, екстракти розчиняли в етанолі.

Ідентифікацію бакучіолу та його кількісне визначення проводили методом вискоєфективної рідинної хроматографії з ультрафіолетовою детекцією (ВЕРХ-УФ), використовуючи як стандарт бакучіол, отриманий з природної сировини *P. drupacea* за описаним раніше методом [3].

Антимікробну активність екстрактів калюсів та рослин *P. drupacea* досліджували методом серійних розведень на рідких поживних середовищах [1]. Тест-мікроорганізмами були референтні штами бактерій та грибів-дерматофітів, які підтримуються в колекції культур відділу антибіотиків ІМВ НАНУ (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Trichophyton mentagrophytes var. gypsum* K).

### Результати та їх обговорення

При дослідженні активності калюсних культур *P. drupacea* як тест-об'єкт був використаний референтний штам *S. aureus* — представник однієї з чутливих до дії бакучіолу груп мікроорганізмів. В таблиці 1



наведено результати випробувань антибактеріальної активності 46 варіантів калюсів сім'ядольного походження *P. drupacea*, культивованих на поживному середовищі з додаванням різних (за якісним та кількісним складом) комбінацій фітогормонів та елісатора метилжасмонату.

Майже у половини з тестованих варіантів калюсних культур *P. drupacea* виявлено невисоку антибактеріальну активність. Екстракти з них пригнічували ріст *S. aureus* в концентраціях 100–400 мкг/мл, у близьких концентраціях діяли бактерицидно. Решта екстрактів була не активною, тобто мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) була більшою за 400 мкг/мл.

Таблиця 1

Антибактеріальна активність щодо *S. aureus* екстрактів калюсних культур *P. drupacea*, культивованих на поживних середовищах різного складу

Table 1

Antimicrobial activity of *P. drupacea* callus cultures extracts obtained on the different media against *S. aureus*

Комбінація фітогормонів у середовищі	МІК калюсних екстрактів, мкг/мл		% активних калюсних екстрактів	
	- мж	+ мж	- мж	+ мж
НОК, БАП	>400	400 – >400	0	66
НОК, К	100 – >400	-	50	-
2,4-Д, К	>400	100	0	100
2,4-Д, БАП	100 – >400	100-200	77	100

Примітки: «2,4-Д» – 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота; «НОК» – 1-нафтилоцтова кислота; «БАП» – 6-бензиламінопурин; «К» – кінетин; «- мж» – метилжасмонат при культивуванні не використовувався; «+ мж» – при культивуванні використовувався метилжасмонат; «-» – не вивчали.

Виявлено деяку залежність між якісним фітогормональним складом середовища та антимікробною активністю екстрактів калюсів: серед калюсних культур, вирощених на середовищах з додаванням комбінацій фітогормонів 2,4-Д+БАП та НОК+К, більша частина виявила слабку антимікробну активність. Калюсні культури, вирощені на середовищі з додаванням НОК+БАП та 2,4-Д+К були неактивними. При цьому різниця у кількісному вмісті фітогормонів не відігравала ролі. Після обробки метилжасмонатом майже всі досліджувані калюсні культури набували слабкої антистафілококової активності. Проте ця активність, на нашу думку, не зумовлена наявністю бакучіолу, адже, як встановлено нами раніше, жоден з досліджених варіантів калюсів не містив помітної





кількості цього меротерпену [14]. Можна припустити, що антимікробна активність була зумовлена наявністю в екстрактах інших антимікробних речовин (наприклад, псоралену) — слабоактивних або синтезованих у незначних кількостях.

Антимікробні властивості асептичних рослин *P. drupacea* досліджено щодо представників умовно-патогенних грамозитивних бактерій (*S. aureus*), грамнегативних бактерій (*E. coli*) та грибів-дерматофітів (*T. mentagrophytes var. gypseum*). Досліджували хлороформні екстракти з надземної частини та коренів рослин, культивованих *in vitro*, у порівнянні з екстрактом з надземних органів рослин *P. drupacea*, зібраних у природі, а також з діючою речовиною рослинних екстрактів — меротерпеновим фенолом бакучіолом.

Як видно з наведених у таблиці 2 даних, за місцем локалізації, спектром та ступенем дії антимікробних речовин рослини псоралеї різного походження не відрізнялися. Екстракти з надземних органів як асептичних, так і зібраних у природі рослин, так само як і бакучіол, пригнічували ріст *S. aureus* і *T. mentagrophytes* та не діяли на *E. coli*. В екстрактах з надземних органів усіх досліджених рослин, вирощених *in vitro*, за допомогою ВЕРХ-УФ-аналізу ідентифіковано бакучіол, вміст якого в більшості випадків становив 1,45–3,82% від сухої маси рослини. Повітряно-суха природна сировина *P. drupacea* містила від 3,4 до 4,6% бакучіолу. Тобто, і за цим показником рослини природного і біотехнологічного походження практично не відрізнялися.

Бактерицидну або фунгіцидну дію екстракти з надземних органів рослин, культивованих *in vitro*, так само, як екстракти з природної сировини *P. drupacea* і їх діюча речовина бакучіол, виявляли в концентраціях, близьких до мінімальних інгібуючих концентрацій.

Таблиця 2  
Антимікробна активність екстрактів з культивованих *in vitro* та зібраних у природі рослин *P. drupacea*

Table 2  
Antimicrobial activity of *P. drupacea* plants extracts cultivated in *in vitro* conditions or collected from nature

Досліджуваний зразок	МІК екстрактів, мкг/мл			Концентрація бакучіолу, %
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>T. mentagrophytes var. gypseum</i>	
Надземна частина культивованих <i>in vitro</i> рослин	3,3 – 33,3	>400	6,7 – 33,3	0,035 – 3,82
Корені культивованих <i>in vitro</i> рослин	>400	>400	>400	сліди
Надземна частина зібраних у природі рослин	10–20	>400	20	3,4–4,67
Бакучіол	2	>400	4-10	100

Примітка: % — відсоток від сухої маси рослинного матеріалу.



Екстракти з коренів досліджених рослин *P. drupacea* (як вирощених в умовах *in vitro*, так і зібраних у природі) антимікробної дії не виявляли. Як показано нами раніше [14], в коренях асептичних рослин є лише сліди бакучіолу. Це узгоджується з даними про незначні кількості цієї речовини в коренях рослин іншого виду даного роду — *P. corylifolia* (псоралей ліщинолистій) [9]. Крім того, оскільки в культурі «бородатих» коренів *P. drupacea* (ізолювані генетично трансформовані корені) бакучіолу не виявлено взагалі [14], можна припустити, що бакучіол не синтезується в клітинах кореня, а потрапляє туди в слідових кількостях з надземної частини рослини.

Таким чином, проведені дослідження показали, що калюсні культури сім'ядольного походження *P. drupacea* — продуцента високоефективного антимікробного меротерпену бакучіолу — значної антимікробної активності не виявляють і бакучіол у помітних кількостях не синтезують. Культура асептичних рослин *P. drupacea*, завдяки високому рівню накопичення бакучіолу в надземних органах, перспективна як джерело високо активного антибіотика і об'єкт для розробки біотехнологічних основ його одержання.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Бондаренко А.С., Айзенман Б.Ю., Приходько В.О., Мещеряков А.О., Скоробогатько Т.І., Мишенкова Є.Л. Антибіотичні властивості ефірного масла *Psoralea drupacea* Вге. // Мікробіол. журн. — 1972. — 34, № 5. — С. 612–616.
2. Бондаренко А.С., Айзенман Б.Е., Бакина Л.А., Кожина И.С., Приходько В.А., Мишенкова Е.Л., Мещеряков А.А. Изучение антимикробной и антивирусной активности эфирного масла из *Psoralea drupacea* Bunge и его компонентов // Растительные ресурсы. — 1974. — 10, № 4. — С. 583–588.
3. Бондаренко А.С., Айзенман Б.Е., Затула Д.Г., Бакина Л.А., Кожина И.С., Приходько В.А., Силкина О.В., Мещеряков А.А. *Psoralea drupacea* как перспективный источник антибиотика бакучиола // Растительные ресурсы. — 1977. — 13, № 3. — С. 460–463.
4. Данилевский Н.Ф., Смирнов В.В., Приходько В.А., Косович Т.Ю. Чувствительность аэробной микрофлоры ротовой полости к антибиотику бакучиолу // Стоматология: респ. межвед. науч. сб. — Киев: Здоров'я, 1985. — С. 9–12.
5. Приходько В.А., Бондаренко А.С., Мишенкова Е.Л. Антимикробная активность и токсичность антибиотика бакучиола // Микробиол. журн. — 1980. — 42, № 5. — С. 646–650.
6. Приходько В.А., Жмурко Л.И., Бобырь А.Д., Мещеряков А.А. Активность бакучиола в отношении вируса табачной мозаики // Микробиол. журн. — 1982. — 44, № 3. — С. 73–74.



7. Adhikari S., Joshi R., Patro B.S., Ghanty T.K., Chintalwar G.J., Sharma A., Chattopadhyay S., Mukherjee T. Antioxidant activity of bakuchiol: experimental evidence and theoretical treatments on the possible involvement of the terpenoid chain // Chem. Res.Toxicol. — 2003. — 16, № 9. — P. 1062–69.

8. Backhouse C.N., Delporte C.L., Negrete R.E., Erazo S., Zuniga A., Pinto A., Cassels B.K. Active constituents isolated from *Psoralea glandulosa* L. with anti-inflammatory and antipyretic activities // J. Ethnopharmacol. — 2001. — 78, № 1. —P. 27–31.

9. Banerji A., Chintalwar G. Biosynthesis of bakuchiol, a meroterpene from *Psoralea corylifolia* // Phytochemistry. — 1983. — 22, № 9. — P. 1945–1947.

10. Baskaran P., Jayabalan N. Psoralen production in hairy roots and adventitious root cultures of *Psoralea corylifolia* // Biotechnol. Lett. — 2009. — 31, № 7. — P. 1073–1077.

11. Bouque V., Bourgaud F., Nguyen C., Guckert A. Production of daidzein by callus cultures of *Psoralea* species and comparison with plants // Plant Cell Tissue Organ Cult. — 1998. — 53, № 1. — P. 35–40.

12. Bourgaud F., Bouque V., Guckert A. Production of flavonoids by *Psoralea* hairy root cultures // Plant Cell Tissue Organ Cult. — 1999. — 56, № 2. — P. 97–104.

13. Katsura H., Tsukiyama R.I., Suzuki A., Kobayashi M. *In vitro* activities of bakuchiol against oral microorganisms // Antimicrob. Agents Chemother. — 2001. — 45, № 11. — P. 3009–3013.

14. Lystvan K., Belokurova V., Sheludko Y., Ingham J.L., Prykhodko V., Kishchenko O., Paton E., Kuchuk M. Production of bakuchiol by *in vitro* systems of *Psoralea drupacea* Bge. // Plant Cell Tissue Organ Cult. — 2010. — 101, № 1. — P. 99–103.

15. Mehta G., Nayak U.R., Dev S. Meroterpenoids. 1. *Psoralea corylifolia* Linn. 1. Bakuchiol, a novel monoterpene phenol // Tetrahedron. — 1973. — 29. — P. 1119–1125.



К.В. Листван<sup>1</sup>, В.А. Приходько<sup>2</sup>, Н.П. Рибальченко<sup>2</sup>, Н.М. Волинець<sup>2</sup>,  
А.Н. Остапчук<sup>2</sup>, Н.В. Кучук<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут кліткової біології та генетическої інженерії НАН України, ул. Академіка  
Заболотного, 148, Київ, 03680, Україна, тел.: +38 (044) 526 71 04, e-mail: lystvan@ukr.net

<sup>2</sup>Інститут мікробіології та вірусології імені Д.К.Заболотного НАН України,  
ул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03680, Україна

## АНТИМІКРОБНА АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ КАЛЛЮСНЫХ КУЛЬТУР И АСЕПТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ *PSORALEA* *DRUPACEA BUNGE*

### Реферат

Исследована антимикробная активность экстрактов культур *Psoralea drupacea* Bunge (псоралеи костянковой), полученных в условиях *in vitro*: каллюсов семядольного происхождения и асептических растений (надземной части и корней). Каллюсные культуры *P. drupacea* проявляли слабую антимикробную активность либо были неактивными. Антимикробное вещество бакучиол в них выявлено не было. Показано, что асептические растения *P. drupacea* не отличались от растений, собранных в природе, по месту локализации, спектру, степени и характеру действия антимикробных веществ. С помощью ВЭЖХ-УФ анализа в экстрактах надземных органов всех исследованных растений, выращенных *in vitro*, идентифицирован меротерпеновый фенол бакучиол, содержание которого в большинстве случаев приближалось к его содержанию в растениях, собранных в природе.

Ключевые слова: *Psoralea drupacea*, бакучиол, антимикробная активность, каллюсные культуры, асептические растения.



**K.V. Lystvan<sup>1</sup>, V.O. Prykhodko<sup>2</sup>, N.P. Rybalchenko<sup>2</sup>, N.M. Volynets<sup>2</sup>,  
A.M. Ostapchuk<sup>2</sup>, M.V. Kuchuk<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NASU, 148, Academ. Zabolotny str.,  
Kyiv, 03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 71 04, e-mail: lystvan@ukr.net

<sup>2</sup>Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Academ.Zabolotny str.,  
Kyiv, 03680, Ukraine

## **ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF CALLUS CULTURES AND ASEPTIC PLANTS OF *PSORALEA* *DRUPACEA* BUNGE**

### **Summary**

Antimicrobial activity has been investigated for *P. drupacea* *in vitro* cultures (cotyledon-derived calli; aerial parts and roots of aseptic plants). Activity of calli was weak or absent. Aseptic *P. drupacea* plants as it is shown have no differences from collected ones in nature in antimicrobial localization, spectrum and degree of influence. By the means of HPLC-UV in the extracts of aerial parts of the investigated plants the meroterpene bakuchiol has been identified. The content of the substance in aseptic plants was similar to the one in the plants collected in nature.

**Key words:** *Psoralea drupacea*, bakuchiol, antimicrobial activity, callus cultures, aseptic plants.



І.І. Гуляєва<sup>1</sup>, О.В. Шевченко<sup>2</sup>, Г.О. Снігур<sup>2</sup>, А.С. Бісов<sup>2</sup>,  
Б.Н. Мілкус<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Одеський державний аграрний університет, вул. Канатна, 99, Одеса, 65039, Україна,  
e-mail: ogssi@te.net.ua, inna\_gulyaeva@list.ru.

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64,  
Київ, 01033, Україна

## ПОШИРЕННЯ ВІРУСУ КАРЛИКОВОСТІ ПШЕНИЦІ НА ПІВДНІ УКРАЇНИ

*На посівах пшениці і ячменю південного регіону України виявлено вірус карликовості пшениці (ВКП). Вірус ідентифіковано за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Проаналізовано поширення вірусу, вивчено сортову чутливість злакових культур до ВКП. Показано залежність ступеня ураження рослин вірусом від строків посіву та кліматичних умов.*

*Ключові слова: вірус карликовості пшениці, імуноферментний аналіз, полімеразна ланцюгова реакція.*

Віруси є однією з серйозних причин зменшення урожайності і якості зерна багатьох сільськогосподарських культур. Віруси є невід'ємною частиною будь-якої екосистеми, причому на різних етапах розвитку віруси знаходяться в тісній взаємодії з різними її компонентами [3].

У зв'язку з великою насиченістю зернових у сівоzmінах в Україні, а саме через короткі паузи при вирощуванні цих культур на одному полі, підвищується інфекційний тиск (навантаження) збудників вірусних хвороб. Внаслідок використання швидкодійних азотних добрив у рослинах підвищується вміст азоту, вільних амінокислот і різних цукрів, що призводить до ураженості зернових попелицями та іншими шкідниками. Це, в свою чергу, сприяє розповсюдженню вірусів зернових культур в агроценозах [6].

Зміни у кліматі, які відбулися за останні роки, зокрема, підвищення континентальності клімату, вимагають поетапного обстеження посівів на наявність шкідливих комах, рослин, уражених різними хворобами, з метою своєчасного застосування заходів захисту від шкочочинних організмів та прогнозування врожайності [3].

ВКП передається персистентно за допомогою унікального вектора — цикадки *Psammotettix alienus*, але не передається цикадками *Javesella pellucid*, *Laodelphax striatellus*, *Macrostoteles laevis*. Вірус зберігається під час линьки та не розмножується в організмі вектора. В процесі





розмноження цикадка не передає вірус своїм нащадкам. ВКП не переноситься механічно, контактом між рослинами, насінням та пилком [3]. Таким чином, епідеміологія ВКП дуже тісно пов'язана з географічним поширенням його унікального вектора, який найбільше розповсюджений у країнах південної та східної Європи: в Болгарії, Чехії, Словаччині, Франції, Угорщині, Німеччині та країнах СНД. Є дані, що його виявили у Швеції. Слід зазначити, що даних щодо поширення вірусу карликовості пшениці в Україні недостатньо.

Нашою метою було не тільки встановити факт наявності вірусу у зразках рослин, але й провести кількісний аналіз для з'ясування поширення даного захворювання на півдні України.

### Матеріали та методи

Відбір зразків рослин проводили за результатами візуальної діагностики. Маршрутні обстеження полів здійснювали за певними стандартними схемами (маршрутами), із застосуванням «діагонального» підходу подібно до спрощених схем дрібномасштабного детального моніторингу полів на 10% загальної площі посівів [7].

Відбір зразків зернових злакових культур проводили за вибірковим методом — відбирали рослини із вірусоподібними симптомами: жовтухою та значною карликовістю рослин. Відбирали рослини озимої та ярої пшениці, ячменю, та супутніх дикорослих злаків. На Півдні України зразки відбирали в основних зерносіючих регіонах — Одеська, Херсонська та Миколаївська області. Загалом було відібрано близько 125 зразків.

Після відбору для подальшого аналізу методом ІФА зразки рослин гомогенізували у фосфатному буфері (0,1 М PBS, рН 7.4) у співвідношенні 1:10. Потім центрифугували на центрифугі РС-6 (5000 g протягом 20 хв.); відбирали надосадову рідину, яку використовували для подальших досліджень.

Для діагностики ВКП методом ІФА використовували комерційну тест-систему виробництва LOEWE (Німеччина). Усі зразки аналізували у трикратній повторності відповідно до рекомендацій виробника тест-системи.

Результати реєстрували на аналізаторі ІФА — при довжині хвилі 405 нм. Позитивним рахували показник, який вдвічі перевищував негативний контроль (сік здорової рослини) [1, 2, 6].

Для детекції вірусу карликовості пшениці застосовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Використовували універсальні видоспецифічні праймери: WDV-forward 468-487 5'-ATCCCGGGTCCTCCGACTAC-3' та WDV-reverse 477-458 5'-GACCCGGGATCGTAAGGGGC-3' [11]. Листки злакових культур (пшениці, ячменю та дикорослих злаків) відбирали з рослин, які при серологічній діагностиці були показані як ВКП-позитивні. Виділення ДНК проводили за рекомендаціями Shepherd et al. [9]. Виділення проводили за допомогою набору Extract-n-Amp™ Plant PCR kit (Sigma, США) за рекомендаціями виробника. Наважку листків (30–50 мг)



переносили в пробірку Еппендорф, вкривали екстрагувальним буфером в об'ємі 50 мкл та нагрівали протягом 10 хв при 95 °С. Надалі додавали буфер для розбавлення в об'ємі 50 мкл, після чого зразок або зберігали при -20 °С, або відразу використовували для проведення ПЛР за стандартною методикою із використанням пари універсальних праймерів. Результати ПЛР слугували підтвердженням дійсного факту інфікування рослин ВКП. Застосування наведених пар праймерів дозволяло ампліфікувати повнорозмірну копію геному вірусу (2700 основ).

Для проведення ПЛР використовували ДНК в об'ємі 3 мкл, виділеної описаним вище способом за допомогою тест-набору. Окрім того, реакційна суміш містила 20 пкмоль праймерів, 200 пкмоль кожного дНТФ, реакційний буфер для ПЛР та 2,5 од/мл Таq-полімерази (Fermentas, Латвія) [9].

Ампліфікацію проводили у режимі: 94 °С — 4 хв. (94 °С — 30 сек., 56 °С — 30 сек., 72 °С — 3 хв. 30 сек.) — 40 циклів, 72 °С — 10 хвилин.

Результати ампліфікації геному вірусу перевіряли методом горизонтального електрофорезу в 1% агарозному гелі [11] за допомогою приладу виробництва «Хійу-Калур» (Латвія) та транслюмінатора (Bio-Rad, США) з використанням стандартних маркерів Gene Ruller 100 bp DNA Ladder plus (Fermentas, Латвія) з подальшим фотографуванням гелів в ультрафіолетовому світлі.

### Результати та їх обговорення

За 2009 рік проведено обстеження агроценозів та відбір зразків злакових культурних та дикорослих рослин: пшениці, ячменю та супутніх трав'янистих бур'янів для подальшого виявлення ВКП.

Обстежували рослини з вірусоподібними симптомами: жовтухою та значною карликовістю. Симптоми на рослинах були типовими для ВКП.

Усі відібрані зразки мали особливий інтерес, оскільки в літературі немає статистичних даних стосовно поширення даного вірусу в агроценозах півдня України.

У результаті проведеного дослідження фітосанітарного стану посівів зернових культур показано, що в різних районах півдня України дуже поширеними є симптоми, типові для ВКП — пожовтіння листкових пластинок, затримка росту та карликовість рослин. Звичайно відсоток уражених рослин і ступінь їх ураження були різними. У результаті ІФА вперше діагностовано ВКП в Одеській області на сортах озимої пшениці Селянка, Кнопа, Знахідка Одеська, Куяльник, Одеська 267 та на сортах озимого ячменю Метелиця, Абориген, Росава, Основа. У Херсонській і Одеській областях ВКП виявлено на диких злаках (*Deschampsia sp.*). В Миколаївській області ВКП не був виявлений.

Проведеними дослідженнями встановлено значне поширення ВКП у зернових агроценозах деяких районів півдня України.

Результати проведеного аналізу стосовно впливу сортів та строку посіву на прояв ВКП наведені в таблицях 1 та 2.



Таблиця 1  
Виявлення ВКП на озимому ячмені в Одеській області за допомогою ІФА

Table 1  
Serological detection (ELISA-test) of WDV in the winter barley at the Odesa region

Сорт	Сівалковий посів	
	2.10.08	12.10.08
Росава	–	+
Основа	–	+
Тамань	–	–
Метелиця	+	–
Абориген	+	–

умовні позначення: – вірусу немає; + наявність вірусу

Таблиця 2  
Результати виявлення ВКП на озимій пшениці в Одеській області за допомогою ІФА

Table 2  
Serological detection (ELISA-test) of WDV in the winter wheat at the Odesa region

Сорти	Строки посіву					
	5.09.08	15.09.08	25.09.08	5.10.08	15.10.08	25.10.08
Одеська 267	–	+	+	–	–	–
Селянка	+	–	–	–	–	–
Кнопа	+	+	–	–	–	–
Знахідка Од.	+	+	–	–	–	–
Куяльник	+	+	+	–	–	–

Аналізуючи дані ІФА, можна зробити висновок про те, що ВКП на озимому ячмені проявлено на таких сортах як Росава, Основа, Метелиця, Абориген. Озимий ячмінь був посіяний звичайними сівалками та у демонстраційному досліді – широкорядним способом посіву. У сівалковому посіві ВКП виявлено на сортах Метелиця та Абориген 2.10.08 строку посіву та Росава і Основа 12.10.08 строку посіву. При широкорядному посіві 12.10.08 ВКП виявлено на сортах Росава і Основа. На сорті Та-



мань ВКП не виявлено взагалі, що ймовірно може свідчити про його несприйнятливості до даного вірусу.

Отримані результати дозволяють зробити висновок про відсутність зв'язку між способом та строком посіву злакових культур і їх ураженістю ВКП. Треба відмітити, що і у виробничих посівах, зокрема у Комінтернівському і Біляївському районах Одеської області, ВКП виявлено на сортах Основа 20.09.08 строку посіву та Росава 2.10.08 строку посіву, відповідно. Отже, основним способом боротьби з ВКП на озимому ячмені має бути вибір стійких сортів. Тим не менше, оскільки ВКП є ДНК-вмісним гемінівірусом, який реплікується в ядрі, пошук сортів злаків, стійких до даного патогену, може виявитися нерентабельним.

Тестування зразків озимої пшениці показало, що на відміну від озимого ячменю, який був уражений в оптимальний для посіву строк (10–15.10), на пшениці ВКП не виявлено за посіву в оптимальний термін. Він виявлявся лише за посіву з 5.09 по 25.09. У зв'язку з цим, важливим є строк посіву культури. Про це свідчать дані таблиці 3, з якої видно, що ВКП ідентифіковано при посіві 5. 09 на сортах Селянка, Кнопа, Знахідка Одеська, Куяльник; 15.09 на сортах: Одеська 267, Кнопа, Знахідка Одеська, Куяльник; 25. 09 на сортах: Одеська 267, Куяльник, а за строків посіву 5.10; 15.10; 25.10 ВКП на жодному із вищевказаних сортів виявлено не було. У зв'язку з цим основну увагу необхідно приділяти своєчасному посіву культур (до або після масового лету векторів ВКП) та проведенню агротехнічних заходів з контролю популяцій вектору ВКП. Зокрема, нами було з'ясовано, що значна кількість популяцій вектора ВКП цикадки *Psammotettix alienus*, виявилася нездатною пережити сувору та тривалу зиму 2009 року, тому рівень інфікованості посівів у 2010 р. виявився значно меншим за показники минулих років.

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Антитела 1*. Методы /под ред. Кетти Д. — М.:Мир. —1991(а). — С. 68–92.
2. *Антитела 2*. Методы /под ред. Кетти Д. — М.:Мир. — 1991(б). — С. 152–165.
3. *Бойко А.Л.* Влияние факторов внешней среды на вирусы, инфицирующие растения //Сельскохозяйственная биология. — 1989. — № 5. — С. 120–125.
4. *Бойко А.Л.* Экология вирусов растений / К.: Вища школа. — 1990. — 167 с.
5. *Гнутова Р.В.* Серология и иммунохимия вирусов растений / М.: Наука. — 1993. — 301 с.
6. *Защита растений в устойчивых системах землепользования (в 4-х книгах) / Под общей редакцией доктора с.-х. наук, профессора, иностранного члена РАСХН Д. Шпаара.* — Минск. — 2004., Книга 4. — 345 с.



7. *Экологизированная* защита растений в овощеводстве, садоводстве и виноградарстве (в двух книгах) / Под общей редакцией доктора с.-х. наук, профессора, иностранного члена РАСХН Д. Шпаара. — Санкт-Петербург. — 2005., Книга 1. — 336 с.

8. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989. 689 p.*

9. *Shepherd D., Martin D., Lefevre P., Monjane A., Owor B., Rybicki E., Varsani A. A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue // Journal of Virological Methods. — 2008. — Vol. 149, Issue 1. — P. 97–102.*

10. *Tobias I., Kiss B., Bakardjieva N., Palkovics L. The Nucleotide Sequence of Barley Strain of Wheat Dwarf Virus Isolated in Bulgaria // Cereal Research Communications. — 2009. —V.37(2). — P. 237–242.*

11. *Virus Taxonomy: The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L.A. Ball (eds).Academic Press, 2005. 1162 p.*

**И.И. Гуляева<sup>1</sup>, А.В. Шевченко<sup>2</sup>, Г.А. Снигур<sup>2</sup>, А.С. Бисов<sup>2</sup>, Б.Н. Милкус<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Одесский государственный аграрный университет, ул. Канатная, 99, Одеса, 65039, Украина, e-mail: ogsi@te.net.ua, inna\_gulyaeva@list.ru.

<sup>2</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина

## **РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВИРУСА КАРЛИКОВОСТИ ПШЕНИЦЫ НА ЮГЕ УКРАИНЫ**

### **Реферат**

На посевах пшеницы и ячменя южного региона Украины выявлен вирус карликовости пшеницы (ВКП). Вирус идентифицирован при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Сделан анализ распространения вируса, изучена сортовая чувствительность злаковых культур к ВКП. Показана зависимость степени поражения растений вирусом от сроков посева и климатических условий.

**Ключевые слова:** вирус карликовости пшеницы, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция.



**I.I. Guliaeva<sup>1</sup>, O.V. Shevchenko<sup>2</sup>, G.O. Snigur<sup>2</sup>, A.S. Bisov<sup>2</sup>,  
B.N. Milkus<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Odesa Agrarian University, 99, Kanatna str., Odesa, 65039, Ukraine,  
e-mail: gulyaeva@list.ru

<sup>2</sup>T. Shevchenko National University, 64, Volodymirska str., Kyiv, 01033, Ukraine

## **SPREAD OF WHEAT DWARF VIRUS (WDV) ON THE SOUTH OF UKRAINE**

### **Summary**

There were detected the wheat dwarf virus (WDV) on the wheat and barley grown at the South part of Ukraine. The virus identification was conducted by ELISA-test and Polymerase Chain Reaction (PCR). The WDV distribution and cereals varietal resistance to this virus were analyzed. It was established that the level of WDV infection depends on the time of crops sowing and the climatic conditions.

**Key words:** wheat dwarf virus, ELISA-test, Polymerase Chain Reaction.





Т.А. Круподьорова, В.Ю. Барштейн, Н.А. Бісько, Т.С. Іванова

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки  
Національної академії наук України»  
вул. Осиповського, 2а, Київ, 04123, Україна, тел.: +38 (044) 462 72 59,  
e-mail: yemets@list.ru

## СКЛАД МІЦЕЛІАЛЬНОЇ МАСИ ТА КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ *CORDYCEPS SINENSIS* (BERK.) SACC. (ASCOMYCETES)

У міцеліальній масі та культуральній рідині *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. ідентифіковано 17 амінокислот з домінуванням 3-х незамінних: лізину, лейцину, треоніну. У загальній фракції ліпідів міцеліальної маси *C. sinensis* знайдено 10 жирних кислот, а в культуральній рідині – 12. Виявлено переважання ненасичених жирних кислот у жирнокислотному складі міцеліальної маси (77,82%) та культуральної рідини (74,34%) *C. sinensis*. У міцеліальній масі та культуральній рідині *C. sinensis* встановлено наявність вітамінів  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_{12}$ , А, С, каротиноїдів та 14 хімічних елементів.

Ключові слова: *Cordyceps sinensis*, міцеліальна маса, культуральна рідина,  $CO_2$ -шрот амаранта.

Унікальні властивості грибів роду *Cordyceps*, які використовують у народній медицині Китаю протягом більш ніж 1200 років як універсальний засіб для зміцнення організму та профілактики різних захворювань, викликають останнім часом все більший інтерес. Вони зустрічаються у лісах Азії, Європи та Північної Америки та є ентомопатогенними грибами, що паразитують на гусеницях метеликів [10, 14–16]. Особлива увага вчених всього світу приділена дослідженням лікувальних властивостей *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc (Кордицепс китайський, «Tschukaso», «DongChongXiaCao») [10, 11, 13–15]. Сполуки (кордицепсова кислота, аденозин, кордицепін, полісахариди – D-глюкани, галактозоаміноглюкани та ін.), що входять до складу цього лікарського гриба, покращують стан імунної системи людини, мають протипухлинну, антиоксидантну, антибактеріальну, гіпотензивну, антиаритмічну дію, підвищують адаптивні можливості організму, гальмують процеси старіння та тромбоутворення, гармонізують обмінні процеси [10, 11, 13–15], а також позитивно впливають на нервову, ендокринну, статеву та дихальну системи [10, 14–16].

Питання щодо можливості використання міцеліальної маси, культуральної рідини будь-якого гриба для харчових чи лікувальних



профілактичних цілей пов'язано з комплексною оцінкою їх харчової та біологічної цінності та пошуком дешевих, екологічно чистих субстратів — відходів рослинного походження та харчової промисловості. Однак, існує дефіцит робіт, вищезначеного напрямку. Крім того, культуральна рідина лікарських грибів на вміст протеїну, амінокислот, жирних кислот, вітамінів, макро- та мікроелементів майже зовсім не досліджена.

Мета нашої роботи — проаналізувати якісний та кількісний склад міцеліальної маси та культуральної рідини лікарського гриба *Cordyceps sinensis*, вирощеного на борошні із CO<sub>2</sub>-шроту амаранту *Amaranthus caudatus* L — відході вуглекислотної екстракції.

### Матеріали та методи

Об'єктом дослідження був штам з Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України [1]: *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 1928.

Субстратом для поверхневого культивування *C. sinensis* був відход рослинного походження — борошно із CO<sub>2</sub>-шроту амаранту *Amaranthus caudatus* L. у кількості 60 г на 1 літр дистильованої води. Субстрат стерилізували в автоклаві у колбах об'ємом 0,25 л 30 хв. при 1 атм. Після стерилізації субстрат інокулювали гомогенізованим міцелієм (10% за об'ємом), що був вирощений попередньо на чашках Петрі з глюкозо-пептонним агаризованим середовищем. Інокульовані субстрати інкубували 14 діб у термостаті при температурі 20±2 °С.

Біомасу та культуральну рідину *C. sinensis*, одержані при вирощенні продуцента на борошні із CO<sub>2</sub>-шроту амаранту, висушували за допомогою ліофільної сушки Cryodos-50 (Іспанія).

Загальний азот у біомасі та культуральній рідині визначали за методом Кьельдаля [6]. Сирий протеїн розраховували перерахунком кількості загального азоту з використанням коефіцієнту 4,38 [9].

Визначення сирого жиру проводилося згідно з методикою М. Кейтса [3]. Встановлення жирнокислотного спектру виконано згідно з ДСТУ ISO 5508-2001 [2]. Хроматографічний аналіз жирних кислот проведено на газовому хроматографі Кристал Люкс 4000 (Росія) з полум'яно-іонізаційним детектором, на капілярній колонці SP-2560 (Supelco). Межа виявлення жирних кислот — 0,01%.

Визначення вмісту вітаміну В<sub>1</sub> ґрунтується на окисненні тіаміну в тіохромі, екстракції останнього органічним розчинником та вимірюванні інтенсивності флуоресценції [8].

Встановлення наявності вітаміну В<sub>2</sub> здійснювали з рибофлавінів'язуючим апобілком з білка курячих яєць відповідно до методики В.М. Коденцової [4].

Виявлення наявності вітаміну В<sub>12</sub> здійснювали мікробіологічним методом [5] за допомогою індикаторної культури *Escherichia coli* 113-2, яка має чутливість 0,005—5,0 мкг/мл, що дозволяє виявити дуже малі кількості вітаміну (мікрограми) у середовищі.



Визначення вітаміну А та каротиноїдів визначали колориметричним методом, заснованим на кольорових реакціях з трьоххлористою сурмою у хлороформі та трифтороцтовій кислоті [8].

Встановлення вітаміну С базувалося на редуруючих властивостях аскорбінової кислоти [6].

Наявність хімічних елементів здійснювали на мас-спектрометрі ICP-MS аналізатором Thermo Finnigan Element-2 (Німеччина) [7].

Повторність дослідів трикратна, результати експериментів оброблено методами математичної статистики з використанням Microsoft Excel.

### Результати та обговорення

Виявлено високий вміст протеїну у міцеліальній масі, і особливо, у культуральній рідині *C. sinensis* (рис. 1). Слід зазначити, що кількість отриманого протеїну у міцеліальній масі аналогічна такій, що отримана при вирощуванні *C. sinensis* на глюкозо-пептоному середовищі [16] і більша за отриману при культивуванні даного виду гриба на картопляно-глюкозному середовищі [11, 14]. Вміст протеїну у дослідженій культуральній рідині *C. sinensis* у 12 разів вищий, за результат отриманий іншими вченими [11].

Важливим компонентом клітини гриба є сирий жир, тобто сума речовин, що екстрагуються сірчистим чи петролейним етером. Було відмічено, що в процесі культивування дослідженого ентомофілу на середовищі з борошном із CO<sub>2</sub>-шроту амаранту у його міцеліальній масі та культуральній рідині міститься менша кількість (<7%) сирого жиру (рис. 1), ніж у наведених даних інших авторів [14, 16].

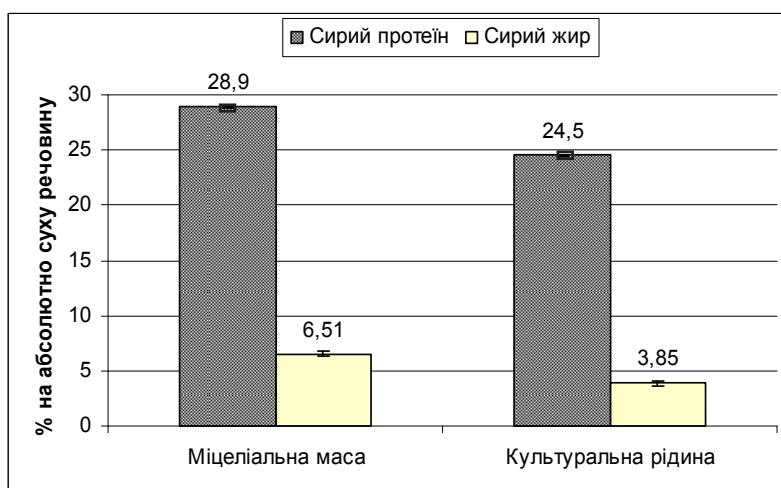


Рис. 1. Вміст сирого протеїну та сирого жиру у міцеліальній масі та культуральній рідині *C. sinensis*.

Fig. 1. Crude protein and crude fat content in mycelial biomass and culture liquid of *C. sinensis*.

Встановлено, що міцеліальна маса *C. sinensis* має такий же набір амінокислот як і культуральна рідина. Виявлено 17 амінокислот (табл. 1).

Таблиця 1  
Амінокислотний склад *C. sinensis*, % від загальної кількості

Table 1  
Content of amino acids in *C. sinensis*, % of total protein

Амінокислота	Міцеліальна маса	Культуральна рідина
Лізін	8,4±0,0	6,3±0,0
Гістидин	3,0±0,0	2,3±0,1
Аргінін	5,1±0,1	4,5±0,0
Аспарагінова кислота	6,3±0,0	9,1±0,5
Треонін	7,2±0,1	7,8±0,2
Серин	6,7±0,0	9,1±0,1
Глутамінова кислота	17,5±0,0	16,3±0,2
Пролін	7,0±0,0	4,0±0,0
Гліцин	6,6±0,0	9,3±0,1
Аланін	8,7±0,0	7,1±0,2
Цистин	1,5±0,0	1,5±0,1
Валін	3,3±0,0	3,4±0,1
Ізолейцин	3,6±0,0	3,9±0,0
Лейцин	6,5±0,0	6,5±0,1
Тирозин	3,2±0,0	4,1±0,0
Фенілаланін	3,9±0,0	3,6±0,1
Метіонін	1,5±0,0	1,2±0,0
Всього:	100	100
$\Sigma_1$ незамінних амінокислот	39,1	38,3
$\Sigma_2$ замінних амінокислот	60,9	61,7
$\Sigma_1/\Sigma_2$	0,64	0,62



16 амінокислот ідентифіковано у міцеліальній масі і 15 амінокислот у культуральній рідині при культивуванні цього виду гриба на картопляно-глюкозному середовищі [11]. В інших роботах [12, 14] міцеліальна маса *C. sinensis* мала 17 та 18 амінокислот, відповідно. Слід відзначити, що у всіх дослідженнях зберігається тенденція домінування глутамінової кислоти і кількісне коливання окремих амінокислот. Серед незамінних амінокислот нашого штаму *C. sinensis* найкраще представлені лізин, треонін, лейцин (табл. 1), що співпадає з результатами інших дослідників [12, 14]. Амінокислотний склад того чи іншого білка визначає його цінність, яку лімітує найбільш рідкісна з незамінних амінокислот. Мінорними у міцеліальній масі нашого гриба виявлено сірковмісні амінокислоти цистин та метіонін, а у культуральній рідині — лише метіонін. Ця амінокислота була також лімітуючою у інших дослідженнях [11, 14].

У загальній фракції ліпідів міцеліальної маси *C. sinensis* виявлено 10 жирних кислот, а в культуральній рідині — 12 (табл. 2).

Таблиця 2  
Склад жирних кислот гриба *C. sinensis*, % до суми жирних кислот

Table 2

Content of fatty acids in *C. sinensis*, % of total lipids

Жирна кислота	Код жирної кислоти	Міцеліальна маса	Культуральна рідина
Мірістинова	C <sub>14:0</sub>	0,36	0,44
Пентадеканова	C <sub>15:0</sub>	1,54	0,21
Пальмітинова	C <sub>16:0</sub>	16,43	20,33
Пальмітолеїнова	C <sub>16:1</sub>	0,33	0,33
Гептадеканова	C <sub>17:0</sub>	0,46	0,75
Гептадеценова	C <sub>17:1</sub>	0,41	0,22
Стеаринова	C <sub>18:0</sub>	2,98	2,89
Олеїнова	C <sub>18:1n 9c</sub>	24,15	25,12
Лінолева	C <sub>18:2n 6c</sub>	52,26	48,63
Ліноленова	C <sub>18:3n 3c</sub>	1,08	0,26
Арахінова	C <sub>20:0</sub>	—	0,51
Бегенова	C <sub>22:0</sub>	—	0,31
Σ <sub>1</sub> насичені		22,18	25,66
Σ <sub>2</sub> ненасичені		77,82	74,34
Σ <sub>1</sub> /Σ <sub>2</sub>		3,5	2,89



Серед ненасичених кислот переважає лінолева ( $C_{18:2n\ 6c}$ ) (табл. 2). Значний також вміст олеїнової кислоти ( $C_{18:1n\ 9c}$ ), відсоток якої був майже на одному рівні у міцеліальній масі та культуральній рідині *C. sinensis*. Високий вміст олеїнової та лінолевої кислот відзначено також у іншій роботі [16]. Ненасичена пальмітолеїнова кислота найкраще була представлена у культуральній рідині *C. sinensis*. За результатами аналізу жирнокислотного складу міцеліальної маси та культуральної рідини *C. sinensis* та даних літератури [14, 16] переважають ненасичені жирні кислоти (табл. 2).

З літератури [10, 14] відомо про наявність у міцеліальній масі *C. sinensis* вітамінів групи В, Е, К. Більш якісний вітамінний профіль виявлено нами у міцеліальній масі *C. sinensis* (табл. 3). Слід також відзначити високий вміст вітаміну С та вищий рівень вітаміну  $B_{12}$  у  $CO_2$ -шроті амаранту та культуральній рідині *C. sinensis*.

Таблиця 3

Вміст вітамінів у біомасі гриба *C. sinensis* та субстраті  $CO_2$ -шрот амаранту

Table 3

Vitamins content of *C. sinensis* and substrate based on flour from the waste of *Amarantus caudatus* L. after  $CO_2$ -extraction

Вітамін	$CO_2$ -шрот амаранту	<i>C. sinensis</i>	
		Міцеліальна маса	Культуральна рідина
$B_1$ (тіамін), мг/г	0,48±0,12	0,27±0,0	0,05±0,0
$B_2$ (рибофлавін), мг/г	не знайдено	26,7±0,1	3,6±0,0
$B_{12}$ , мкг/г	0,12±0,002	0,9±0,0	0,27±0,0
А, мг/г	сліди	2,7±0,0	0,64±0,0
Каротиноїди, мг/г	сліди	29,5±0,1	2,1±0,0
С, мг/%	46,9±0,4	22,3±0,1	35,2±0,3

Як в субстраті, так і у дослідженому лікарському грибі *C. sinensis* виявлено 14 хімічних елементів (табл. 4), Міцуно [14] відзначив факт ідентифікування 20 елементів. Мінеральні речовини не мають енергетичної цінності, проте вони беруть активну участь у життєдіяльності людини, виконуючи регуляторну функцію у обміні речовин, входять до складу багатьох ферментів, є одним з основних матеріалів для побудови кісткової тканини.

Вміст більшості елементів дещо відрізняється у зразках субстрату, міцеліальної маси та культуральної рідини *C. sinensis*. У той же час кіль-



кість Ti, Cr, Mo, Bi та P знаходиться на одному рівні у всіх досліджених зразках. Найбільшу увагу привертають есенціальні мікроелементи Mn, Co, Cr, Mo, Cu, Zn, які мають важливе значення для людини. Адже дефіцит цих елементів призводить до виникнення клінічних симптомів.

Про нешкідливість досліджених нами зразків субстрату (CO<sub>2</sub>-шрот амаранту) та ентомофільного гриба свідчить відсутність небезпечних для організму людини іонів кадмію та ртуті.

Таблиця 4

Вміст хімічних елементів у субстраті, міцеліальній масі та культуральній рідині *C. sinensis*, мг/кг

Table 4

Chemical elements content in substrate, mycelium and culture broth of *C. sinensis*, mg/kg

Хімічний елемент	CO <sub>2</sub> -шрот амаранту	<i>C. sinensis</i>	
		Міцеліальна маса	Культуральна рідина
Cd	не знайдено	не знайдено	не знайдено
Pb	не знайдено	не знайдено	не знайдено
Mn	80	100	300
Co	10	1	3
Cr	2	2	3
Mo	2	<1	2
Cu	20	20	30
Zn	30	200	30
Ti	600	100	200
V	2	2	2
Bi	1	1	1
Ce	200	100	100
La	100	50	40
Ba	100	<10	<10
P	10000	10000	10000
Zr	60	50	50

Таким чином, отримані результати дослідження хімічного складу міцеліальної маси та культуральної рідини лікарського гриба *C. sinensis* дають змогу констатувати значну їх харчову та біологічну цінність. З по-



зиції безвідходної й екологічно чистої переробки вторинних матеріальних ресурсів отримані дані свідчать про ефективність використання шроту амаранту як субстрату для вирощування грибів.

Отже, наявність в складі лікарського гриба *C. sinensis* виявленого комплексу біологічно активних сполук (білків, ліпідів, вітамінів, мікроелементів) свідчить про можливість використання його міцеліальної маси та культуральної рідини для створення на їх основі харчових або дієтичних добавок, інгредієнтів функціональних продуктів.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Бухало А.С., Митропольская Н.Ю., Михайлова О.Б. Каталог колекції культур шапинкових грибів ІБК — К. : НВК «Славутич-дельфін», 2006. — 36 с.
2. ДСТУ ISO 5508-2001. Жири та олії тваринні й рослинні. Аналізуван-ня методом газової хроматографії метилових ефірів жирних кислот (ISO 5508:1990, IDT) — [Чинний від 2003-01-01]. — К. : Держспоживстандарт України, 2003. — 14 с. (Національний стандарт України).
3. Кейтс М. Техника липидологии. — М. : Мир, 1975. — 322 с.
4. Коденцова В.М. Выделение рибофлавинсвязывающего апобелка из белка куриных яиц и его использование для определения рибофлавина в биологических образцах. // Прикладная биохимия и микробиология. — 1994. — 30, № 4–5. — С. 603–609.
5. Методы экспериментальной микологии : Справочник / [под ред. В.И. Билай]. — К. : Наукова думка, 1982. — С. 583.
6. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. — М.: Колос, 1985. — 255 с.
7. Чудинов Э.Г. Атомно-эмиссионный анализ с индукционной плазмой. // Итоги науки и техники. — 1990. — 2. — С. 3–46.
8. Экспериментальная витаминология (под. ред. Ю.М. Островско-го— Минск: Наука и техника, 1979. — 549 с.
9. Crisan E.V. and Sands A. Nutritional value. In: The Biology and Cul-tivation of Edible Mushrooms. Chang ST and WA Hayes (eds.): Academic Press, New York, 1978. — P. 137–165.
10. Holiday J., Cleaver M. Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus Cordyceps (Fr.) Link. (Ascomycetes). A review // Int. J. Med. Mush. — 2008. — 10, № 3. — P. 219–234.
11. Hsu T.-H., Shiao L.H., Hsieh G., Chang D.-M. A comparison of the chemical composition and bioactive ingredients of the Chinese medicinal mushroom DongChongXiaCao, its counterfeit and mimic, and fermented mycelium of Cordyceps sinensis // Food chemistry. — 2002. — 78. — P. 463–469.



12. Liang C-H, Huang S-J, Tsai S-Y, Lee Yu-L, Kuo H-C et al. Preparation of novel culinary mushroom products using solid-state fermentation and their taste quality // Int. J. Med. Mush. — 2009. — 11, № 2. — P. 141–156.

13. Leung P.H., Zhao S., Ho K.P., Wu J.Y. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides from mucelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK 1 // Food chemistry. — 2009. — 114. — P. 1251–1256.

14. Mizuno T. Medicinal effect and utilization of *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes) and *Isaria* Fr. (Mitosporic Fungi) Chinese caterpillar fungi, «Tochukaso» (review) // Int. J. Med. Mush. — 1999. — P. 251–261.

15. Russel R., Paterson M. *Cordyceps*- a traditional Chinese medicine and another fungal thepaeutic biofactory? // Phytochemistry. — 2008. — 69. — P. 1469–1495.

16. Smirnov D.A., Babitskaya V.G., Puchkova T.A. et al. Some biologically active substances from a mycelium biomass of medicinal caterpillar fungus *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (Ascomycetes) // Int. J. Med. Mush. — 2009. — 11, № 1. — P. 69–76.

**T.A. Krupodiorova, V.Yu. Barshteyn, N.A. Bisko, T.S. Ivanova**

Institute of Food Biotechnology and Genomics, NASU, 2a, Osipovskogo str., Kyiv, 04123,  
Ukraine, tel.: +38 (044) 462 72 59,  
e-mail: yemets@list.ru

## **CONTENT OF MYCELIAL BIOMASS AND CULTURE LIQUID OF *CORDYCEPS SINENSIS* (BERK.) SACC. (ASCOMYCETES)**

### **Summary**

The myceliual biomass and culture liquid of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. were investigated. 17 amino acids with majority of 3 essential amino acids: **lysine, leucine, threonine were determinated. Generally lipids fraction of *C. sinensis* mycelial biomass contains 10 fatty acids and in culture liquid — 12. It was found out predomination of unsaturated fatty acids in mycelial biomass (77.82%) and culture liquid (74.34%) of *C. sinensis*. Mycelial biomass and culture liquid of *C. sinensis* had vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub>, A, C, carotenoids and 14 chemical elements.**

**Key words:** *Cordyceps sinensis*, mycelial biomass, culture liquid, amaranthseed meal.



**Т.А. Круподерова, В.Ю. Барштейн, Н.А. Бисько, Т.С. Иванова**

Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики  
Национальной академии наук Украины»,  
ул. Осиповского, 2а, Киев, 04123, Украина, тел.: +38 (044) 462 72 59,  
e-mail: yemets@list.ru

## **СОСТАВ МИЦЕЛИАЛЬНОЙ МАССЫ И КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *CORDYCEPS SINENSIS* (BERK.) SACC. (ASCOMYCETES)**

### **Реферат**

В мицелиальной массе и культуральной жидкости *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. идентифицированы 17 аминокислот с доминированием 3-х незаменимых: лизина, лейцина, треонина. Общая фракция липидов мицелиальной массы *C. sinensis* содержит 10 жирных кислот, а в культуральной жидкости — 12. Выявлено преобладание ненасыщенных жирных кислот в жирнокислотном составе мицелиальной массы (77,82%) и культуральной жидкости (74,34%) *C. sinensis*. В мицелиальной массе и культуральной жидкости *C. sinensis* установлено наличие витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>12</sub>, А, С, каротиноидов и 14 химических элементов.

Ключевые слова: *Cordyceps sinensis*, мицелиальная масса, культуральная жидкость, СО<sub>2</sub>-шрот амаранта.



**О.В. Чайка, О.В. Федотов**

Донецький національний університет,  
вул. Університетська, 24, Донецьк, 83000, Україна,  
тел.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: bio.graff@yandex.ua

## **РІСТ ТА ІНТЕНСИВНІСТЬ ПРОЦЕСІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ШТАМУ *PLEUROTUS OSTREATUS* P-107**

*Досліджено динаміку накопичення біомаси та вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), активних до тіобарбітурової кислоти, у міцелії та культуральному фільтраті штаму P-107 гливи *Pleurotus ostreatus*, що культивували на глюкозо-пептонному та стандартному синтетичному живильних середовищах. Встановлено, що більше накопичення біомаси та менша концентрація продуктів ПОЛ притаманні культурі, що росла на глюкозо-пептонному середовищі. На обох середовищах виявлені подібні закономірності динаміки вмісту продуктів ПОЛ.*

*Ключові слова: базидіоміцети, перекисне окиснення ліпідів, живильні середовища.*

Останнім часом швидко зростає інтерес до промислового грибівництва та біотехнологій отримання біологічно активних речовин (БАР) грибного походження. Ксилотрофний базидіоміцет глива звичайна *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kunt. займає одне з провідних місць у світі за загальною кількістю виробленої грибною продукції [5, 11]. Культури *P. ostreatus* здатні рости на доступних та малоцінних субстратах, виявляють стійкість до шкідників і хвороб тощо [3, 5, 11]. Встановлено, що цей гриб має високу біологічну цінність і лікувально-профілактичні властивості та є продуцентом різноманітних біологічно активних речовин. Багато з них виявляють фармакологічну активність та мають антиоксидантну, антивірусну, протипухлинну, антифунгальну, радіопротекторну і імуномодельовальну лікарську дію [1, 4, 11, 12]. Порівняно з продуктами хімічного синтезу препарати з гливи звичайної є менш токсичними і ефективнішими при застосуванні у медичній практиці [1, 9, 12].

Найголовнішою умовою належного росту, функціонування та біосинтетичної активності живих організмів є сталість внутрішнього середовища — гомеостаз. Його складовою частиною є динамічна рівновага між активацією та інгібуванням процесів вільнорадикального окиснення,



зокрема, перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Отже, ПОЛ є необхідним метаболічним процесом, що підтримується на стабільному рівні завдяки жорсткому контролю багаторівневого антиоксидантного захисту [2, 13]. Окрім того, гриби, зокрема ксилотрофні макроміцети, мають здатність до ініціювання реакцій ПОЛ, які спрямовані на вільнорадикальне розкладання лігніну і інших феноловмісних речовин, що має суттєве адаптаційне та екологічне значення [8].

Порушення рівноваги у системі окиснення-антиокиснення та активізація процесів ПОЛ має суттєве значення за багатьох станів і процесів, розвитку і наслідків дії на організм різноманітних факторів довкілля [2, 13, 14].

Таким чином, дані про вміст продуктів ПОЛ у біологічному матеріалі можуть надати інформацію про стан життєдіяльності об'єкта. Як кількісні маркери інтенсивності ПОЛ найчастіше використовується один з його кінцевих продуктів — малоновий діальдегід (МДА).

Метою роботи було вивчення росту та інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів штаму *Pleurotus ostreatus* P-107 (Jacq.: Fr.) Kunt.

### Матеріали і методи

Об'єкт дослідження — штам *Pleurotus ostreatus* P-107, виділений з дикоростучих плодових тіл, зібраних в НПП «Святі Гори» та депонований у колекції культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України.

Інтродукований штам P-107, що має порівняно високі ростові та біосинтетичні характеристики, культивували при температурі 27,5 °С в колбах Ерленмейера ємністю 250 мл на глюкозо-пептонному (ГПС) та стандартному синтетичному (СС) живильних середовищах об'ємом 50 мл. Живильні середовища мали такий склад (г/л): ГПС — глюкоза — 10,0; пептон — 3,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,6;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,4;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,5;  $\text{CaCl}_2$  — 0,05;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,001; СС — глюкоза — 10;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 2,3;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,5;  $\text{CaCl}_2$  — 0,1;  $\text{FeSO}_4$  — 0,02;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  — 0,02;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,02 [3]. Інокулюмом був вегетативний міцелій штаму P-107 розміром 5×5 мм, який ріс 7–10 діб на 4° за Баллінгом сусло-агарі. Термін культивування — 15 діб. Матеріалами для досліджень слугували гомогенізований міцелій (МГ) та культуральний фільтрат (КФ). Для одержання гомогенату міцелію температуру зразка доводили до  $5 \pm 1$  °С. Міцелій відділяли від культуральної рідини шляхом фільтрування через фільтрувальний папір. Отриманий міцелій додатково промивали у дистильованій воді та підсушували на фільтрувальному папері і охолоджували до  $0 \pm 1$  °С. Підготовлений міцелій гомогенізували шляхом розтирання у ступці. Осад відділяли центрифугуванням на рефрижераторній центрифугі при  $5 \pm 1$  °С, відцентровому прискоренні 2000 g протягом 15 хвилин. Дослідження провадили на 6-ту, 9-ту, 12-ту та 15-ту





добу культивування штаму Р-107. Вони включали визначення вмісту продуктів ПОЛ [7], сирої та сухої біомаси міцелію ваговим методом; рН культурального фільтрату потенціометричним методом на рН-метрі 150 МИ; вміст білка на спектрофотометрі СФ-26 за методом Варбурга—Христіана [6]. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів у міцелії та культуральному фільтраті визначали за вмістом продуктів ПОЛ, активних до тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП), з використанням модифікованого методу [7]. В основі методу лежить реакція між малоновим дільдегідом (МДА) і тіобарбітуровою кислотою (ТБК), що веде до утворення забарвленого триметинового комплексу з максимумом поглинання при 535 нм.

Досліди проводили у трикратній повторності. Отримані експериментальні дані обробляли з використанням програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів. Достовірною вважалася різниця при показнику достовірності  $P > 0,95$  [10].

### Результати та їх обговорення

Одним із показників придатності живильного середовища до культивування штамів базидіоміцетів є накопичення біомаси міцелію. Проведені дослідження показали (рис. 1), що під час культивування штаму Р-107 на ГПС спостерігалася стрімке накопичення біомаси протягом усього періоду культивування, яке досягло на 15-ту добу максимальних значень 142,48 г/л, що складає 3,28 г/л у перерахунку на суху біомасу.

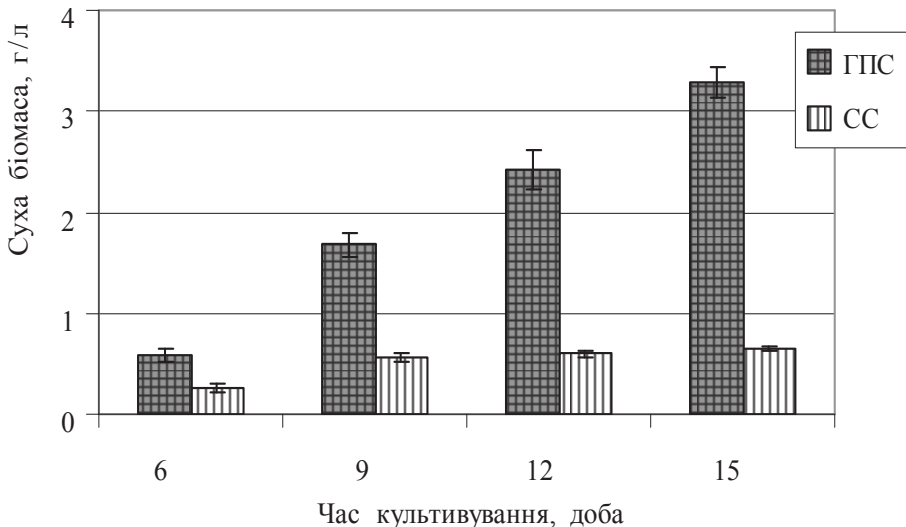


Рис. 1. Накопичення біомаси штамом Р-107 на ГПС та СС

Fig. 1. Accumulation of biomass by strain P-107 on GPM and SM

Спостерігали і культурально-морфологічні відмінності міцелію на застосованих середовищах: міцелій на СС, у порівнянні з ГПС, був менш щільний та переважно занурений у культуральну рідину. Гальмування росту штаму на СС, вірогідно, пояснюється зниженням концентрації необхідних для росту компонентів середовища, в тому числі і сполук Нітрогену, накопиченням продуктів обміну та, як наслідок, обмеженістю поживних речовин в клітинах штаму.

Стосовно зміни рН КФ можна зазначити, що водневий показник обох живильних середовищ протягом терміну культивування поступово знижувався. На ГПС, вихідне рН якого дорівнювало 6,49 од., водневий показник знизився до 5,05 од. на 15-ту добу культивування, причому більш інтенсивно це відбувалося на 12–15-ту добу культивування. На СС було відмічене поступове зниження рН з початкового рівня 4,45 од. до 3,25 од. на 15-ту добу росту. Це, ймовірно, пов'язано з біосинтетичними властивостями штаму Р-107 – синтезом метаболітів кислоти природи та зміною складу середовища.

Аналіз динаміки вмісту білка у культуральній рідині показав, що ( $p \leq 0,05$ ) при культивуванні штаму Р-107 на ГПС вміст білка з початкового рівня 1,43 мг/мл незначно зменшився до 1,11 мг/мл на 12-ту добу з подальшим підвищенням до рівня 1,49 мг/мл на 15-ту добу. Це, ймовірно, пояснюється тим, що на початку культивування процеси синтезу екзоферментів та розкладу білкових речовин у КФ врівноважені. Також треба врахувати, що низький рівень накопичення біомаси на початку культивування обумовлює незначний синтез цих ферментів. Подальше культивування веде до зміщення рівноваги на користь розкладу білка. На 15-ту добу, ймовірно, на фоні виникнення дефіциту поживних речовин, відбувається посилення синтезу екзоферментів, що призводить до підвищення вмісту білка у КФ наприкінці культивування. У складі синтетичного живильного середовища білкові сполуки відсутні. Під час культивування штаму Р-107 на СС, концентрація білку з нульового рівня на початку культивування поступово збільшувалася до 0,07 мг/мл на 12-ту добу, що становило максимум, і незначно знижувалася наприкінці ферментації до 0,05 мг/мл. Ця динаміка пов'язана, можливо, із синтезом позаклітинних ферментів, що забезпечують процеси живлення.

Аналіз даних інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів у міцелії досліджуваного штаму Р-107 (рис. 2) дозволяє зазначити, що вміст продуктів ПОЛ виявився значно вищим у тих зразках, що зростали на синтетичному живильному середовищі, однак можна відмітити подібність у динаміці вмісту малонового діальдегіду в міцелії на обох середовищах. Рівень ПОЛ на початок росту культури не визначали, оскільки кількість інокулюму є недостатньою для проведення дослідів.



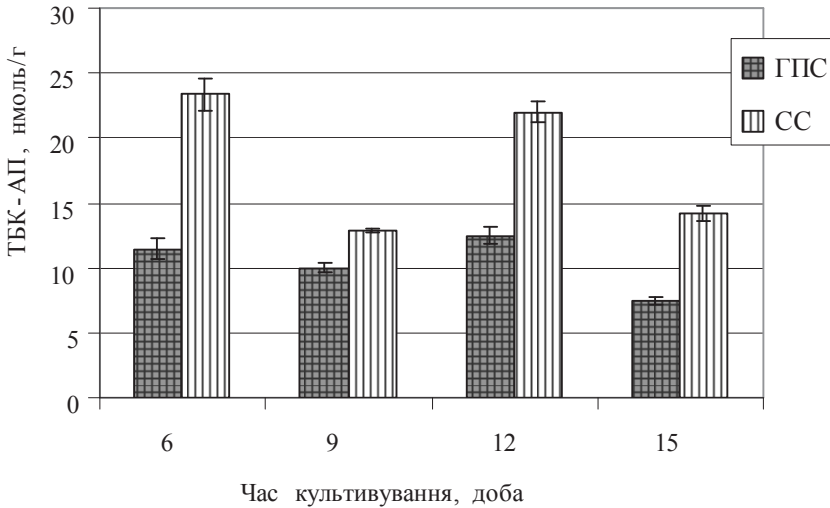


Рис. 2. Вміст ТБК-АП у міцелії штаму P-107 під час культивування на ГПС та СС

Fig. 2. Content of TBARS in strain P-107 mycelium during cultivation on GPM and SM

Вміст ТБК-АП у міцелії досліджуваного штаму *P. ostreatus* P-107, що ріс на ГПС, мав два максимуми на 6-ту та 12-ту добу культивування — 11,5 та 12,5 нмоль/г, відповідно. Мінімальний вміст ТБК-АП зафіксовано на 15-ту добу — 7,5 нмоль/г.

При культивуванні штаму P-107 на СС, як і на ГПС, найбільший вміст ТБК-АП у міцелії спостерігався на 6-ту і 12-ту добу росту. На 6-ту добу він становив 23,4 нмоль/г, а на 12-ту — 22,0 нмоль/г. Найнижчі показники інтенсивності ПОЛ були відмічені на 9-ту та 15-ту добу (12,9 та 14,2 нмоль/г, відповідно). Отже, на обох живильних середовищах були відмічені два максимуми рівня вмісту продуктів ПОЛ у міцелії — на 6-ту та 12-ту добу ферментації. Виходячи з рис. 2, 9-та та 15-та доба за вмістом ТБК-АП не мають достовірних розбіжностей для СС. Теж саме спостерігається і у випадку для ГПС для значень 6-тої, 9-тої і 12-тої доби. Це пояснюється тим, що на відміну від ГПС, СС містить солі феруму (II) і марганцю (II). По мірі їх надходження до клітин гриба збільшується швидкість утворення гідроксильних радикалів та інших активних форм кисню, тобто інтенсивність процесів ПОЛ.

Дереворуйнівні міцеліальні гриби, що викликають білу гниль деревини, є основними деструкторами лігніну в природі. Для руйнування цього полімеру, лігнотрофи утворюють декілька типів вільних радикалів, завдяки чому запускається ланцюг спонтанних деградаційних реакцій [8].

Вміст продуктів ПОЛ у КФ (рис. 3) більше як у два рази нижчий, ніж у міцелії. Як видно з графіку, максимальні значення вмісту продуктів ПОЛ в КФ на обох середовищах набувають на початку культивування

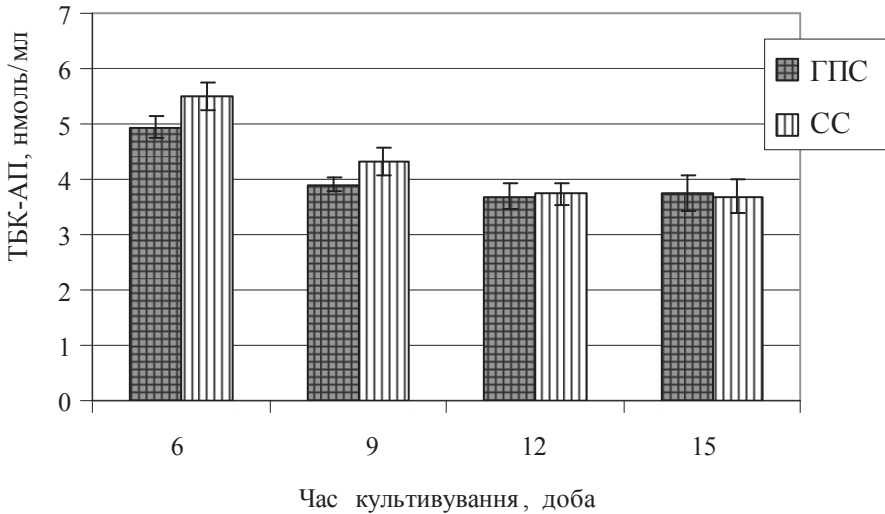


Рис. 3. Вміст ТБК-АП у культуральному фільтраті штаму P-107 під час культивування на ГПС та СС

Fig. 3. Content of TBARS in strain P-107 culture broth during cultivation on GPM and SM

(4,9 нмоль/мл в ГПС та 5,5 нмоль/мл у СС). На 15-ту добу ферментації ці показники склали 3,8 нмоль/мл (ГПС) та 3,7 нмоль/мл (СС). Очевидна подібність динаміки вмісту ТБК-АП у КФ досліджуваного штаму при культивуванні на обох середовищах, яка полягає у віковому збігу максимумів активності процесів ПОЛ дослідженої культури *P. ostreatus*. Незважаючи на те, що використані живильні середовища не містять лігніну, у досліді доведена здатність штаму P-107 до ініціювання реакцій ПОЛ у зовнішньому середовищі.

Таким чином, при вирощуванні штаму P-107 на глюкозо-пептонному середовищі спостерігається більше, ніж на синтетичному середовищі, накопичення біомаси та значно нижчий рівень вмісту продуктів ПОЛ у міцелії і КФ. Максимальна активність процесів ПОЛ у міцелії на обох живильних середовищах зафіксована на 6-ту та 12-ту добу, а у культуральній рідині — на 6-ту добу росту. Протягом культивування на обох середовищах відбувається поступове збільшення кислотності середовища. Динаміка концентрації білка у КФ має індивідуальні особливості при ферментації на ГПС і СС через відмінності в їх початковому складі. Отже, склад живильного середовища впливає не лише на накопичення біомаси, а й на такий важливий інтегральний показник стану функціонування штаму P-107 *P. ostreatus*, як інтенсивність процесів ПОЛ, що може виконувати роль тригера в механізмах стресу та адаптації.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Гвоздиков Т.С. Новые биологически активные добавки на основе глубинного мицелия базидиальных грибов // Успехи медицинской микологии. — 2006. — Т. 7. — С. 178—180.
2. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи современной биологии. — 1991. — Т. 111, Вып. 6. — С. 923—932.
3. Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П., Дудка И.А., Кулеш М.Д., Соломко Э.Ф., Шевченко С.В. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. — К.: Наук. думка, 1983. — 311 с.
4. Бисько Н.А., Митропольская Н.Ю., Соломко Э.Ф. Лекарственные грибы для здоровья и красоты. — К.: Наук. думка, 2003. — 40 с.
5. Бухало А.С., Бисько Н.А., Соломко Э.Ф., Билай В.Т., Митропольская Н.Ю., Поединок Н.Л., Гродзинская А.А., Михайлова О.Б. Культивирование съедобных и лекарственных грибов. Практические рекомендации. — К.: Чернобыльинтеринфом, 2004. — 120 с.
6. Дарбре А. Практическая химия белка. — М.: Мир, 1989. — 623 с.
7. Дослідження пероксидної окисації ліпідів та антиоксидантного захисту організму в клінічній практиці (методичні рекомендації) / Б.В. Качоровський, В.Л. Новак, В.П. Руденко, М.Ю. Аношина, О.В. Стасишин, А.Б. Новосад. — Львів, 2002. — 20 с.
8. Капич А.Н. Процессы перекисного окисления липидов у грибов (биотехнологические аспекты) // Проблемы микробиологии и биотехнологии — Минск, 1998. — С. 185—188.
9. Петров П.Т., Скрипко А.Д., Литвинова К.В., Дедюшко Н.А., Гриневич Л.Н. Новые лекарственные средства на основе биологически активных соединений мицелиальных грибов // Успехи медицинской микологии. — 2006. — Т. 7. — С. 198—199.
10. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. — Донецьк: Кассиопея, 1999. — 210 с.
11. Соломко Э.Ф. Химический состав и пищевая ценность вешенки // Съедобный гриб вешенка: мицелий, субстрат, выращивание. — К., 2001. — С. 35.
12. Gunde-Cimerman N. Medicinal value of the genus *Pleurotus* // International Journal of Medicinal Mushrooms. — 1999. — P. 69—80.
13. McCord J.M. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress // Am J Med. — 2000. — Vol. 108. — P. 652—659.
14. Thom S., Elbukem M. Oxygen-Dependent Antagonism of Lipid Peroxidation // Free Radical Biol Med. — 1991. — Vol. 10. — P. 413—426.



**А.В. Чайка, О.В. Федотов**

Донецкий национальный университет,  
ул. Университетская, 24, Донецк, 83000, Украина,  
тел.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: bio.graff@yandex.ua

## **РОСТ И ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ШТАММА *PLEUROTUS OSTREATUS* P-107**

### **Реферат**

Исследована динамика накопления биомассы и содержания продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), активных к тиобарбитуровой кислоте, в мицелии и культуральном фильтрате штамма вешенки *Pleurotus ostreatus* P-107, который культивировали на глюкозо-пептонной и стандартной синтетической питательных средах. Установлено, что большее накопление биомассы и меньшая концентрация продуктов ПОЛ присуща культуре, растущей на глюкозо-пептонной среде. На обеих средах обнаружены подобные закономерности динамики содержания продуктов ПОЛ.

Ключевые слова: базидиомицеты, перекисное окисление липидов, питательные среды.

**O.V. Chaika, O.V. Fedotov**

Donetsk National University,  
24, University Str., Donetsk, 83000, Ukraine,  
tel.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: bio.graff@yandex.ua

## **GROWTH AND INTENSITY OF LIPID PEROXIDATION PROCESSES OF *PLEUROTUS OSTREATUS* P-107 STRAIN**

### **Summary**

The dynamics of biomass accumulation intensity and maintenance of lipid peroxidation products – the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), in the mycelium and culture filtrate (CF) of strain Oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* P-107, cultivated on glucose-peptone (GPM) and standard synthetic (SM) nutrient media were studied. It was established that higher accumulation of biomass and lower concentration of LPO products are inherent for strain growing on glucose-peptone medium. The conformity of the dynamics of LPO products maintenance changes during cultivation on both media was revealed.

Key words: basidiomycetes, lipid peroxidation, nutrient media.



**В.Ю. Барштейн**

Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики  
НАН Украины», ул. Осиповского, 2а, Киев, 04123, Украина,  
тел.: +38(044) 462 72 59, e-mail: ihtbar@ Rambler.ru

## **ПЕРВЫЕ ШАГИ ВИРУСОЛОГИИ В ПАМЯТНИКАХ ФИЛАТЕЛИИ И НУМИЗМАТИКИ**

*Статья посвящена первым шагам вирусологии — открытию возбудителей: мозаичной болезни табака, ящура, желтой лихорадки, бешенства, натуральной оспы, полиомиелита, саркомы Рауса. Рассказ проиллюстрирован произведениями филателии и нумизматики разных стран: СССР, ФРГ, Нидерландов, США, Румынии, Португалии, Гвинейской Республики, Украины и ООН.*

*Ключевые слова: история вирусологии, филателистическая продукция, памятная медаль.*

В статье [1], рассказавшей о некоторых событиях из истории микробиологии и проиллюстрированной произведениями медальерного искусства, был и короткий рассказ о выдающемся русском физиологе растений и микробиологе Дмитрие Иосифовиче Ивановском, который в 1892 г. впервые открыл существование вируса (как нового типа возбудителя болезней), называемого им то «фильтрующимися» бактериями, то микроорганизмами.

К столетию со дня рождения Д.И. Ивановского в 1964 г. почта СССР выпустила марку (достоинство — 4 коп., цвет — серо-коричневая, сине-серая, художник — С. Соколов). На марке (рис. 1) изображен портрет ученого и его факсимиле. Слева, вертикально надпись: «ПЕРВООТКРЫВАТЕЛЬ ВИРУСОВ». В левом нижнем углу — колба с бактериальным фильтром. Фильтр больше напоминает воронку Бюхнера с впаянной пластинкой из мелкопористого стекла, хотя должен быть изображен фильтр Шамберлана. В правом нижнем углу — годы жизни Ивановского: «1864—1920».

Тот же метод фильтрации, которым Ивановский открыл возбудитель мозаичной болезни табака, использовали немецкие бактериологи и вирусологи: один из основоположников медицинской микробиологии, Фридрих Август Иоганн Леффлер (нем. *Friedrich August Johannes Loeffler*, 1852—1915) и Пауль Фрош (нем. *Paul Frosch*, 1860—1928), когда установили в 1898 г. фильтруемость возбудителя ящура (*Aphthae epizooticae*), страшной болезни животных. Возбудитель ящура относится к семейству *Picornaviridae* и является одним из наиболее мелких РНК-содержащих вирусов.







Рис. 1. Д.И. Ивановский. Почтовая марка (СССР)

Fig. 1. D.I. Ivanovsky. Postage stamp (USSR)

Фридрих Леффлер открыл также, совместно с соавторами, возбудителей: дифтерии (*Corynebacterium diphtheriae*), лошадиного сапа (*Pseudomonas mallei*), мышиного тифа (*Salmonella typhimurium*) и т.д. [2].

Портрет ученого украшает немецкую марку (рис. 2) достоинством в 85 центов, выпущенную в 2010 г. в ознаменование 100-летия Института им. Фридриха Леффлера (нем. *Friedrich-Loeffler-Institut*), национального исследовательского ветеринарного центра Германии, основанного Леффлером и получившим его имя в 1952 г. Упомянутый портрет расположен в левой стороне марки, справа — микроскоп на фоне изображения вируса, в центре — модель вируса (в разрезе).

В 1898 г. опыты Д.И. Ивановского воспроизвел нидерландский микробиолог и ботаник, член-корреспондент и почетный член Российской академии наук Мартин Виллем Бейеринк (нидерл. *Martinus Willem Beijerinck*, 1851—1931). Он назвал микроорганизмы, открытые Ивановским «фильтрующимися вирусами». Со временем данную группу микроорганизмов стали называть вирусами.

Заслуги Бейеринка, которого некоторые считают основателем вирусологии, перед микробиологической наукой трудно переоценить. Он стал, среди прочего, первооткрывателем симбиотических азотфиксаторов (1888), свободноживущих аэробных азотфиксаторов (1901), сульфатредуцирующих бактерий, наряду с С.Н. Виноградским [1], стал одним из основателей почвенной и экологической микробиологии [2].



Рис. 2. Фридрих Леффлер. Почтовая марка (ФРГ)

Fig. 2. Friedrich Loeffler. Postage stamp (Germany)

Нидерландская королевская академия наук (нидерл. *Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, KNAW*) учредила в 1965 г. премию имени Мартина Виллема Бейеринка по вирусологии, которая вручается каждые два года за выдающиеся достижения в этой области знаний [3]. Помимо денежного вознаграждения в 35000 евро награжденный получает золотую медаль, в центре аверса которой расположен рельефный, погрудный, профильный, повернутый вправо портрет Бейеринка (рис. 3). По краю медального поля, по кругу надпись на латыни: «*MARTINUS WILLEM BEIJERINCK EGREGIUS VIROLOGIÆ CONDITOR*» (МАРТИН ВИЛЛЕМ БЕЙЕРИНК БЛИСТАТЕЛЬНЫЙ ОСНОВОПОЛОЖНИК ВИРУСОЛОГИИ).

Утонченный растительный орнамент по краю медального поля реверса (рис. 4) оставляет центральную часть его для посвящения награжденному.

Увлекательные страницы истории борьбы с желтой лихорадкой [4] можно было бы проиллюстрировать дюжиной прекрасных памятных медалей. Вирусная природа желтой лихорадки, первого обнаруженного вирусного заболевания человека, была доказана Уолтером Ридом (англ. *Walter Reed*, 1851–1902) и Джеймсом Кэрроллом (англ. *James Carroll*, 1854–1907) в 1901–1902 гг., после того, как при подкожном введении трем добровольцам профильтрованной сыворотки больных у двух из них возникло заболевание. Заболевание вызывается вирусом из семейства *Flaviviridae*.

Американская медаль (44 мм, бронза, Medallie Art Co. N.Y., США, 1971), посвященная Уолтеру Риду, создана *A. Belskie* (в серии медалей в честь выдающихся деятелей медицины всех веков и народов).



Рис. 3. Мартин Виллем Бейеринк.  
Медаль, аверс (Нидерланды)

Fig. 3. Martinus Willem Beijerinck.  
Medal, obverse (Netherlands)



Рис. 4. Мартин Виллем Бейеринк.  
Медаль, реверс (Нидерланды)

Fig. 4. Martinus Willem Beijerinck.  
Medal, reverse (Netherlands)

Высокорельефный, полупогрудный, профильный, повернутый на ≠ вправо портрет врача на фоне канала, растущих на берегу пальм, занимает центральную часть аверса медали (рис. 5). Справа от портрета — рельефное изображение москита *Aedes aegypti*, переносчика желтой лихорадки, на фоне вирусной частицы. Выше — горизонтальная надпись в две строки, годы жизни Уолтера Рида: «1851 / 1902». По краю медального поля, по кругу, надпись на английском языке, сверху: «WALTER REED», снизу: «CONQUEST OF YELLOW FEVER» (ПОБЕДА НАД ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКОЙ).

Реверс медали (рис. 6) занимает высококорельефная композиция: двое полуобнаженных землекопов, продираясь сквозь джунгли, копают канал. Над изображением, по краю медального поля, по кругу сверху и справа надпись на английском языке: «PANAMA CANAL» (ПАНАМСКИЙ КАНАЛ).



Рис. 5. У. Рид. Медаль, аверс (США)  
Fig. 5. W. Reed. Medal,  
obverse (USA)



Рис. 6. У. Рид. Медаль, реверс (США)  
Fig. 6. W. Reed. Medal,  
reverse (USA)

Борьбу с бешенством Луи Пастер [1] начал еще до открытия возбудителя этого вирусного заболевания.

Румынский врач, биолог и один из первых микробиологов Виктор Бабеш (рум. *Victor Babeș*, 1854–1926) и итальянский патолог и микробиолог Адельчи Негри (итал. *Adelchi Negri*, 1876–1912) обнаружили (1898–1903) в нейронах головного мозга заражённых бешенством внутриклеточные включения (тельца Бабеша–Негри) [5]. Вирусную природу бешенства доказал в 1903 г. французский врач Поль Ремленже (фр. *Paul Remlinger*, 1871–1964).

Бабеш внес весомый вклад в изучение бешенства, лепры, дифтерии, туберкулеза и других инфекционных заболеваний. Он описал в 1888 г. *Babesia* — род протозоа отряда пироплазмид класса споровиков, возбудителя Техасской лихорадки крупного рогатого скота.

Портрет Виктора Бабеша, рельефный, головной, профильный, повернутый влево, поместил скульптор *I. Jalea* в центр аверса румынской медали (68 мм, бронза, 1962), выпущенной к открытию III<sup>го</sup> Международного конгресса по инфекционной патологии (рис. 7). По краю медального поля, по кругу, слева, сверху и справа надпись: «PROFESORUL DR VICTOR BABEȘ» (ПРОФЕССОР Д-Р ВИКТОР БАБЕШ), снизу — годы жизни ученого: «1854–1926».



Рис. 7. В. Бабеш. Медаль, аверс (Румыния)

Fig. 7. V. Babeș. Medal, obverse (Romania)

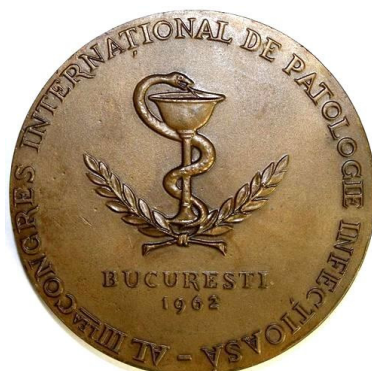


Рис. 8. В. Бабеш. Медаль, реверс (Румыния)

Fig. 8. V. Babeș. Medal, reverse (Romania)

Лаконичным и традиционным сделал скульптор реверс медали (рис. 8). В центре — медицинская эмблема (чаша со змеей), под которой — скрещенные лавровые ветки. Ниже — горизонтальная надпись в две строки: «BUCURESTI / 1968» (БУХАРЕСТ / 1962). По краю медального поля, по кругу надпись: «AL III<sup>LEA</sup> CONGRES INTERNAȚIONAL DE PATOLOGIE INFECȚIOASĂ» (III<sup>ий</sup> МЕЖДУНАРОДНЫЙ КОНГРЕСС



ПО ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ). Все надписи на медали — на румынском языке.

Тысячи и тысячи людей погибли на протяжении столетий от натуральной оспы (лат. *Variola, Variola vera*) или, как её ещё называли ранее, чёрной оспы — высококонтагиозной вирусной инфекции.

Несмотря на то, что английский врач Эдвард Дженнер (англ. *Edward Jenner, 1749—1823*) разработал вакцину против оспы (вообще — первую вакцину) и 14 мая 1796 г. впервые ввел восьмилетнему мальчику Джеймсу Фипсу неопасный вирус коровьей оспы, возбудитель этого страшного заболевания был открыт только в 1906 г. немецким бактериологом Энрике Пашеном (нем. *Enrique Paschen, 1860—1936*). Пашен — автор многочисленных работ по натуральной оспе и оспенной вакцинации.

Искоренению натуральной оспы, в осуществление которой внесли свой вклад и Энрике Пашен, и, особенно, Эдвард Дженнер, посвящены две марки (рис. 9, 10), выпущенные 31.03.1978 г. почтовой администрацией Организации Объединённых Наций для офиса ООН в Женеве (в швейцарских франках — 0,8 и 1,1).



Рис. 9. Искоренение натуральной оспы, Почтовая марка (ООН)

Fig. 9. Eradication of Smallpox. Postage stamp (UN)



Рис. 10. Искоренение натуральной оспы. Почтовая марка (ООН)

Fig. 10. Eradication of Smallpox. Postage stamp (UN)

На марках на желтом (рис. 9) и зеленом (рис. 10) фоне изображены как бы два полушария. Слева — изображение восточного полушария: Африка, часть Европы и часть Азии, континенты, наиболее страдавшие от смертельной болезни. Справа, вместо континентов, возбудитель натуральной оспы.

1908—1909 гг. ознаменовались выделением вируса полиомиелита — детского спинномозгового паралича, острого высококонтагиозного инфекционного заболевания. Методом заражения обезьян растертым мозгом умершего от полиомиелита ребенка это удалось сделать австрийцам:

выдающемуся врачу, химику, иммунологу и инфекционисту Карлу Ландштейнеру (нем. *Karl Landsteiner*, 1868—1943) и врачу Эрвину Попперу (нем. *Erwin Popper*, 1879—1955).

Почтовая продукция Австрии, Румынии, бывшей ГДР, банкнота Австрии номиналом 1000 австрийских шиллингов (введена в обращение 20 октября 1997), множество памятных медалей посвящены Карлу Ландштейнеру. Связано это не с вышеупомянутым открытием, а с открытием групп крови человека, за которое Ландштайнер был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине (1930).

Именно этому событию посвящена медаль (80 мм, бронза, Монетный двор Португалии, последняя треть XX века) которую создал известный португальский скульптор *Cabral Antunes*.

Центральную часть медального поля аверса (рис. 11) медали занимает рельефный, погрудный, почти анфас портрет ученого. Слева и сверху, по краю медального поля, по кругу надпись: «KARL LANDSTEINER» (КАРЛ ЛАНДШТАЙНЕР). Справа от портрета, горизонтально, в две строки — годы рождения и смерти ученого: «1868/1943».

В верхней части реверса (рис. 12), по краю медального поля, по кругу надпись: «PRÊMIO NOBEL DA MEDICINA» (НОБЕЛЕВСКАЯ ПРЕМИЯ ПО МЕДИЦИНЕ). Ниже, горизонтально — год присуждения премии: «1930». В нижней части медального поля реверса — надпись на португальском языке в три строки: «PELA DESCOBERTA DOS GRUPOS SANGUINEOS DA ESPÉCIE HUMANA» (ЗА ОТКРЫТИЕ ГРУПП КРОВИ ЧЕЛОВЕКА). В центральной части реверса, на пластине, приподнятой над поверхностью реверса, таблица, иллюстрирующая открытие Ландштайнера.

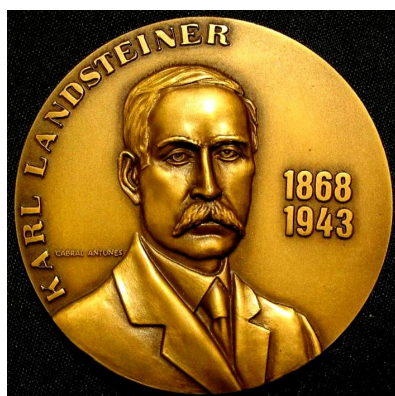


Рис. 11. Карл Ландштейнер. Медаль, аверс (Португалия)

Fig. 11. Karl Landsteiner. Medal, obverse (Portugal)



Рис. 12. Карл Ландштейнер. Медаль, реверс (Португалия)

Fig. 12. Karl Landsteiner. Medal, reverse (Portugal)



В мае 2005 г. 58-я сессия Всемирной организации здравоохранения в Женеве приняла решение 14 июня (день рождения Карла Ланштейнера), ежегодно проводить Всемирный день донора крови.

55 лет пришлось ждать Нобелевской премии по физиологии и медицине (1966) «за открытие онкогенных вирусов» американскому патологу Фрэнсису Пейтону Раусу (англ. *Francis Peyton Rous*, 1879–1970). Раус еще в 1911 г. доказал вирусную природу рака — саркомы Рауса.

В 2008 г. почтовое ведомство Гвинейской Республики (фр. *République de Guinée*) — государства в Западной Африке, выпустило почтовый блок, посвященный Нобелевским лауреатам по физиологии и медицине разных лет. Блок состоит из 6 марок (рис. 13). На верхней правой марке изображен Фрэнсис Пейтон Раус в молодые и зрелые годы. Кроме него, на марках изображены: итальянский врач и ученый (Нобелевская премия (НП) 1906 г.) Камилло Гольджи (итал. *Camillo Golgi*, 1843–1926), американский биолог (НП 1933 г.) Томас Хант Морган (англ. *Thomas Hunt Morgan*, 1866–1945), швейцарско-американский биохимик (НП 1992 г.) Эдмонд Фишер (англ. *Edmond H. Fischer*, род. 1920), шведский фармаколог (НП 2000 г.) Арвид Карлссон (швед. *Arovid Carlsson*, род. 1923), американский молекулярный генетик (НП 2006 г.) Эндрю Захари Файер (англ. *Andrew Z. Fire*, род. 1959). Еще четыре выдающихся ученых изображены на блоке вокруг марок: американский цитогенетик (НП 1983 г.) Барбара Мак-Клинток (англ. *Barbara McClintock*, 1902–1992), шотландский бактериолог (НП 1945 г.) Александр Флеминг (англ. *Sir Alexander Fleming*, 1881–1955), американский физик, биофизик и физиолог (НП 1961 г.) Дьёрдь фон Бекеши (венг. *Békésy György*; нем. *Georg von Békésy*, 1899–1972), британский молекулярный биолог, врач и нейробиолог (НП 1962 г.) Фрэнсис Крик (англ. *Francis Crick*, 1916–2004).



Рис. 13. Фрэнсис Пейтон Раус. Лауреаты Нобелевской премии по физиологии и медицине. Почтовый блок (Гвинейская Республика)

Fig. 13. Francis Peyton Rous. Nobel laureates in the field of physiology and medicine. Miniature sheet (Republic of Guinea)



Наш рассказ был бы не полным без упоминания об еще одном ученом. В 2009 г. Укрпочта выпустила (к 150-летию со дня рождения) художественный маркированный конверт (ХМК), посвященный выдающемуся уроженцу Одессы, врачу, микробиологу и эпидемиологу, почётному члену АН СССР (1940), академику АМН СССР (1945), Лауреату Государственной премии СССР (1943) Николаю Фёдоровичу Гамалею (1859–1949). На конверте воспроизведен портрет ученого в молодые годы. Марки проштампованы специальным штемпелем, в центре которого — микроскоп (рис. 14).



Рис. 14. Николай Фёдорович Гамалея. ХМК (Украина)

Fig. 14. Nikolay Fyodorovich Gamaleia. FDC (Ukraine)

Заслуги Гамалеи перед наукой настолько велики, что мы можем упомянуть только ряд из них. Совместно с И.И. Мечниковым и Я.Ю. Бардахом, при содействии Луи Пастера, Н.Ф. Гамалея участвовал в создании в Одессе в 1886 г. первой в России (и второй в мире) бактериологической станции и впервые в России осуществил вакцинацию людей против бешенства. За первые 3 года деятельности станции были сделаны прививки приблизительно 1500 человек, что в четыре раза снизило смертность от бешенства. С 1899 по 1908 г. Гамалея был директором основанного им Бактериологического института в Одессе. С 1912 по 1928 г. он руководил Петербургским (Петроградским) оспопрививательным институтом имени Дженнера. С 1930 по 1938 г. Н.Ф. Гамалея — научный руководитель Центрального института эпидемиологии и микробиологии в Москве (в настоящее время носит его имя). Деятельность ученого была посвящена борьбе с чумой в Одессе, холерой на юге России, профилактике тифов, холеры, чумы, оспы и других инфекционных заболеваний.

Возвращаясь к теме нашей статьи, упомянем о большом теоретическом и практическом значении работ Н.Ф. Гамалеи по изучению фильтрующихся вирусов. Это и обнаружение того, что чума крупного рогатого скота вызывается ими, доказательство того, что возбудителем инфекционной анемии лошадей является вирус и т.д. Ещё в 1898 году Гамалея впервые наблюдал явление лизиса бактерий (сибиреязвенной палочки).

С образом Николая Федоровича Гамалеи связаны три медали (СССР). Две из них посвящены институту, в котором он работал в последние годы жизни и который носит его имя. Третья — выпущена в честь 125-летия со дня рождения ученого (бронза, 60 мм, Ленинградский монетный двор, 1987) [6].



Рис. 15. Н.Ф. Гамалея. Медаль, аверс (СССР)

Fig. 15. N.F. Gamaleia. Medal, obverse (USSR)



Рис. 16. Н.Ф. Гамалея. Медаль, реверс (СССР)

Fig. 16. N.F. Gamaleia. Medal, reverse (USSR)

Оригинальный портрет ученого (каким он был в последние годы жизни) выполнен скульптором Марианной Романовской в несколько стилизованной манере, с обостренными линиями, которые подчеркивают остроту ума, деловитость, бескомпромиссность исследователя. Полупогрудный, профильный, повернутый на  $\neq$  влево портрет ученого в очках и тубетейке, которую он носил много лет, занимает почти все медальное поле аверса (рис. 15). Слева, по краю медального поля, по кругу надпись: «Н.Ф. ГАМАЛЕЯ».

В центре реверса (рис. 16) на фоне рукописей — изображение микроскопа, которым ученый пользовался для своих исследований и открытий. Слева сверху, горизонтально в две строки — годы его рождения и смерти: «1859—/—1949».

К сожалению, формат журнальной статьи позволил нам лишь упомянуть о первых шагах вирусологии — открытии ряда вирусов, о

выдающихся ученых — авторах этих открытий. Почтовые марки, блоки, ХМК, памятные медали позволили нам проиллюстрировать этот рассказ. Такое использование памятников материальной культуры может послужить своеобразным пособием в изучении истории науки.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Барштейн В.Ю.* Страницы истории микробиологии в медальерном искусстве [Текст] / В.Ю. Барштейн // *Мікробіологія і біотехнологія.*— 2011.— № 1(13) .— С. 86–94.

2. *Шлегель Г.Г.* История Микробиологии: Пер. с нем. Т.Г. Мирчинг [Текст] / Г.Г. Шлегель.— М.: Едиториал УРСС, 2002.— 304 с. — ISBN 5–354–00010–6.

3. *Beijerinck Virology Prize* [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.knaw.nl/Pages/DEF/27/202.bGFuZz1FTkc.html>

4. *Де Крюи Поль.* Охотники за микробами. Борьба за жизнь: Пер. с англ. И.П. Червонского [Текст] / Поль де Крюи.— М.: Наука, 1987.— 432 с.

5. *Сорокина Т.С.* История медицины: учебник для студ. высш. мед. учеб. заведений [Текст] / Т.С. Сорокина.— М.: Издательский центр «Академия», 2006.— 560 с. — ISBN 5–7695–3125–8.

6. *Барштейн Ю.А.* Медицина в медальерному мистецтві [Текст] / Ю.А. Барштейн, В.Ю. Барштейн.— Тернопіль: Укрмедкнига, 2003.— 352 с.— ISBN 966–673–046–4.

### В.Ю. Барштейн

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,  
вул. Осиповського, 2а, Київ, 04123, Україна, тел.: +38 (044) 462 72 59,  
e-mail: ihtbar@rambler.ru

## ПЕРШІ КРОКИ ВІРУСОЛОГІЇ В ПАМ'ЯТКАХ ФІЛАТЕЛІЇ І НУМІЗМАТИКИ

### Реферат

Стаття присвячена першим крокам вірусології — відкриттю збудників: мозаїчної хвороби тютюну, ящура, жовтої лихоманки, сказу, натуральної віспи, поліомієліту, саркоми Рауса. Розповідь проілюстровано творами філателії і нумізматики різних країн: СРСР, Німеччини, США, Нідерландів, Румунії, Португалії, Гвінейської Республіки, України та ООН.

Ключові слова: історія вірусології, філателістична продукція, пам'ятна медаль.



**V.Yu. Barshteyn**

Institute of Food Biotechnology and Genomics, NASU, 2a, Osipovskogo str., Kyiv, 04123,  
Ukraine, tel.: +38 (044) 462 72 59,  
e-mail: ihtbar@rambler.ru

## **FIRST STEPS OF VIROLOGY IN MONUMENTS OF PHILATELY AND NUMISMATICS**

### **Summary**

The article is devoted to the reflection of the first steps of virology — discovery of causative agents of: tobacco mosaic disease, foot-and-mouth disease, yellow fever, rabies, natural pox, poliomyelitis, Rous sarcoma. The story is illustrated with works of philately and numismatics of different countries: USSR, Germany, Netherlands, USA, Romania, Portugal, Republic of Guinea, Ukraine and UN.

Key words: history of virology, philately objects, art medal.



## ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

Науковий журнал «Мікробіологія і біотехнологія» запрошує Вас до співпраці з питань висвітлення результатів наукових досліджень у галузі мікробіології і біотехнології.

**Програмні цілі видання:** висвітлення результатів наукових досліджень у галузі мікробіології та біотехнології, об'єктами яких є прокаріотні (бактерії, архебактерії) та еукаріотні (мікроскопічні гриби, мікроскопічні водорості, найпростіші) мікроорганізми, віруси.

**Тематична спрямованість:** мікробіологія, вірусологія, імунологія, молекулярна біотехнологія, створення та селекція нових штамів мікроорганізмів, мікробні препарати, антимікробні засоби, біосенсори, діагностичуми, мікробні технології в сільському господарстві, мікробні технології у харчовій промисловості; захист та оздоровлення навколишнього середовища; отримання енергоносіїв та нових матеріалів тощо.

**Мова (мови) видання:** українська, російська, англійська.

**Рубрики журналу:** «Оглядів та теоретичні статті», «Експериментальні праці», «Дискусії», «Короткі повідомлення», «Хроніка наукового життя», «Сторінки історії», «Ювілеї і дати», «Рецензії», «Книжкова полиця».

До статті додається рекомендація установ, організацій, у яких виконувалася робота, за підписом керівника та письмова згода керівників установ, організацій, де працюють співавтори.

### **Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:**

Стаття має відповідати тематичному спрямуванню журналу і, відповідно до п. 3 Постанови ВАК України від 15.01.2003 р. № 7-05/1, включати такі структурні елементи: постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями; аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано вирішення даної проблеми і на які опирається автор; виокремлення раніше не вирішених частин загальної проблеми, котрим присвячується стаття; формулювання цілей статті (постановка завдання); виклад основного матеріалу дослідження з повним обґрунтуванням наукових результатів; висновки з даного дослідження і перспективи подальших пошуків у даному напрямі.

До друку приймаються статті (2 примірники) обсягом не більше 10 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди — до 15 стор., рецензії — до 3 стор., короткі повідомлення — до 2 стор.

До рукопису додається електронний варіант статті на дискеті або дискові (Word, шрифт Times New Roman, кегль 14, інтервал автоматичний, не більше 30 рядків на сторінці, поля по 2 см).



**При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:**

- індекс УДК у лівому верхньому кутку першого аркуша;
- прізвища та ініціали автора (авторів) мовою оригіналу, місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail). Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
- назва статті великими літерами;
- анотація із зазначенням новизни результатів дослідження (до 200 слів);
- ключові слова (не більше п'яти);

**Текст статті має включати такі складові:** вступ; матеріали і методи; результати та їх обговорення; висновки; література.

До кожного примірника статті додається анотація мовою оригіналу та реферати українською / російською (в залежності від мови оригіналу статті), та англійською мовами (кожен реферат на окремому аркуші). Перед словом «реферат» необхідно написати прізвища та ініціали авторів, назви установ, адреси, повну назву статті відповідною мовою. Після тексту реферату з абзацу розміщуються ключові слова.

У кінці тексту статті указати прізвища, імена та по батькові усіх авторів, поштову адресу, телефон, факс, e-mail (для кореспонденції).

Стаття має бути підписана автором (усіма авторами) з зазначенням дати на останній сторінці.

Автори несуть повну відповідальність за бездоганне мовне оформлення тексту, особливо за правильну наукову термінологію (її слід звіряти за фаховими термінологічними словниками).

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

Якщо часто повторювані у тексті словосполучення автор вважає за потрібне скоротити, то абревіатури за першого вживання обумовлюють у дужках. Наприклад: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Посилання на літературу подаються у тексті статті, цифрами у квадратних дужках, згідно з порядковим номером у списку літератури.

Таблиці мають бути компактними, мати порядковий номер; графи, колонки мають бути точно визначеними логічно і графічно. Матеріал таблиць (як і рисунків) має бути зрозумілим і не дублювати текст статті. Цифровий матеріал таблиць слід опрацювати статистично.

Рисунки виконуються у вигляді чітких креслень (за допомогою комп'ютерного графічного редактора у форматі TIF, JPG). Осі координат на графіках мають бути позначені. Рисунки розміщуються у тексті статті та дублюються окремим файлом на CD.

Підписи, а також пояснення, примітки до рисунків подаються мовою оригіналу та англійською.

Розділ «Результати та їх обговорення» має бути написаний коротко: необхідно чітко викласти виявлені ефекти, показати причинно-



результативні зв'язки між ними, порівняти отриману інформацію з даними літератури, дати відповідь на питання, поставлені у вступі.

Список літератури складається за алфавітно-хронологічним порядком (спочатку кирилиця, потім латиниця) і розміщується в кінці статті. Якщо перший автор у декількох працях один і той самий, то праці розміщуються у хронологічному порядку. Список посилань треба пронумерувати, а у тексті посилатися на відповідний номер джерела літератури (у квадратних дужках).

У посиланні наводять прізвища усіх авторів. В експериментальних працях має бути не більше 15 посилань літературних джерел. Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

## ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

### На книги

*Векірчик К.М.* Мікробіологія з основами вірусології. — К.: Либідь, 2001. — 312 с.

*Патика В.П., Тихонович І.А.* Мікроорганізми і альтернативне землеробство. — К.: Урожай, 1993. — 176 с.

*Промышленная микробиология* / Под ред. Н.С. Егорова. — М.: Высш. шк., 1989. — 688 с.

*Методы общей бактериологии*: В 3 т. / Под ред. Ф. Герхардта. — М.: Мир, 1983. — Т. 1. — 536 с.; Т. 2. — 470 с.; — Т. 3. — 263 с.

*Шлегель Г.* Общая микробиология. — М.: Мир, 1987. — 566 с.

*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. — 9th ed. — Baltimore; London, 1986. — Vol. 2. — 1599 p.

*Rogers H., Perkins H., Ward I.* Microbial cell walls and membranes. — London; New York: Fcfd. Press, 1980. — 364 p.

### На журнальні статті

*Подгорский В.С.* Систематическое положение, экологические аспекты и физиолого-биохимические особенности микроорганизмов, имеющих промышленное значение // *Мікробіол. журн.* — 1998. — 60, № 5. — С. 27 - 42.

*Андреюк Е.И., Козлова И.А., Рожанская А.М.* Микробиологическая коррозия строительных материалов // *Биоповреждения в строительстве*. — М.: Стройиздат, 1984. — С. 209 - 221.

*Глоба Л.І., Подорван Н.І.* Біотехнологія очищення забрудненої природної води // *Вісник ОНУ*. — 2001. — т. 6, в. 4. — С. 65 - 67.

*Eaton R.W., Ribbons D.V.* Utilization of phtalate esters by micrococci // *Arch. Microbiol.* — 1982. — 132, № 2. — P. 185 - 188.

### На тези доповідей





*Мацелюх Б.П.* Розробка біотехнології одержання ландоміцину E // Міжнародна наук. конф. «Мікробні біотехнології» (Одеса, вересень, 2006 р.): тез. доп. — О.: «Астропринт», 2006. — С. 17.

### **На депоновані наукові роботи**

*Лопатина Н.В., Терентьев А.Н., Наталич Л.А., Янгулов Ш.У.* Оптимизация питательной среды для культивирования вакцинного штамма чумного микроба с применением метода математического планирования эксперимента / Редкол. «Микробиол. журн.» — К., 1991. — 7 с. — Деп. в ВИНТИ 03.01.92, № 1-В92.

### **На стандарти**

*ГОСТ 20264.4-89.* Препараты ферментные. Методы определения амилолитической активности. — М.: Изд-во стандартов, 1989. — 17 с.

### **На автореферати дисертацій**

*Онищенко О.М.* Таксономія і антибіотична активність *Alteromonas*-подібних бактерій Чорного моря: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2003. — 21 с.

Датою надходження статті вважають день, коли до редколегії надійшов остаточний варіант тексту статті після рецензування.

Після одержання коректури статті автор повинен виправити лише помилки (чітко, синьою або чорною ручкою неправильно закреслити, а поряд з цим на полі написати правильний варіант) і терміново відіслати статтю на адресу редколегії або повідомити про свої правки по телефону або електронною поштою.

У разі затримки редакція, додержуючись графіка, залишає за собою право здати коректуру до друкарні (у виробництво) без авторських правок.

Підпис автора у кінці статті означає, що автор передає права на видання своєї статті редакції. Автор гарантує, що стаття оригінальна; ні стаття, ні рисунки до неї не були опубліковані в інших виданнях.

Відхилені статті не повертаються.

Редакція приймає до друку на сторінках і обкладинках журналу платні рекламні оголошення біотехнологічного та медичного напрямів; виробників лабораторного обладнання, діагностикумів, реактивів для наукових досліджень тощо.



## INFORMATION FOR THE AUTHORS

*Scientific journal «Microbiology and biotechnology»  
invites you to spotlight*

**Aims.** Journal «Microbiology and biotechnology» publishes primary research papers on microbiology and biotechnology of prokaryotic (bacteria, archaea) and eucaryotic (fungi, microscopic algae, protozoa) microorganisms, viruses.

**Topics:** microbiology, virology, molecular biotechnology, development and selection of new microbial strains, microbial preparations, antimicrobial preparations, biosensors, diagnosticums, microbial technologies in agriculture, microbial technologies in food production, environment protection and enhancement, development of energy vectors and new raw materials, etc.

**Languages:** Ukrainian, Russian, English.

**Types of publications:** «Observation and theoretical articles», «Experimental works», «Reviews», «Original Research Papers», «Discussions», «Short communications», «Conferences, congresses, trend schools», «Scientific life chronicles», «Pages of History», «Anniversaries», «Book reviews», «Bookshelf».

The manuscript should be accompanied by a letter from an institution expert commission that should state that the paper is suitable for publication in MSM, and comprise a recommendation of the institution where the research was carried out, signed by the chief and a signed agreement of institution leader.

### **Article appearance:**

The manuscript should satisfy journal topics and according to Resolution of Higher Attestation Commission of Ukraine (15.01.2003, № 7-05/1, p. 3) must contain the following elements: problem definition with the reference to main scientific and practical tasks; analysis of recent studies and publications that form a basis for problem decision; highlighting of main unsolved tasks; article task; narrative of main results with their full substantiation; conclusions and main challenges in given area of focus.

The following articles are accepted:

- original research papers — at most 10 pages (with pictures, tables, and captions, resume, bibliography)
- reviews — at most 15 pages
- book reviews — at most 3 pages



- short communications – at most 2 pages.

The manuscript should be given in 2 carbon copies with an electronic variant on CD (Word, font Times New Roman, 14, line spacing automatic, at most 30 lines per page, page margins – 2 cm on all sides).

### Contents of manuscript

- UDC index on the first page top left;
- author(s) full name(s) in source language, name(s) of institution(s), institution postal address (in international format), contact phone number, e-mail address. Authors names and institutions they represent should be clearly stated by using superscript numbers;
- article title uppercase;
- article abstract (should not exceed 200 words);
- key words pertaining to the subject matter (5 maximum).

The manuscript should be divided into the following sections: introduction, materials and methods, results and discussion, concluding remarks, and references.

Abstracts in source language, Ukrainian/Russian (depending on article language) and English (each one on single page) should be attached to every copy of an article. **Author(s) name(s), institution(s) and article title** should be followed by word «Abstract», abstract itself and key words (new paragraph).

Next to article text contact details should be set: names of all the authors, institution names, postal address, phone/fax number, e-mail.

The manuscript should be signed by the author (all the authors) and dated on the last page.

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

Repeated word-combinations can be abbreviated. An abbreviation is set in brackets when first introduced, e. g. polimerase chain reaction (PCR).

Bibliography references should be numeral and are given in the text in square brackets according to their order in the bibliography list.

Tables should be compact, and numbered with Arabic numerals; all columns and rows should be arranged in logical and graphical order. All material presented in the tables (figures) should be clear and should not duplicate an article text. Results should be processed statistically.

All pictures should be presented in TIFF or JRG format, axes named. Figures should be placed in article body with electronic copies on CD in separate file.

Section «Results and Discussion» should clearly state revealed effects, cause-effect relations, compare obtained data with literature data and give the answers on questions specified in the introduction.

References should be numbered sequentially in alphabetical-chronological order (Cyrillic first, then Latin) at the end of the manuscript. If the first author in several references is the same, all these references are arranged in chronological order. Reference list should be numbered. The numbers should be set in square brackets in the text, *i. e.* [2, 15].



References should contain all the authors' names. Original research papers should contain at most 15 references. Patent documents should be mentioned at the end of the list.

### Books

*Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. — 9<sup>th</sup> ed. — Baltimore; London, 1986. — Vol. 2. — 1599 p.

*Rogers H., Perkins H., Ward I.* Microbial cell walls and membranes. — London; New York: Fcfd. Press, 1980. — 364 p.

### Journals

*Eaton R.W., Ribbons D.V.* Utilization of phtalate esters by micrococci // *Arch. Microbiol.* — 1982. — 132, № 2. — P. 185 — 188.

The date of article acceptance is that one when the final variant comes to the publisher after a prepublication review.

After obtaining the proof sheet the author should correct mistakes (clearly cancel incorrect variant with blue or black ink and put the correct variant on border) and send the revised variant to the editor (by post, e-mail or phone).

In case of delays, editors keeping to the schedule have a right to publish the revised variant without author's proofreading.

Author's signature vouches that author grants a copyright to the publisher. Author vouches that the work has not been published elsewhere, either completely, or in part and has not been submitted to another journal.

Not accepted manuscripts will not be returned.

The publisher accepts paid-for advertisement on biotechnology, medicine, laboratory equipment, research diagnosticums, tests, reagents for publication on the cover or journal pages.



*Наукове видання*

## «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»

Увага: передрук, усі види копіювання та відтворення матеріалів,  
що надруковані у журналі «Мікробіологія і біотехнологія»,  
можливі лише за умови посилання на джерело інформації  
та з дозволу редакційної колегії.  
Усі права захищені згідно законодавства України.

Підп. до друку 08.06.2011. Формат 70x108/16.  
Гарн. Таймс. Тираж 100 прим.

Видавець — ПП «Фенікс»  
(Свідоцтво ДК № 1044 від 17.09.02).  
Україна, м. Одеса, 65009, вул. Зоопаркова, 25. Тел. (048) 7777-591.  
e-mail: maritimebooks@yandex.ru  
www.law-books.od.ua

Виготовлювач — Редакційно-видавничий Центр  
Одеського національного університету  
імені І.І. Мечникова,  
65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна  
Тел.: +38 (048) 723 28 39