

## МЕТАБОЛИЗМ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ У МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

Н.П. Максимова

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

### **Введение**

Метилотрофные бактерии, способные утилизировать метанол и другие восстановленные  $C_1$ -соединения, в течение ряда лет привлекают внимание не только особенностями своей биологии, но и реальными перспективами использования в биотехнологических целях. Интерес к метилотрофам обусловлен уникальностью этих организмов в плане их питательных потребностей [1, 2], потенциальной возможностью их использования в качестве продуцентов белка, а также ряда других клеточных метаболитов: органических кислот, полисахаридов, витаминов ( $B_{12}$ , пантотеновой кислоты, биотина и тиамина), ФАД, АТФ, убихинонов, каротиноидов, нуклеозидов, PQQ, цитохрома  $c$ ,  $\beta$ -оксибутирата, ферментных препаратов (каталазы, алкогольоксидазы, форматдегидрогеназы, метанолдегидрогеназы), аминокислот (глутаминовой, серина, фенилаланина и др.). Кроме того, метилотрофные бактерии обладают уникальной способностью осуществлять биотрансформацию различных природных и неприродных полимеров, а также выступать в качестве деструкторов метилсодержащих токсических соединений, а в ассоциации с другими микроорганизмами – их полного разложения и утилизации [2-8].

Представленные выше сведения демонстрируют высокий биотехнологический потенциал метилотрофов и аргументируют интерес к этим организмам. Особенно перспективным является использование метилотрофных бактерий для получения уникальных микробных метаболитов, химический синтез которых является чрезвычайно трудоемким либо практически невозможным. К их числу относится большинство соединений ароматического ряда: аминокислоты, витамины, пигменты, антибиотики, алкалоиды и др. Предпочтительное использование метилотрофных бактерий (в частности, облигатно потребляющих метанол) для микробиологического синтеза аргументируется возможным существованием у них тесной связи между начальными этапами ароматического пути и ассимиляционной ветвью  $C_1$ -соединений. Исследование этой проблемы представляет существенный интерес не только в плане выявления новых, ранее не известных связей между отдельными звеньями клеточного метаболизма микробных клеток, но и для определения биосинтетического потенциала метилотрофных бактерий,

создания новых рычагов управления их метаболизмом и повышения продуктивности.

Целью работы являлось исследование у метилотрофных бактерий генетических и биохимических основ метаболизма ароматических соединений, разработка новых подходов использования биосинтетического потенциала данных организмов и создание штаммов-продуцентов биологически активных соединений ароматической природы на их основе. В соответствии с этим, представлялось интересным изучить связь между метилотрофным метаболизмом (ассимиляцией  $C_1$ -соединений) и ароматическим путем, в результате чего сделать заключение о возможности использования метилотрофных бактерий для создания на их основе штаммов-продуцентов ароматических аминокислот и других метаболитов ароматической природы; охарактеризовать ароматический путь данных бактерий и механизмы его регуляции, определить способность метилотрофов к синтезу вторичных метаболитов ароматической природы, расшифровать пути и регуляторные механизмы их синтеза и определить биотехнологическую значимость данных соединений; разработать новые подходы практического использования метилотрофных бактерий и рекомендации по их применению для получения биологически активных соединений ароматической природы, а также для создания на основе изучаемых микроорганизмов новых микробных препаратов.

## СИНТЕЗ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ У БАКТЕРИЙ

Первые семь реакций общего участка ароматического пути (называемого шикиматным) завершаются синтезом хоризмата, являющегося предшественником трех ароматических аминокислот: фенилаланина, тирозина и триптофана. На этом этапе путь разветвляется, и последующий синтез всех метаболитов происходит индивидуально. В связи с этим регуляцию их синтеза необходимо исследовать как на уровне ключевого фермента (ДАГФ-синтазы), так и на каждом из этих этапов, обеспечивающих дальнейшее превращение хоризмата в различные ароматические продукты (рис. 1). Ароматический путь у бактерий, помимо синтеза аминокислот, обеспечивает образование большого числа клеточных метаболитов: пигментов – виолацеина, феназинов, ДОФА, пиовердинов; антибиотиков – пирролнитрина, актиномицина *D*, кандицидина, хлорамфеникола, микобактина, псевдомоновой кислоты, Руо-соединений, рифампицина, обафлуорина; ряда биогенных соединений, таких как НАД, 2,3-диоксибензоат, PQQ; сидерофоров; ИУК; витаминов – *n*-аминобензоата, убихинонов; витамина К, фолиевой кислоты и др. [9]. Практически все названные соединения обладают биологической активностью, представляют интерес в практическом отношении и могут найти применение в различных областях, в том числе, медицине и сельском хозяйстве.

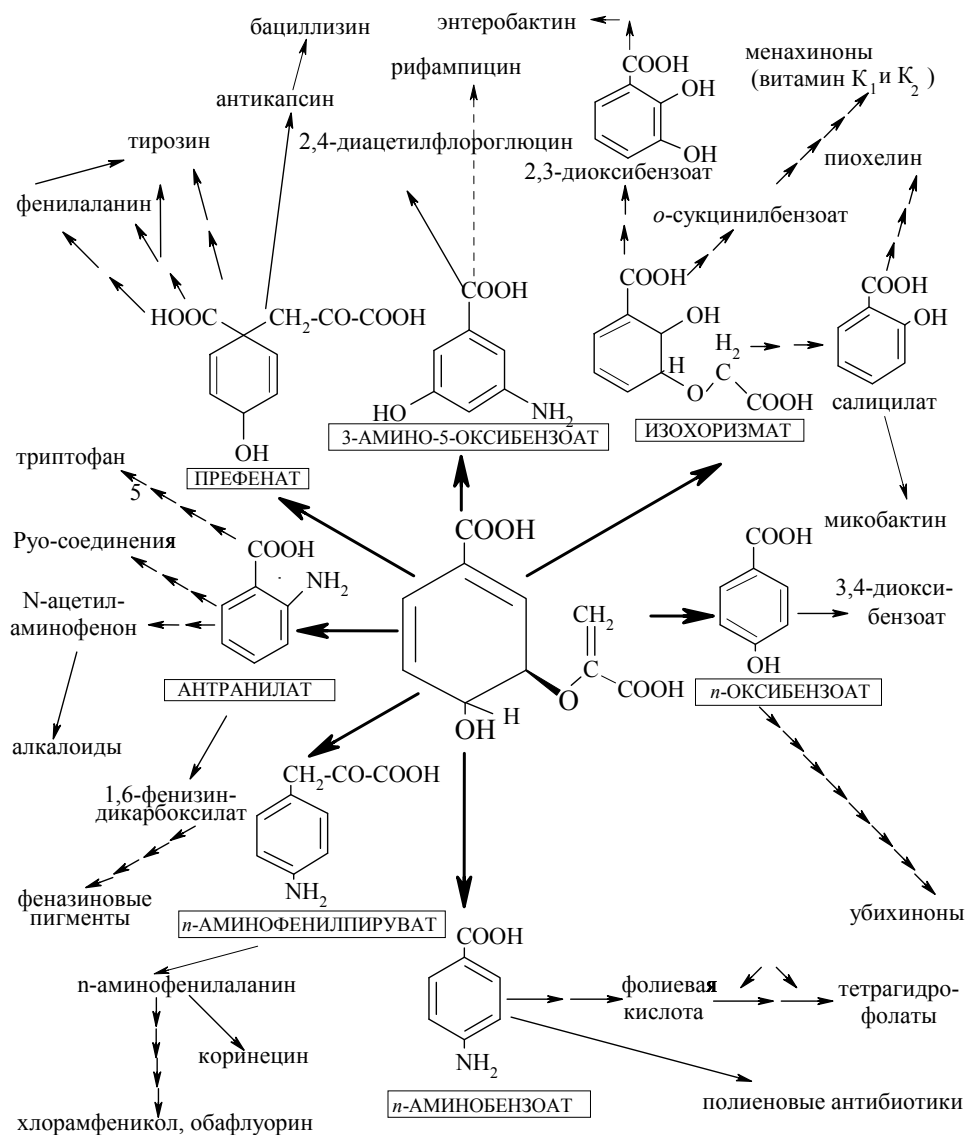


Рисунок 1 - Пути превращения хоризмата у бактерий. Пунктирная линия указывает на отсутствие данных о путях синтезе соединений

## СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ОТНОШЕНИИ ШТАММОВ МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

При подборе штаммов метилотрофных бактерий для исследования в первую очередь оценивался их биосинтетический потенциал, а именно, способность к синтезу микробных метаболитов ароматической природы, а также способность к росту на простых источниках углерода и энергии, какими являются метанол и его производные. В качестве основного критерия при этом была выбрана активность ключевого фермента ароматического пути – ДАГФ-синтазы. Было сделано предположение, что высокая активность этого фермента может обеспечить ароматический путь достаточным количеством метаболитов и, как следствие этого, привести к сверхпродукции тех или иных ароматических соединений после направленной дерегуляции их синтеза. Анализ по этому показателю коллекции облигатных и факультативных метилотрофных бактерий позволил отобрать пять

штаммов: *M. mucogenes* М75, *M. flagellatum* КТ, *M. capsulatus* ИМ, *P. methylica* 2 и *P. putida* М, которые характеризовались более высоким уровнем активности ДАГФ-синтазы (табл. 1). Два из них – *M. mucogenes* М75 и *P. putida* М– выделены, идентифицированы и охарактеризованы автором [10,11], а – *M. flagellatum* КТ, *M. capsulatus* ИМ и *P. methylica* 2 – являются коллекционными.

Таблица 1. Активность ДАГФ-синтазы у изучаемых метилотрофных бактерий [12-14]

Штаммы	Удельная активность ДАГФ-синтазы (нмоль/мин·мг белка)	Путь ассимиляции С <sub>1</sub> -соединений	Происхождение штаммов
<i>M.mucogenes</i> М75	2,9	РМФ цикл (КДФГА/ГА вариант)	выделен из почвы на территории Беларуси (коллекция БГУ, Минск)
<i>M.flagellatum</i> КТ	3,7	РМФ цикл (КДФГА/ГА вариант)	коллекция ГосНИИГенетика (г. Москва)
<i>M.capsulatus</i> ИМ	2,52	сериновый	коллекция ИБФМ (г. Пушино)
<i>P.methylica</i> 2	2,12	сериновый	–"–
<i>P.putida</i> М	3,5	за счет активности алкогольдегидрогеназы	выделен из почвы на территории Беларуси (коллекция БГУ, Минск)

Остановившись более детально на характеристике выделенных облигатных метилотрофных бактерий, следует отметить, что у *M. mucogenes* М75 утилизация метанола осуществляется за счет функционирования КДФГА/ГА варианта РМФ-цикла. Наиболее интересным среди факультативных метилотрофных бактерий является штамм *P. putida* М, отнесенный к уникальным представителям *Pseudomonas*, который отличается от них способностью к росту на метаноле благодаря наличию алкогольдегидрогеназы – фермента широкой субстратной специфичности, осуществляющего окисление этого субстрата наряду с этанолом, хотя и с меньшей эффективностью.

Создание коллекции генетически маркированных метилотрофных штаммов является необходимым этапом работы для изучения метаболизма ароматических соединений. Проблема получения мутантов у метилотрофных бактерий, в частности, облигатных, представляет известную сложность, которую удалось преодолеть благодаря подбору специальных условий химического мутагенеза, а также учету особенностей метаболизма

данных организмов. В результате была создана уникальная коллекция ауксотрофных и регуляторных мутантов, отличающаяся как своей полнотой, так и степенью изученности входящих в ее состав штаммов. Например, у бактерий *M. mucogenes* M75 впервые для облигатных метилотрофов получены и охарактеризованы ферментативно зависимые по ароматическим аминокислотам мутанты, имеющие мутации в генах *trpE*, *trpD* и *trpF*, *trpA*, *trpB*, *tyrA* и *pheA*. Подобный набор ауксотрофных мутантов был создан и для факультативных метилотрофных бактерий *M. capsulatus* ИМ, *P. methylica* 2 и *P. putida* М.

С использованием токсических аналогов 5-метилтриптофана и 6-фтортриптофана у метилотрофных бактерий *Methylobacillus* и *Pseudomonas* получены регуляторные 5-МТ<sup>R</sup>- и 6-ФТ<sup>R</sup>-мутанты, способные к сверхпродукции триптофана. Некоторые мутантные штаммы были предложены для практического использования. Например, ряд штаммов *P. putida* М3, М7, М9 и М11 – в качестве тест-культур для изучения продукции ароматических аминокислот у метилотрофных бактерий [15-20]; *P. putida trpA15* – как продуцент триптофан-синтазы и ферментативного получения триптофана из индола и серина [19]; *P. putida* М35 – продуцент триптофана [21]. Однако основной целью создания коллекции штаммов метилотрофных бактерий являлось ее использование для расшифровки генетических и биохимических механизмов синтеза ароматических соединений у данной группы организмов, которая была начата с установления связи между ароматическим и метилотрофным метаболизмом, а также изучения изоферментного состава и регуляции ключевого фермента ароматического пути – ДАГФ-синтазы.

## **СВЯЗЬ АРОМАТИЧЕСКОГО ПУТИ И С<sub>1</sub>-МЕТАБОЛИЗМА У МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ**

Ароматический путь, как известно, начинается реакцией конденсации фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата, катализируемой 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат-синтазой (ДАГФ-синтазой). Необходимый для данной реакции эритрозо-4-фосфат у большинства организмов поступает из пентозофосфатного цикла, а фосфоенолпируват является продуктом промежуточного метаболизма клеток. У бактерий, облигатно использующих метанол в качестве источника углерода и энергии, эритрозо-4-фосфат образуется в рибулозомонофосфатном цикле (РМФ-цикле), а фосфоенолпируват – в процессе превращения одного из продуктов этого же цикла 2-кето-3-дезоксид-6-фосфоглюконата (или фруктозо-1,6-бисфосфата) в клеточный материал. В отличие от пентозофосфатного цикла, играющего в клетках гетеротрофов вспомогательную роль, РМФ-цикл у облигатных метилотрофов является основным и обеспечивает синтез всех без исключения клеточных метаболитов. При этом синтез

ферментов РФМ-цикла индуцибелен и регулируется количеством образующегося в клетках формальдегида при окислении метанола. Было сделано предположение, что у облигатных метилотрофных бактерий при росте на метаноле уровень синтеза необходимых для ДАГФ-синтазной реакции соединений также окажется высоким, и в случае ее дерегуляции ароматический путь будет обеспечиваться соответствующими метаболитами в достаточном количестве.

Для выяснения этого вопроса у метилотрофных бактерий, имеющих различные варианты  $C_1$ -ассимиляционных циклов, изучали зависимость уровня синтеза ДАГФ-синтазы от концентрации источника углерода (т.е. метанола) в среде культивирования (рис. 2).

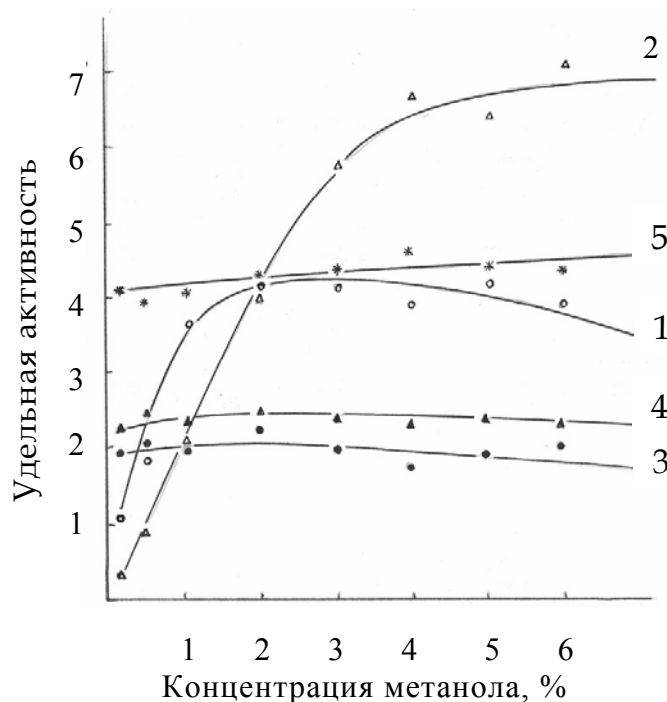


Рис. 2. Зависимость удельной активности ДАГФ-синтазы метилотрофных бактерий от концентрации метанола в среде культивирования. 1 – *M. flagellatum* КТ; 2 – *M. mucogenes* M75; 3 – *P. methylica* 2; 4 – *M. capsulatus* ИМ; 5 – *P. pu-tida* М; удельная активность фермента в нмоль/мин·мг белка

В результате было установлено, что уровень синтеза ДАГФ-синтазы в процессе культивирования «реагирует» на изменение концентрации метанола лишь у облигатных метилотрофных бактерий *M. mucogenes* M75 и *M. flagellatum* КТ, реализующих КДФГА/ТА вариант РФМ-цикла при ассимиляции метанола [11,14]. Ранее такое явление для ДАГФ-синтазы описано не было. Возможное объяснение наблюдаемого явления может быть следующим – при повышении концентрации метанола в среде уровень синтеза соединений, необходимых для ДАГФ-синтазной реакции также повышается, в результате чего регистрируется возрастание удельной активности фермента. В пользу

этого говорят также следующие факты:

► во-первых, уровень синтеза ДАГФ-синтазы у изучаемых облигатных метилотрофных бактерий увеличивается в известных пределах (в 4 раза для *M. flagellatum* КТ и примерно в 20 раз для *M. mucogenes* М75) пропорционально содержанию метанола в среде (0,2-2,0 % для *M. flagellatum* КТ и 0,2-4,0 % – *M. mucogenes* М75);

► во-вторых, уровень синтеза ДАГФ-синтазы находится в прямой зависимости от концентрации субстратов реакции – эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата в достаточно широких пределах (от 0 до 0,7 ммоль/л и от 0 до 0,5 ммоль/л, соответственно);

► в-третьих, известно, что у бактерий, облигатно использующих метанол, эритрозо-4-фосфат образуется в РМФ-цикле, а фосфоенолпируват – в процессе превращения одного из продуктов этого же цикла – 2-кето-3-дезоксидезокси-6-фосоглюконата – в клеточный материал. Уровень синтеза ферментов РМФ-цикла у *M. mucogenes* М75 и *M. flagellatum* КТ достаточно высокий.

Что касается факультативных метилотрофных бактерий (*M. capsulatus* ИМ, *P. methylica* 2 и *P. putida* М), то индукции синтеза субстратов ДАГФ-синтазной реакции (эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата) у них, по-видимому, не происходит, и уровень синтеза изучаемого фермента не зависит от концентрации метанола в среде, что согласуется с представлениями о более сложном характере зависимости между пентозофосфатным (или сериновым) циклом и ароматическим путем.

## **БИОСИНТЕЗ ПЕРВИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ АРОМАТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ МЕТИЛОТРОФНЫМИ БАКТЕРИЯМИ**

Исследование механизмов регуляции ароматического метаболизма у метилотрофных организмов на уровне шикиматного пути позволило установить, что ДАГФ-синтазы метилотрофных бактерий имеет разный изоферментный состав. В частности, ДАГФ-синтаза бактерий *M. mucogenes* М75, *M. flagellatum* КТ и *M. capsulatus* ИМ состоит из трех изоферментов – ДАГФС-[Тур], ДАГФС-[Phe] и ДАГФС-[Trp], а *P. methylica* 2 и *P. putida* М – двух – ДАГФС-[Тур] и ДАГФС-[Trp] [11,14,22,23]. На биохимическом уровне ДАГФ-синтаза изучаемых бактерий регулируется путем ретроингибирования, причем характер этого процесса зависит от изоферментного состава (табл. 2). Так, активность фермента у *M. mucogenes* М75, *M. flagellatum* КТ и *M. capsulatus* ИМ ингибируется тремя ароматическими аминокислотами (триптофаном, фенилаланином и тирозином), а у *P. methylica* 2 и *P. putida* М – триптофаном и тирозином. В ряде случаев зарегистрировано ингибирующее действие антранилата и фенилпирувата [11,14,22,23]. По своему составу и способу аллостерической регуляции ДАГФ-

Таблица 2. Регуляция активности и синтеза ДАГФ-синтазы у мезофильных бактерий

Бактерии	Изоферменты	Ингибиторы (ингибирование, %)*	Аминокислоты, вызывающие репрессию	Уд. акт. ДАГФ- синтазы в нмоль/мин·мг белка
<i>M. mucogenes</i> М75	ДАГФС-[Trp] ДАГФС-[Phe] ДАГФС-[Tyr]	триптофан (72) фенилаланин (46) тирозин (50) антранилат (44) фенилпируват (35)	нет	–
<i>M. flagellatum</i> КТ	ДАГФС-[Trp] ДАГФС-[Phe] ДАГФС-[Tyr]	триптофан (40) фенилаланин (99) тирозин (99)	триптофан тирозин	3,3–62,1 3,1–47,7
<i>M. capsulatus</i> ИМ	ДАГФС-[Trp] ДАГФС-[Phe] ДАГФС-[Tyr]	триптофан (50) фенилаланин (63) тирозин (47) антранилат (20)	триптофан	3,5–20,8
<i>P. methylica</i> 2	ДАГФС-[Trp] ДАГФС-[Tyr]	триптофан (29) тирозин (50)	нет	–
<i>P. putida</i> М	ДАГФС-[Trp] ДАГФС-[Tyr]	триптофан (26) тирозин (62) антранилат (26) фенилпируват (30)	фенилаланин тирозин	2,6–10,7 2,8–8,0

Примечания. \* - В скобках указаны уровни ингибирования активности фермента при концентрации ингибитора 1 ммоль/л. \*\* - Приведены уровни активности фермента в состоянии репрессии и дерепрессии. Уд. акт. – удельная активность

синтаза представителей облигатных мезофильных бактерий рода *Methylobacillus* и факультативных *M. capsulatus* ИМ более всего близка к одноименному ферменту бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, для которых также характерно наличие трех изоферментов в его составе. Причем вклад каждого из изоферментов в суммарную активность ДАГФ-синтазы у *Methylobacillus* сходен с бактериями *E. coli*, поскольку изофермент ДАГФС-[Phe] у последних также является «доминантным» и обеспечивает 80 % общей активности фермента. ДАГФ-синтаза факультативного мезофильного *M. capsulatus* ИМ имеет сходство с данным ферментом других представителей энтеробактерий, например *Erwinia*, у которых все три изофермента по активности равнозначны. Двухизоферментный состав ДАГФ-синтазы у мезофильных бактерий *P. methylica* 2 и *P. putida* М является типичным



для представителей *Pseudomonas*, при этом основной изофермент у них – ДАГФС-[Тур] [24].

С использованием зависимых по ароматическим аминокислотам мутантов (Ago<sup>-</sup> фенотипа) у метилотрофных бактерий изучена генетическая регуляция синтеза ДАГФ-синтазы (см. табл. 2). Репрессия синтеза фермента зарегистрирована у трех метилотрофных штаммов из пяти изученных, независимо от того, являются ли они облигатными или факультативными по отношению к метанолу [11,14,22,23]. При этом число имеющихся у них Ago-генов (число изоферментов) не соответствует числу обнаруженных апорепрессоров: у *M. flagellatum* КТ из трех Ago-генов репрессии подвержены только два – agoH и agoF, у *M. capsulatus* ИМ один – agoH, а у *P. putida* М из двух генов agoH и agoF репрессируется только последний.

Наиболее интересным среди изучаемых является штамм *M. flagellatum* КТ, у которого в дерепрессированном состоянии уровень удельной активности ДАГФ-синтазы оказался чрезвычайно высоким – 48-62 нмоль/мин·мг белка, что почти в 20 раз выше такового в состоянии репрессии (3,1-3,3 нмоль/мин·мг белка) [11]. Наоборот, отсутствие генетической регуляции ДАГФ-синтазы у бактерий *M. mucogenes* М75 [23] нельзя считать положительным, так как в этом случае невозможно использовать прием повышения уровня синтеза фермента за счет его дерепрессии. Однако дерегуляция фермента при снятии ретроингибирования, а также повышение уровня его синтеза за счет варьирования концентрации метанола в среде культивирования (см. рис. 2) у данных бактерий сохраняется.

Следует отметить, что перечень бактериальных штаммов, у которых генетическая регуляция синтеза ДАГФ-синтазы была известна к моменту начала выполнения работы, ограничивался лишь несколькими представителями. Одной из основных причин слабой изученности этого механизма регуляции ДАГФ-синтазы у бактерий являлось отсутствие адекватных методов его изучения. Предложенный нами новый подход, основанный на изучении этого процесса с помощью Ago<sup>-</sup>мутантов (имеющих блок того или иного этапа шикиматного пути), позволил значительно увеличить разрешающую способность метода и обнаружить данный тип регуляции синтеза ДАГФ-синтазы у новых бактериальных штаммов [12].

Таким образом, анализ изоферментного состава ДАГФ-синтазы у различных штаммов метилотрофных бактерий, а также процессов регуляции активности и синтеза данного фермента позволил выявить сходство изучаемой группы с большинством известных в этом отношении микроорганизмов, продемонстрировать достаточно широкую распространенность механизмов генетического контроля синтеза ключевого

фермента ароматического пути – ДАГФ-синтазы среди бактерий и сделать вывод об универсальности регуляторных механизмов ароматического метаболизма у представителей различных систематических групп.

Определенное сходство с другими бактериями проявляют метилотрофы и в отношении механизмов регуляции отдельных ветвей ароматического пути, а именно, синтеза триптофана, фенилаланина и тирозина. Изучение регуляции биосинтеза триптофана у метиловых бактерий на примере облигатного метилотрофа *M. mucogenes* M75 показало, что этот путь у них регулируется с помощью двойного контроля – репрессии *trpE*, *trpD*- и *trpC*-генов и ретроингибирования антранилат-синтазы триптофаном [14,23,25].

О репрессии генов судили по снижению уровня синтеза трех ферментов антранилат-синтазы, антранилат-5-фосфорибозилтрансферазы и индол-3-глицерофосфат-синтазы (от 3 до 20 раз) при избытке триптофана. Остальные ферменты триптофанового пути (в частности, А- и Б-активности триптофан-синтазы, являющиеся продуктами генов *trpAB*) у *M. mucogenes* M75 синтезируются конститутивно (табл. 3).

Таблица 3. Регуляция синтеза ферментов триптофанового пути у облигатных метилотрофных бактерий *M. mucogenes* M75

Штамм	L-триптофан (мкг/мл)	Удельная активность (нмоль/мин·мг белка)				
		АС II	ФРТ	ИнГФС	ТС-А	ТС-Б
дикий тип	500	0,06±0,01	1,76±0,1	6,5±0,2	0,1±0,01	3,8±0,1
<i>trpE2</i>	500	0	0,3±0,01	2,9±0,1	0,11±0,01	3,9±0,2
	50	0	1,72±0,02	6,7±0,2	0,09±0,01	3,7±0,1
<i>trpD6</i>	500	0,09±0,01	0	4,2±0,1	0,16±0,01	4,3±0,2
	100	1,7±0,02	0	9,2±0,9	0,15±0,01	4,5±0,2
<i>trpC14</i>	500	0,08±0,01	1,13±0,01	1,2±0,01	0,15±0,01	4,6±0,1
	50	1,8±0,02	1,35±0,02	4,4±0,2	0,17±0,01	4,5±0,2
<i>trpA10</i>	500	0,06±0,01	1,21±0,02	3,5±0,1	0	5,9±0,2
	50	1,5±0,02	1,5±0,01	11,0±0,3	0	6,7±0,3
<i>trpB9</i>	500	0,1±0,01	0,4±0,01	4,7±0,2	0,09±0,01	0
	100	2,5±0,1	1,9±0,1	9,3±0,3	0,1±0,01	0

Примечание АС II - амидотрансферазная активность антранилатсинтазы; ФРТ - антранилат-5-фосфорибозилтрансфераза; ИнГФС - индол-3-глицерофосфат-синтаза; ТС-А - активность  $\alpha$ -субъединицы триптофан-синтазы; ТС-Б - активность  $\beta$ -субъединицы триптофан-синтазы

Характер ингибирования ключевого фермента триптофанового пути – антранилат-синтазы у *M. mucogenes* M75 такой же, как и у известных в этом отношении бактерий.

Снижение активности АС II на 50 % регистрировалось при концентрации триптофана  $10^{-4}$  моль/л, что говорит о слабой чувствительности фермента к этому ингибитору. Сигмоидный характер кривой ингибирования указывает на аллостерический тип его регуляции.

Установлена возможность получения у облигатных метилотрофов *M. tucogenes* M75 5-метилтриптофан- и 6-фтортриптофан-резистентных регуляторных мутантов (5MT<sup>R</sup> и 6-FT<sup>R</sup>), способных к сверхсинтезу триптофана. Показано, что в основе этого явления лежит дерепрессия триптофанового пути, а также частичное снятие ретроингибирования ДАГФ-синтазы и анранилат-синтазы [14]. Таким образом, на примере бактерий *M. tucogenes* M75 продемонстрировано, что, несмотря на биохимическую уникальность и филогенетическую отдаленность от других групп бактерий, у облигатных метилотрофных бактерий имеется сходный тип регуляции синтеза триптофана, осуществляемый с помощью репрессии трех генов *trpEDC* и ретроингибирования анранилат-синтазы. Способы дерегуляции этого пути у облигатных метилотрофных бактерий также аналогичны.

У факультативных метилотрофных бактерий *P. putida* M регуляция синтеза триптофана осуществляется подобным образом – с помощью репрессии трех генов *trpEDC* (табл. 4). В условиях лимита триптофана синтез трех ферментов - анранилат-синтазы, анранилат-5-фосфоризобизтрансферазы и индол-3-глицерофосфат-синтазы увеличивается в 4-10 раз.

Однако, помимо характерной для бактерий *Pseudomonas* репрессии, у бактерий *P. putida* M обнаружен новый тип регуляции синтеза триптофана – индукция *trpA*- и *trpB*-генов индол-3-глицерофосфатом. Ингибирование активности ферментов зарегистрировано на уровне анранилат-синтазы и триптофан-синтазы триптофаном [26].

Таблица 4. Регуляция синтеза ферментов триптофанового пути у факультативных метилотрофных бактерий *P. putida* M

Мутанты	Триптофан (мкг/мл)	Относительная активность					
		АС II	ФРТ	ФРАИ	ИнГФС	ТС-А	ТС-Б
дикий тип	50	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
		(0,82)	(1,42)	(7,35)	(1,85)	(0,02)	(1,01)
<i>trpE53</i>	50	0	0,7	0,7	1,3	1,0	0,9
	2	0	1,7	0,7	4,0	1,02	0,9
<i>trpD69</i>	50	0,6	0	0,6	1,3	1,0	0,9
	2	6,7	0	0,7	4,0	1,0	1,2

trpF2	50	1,1	1,3	0	1,0	1,0	0,8
	2	2,1	4,9	0	2,5	1,0	1,2
trpC100	50	0,8	0,8	0,7	0	1,0	0,9
	2	2,4	1,5	0,9	0	1,0	1,3
trpA88	50	1,7	0,9	1,0	1,2	0	10,5
	2	11,0	4,1	0,9	6,7	0	139,4
trpB9	50	0,6	0,6	0,6	1,0	20,0	0
	2	3,9	2,1	0,8	6,7	71,8	0

Примечание. В скобках даны значения удельной активности ферментов, принятые за единицу

В ходе исследований разработаны новые интересные в практическом отношении приемы получения предшественников триптофана, в частности, фосфорибозилпирофосфата, а также способы его количественного определения [27,28]. Штамм *P. putida* M15, клетки которого способны к сверхсинтезу триптофан-синтазы (200 нмоль/ мин·мг белка), отобран как сверхпродуцент этого фермента и рекомендован для энзиматического получения триптофана из индола и серина в лабораторных и промышленных условиях [19].

С помощью токсических аналогов триптофана – 5-метилтриптофана, 5- и 6-фтортриптофана получен набор регуляторных мутантов метилотрофных бактерий *P. putida* M, секретирующих триптофан в достаточно больших количествах вследствие дерегуляции генов trpEDC и снятия ретроингибирования антранилат-синтазы [21,29]. Штаммы продуценты рекомендованы для дальнейшего генно-инженерного совершенствования и конструирования на их основе сверхпродуцентов триптофана и их производных, а также получения белка одноклеточных, обогащенных этой незаменимой аминокислотой.

Исследование регуляции биосинтеза фенилаланина и тирозина у облигатных метилотрофных бактерий *M. mucogenes* M75 показало, что этот участок ароматического пути у них контролируется путем репрессии синтеза хоризматмутазы и префенатдегидратазы тирозином. Как видно из результатов табл. 5, в условиях лимита этой аминокислоты уровень синтеза хоризматмутазы возрастает в 2,5 раза, а префенатдегидратазы – в 6 раз [23]

Таблица 5. Регуляция синтеза фенилаланина у бактерий *M. mucogenes*

Мутанты	Аминокислоты (мкг/мл)	Удельная активность (нмоль/мин · мг белка)	
		ХМ	ПДТ
дикий тип	без добавок	4,5±0,2	2,3±0,1

M751	фенилаланин (500)	4,8±0,1	1,9±0,02
	тирозин (500)	4,8±0,2	1,9±0,1
	триптофан (500)	4,8±0,2	1,9±0,02
M755	фенилаланин (150)	4,8±0,1	н.о
	фенилаланин (500)	6,7±0,3	н.о
M757	тирозин (200)	13,5±0,5	17,3±0,7*
	тирозин (500)	5,4±0,2	2,6±0,1*
	триптофан (80)	4,3±0,1	2,13±0,1
	триптофан (500)	3,0±0,1	1,65±0,02

Примечания. ХМ – хоризматмутаза, ПДГ – префенатдегидратаза. \* - Различия статистически достоверны при  $p < 0,01$

Изучение этого пути у факультативных метилотрофных бактерий *P. putida* M позволило обнаружить уникальный фермент фенилаланингидроксилазу, широко распространенную лишь среди эукариотических организмов, и осуществляющую превращение фенилаланина в тирозин. У бактерий *P. putida* M этот путь синтеза тирозина является дополнительным к основному: хоризмат → префенат → *n*-оксифенил-пируват → тирозин [30]. Наличие двойного пути синтеза этой аминокислоты создает определенные трудности при получении ауксотрофных  $\text{Tyr}^-$ -мутантов. Для решения этого вопроса был разработан новый способ их отбора,

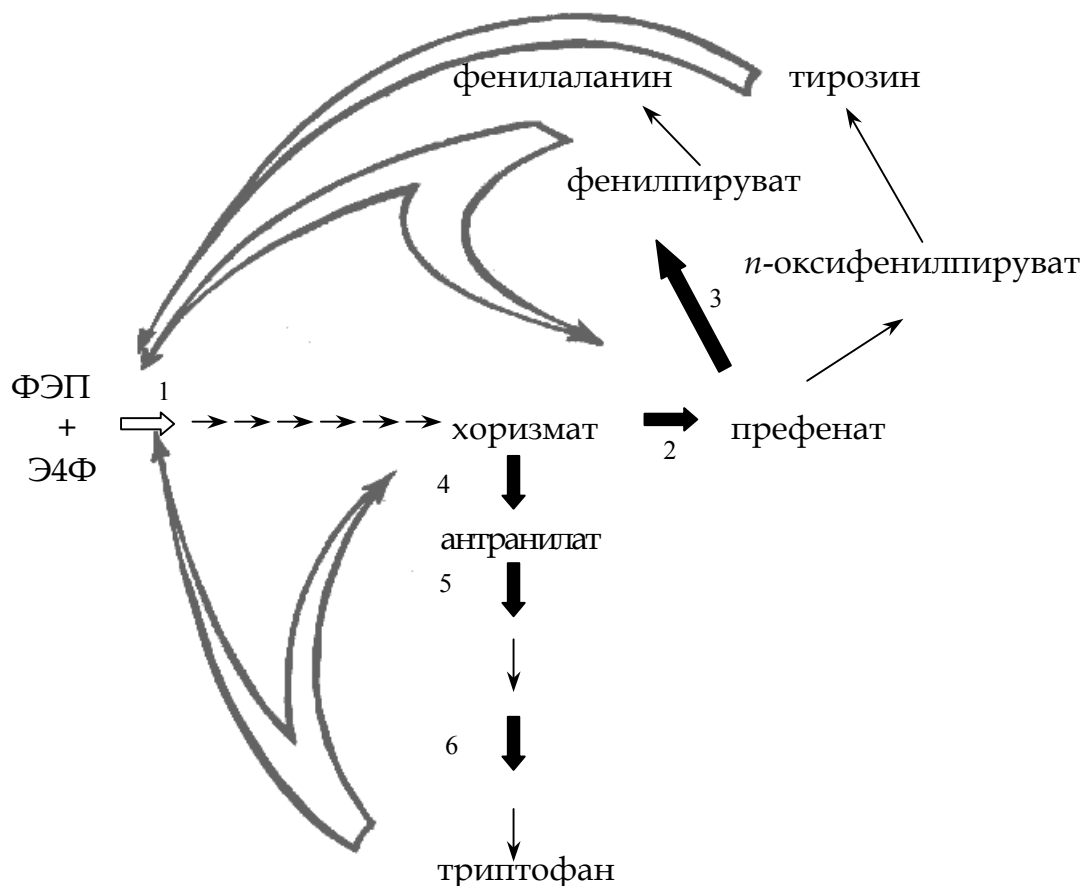
Таблица 6. Ингибирование активности префенатдегидратазы *M. mucogenes* M75

Ингибиторы (0,5 ммоль/л)	Ингибирование (%)
тирозин	0
фенилаланин	84±2,1
триптофан	0
тирозин	44±1,3
фенилаланин	
триптофан	
фенилаланин	49±1,2
тирозин	
фенилаланин	80±1,7
триптофан	

основанный на использовании бактериями фенилаланингидроксилазного пути утилизации фенилаланина в качестве источника углерода и энергии. Его идентификация дала возможность разработать оригинальную методику получения и отбора  $\text{Phu}^-$ ,  $\text{Tyr}^-$ -и  $\text{Tyr}^-$ -

мутантов, которые были использованы для изучения регуляции синтеза фенилаланина и тирозина [30]. В результате было установлено, что у исследуемых бактерий путь синтеза фенилаланина и тирозина на генетическом уровне регулируется в незначительной степени.

При анализе регуляторных механизмов тирозинового пути бактерий *P. putida* M



зарегистрирована репрессия синтеза префенатдегидрогеназы триптофаном и индукция синтеза фенилаланингидроксилазы фенилаланином. Единственным механизмом биохимической регуляции синтеза фенилаланина у данных бактерий является ингибирование активности префенатдегидратазы фенилаланином и триптофаном [31].

Рисунок 3 - Регуляция биосинтеза ароматических аминокислот у *M. tucogenes* M75. 1- ДАГФ-синтаза, 2 - хоризматмутаза, 3 - префенатдегидратаза, 4 - антранилат-синтаза, 5 - антранилат-фосфорибозил-трансфераза, 6 - индол-3-глицерофосфат-синтаза; ФЭП – фосфоенолпируват, Э4Ф - эритрозо-4-фосфат.

⇒ - ретроингибирование, **→** - репрессия.  
⇒

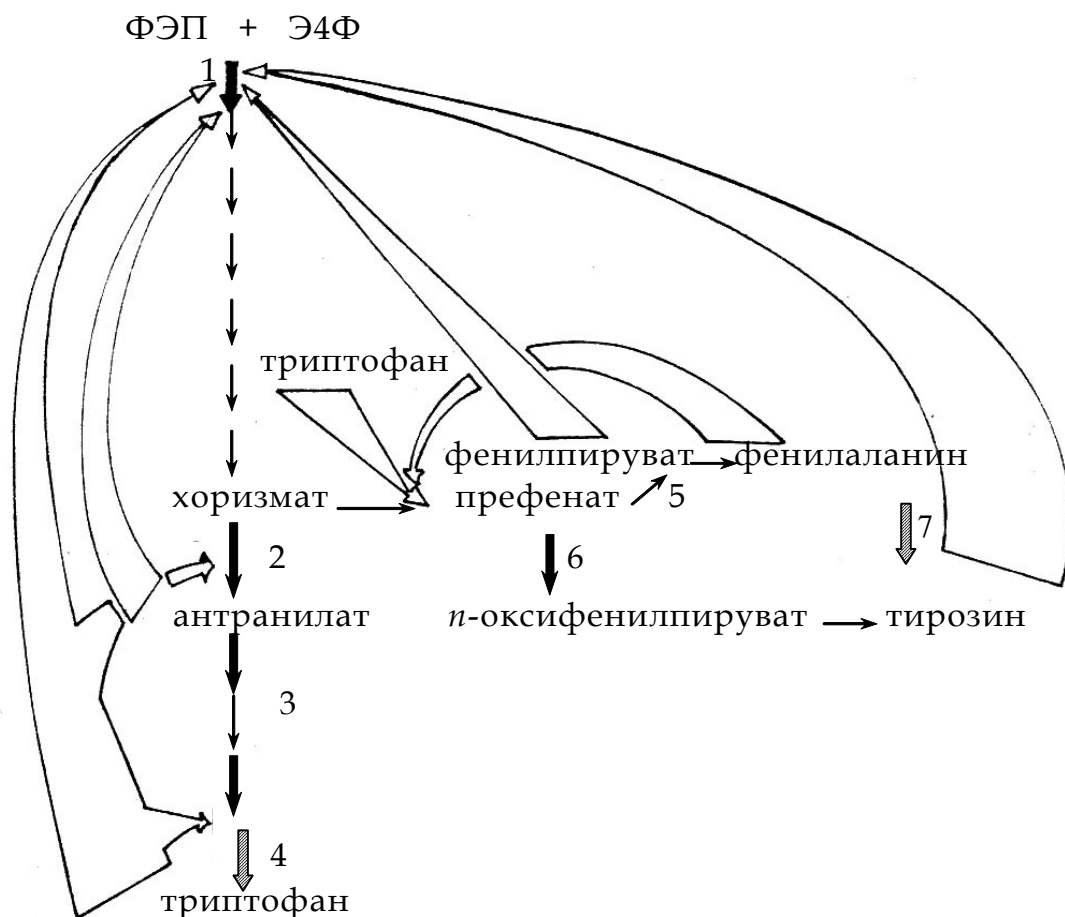


Рисунок 4 - Регуляция синтеза ароматических аминокислот у *P. putida* M. 1- ДАГФ-синтаза; 2 - антранилат-синтаза; 3 - N-5-фосфорибозил-антранилизомераза; 4 - триптофан-синтаза; 5 - префенатдегидратаза; 6 - префенатдегидрогеназа; 7 - фенилаланингидроксилаза.

⇒ - ретроингибирование, → - репрессия, ⇨ - индукция

триптофана важную роль играет группа генов *trpEDC*, экспрессия которых контролируется

негативно триптофаном. Синтез фенилаланина и тирозина у *Methylobacillus* регулируется на уровне *pheA*-гена, а также *tyrA*-гена с помощью триптофана. У облигатных и факультативных метилотрофных бактерий ключевыми ферментами ароматического пути, регуляция которых осуществляется путем ретроингибирования, являются три – ДАГФ-синтаза, антранилат-синтаза и префенатдегидратаза.

## БИОСИНТЕЗ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ АРОМАТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ МЕТИЛОТРОФНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

**Биосинтез 2,3-диоксибензоата.** При дальнейшем анализе возможностей биотехнологического использования метилотрофных бактерий в качестве продуцентов ароматических соединений установлено, что клетки облигатных метилотрофных

бактерий *M. mucogenes* M75 выделяют в среду вещество, идентифицированное как 2,3-диоксибен-зоат.

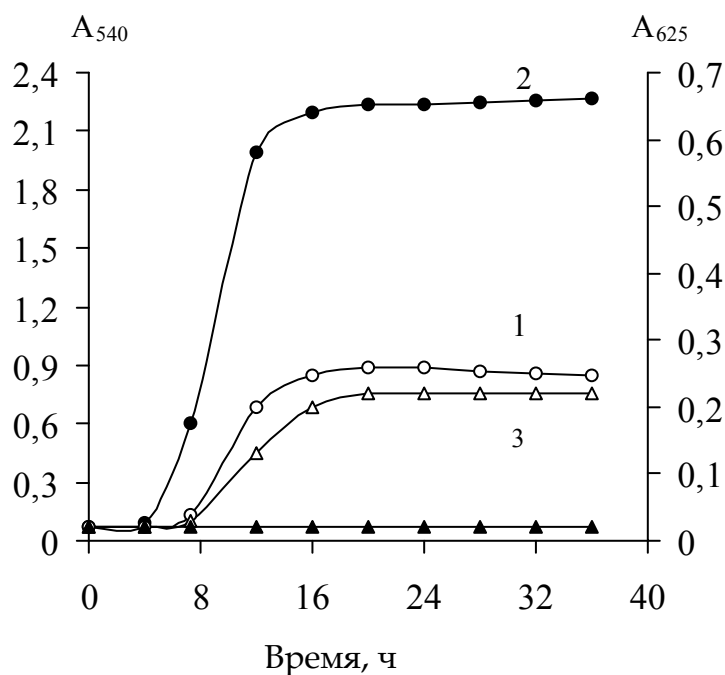


Рисунок 5 - Влияние  $Fe^{3+}$ -ионов на рост культуры *M. mucogenes* M75 и продукцию катехольных соединений. Цифрами обозначены: 1 - кривая роста при лимите  $Fe^{3+}$ -ионов; 2 - кривая роста при избытке  $Fe^{3+}$ -ионов в среде (10 мкг/мл); 3 - продукция катехольных соединений при лимите  $Fe^{3+}$ -ионов; 4 - продукция катехольных соединений при избытке  $Fe^{3+}$ -ионов (10 мкг/мл)

Синтез его осуществляется по известному пути: хоризмат  $\rightarrow$  изохоризмат  $\rightarrow$  2,3-диоксибензоат. Показано, что продукция 2,3-диокси-бензоата репрессируется  $Fe^{3+}$ -ионами (рис. 5), на основании чего был сделан вывод о том, что это соединение является компонентом системы, участвующей в ассимиляции  $Fe^{3+}$ -ионов, и выполняет у бактерий *M. mucogenes* M75 функцию сидерофора. Помимо  $Fe^{3+}$ -ионов на синтез 2,3-диоксибензоата оказывают негативное влияние *n*-аминобензоат, *n*-оксибензоат и антранилат, что указывает на их участие в регуляции метаболизма данного соединения. При изучении способности бактерий *M. mucogenes* M75 синтезировать 2,3-диоксибен-зоат показано, что его выход составляет 180 мг/л, что значительно превосходит известные продуценты [14]. В практическом отношении 2,3-диоксибензоат представляет интерес как стимулятор роста микроорганизмов и может быть рекомендован для этих целей. Интересной является также способность этого соединения связывать кислородные радикалы и защищать клетки от их токсического действия.

**Биосинтез и свойства пиовердина P<sub>m</sub>.** При анализе бактерий факультативного метилотрофного штамма *P. putida* M на предмет способности синтезировать вторичные метаболиты ароматической природы было установлено, что его клетки продуцируют



флуоресцирующий пигмент пиовердин  $P_m$ , обладающий антимикробной активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов, в том числе фитопатогенных. В серии предварительных экспериментов была расшифрована структура пиовердина  $P_m$  и осуществлен его физико-химический анализ. Установлено, что, помимо короткого пептида, включающего пять аминокислот – треонин, серин, лизин, оксиаспарагиновую кислоту и  $N^{\delta}$ -оксиорнитин в молярных соотношениях 3:2:1:1:1, в состав пигмента входит ароматическое соединение – диоксихинолиновый хромофор, обуславливающий физико-химические свойства пигмента и его биологическую активность. Показано, что спектр поглощения пиовердина  $P_m$  характеризуется двумя максимумами поглощения: первый расположен в ультрафиолетовой области спектра (230 нм), а второй – в видимой области (400 нм); при этом положение второго максимума поглощения зависит от pH среды и может смещаться от 378 нм (при pH 5,0) до 407 нм (при pH 9,0) [32].

В ходе работы обнаружено высокое сродство пиовердина  $P_m$  к ионам трехвалентного железа, а также ионам двухвалентных ( $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Sn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) и шестивалентных ( $W^{6+}$  и  $Mo^{6+}$ ) металлов [14]. Это свойство пигмента может быть использовано для разработки новых приемов извлечения тяжелых металлов из различных сред и детоксикации почв.

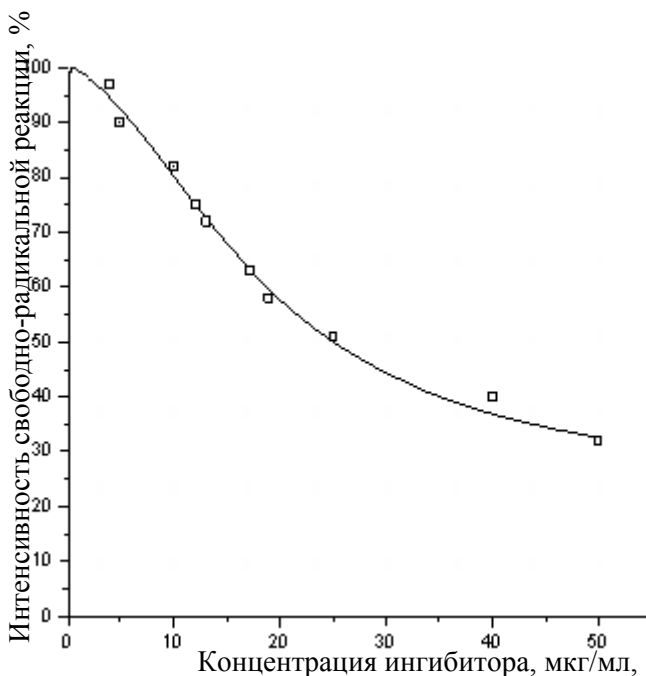


Рисунок 6 - Зависимость перекисного восстановления ПНТХ от концентрации пиовердина  $P_m$ .

Хелатирующая способность пиовердина  $P_m$  позволяет предположить наличие у этого соединения антиоксидантной активности, подобно 2,3-диоксибензоату, меланину и другим полифенолам. Исследование этого свойства, проведенного с использованием

системы перекисного восстановления ПНТХ, показал, что концентрация пигмента, обеспечивающая 50 %-ное ингибирование свободно-радикальных процессов, является достаточно низкой и составляет 25 мкг/мл. При этом степень проявления антиоксидантной активности зависит от концентрации пигмента (рис. 6). Для оценки антирадикальной активности пиовердина  $P_m$  было произведено сравнение его свойств с известными в этом отношении соединениями. Как видно из представленных на табл. 7 результатов, концентрация пигмента, обеспечивающая 50%-ное ингибирование свободно-радикальных процессов ( $I_{50}$ ) для пиовердина  $P_m$  сопоставима с известными антиоксидантами фенольного типа.

Дополнительным доказательством антирадикальной активности пиовердина  $P_m$  должно быть отсутствие таковой у мутантов, дефектных по синтезу пигмента. Такие мутанты были получены с помощью Tn5-транспозонного мутагенеза и использованы для анализа антирадикальной активности. Было установлено, что у обоих  $Pvd^-$  мутантов антиоксидантная активность полностью утрачивается.

Таблица 7. Антиоксидантная активность природных органических соединений

Вещество	$I_{50}$ (мкмоль/л)
Кверцетин*	4,6
Рутин*	15,5
Дигидрокверцетин*	5,4
Пиовердин $P_m$	20,0

Биологической функцией флуоресцирующих пигментов является хелатирование  $Fe^{3+}$ -ионов с образованием прочного комплекса. В связи с этим было проведено исследование антирадикальной активности комплекса пиовердин  $P_m-Fe^{3+}$ . Предполагалось, что экранирование химически активных ОН-групп хелатирующего центра молекулы пиовердина  $P_m$   $Fe^{3+}$ -ионами будет снижать антиоксидантную активность пигмента. Антиоксидантные свойства комплекса исследовали в системе свободно-радикального восстановления ПНТХ.

Как видно из результатов, представленных на рис. 7, ионы  $Fe^{3+}$  значительно снижают антиоксидантные свойства пигмента. В этом случае 50 %-ное ингибирование свободнорадикальной реакции достигалось лишь при концентрации пигмент- $Fe^{3+}$  комплекса, близкой к 70 мкг/мл. Остаточную антиоксидантную активность комплекса

пиовердин  $P_m-Fe^{3+}$  можно объяснить возможным участием в реакции других активных группировок, не связанных с хелатирующим центром молекулы пигмента.

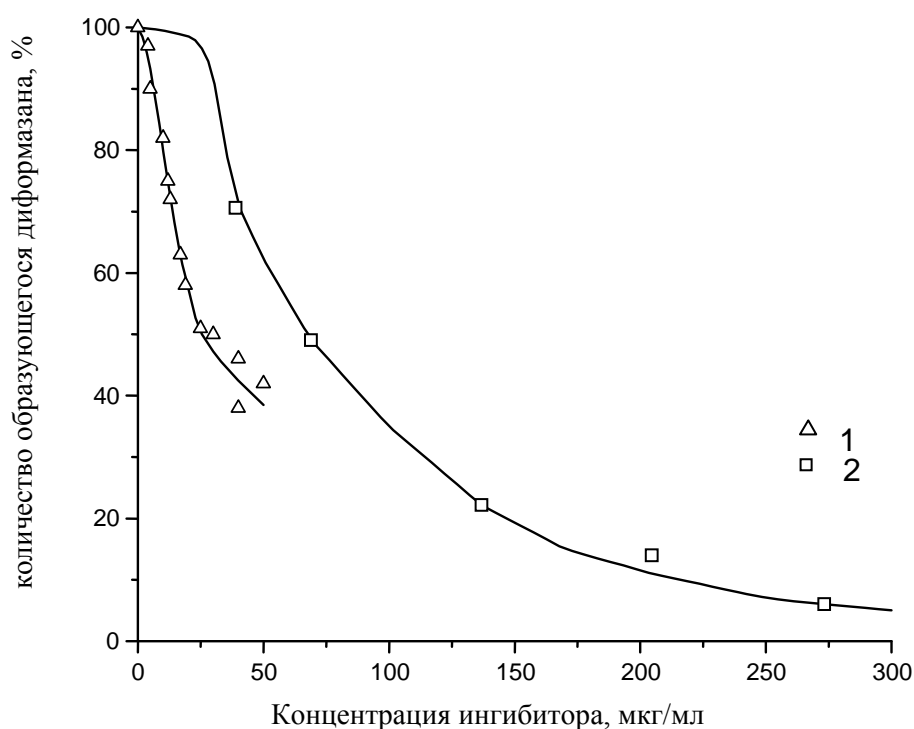


Рисунок 7 - Зависимость свободнорадикальной реакции от концентрации пиовердина  $P_m$  и комплекса пигмент- $Fe^{3+}$ . Цифрами обозначены: 1- пиовердин  $P_m$ ; 2- комплекс пигмент- $Fe^{3+}$

Высокая хелатирующая способность пиовердина  $P_m$  позволила предположить наличие у него достаточно высокой антирадикальной активности, что открывает широкие перспективы использования пигмента в пищевой промышленности и медицине в качестве антиоксидант. Анализ этого свойства у пиовердина  $P_m$ , проведенный в системе перекисного восстановления ПНТХ, показал наличие таковой (50 %-ое ингибирование свободнорадикальных процессов наблюдалось при концентрации пигмента 25 мкг/мл), что сопоставимо с действием меланина и других полифенолов [33]. Установлено, что антиоксидантная активность пигмента связана с его хелатирующей способностью [34,35].

Для выяснение путей и механизмов синтеза ароматической части молекулы пиовердина  $P_m$  был разработан новый генетический подход выявления его биосинтетических предшественников с использованием зависимых по ароматическим аминокислотам и азотистым основаниям мутантов ( $Arg^-$  и  $Pur^-$ -мутантов). Клетки мутантного штамма *P. putida* M1 (*arg1phu1*-генотипа), имеющего блок одного из этапов шикиматного пути, а также дефект фенилаланингидроксилазы – фермента,

превращающего фенилаланин в тирозин, выращивали в условиях лимита и избытка каждой из ароматических аминокислот. В результате было установлено, что продукция пигмента регистрировалась только при избытке в среде L-фенилаланина (100 мкг/мл) (рис. 8), тогда как L-триптофан и L-тирозин в тех же концентрациях подобного действия не оказывали. Аналогичные результаты были получены и в присутствии D-формы фенилаланина. Вместе с тем, при использовании 2,3-диоксибензоата, 3,4-диоксибензоата, 2,4-диоксибензоата, *n*-оксибензоата, *n*-аминобензоата, катехола, салицилата, 3,4-диоксифенилаланина (ДОФА) или антранилата продукция пигмента не восстанавливалась. Было сделано заключение, что пиовердин Р<sub>м</sub> синтезируется у бактерий *P. putida* М только при участии фенилаланина (в D- или L-форме).

Дополнительное доказательство участия фенилаланина в биосинтезе пиовердина Р<sub>м</sub> было получено в экспериментах по включению в его состав меченого <sup>14</sup>С-фенилаланина. Клетки бактерий *P. putida* М1 выращивали в присутствии метки и затем после выделения и очистки пигмента определяли уровень остаточной радиоактивности (табл. 8). Было установлено, что в пигмент переходит 41,7 % радиоактивной метки [36,37].

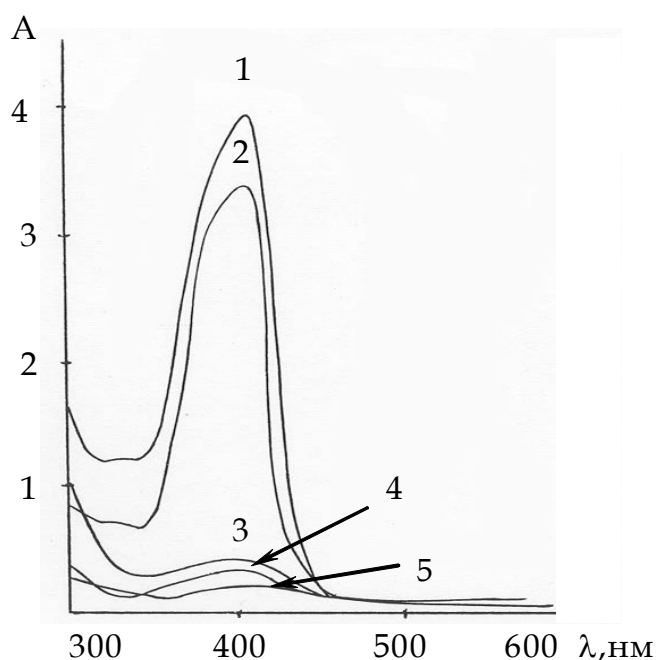


Рис. 8. Продукция пиовердина клетками штамма *P. putida* М1. 1 – при избытке трех аминокислот, 2 – L-фенилаланина, 3 – L-триптофана, 4 – L-тирозина и 5 – лимите трех аминокислот

Таблица 8. Включение  $^{14}\text{C}$ -фенилаланина в молекулу пиовердина  $P_m$

Анализируемый препарат	Концентрация пигмента в усл.единицах	Удельная радиоактивность, мкКи/мл	Доля остаточной радиоактивности (%)
культура в стационарной фазе роста		0,612	100
супернатант после осаждения клеток	9,0	0,282	46,05
препарат очищенного пигмента	5,6*	0,163	26,57

Примечание. \* - Степень разведения раствора пигмента 1,607

С использованием  $\text{Pug}^-$ -мутантов установлено, что вторым биосинтетическим предшественником пиовердина  $P_m$  является дигидрооротат (табл. 9). Было показано, что в норме пигмент синтезируется лишь бактериями, не имеющими дефектов в области  $\text{rugA}$ – $\text{rugC}$ - генов, которые, как известно, кодируют синтез ферментов карбамоилфосфатсинтазы, аспартат-

Таблица 9. Продукция пигмента  $\text{Pug}^-$ -мутантами бактерий *P. putida* M

Штаммы	Продукция пигмента (%)	Антибактериальная активность	Способность пигмента связывать $\text{Fe}^{3+}$ -ионы
$\text{Pug}^+$ (дикий тип)	100,0	+	+
$\text{rugA19}$	0,6	-	н.о.
$\text{rugB2}$	2,9	-	н.о.
$\text{rugCD22}$	28,6	-	±
$\text{rugC41}$	23,13	-	±
$\text{rugD7}$	100,0	+	+
$\text{rugE32}$	100,0	+	+

Примечание. н.о. – Не определяли

транскарбамоилазы и дигидрооротаза. С другой стороны, мутации в этих генах вызывали либо полную утрату способности к пигментообразованию (мутации  $\text{rugA}$ - и  $\text{rugB}$ -генов), либо существенно снижали его синтез с одновременным изменением характерных для него свойств (мутация  $\text{rugC}$ -гена). Дефекты  $\text{rugD}$ - и  $\text{rugE}$ -генов, контролирующих синтез дигидрооротатдегидрогеназы и оротатфосфорибозилтрансферазы, не влиял на

образование пигмента [38,39]. В процессе изучения генетической и физиологической регуляции синтеза пиовердина  $P_m$  показано, что его синтез репрессируется ионами  $Fe^3$  и других металлов ( $Ni^{2+}$ ,  $Sn^{2+}$ ,  $W^{6+}$ ), а также глюкозой. Оптимальными условиями для синтеза пигмента являются: температура 28-30°C, pH среды 6,0-8,0 и источник углерода сукцинат 0,2-0,4 % [14].

Угнетающее действие на синтез пигмента оказывали также аскорбиновая кислота, N,N-диэтилдитиокарбомат и сульфосалицилат. Кроме того, синтез предшественника диоксихинолинового ядра пигмента – дигидрооротата – регулируется посредством ингибирования активности аспартат-транскарбамоилазы нуклеотидами (ЦТФ, ГТФ, УТФ) и пирофосфатом, а также стимуляции фенилаланином. Участие фенилаланина в регуляции активности аспартат-транскарбамоилазы является достаточно интересным фактом и подтверждает наличие связи между пиримидиновым и фенилаланиновым путями в процессе синтеза изучаемого пигмента [38,39].

На основании полученных результатов предложена гипотетическая многоэтапная схема синтеза пиовердина  $P_m$  (рис. 9). Логическим продолжением исследований в этом направлении явилась детализация предложенной схемы, в частности, ее первого этапа, предусматривающего включение фенилаланина в пигмент при взаимодействии с дигидрооротатом. С помощью биохимических и генетических подходов было показано, что наиболее вероятным предшественником пиовердина  $P_m$  является производное фенилаланина – фенилацетамид.

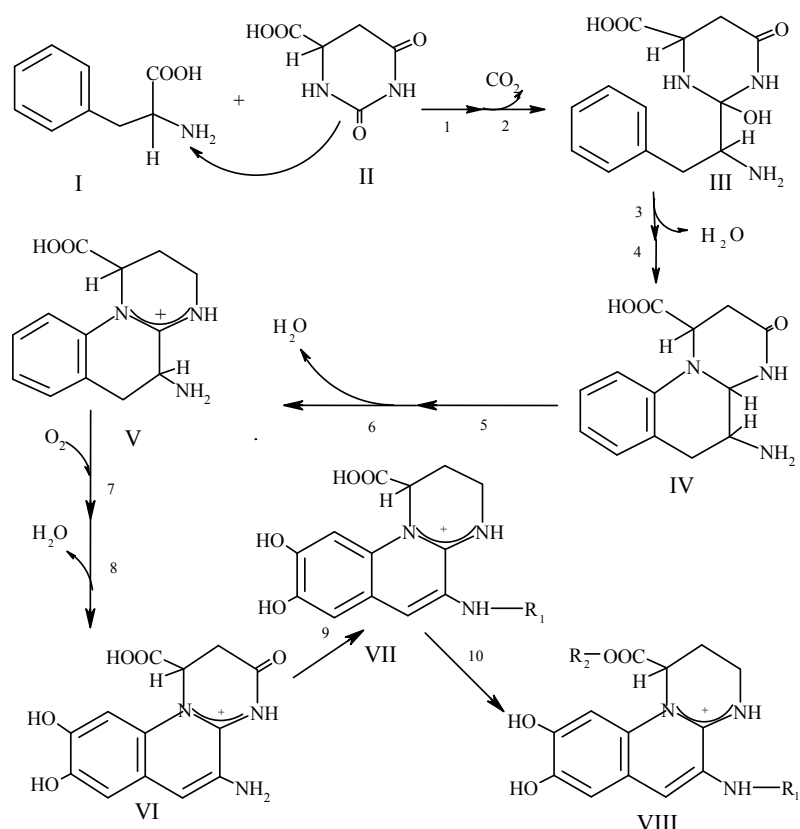


Рисунок 9 - Предполагаемая схема пути синтеза диоксихинолинового ядра пиовердина  $P_m$  из фенилаланина и дигидрооротата у бактерий *P. putida* M. I – фенилаланин; II – дигидрооротат; III – VII – предполагаемые предшественники; VIII – пиовердин  $P_m$ .  $R_1$  - карбоновая кислота или ее амид.  $R_2$  - пептидная часть

Обнаруженная в ходе исследований антимикробная активность пиовердина  $P_m$  в отношении ряда фитопатогенных бактерий и грибов, послужила основанием для более детального исследования этого феномена и проведения работ прикладного плана по созданию на основе синтезирующих этот пигмент метилотрофных бактерий *P. putida* M биопрепарата для защиты растений. Исследование антагонистической активности данного штамма в отношении 771 культуры микроорганизмов, большинство из которых являются представителями фитопатогенной микрофлоры растений, показало чрезвычайно высокую антимикробную (подавляет рост более 95,9 % культур) активность изучаемых бактерий [14,40,41]. Не менее интересным свойством бактерий *P. putida* M оказался их фитостимулирующий эффект [42,43], связанный, вероятно, с антиоксидантной активностью пигмента. Стимулирующее действие *P. putida* M зарегистрировано в отношении 24 сельскохозяйственных культур. На уровне проростков увеличение основных показателей роста возрастало в 2-4 раза [40,41].

Полученные данные аргументировали вывод, что штамм *P. putida* M является перспективным объектом агробιοтехнологии и может быть использован для создания на его основе биопрепарата широкого спектра противомикробного действия, обладающего одновременно антиоксидантной активностью, а также способностью стимулировать рост растений. Такой препарат был разработан под коммерческим названием Бактофил.

### **Заключение**

Таким образом, проведенное исследование метилотрофных бактерий позволило сделать ряд важных обобщений, вскрыть новые закономерности биологических процессов и продемонстрировать, что метилотрофные бактерии представляют существенный интерес как в теоретическом отношении, так и в плане их практического использования.

На примере ароматического пути метилотрофных бактерий подтверждена общность механизмов регуляции метаболизма (наличие генетического контроля экспрессии генов путем репрессии или индукции, а также регуляции активности ферментов с помощью ретроингибирования) у широкого круга бактерий, независимо от их систематического положения и филогенетического родства. Универсальной оказалась также схема расположения ключевых звеньев ароматического пути, на уровне которых функционируют регуляторные механизмы: это первый этап общего участка

ароматического пути, контролируемый ДАГФ-синтазой, первый этап пути синтеза триптофана, контролируемый антранилат-синтазой, и два первых этапа синтеза фенилаланина и тирозина, контролируемых хоризматмутазой и префенатдегидратазой (префенатдегидрогеназой), соответственно. Сходство обнаружилось также и по таким параметрам, как изоферментный состав ДАГФ-синтазы (двух- или трехизоферментный), наличие генетической регуляции синтеза данного фермента, кластерность некоторых генов (в частности, группы trpEDC- и trpAB-генов) в плане регуляции их экспрессии, сверхсинтез ароматических аминокислот в случае направленной дерегуляции синтеза, способность к синтезу вторичных метаболитов и др.

К числу новых закономерностей можно отнести выявленную у облигатных метилотрофных бактерий связь ассимиляции  $C_1$ -соединений (КДФГА/ТА варианта РМФ-цикла) и ароматического метаболизма. Роль связующих элементов при этом играют промежуточные продукты РМФ-цикла – эритрозо-4-фосфат и фосфоенолпируват, являющиеся одновременно субстратами ДАГФ-синтазы. Установлена корреляция между уровнем активности данного фермента и способностью бактерий синтезировать ароматические соединения. Этот феномен может быть использован в качестве критерия для отбора перспективных в биотехнологическом отношении штаммов, разработки новых принципов реализации их биосинтетического потенциала, а также создания штаммов-продуцентов и получения ценных микробных метаболитов ароматической природы. Поиск среди метилотрофных бактерий продуцентов ароматических метаболитов вторичного происхождения позволил обнаружить среди них природные продуценты 2,3-диоксибензоата и флуоресцирующего пигмента пиовердина  $P_m$ , обозначить возможные аспекты их практического использования и продемонстрировать, что изучаемая группа бактерий пригодна для получения не только первичных, но и вторичных микробных метаболитов ароматической природы.

#### Литература

1. Biology Methylophs // Ed.I.Galdbegg, J.S.Rokem, Ierusalem, Israel. Butterworth-Heinemann. – 1991. – 349 p.
2. К 100-летию открытия метанотрофии: труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского.- Вып. 13. – М.: Наука, 2006. – 343 с.
3. Штамм бактерий *Pseudomonas methylica*, используемый для очистки сточных вод от метанола: а.с. 1620479 СССР, МКИ С 112 N 1/20 / А.С. Самсонова, Н.Л.Маркова, З.М Слизень и др. – № 4488070/13; заявл. 28.09.88; опубл. 10.01.91 // Открытия. Изобрет. – 1991. – № 4. – С. 4.
4. Штамм бактерий *Methylobacillus sp. 75*, используемый в качестве тест-культуры для определения метанола и метиламина: пат. 1973 Респ. Беларусь, МПК С12 N1/20, С12 Q1/06 / Максимова Н.П.,



Доброжинская Е.В., Фомичев Ю.К. – № 1969; заявл. 13.06.1994; опубл. 4.08.1997 // Афіцыйны бюл. / Дзярж. пат. ведамства Рэсп. Беларусь. – 1997. – № 1. – С. 3.

5. Консорциум штаммов бактерий *Pseudomonas sp.* и *Methylobacillus methanolovorius*, разлагающих метилацетат: а.с. 1687608 СССР, МКИ С 12 N 1/20. / Д.Ю. Раков. – № 475857/13; заявл. 28.08.89; опубл. 30.10.91 // Открытия. Изобрет. – 1991, № 40. – С. 4.

6. Максимова, Н.П. Регуляция биосинтеза ароматических аминокислот у метилотрофных бактерий / Н.П. Максимова, И.Н. Олехнович, Ю.К. Фомичев // Биохимия и физиология микроорганизмов: сб. ст. – Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1987. – С. 77-85.

7. Максимова, Н.П. Генетика и биохимия биосинтеза ароматических соединений метилотрофными микроорганизмами / Н.П. Максимова // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2: Химия. Биология. География. – 1996. – № 3. – С. 51–54.

8. Доброжинская, Е.В. Использование бактерий *Methylobacillus mucogenes* M75 для утилизации метанола / Е.В. Доброжинская, В.В. Щерба, Н.П. Максимова // Биотехнология. – 1995. – № 5-6. – С. 30–31.

9. Budzikiewicz, H. Secondary metabolites from fluorescent pseudomonas / H. Budzikiewicz // FEMS Microbiol. Rev. – 1993. – Vol. 104, N 3-4. – P. 209-228.

10. Максимова, Н.П. Видовая идентификация метанолутилизирующих бактерий *Pseudomonas sp.* / Н.П. Максимова // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2: Химия. Биология. География. – 1991. – № 3. – С. 40-45.

11. Доброжинская, Е.В. Характеристика нового облигатного метилотрофа *Methylobacillus M75* / Е.В. Доброжинская, Н.П. Максимова // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2: Химия. Биология. География. – 1994. – № 3. – С. 32–36.

12. Доброжинская, Е.В. Регуляция биосинтеза ароматических аминокислот у облигатных метилотрофных бактерий *Methylobacillus mucogenes* M75 / Е.В. Доброжинская, Н.П. Максимова // Достижения современной биологии и биологическое образование: тр. науч. конф., посвящ. 75-летию биол. фак. БГУ, Минск, 1997 г. // Белорус. гос. ун-т: В.М. Юрин [и др.]. – Минск, 1997. – С. 101–107.

13. Максимова, Н.П. Регуляция активности и синтеза 3-дезоксид-аробиногептулозонат-7-фосфат-синтазы у облигатного метилотрофа *Methylobacillus flagellatum* КТ / Н.П. Максимова, Ю.К. Фомичев // Молекул. генет., микробиол. и вирусол. – 1991. – № 9. – С. 6–9.

14. Биосинтез биологически активных соединений ароматической природы микроорганизмами / Н.П. Максимова [и др.] // Выбранные научные работы Беларускага дзяржаўнага ўніверсітэта. Біялогія. Геаграфія. / Беларус. дзярж. ун-т; пад рэд. І. І. Пірожнік. – Мн.: БДУ, 2001. – Т. 7. – С. 102-126.

15. Штамм *Pseudomonas species* M3 – тест-объект для определения продукции L-триптофана: а.с. 1191464 СССР, МКИ<sup>4</sup> С12 Q1/04 / Н.П. Максимова, И.Н. Олехнович, Р.А. Желдакова, Ю.К. Фомичев. – № 42; заявл. 25.05.84; опубл. 15.11.85 // Открытия. Изобрет. – 1986. – № 1. – С. 12.

16. Штамм *Pseudomonas species* M9 – тест культура для определения L-фенилаланина: а.с. 1254005 СССР, МКИ<sup>4</sup> С12 P13/22. / Н.П. Максимова, И.Н. Олехнович, Р.А. Желдакова, Ю.К. Фомичев. – № 32; заявл. 1.03.85; опубл. 30.08.86 // Открытия. Изобрет. – 1986. – № 12. – С. 18.

17. Штамм *Pseudomonas species* M7 – тест культура для определения L-тирозина: а.с. 1254006 СССР, МКИ<sup>4</sup> С12 P13/22 / И.Н. Олехнович, Н.П. Максимова, Ю.К. Фомичев. – № 32; заявл. 03.01.85; опубл. 30.08.86 // Открытия. Изобрет. – 1986. – № 12. – С. 18.

18. Штамм бактерий *Pseudomonas sp.*, используемый в качестве тест-культуры для определения никотиновой кислоты: а.с. 1535893 СССР, МКИ<sup>4</sup> С12 N15/00, 1/20, С12 Q1/00. / Н.П. Максимова, И.Н. Олехнович, Ю.К. Фомичев. – № 4343600/31-13; заявл. 14.12.87; опубл. 15.01.90 // Открытия. Изобрет. –

1990.– № 2.– С. 8.

19. Штамм *Pseudomonas species* – продуцент триптофансинтазы: а.с. 1441923 СССР, МКИ<sup>4</sup> С12 N9/88 / И.Н. Олехнович, Н.П. Максимова, Ю.К. Фомичев.–№ 4208726/31-13; заявл. 10.03.87; опубл. 30.11.88 // Открытия. Изобрет.– 1988.– № 44.– С. 4.

20. Олехнович, И.Н. Триптофановый оперон факультативных метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp.* М. I. Выделение и характеристика ауксотрофных Тг<sup>+</sup>-мутантов / И.Н. Олехнович, Н.П. Максимова, Ю.К. Фомичев // Генетика.– 1985.– Т. 21, № 7.– С. 1099–1104.

21. Штамм *Pseudomonas species* М35 – продуцент L-триптофана на этаноле: а.с. 1206306 СССР, МКИ<sup>4</sup> С12 Р13/22. / Н.П. Максимова, И.Н. Олехнович, Р.А. Желдакова, Ю.К. Фомичев. – № 3; заявл.06.07.84; опубл. 23.01.86 // Открытия. Изобрет.– 1986.– № 3.– С. 14.

22. Олехнович, И.Н. Репрессия синтеза и ретроингибирование 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат-синтазы факультативных метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp.* М / И.Н. Олехнович, Н.П. Максимова, Ю.К. Фомичев // Молекул. генет., микробиол. и вирусол.– 1986, № 12.– С. 34–36.

23. Максимова, Н.П. Регуляция биосинтеза фенилаланина у облигатного метилотрофа *Methylobacillus* М75 / Н.П. Максимова, Е.В. Доброжинская, Ю.К. Фомичев // Молекул. генет., микробиол. и вирусол.– 1990.– № 10.– С. 28–30.

24. Максимова, Н.П. Регуляция синтеза 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат-синтазы у бактерий *Pseudomonas* / Максимова Н.П., Олехнович И.Н., Ю.К. Фомичев // Генетика.–1991.– Т.27, № 2.– С. 217–221.

25. Максимова, Н.П. Регуляция биосинтеза ароматических аминокислот у облигатных метилотрофных бактерий *M. mucogenes* М75 / Н.П. Максимова, Е.В. Доброжинская, Ю.К. Фомичев // Изв. РАН. Сер. биол. наук.– 2000.– № 4.– С. 428–437.

26. Олехнович, И.Н. Триптофановый оперон факультативных метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp.* М. II. Регуляция синтеза триптофана / И.Н. Олехнович, Н.П. Максимова, Ю.К. Фомичев // Генетика.– 1985.– Т. 21, № 10.– С. 1627–1633.

27. Способ определения 5-фосфо-рибозилпирофосфата: а.с. 1264705 СССР, МКИ<sup>4</sup> С12 Р13/22. / И.Н. Олехнович, Н.П. Максимова, Ю.К. Фомичев. № 55; заявл. 22.01.85; опубл. 15.06.86.– С. 6.

28. Способ получения 5-фосфо-рибозилпирофосфат-синтазы: а.с. 1255639 СССР, МКИ<sup>4</sup> С12 11 9/00. / И.Н. Олехнович, Н.П. Максимова, Ю.К. Фомичев. – № 33; заявл. 28.01.85; опубл. 07.09.86 // Открытия. Изобрет.– 1986.– № 12.– С. 15.

29. Максимова, Н.П. Триптофановый оперон факультативных метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp.* М III. Характеристика регуляторных 5-МТ<sup>R</sup>-мутантов / Н.П. Максимова, И.Н. Олехнович, Ю.К. Фомичев // Генетика.– 1986.– Т. 22, № 2.– С. 194–199.

30. Олехнович, И.Н. Получение Туг<sup>+</sup>-мутантов факультативных метилотрофных бактерий *Pseudomonas sp.* М / И.Н. Олехнович, Н.П. Максимова, Ю.К. Фомичев // Генетика.– 1986.– Т. 22, № 4.– С. 705–708.

31. Олехнович, И.Н. Регуляция биосинтеза фенилаланина и тирозина у факультативных метилотрофных *Pseudomonas sp.* М7 // И.Н. Олехнович, Н.П. Максимова, Ю.К. Фомичев // Генетика.– 1987.– Т. 23, № 3.– С. 414–420.

32. Максимова, Н.П. Характеристика флуоресцирующего пигмента пиовердина Р<sub>м</sub> *Pseudomonas putida* М / Н.П. Максимова, О.В. Блажевич, В.В. Лысак, Ю.К. Фомичев / Микробиология.– 1994.– Т. 63.– № 5.– С. 220–226.

33. Кулешова, Ю.М. Определение антирадикальных свойств бактериального сидерофора пиовердина  $P_m$  / Ю.М. Кулешова, Н.П. Максимова, В.А. Костюк // Новости мед.-биол. наук. – 2005. – №2. С. 46-49
34. Кулешова, Ю.М. Характеристика антирадикальной активности бактериального пигмента пиовердина  $P_m$  // Ю.М. Кулешова, Н.П. Максимова // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2: Химия. Биология. География.– 2006. – № 1. – С. 57-60.
35. Кулешова, Ю.М. Получение бактерий *Pseudomonas putida* КМБУ4308, способных к сверхпродукции пигмента пиовердина  $P_m$  / Ю.М. Кулешова, М.В. Камаева, Н.П. Максимова // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2: Химия. Биология. География.– 2006. – № 2. – С. 48-52.
36. Максимова, Н.П. Роль фенилаланина в биосинтезе флуоресцирующего пигмента у *Pseudomonas putida* / Н.П. Максимова, О.В. Блажевич, Ю.К. Фомичев / Микробиология.– 1992.– Т. 61, № 5.– С. 818–823.
37. Блажевич, О.В. Биосинтез флуоресцирующего пигмента пиовердина  $P_m$  у ризосферных бактерий *Pseudomonas putida* М / О.В. Блажевич, Н.П. Максимова // Изв. РАН. Сер. биол. наук.– 1994.– № 2.– С. 205–210.
38. Максимова, Н.П. Роль пиримидинов в биосинтезе флуоресцирующего пигмента пиовердина  $P_m$  у *Pseudomonas putida* М / Н.П. Максимова, О.В. Блажевич, Ю.К. Фомичев // Молекул. генет., микробиол. и вирусол.– 1993.– № 5.– С. 22–26.
39. Блажевич, О.В., Биосинтез пиримидинов бактериями *Pseudomonas putida* М / О.В. Блажевич, Н.П. Максимова // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2: Химия. Биология. География.– 1993.– № 2.– С. 21–26.
40. Штамм бактерий *Pseudomonas sp.* М – продуцент сидерофоров, подавляющих рост фитопатогенных бактерий: а.с. 1621508 СССР, МКИ<sup>4</sup> С12 Р13/22. / Н.П. Максимова, В.В. Лысак, Ю.К. Фомичев. – № 86; заявл. 04.10.88; опубл. 15.09.90. – С. 9.
41. Комарова, М.С. Изучение возможностей использования бактериальных препаратов в борьбе с галловой нематодой в условиях защищенного грунта / М.С. Комарова, Н.П. Максимова, И.А. Баева // Защита растений. – № 5.– 2001.– С. 25.
42. Штамм бактерий *Pseudomonas putida* – биостимулятор роста растений: пат. 2051586, РФ, МКИ 6 А01 N 63/00, С12 N1/20, С12 R1:40 / Н.П. Максимова, В.В. Лысак, О.В. Игнатович, Ю.К. Фомичев.– № 2051586; заявл. 12.07.91; опубл. 10.01.96 // Изобретения.– 1996.– № 1.– С. 3.
43. Лысак, В.В. Теоретические и прикладные аспекты создания биопрепаратов для защиты растений / В.В. Лысак, Н.П. Максимова // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2: Химия. Биология. География.– 2001.– № 3.– С. 56–64.