

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПИОВЕРДИНА P_m – НОВОГО
АНТИРАДИКАЛЬНОГО СОЕДИНЕНИЯ, СИНТЕЗИРУЕМОГО БАКТЕРИЯМИ
PSEUDOMONAS PUTIDA КМБУ 4308**

Кулешова Ю.М., Максимова Н.П., Блажевич О.В, Семак И.В.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Бактерии рода *Pseudomonas* уже давно привлекают внимание исследователей, так как способны синтезировать широкий спектр различных биологически активных соединений. Особый интерес вызывают представители так называемой флюоресцирующей группы, выделяющие в среду культивирования специфические водорастворимые пигменты – пиовердины – выполняющие функцию сидерофоров. К этой группе относятся ризосферные бактерии *Pseudomonas putida* КМБУ 4308, стимулирующие рост растений и проявляющие антибактериальную, антифунгальную и антинематодную активности [5]. Установлено, что антимикробным агентом *P. putida* КМБУ 4308 является желто-зеленый флюоресцирующий пигмент пиовердин P_m , обладающий железохелатирующей активностью [1]. В связи с этим представлялось интересным получить чистый препарат пиовердина, изучить его структуру и свойства.

Методы исследований

В работе использовали штамм бактерий *P. putida* КМБУ 4308 [4]. Бактерии выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл в 100 мл жидкой минимальной среды, освобожденной от ионов Fe^{3+} [12], на основе солевого концентрата Канада [10]. В качестве источника углерода и энергетического субстрата использовали сукцинат (0,4 %). Культивирование бактерий осуществляли при 28 °С в течение 48 ч. Клетки осаждали путем центрифугирования при 5000 об/мин. Выделение пигмента из освобожденной от клеток культуральной жидкости осуществляли путем замораживания-оттаивания. Очистку пигмента проводили с помощью колоночной хроматографии (Биогель Р6, колонка 10×450 мм, элюция 0,2 М ацетатным буфером, рН 7,0) а также с помощью ионообменной хроматографии (амберлит XAD-4, элюция 50% раствором этанола). Для связывания пигмента с ионами металлов в водный раствор пиовердина добавляли соли соответствующих металлов, взятых в избыточном количестве. Очистку полученных комплексов проводили с помощью повторной колоночной хроматографии на биогеле Р6. Для исследования антирадикальной активности пиовердина P_m и его комплексов с ионами металлов использовали систему супероксид-зависимого восстановления Nitrotetrazolium Blue chloride «Fluka» (NBT) [2]. Для определения концентрации пиовердина P_m использовали полученную ранее калибровочную кривую зависимости оптической

плотности раствора препарата пигмента от его концентрации [3]. Для определения молекулярной массы пигмента препарат пиовердина P_m анализировали на жидкостном хроматографе с масс-спектрометрическим детектором LCMS-QP8000a (Shimadzu, Japan). Аликвоту образца объемом 20 мкл наносили на обратнофазную колонку Restec Allure C18 (150 x 4.6 мм; 60 Å). Элюцию осуществляли мобильной фазой, состоящей из растворов А (H_2O , 0.1 % уксусная кислота) и В (ацетонитрил, 0.1 % уксусная кислота) со скоростью 0.75 мл/мин при 40 °С. В течение первых 30 мин выдерживали линейный градиент раствора А (концентрация от 20 до 50 %), затем 20 мин раствора В (концентрация от 50 до 100 %), после чего элюцию проводили раствором В (концентрация 100 %) в изократическом режиме в течение 10 мин. Спектры поглощения регистрировали в потоке с помощью детектора на основе фотодиодной матрицы SPD-M10Avp (Shimadzu, Japan). Масс-спектрометрический анализ проводили, используя в качестве источника ионов электроспрей-интерфейс, настроенный на положительную ионизацию. Регистрацию вели в сканирующем режиме в диапазоне масс 500-1300. Аминокислотный состав пигмента определяли следующим образом: 17 мг очищенного препарата пигмента подвергали гидролизу 6N HCl или 6N HJ при 105 °С в течение 24ч, выпаривали и ресуспендировали в 5мл буфера А [13] для HCl-гидролизата либо буфере Б [8] для HJ. Для нанесения на колонку использовали по 0,1 мл полученных растворов. Аминокислотный анализ гидролизатов пигмента осуществляли с помощью аминокислотного анализатора Т339 (ЧССР). Спектрофотометрические измерения проводили с использованием спектрофотометра Cary 50 scan (Varian, Australia).

Результаты исследований и обсуждение

В результате изучения физико-химических свойств выделенного и очищенного пиовердина P_m было показано, что спектр поглощения пигмента характеризуется двумя пиками:

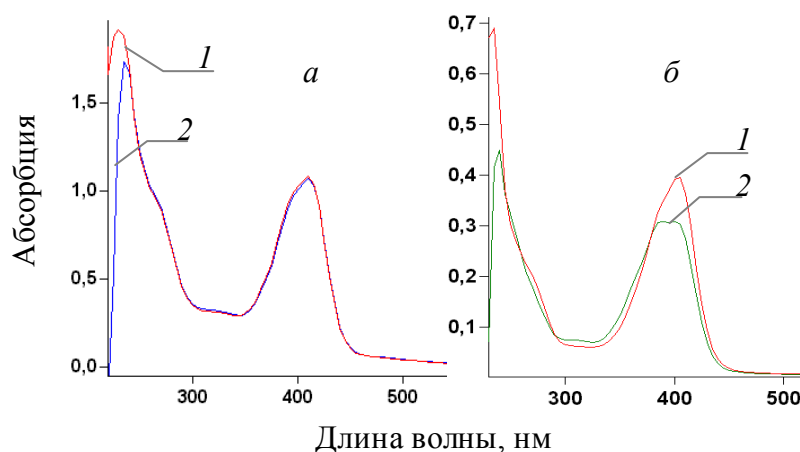


Рис. 1. Спектр поглощения комплекса пиовердин- Mn^{2+} (а) и чистого пиовердина P_m (б) при pH 7,2(1) и pH 6,5(2)

в ультрафиолетовой (230 нм) и видимой области (405 нм) при рН 7,0, при этом положение второго максимума является рН-зависимым (рис. 1).

Биологической функцией всех пиовердинов является хелатирование ионов Fe^{3+} с образованием прочного комплекса [13]. Как было показано ранее, кроме ионов Fe^{3+} пиовердин P_m может связывать также ионы Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} и других металлов [1]. Проведенные в данной работе исследования показали, что пиовердин P_m также способен взаимодействовать с ионами Mn^{2+} . При этом максимум поглощения в видимой области спектра смещается в область 409 нм (рис. 2), утрачивается зависимость его местоположения от рН, а также способность к флуоресценции в УФ свете. Вышеперечисленные изменения свойств пигмента свидетельствуют об образовании комплекса пиовердин P_m - Mn^{2+} .

Ранее было установлено, что пиовердин P_m , синтезируемый *P. putida* КМБУ 4308, относится к сидерофорам катехольно-гидроксаматного типа и состоит из трех структурно-функциональных частей, представленных хромофором (диоксихинолиновым ядром), дикарбоновой кислотой (или ее амидом) и пептидной цепью. Видоспецифичным является только аминокислотный состав белковой части пигмента, которая включает обычно не более 6 – 12 аминокислот [6]. Аминокислотный анализ гидролизованного 6 н НСI пиовердина P_m позволил обнаружить в его молекуле четыре аминокислоты: треонин, серин, лизин, оксиаспарагиновую кислоту (рис. 2) в молярных соотношениях 3 : 2 : 1 : 1. Отсутствие в анализируемых образцах N^{δ} -оксиорнитина, являющегося обязательным составным элементом пептидной части всех флуоресцирующих пигментов [9], по-видимому, связано с его деградацией в процессе длительного НСI-гидролиза, на возможность чего указывалось ранее [13]. Для обнаружения N^{δ} -оксиорнитина в молекуле пиовердина P_m был проведен гидролиз пигмента с использованием 6 н НI, в результате чего в продуктах гидролиза был обнаружен орнитин в эквимольном количестве соотношениях с лизином (другие аминокислоты не определялись) (рис. 2).

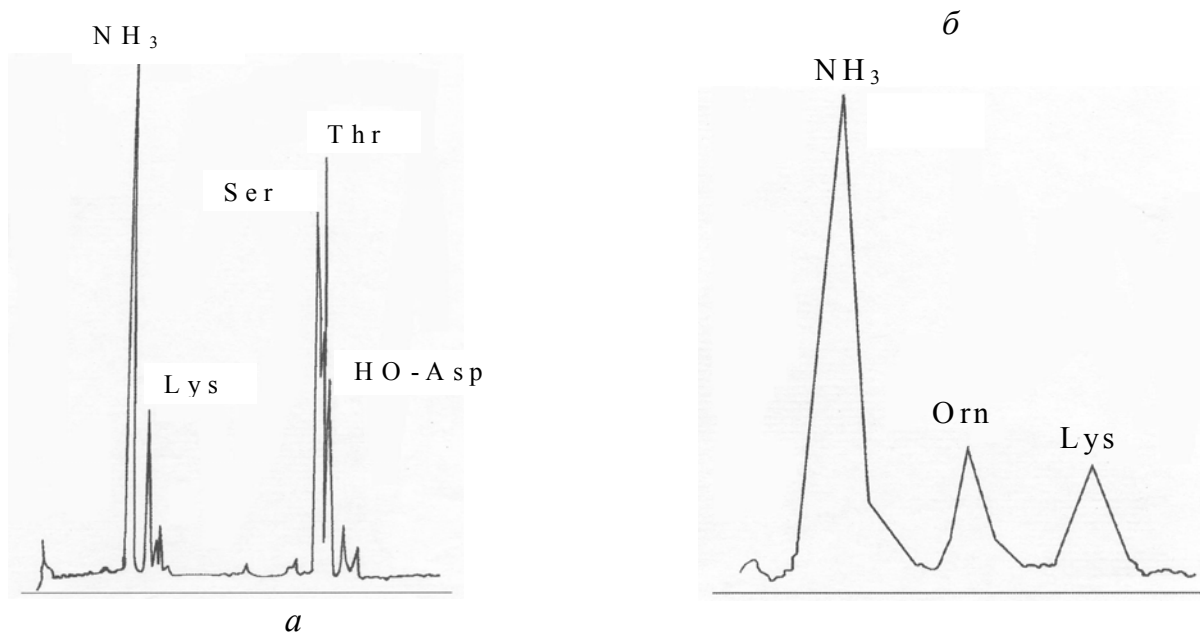


Рисунок 2 - Аминокислотный анализ гидролизатов пиовердина P_m (а) 6N HCl - гидролизата. и (б) 6N HCl - гидролизата пигмента.

Поскольку орнитин в HJ-гидролизатах является продуктом превращения N^δ -оксиорнитина под действием иодоводородной кислоты, можно утверждать, что в молекуле пиовердина P_m содержится 1 моль N^δ -оксиорнитина. Итак, было показано, что в состав пиовердина P_m входят четыре аминокислоты: треонин, серин, лизин, оксиаспарагиновая кислота и N^δ -оксиорнитин в молярных соотношениях 3:2:1:1:1 соответственно. Так как соотношение аминокислот в данном исследовании было нормализовано по отношению к лизину, то для точного определения молекулярной массы было необходимо провести масс-спектрометрический анализ пигмента. Результаты проведенного анализа представлены на рис.2.

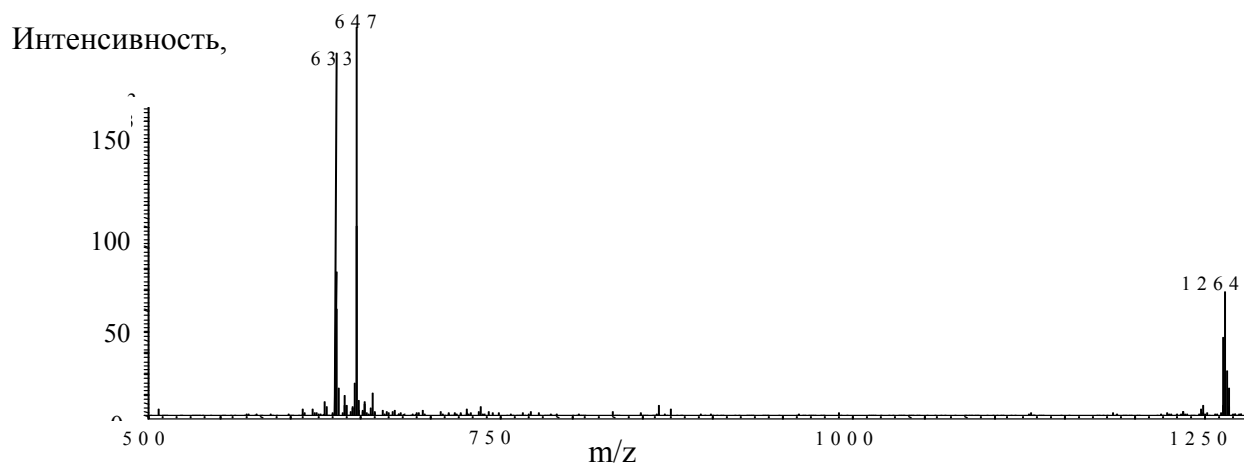


Рисунок 3 - Масс-спектр пиовердина P_m Примечание: m/z –соотношение массы к заряду

Как видно из полученных результатов, молярная масса пиовердина P_m равна 1211 г/Моль и полностью соответствует расчетной.

Известно, что в состав диоксихинолинового ядра входит катехольная единица, две реакционно-активные ОН-группы которой находятся в C_8 - и C_9 -положении. Кроме того, две других ОН-группы входят в состав гидроксильированных производных N^δ -оксиорнитина и N -оксиаспарагиновой кислоты, находящихся в пептидном хвосте пигмента. Перечисленные группы обеспечивают железосвязывающие свойства пиовердинов [7, 13]. Ранее нами было показано, что хелатирующая активность пиовердина P_m связана с проявлением его антирадикальной активности [2]. Ингибирующий эффект пиовердина P_m в отношении свободнорадикальных процессов зависел от его концентрации и проявлялся уже при 4 мкг/мл (рис. 4). При этом 50%-ое ингибирование свободнорадикальной реакции (I_{50}) наблюдалось при $25 \pm 2,5$ мкг/мл, а максимальный уровень (около 90 %) – при 90 мкг/мл. С учетом установленной молярной массы пигмента (1211 г/Моль) его I_{50} составляет около 20 мкМ и приближается к таковой для антирадикальных соединений флавоноидной природы [11].

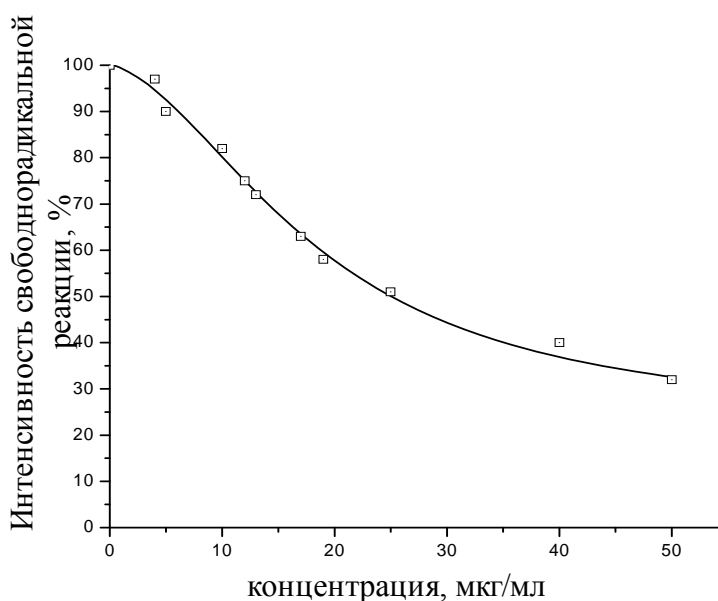


Рис.4. Зависимость интенсивности свободнорадикальной реакции от концентрации пиовердина P_m

Как упоминалось ранее, пиовердин P_m может связывать также ионы Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} и других металлов [1]. Однако антирадикальная активность таких соединений исследована не была. Поэтому представлялось интересным изучить данные свойства комплексов пиовердина P_m с ионами металлов. Предполагалось, что экранирование химически

активных ОН-групп хелатирующего центра молекулы пиовердина P_m ионами будет снижать ан-тирадикальную активность пигмента.

Для определения концентрации комплексов пигмент-ион металла использовали калибровочную кривую зависимости оптической плотности раствора очищенного препарата пиовердина P_m от его концентрации [3] с учетом поправки на коэффициент пересчета (К) для комплекса каждого из металлов (табл. 1). Коэффициент К определяли с помощью следующей формулы:

$$K = A_m / A_{405}, \text{ где}$$

A_m – величина максимума поглощения комплекса пигмент – ион металла при соответствующей длине волны (λ_{\max}) и рН 7,0.

A_{405} – величина максимума поглощения очищенного пигмента при длине волны 405 нм и рН 7,0.

Таблица 1. Коэффициенты пересчета концентрации комплексов пиовердин P_m -ион металла

Ион металла	λ_{\max}	Коэффициент К
Fe^{3+}	395	1,38
Cu^{2+}	410	1,21
Co^{2+}	414	1,66
Zn^{2+}	415	1,42
Mn^{2+}	410	1,21
Чистый пиовердин	405	1

Поправка калибровочной кривой на коэффициент К обусловлена тем, что при образовании комплекса пигмент-ион металла изменяются физико-химические свойства пиовердина, что, в свою очередь, приводит к изменению его спектральных характеристик [1].

Анализ антирадикальной активности комплексов пиовердин P_m -ион металла показал, что ионы железа значительно снижают антиоксидантные свойства пиовердина P_m (рис. 5). При этом 50 % ингибирование свободно-радикальной реакции достигалось лишь при концентрации пигмент- Fe^{3+} комплекса, близкой к 70 мкг/мл. Полного исчезновения антирадикальной активности комплекса пигмент- Fe^{3+} зарегистрировано не было, что может быть результатом проявления антирадикальной активности химических группировок молекулы пиовердина, не связанных с хелатирующим центром пигмента, так как диссоциация данного комплекса маловероятна [12].

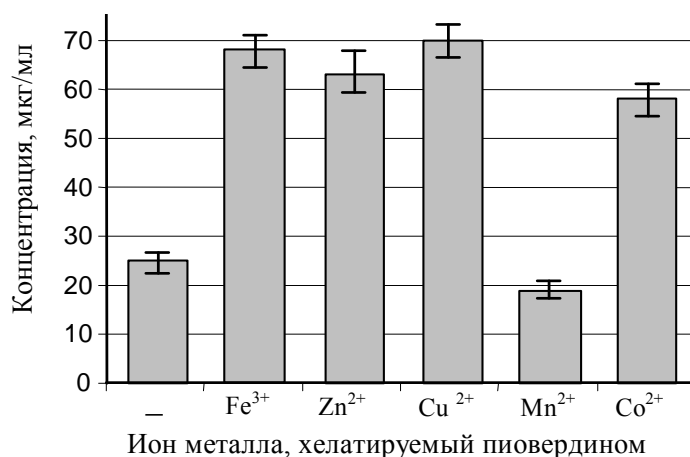


Рис. 5. Концентрация комплексов пиовердин- ион металла, необходимая для подавления 50% свободно-радикальной реакции (I_{50})

Аналогичная картина наблюдалась и при анализе антирадикальных свойств комплекса пиовердина P_m - Cu^{2+} . Хелатирование ионов Co^{2+} и Zn^{2+} также снижало антирадикальную активность пигмента, хотя и в несколько меньшей степени.

Напротив, при связывании пиовердина с ионами Mn^{2+} снижения антирадикальной активности зарегистрировано не было. Этот интересный феномен показан впервые и может быть объяснен химическими либо конформационными изменениями в молекуле пиовердина P_m , происходящими при образовании комплекса пигмент-ион Mn^{2+} . Не исключено, что в процессе свободнорадикальной реакции также может происходить диссоциация комплекса.

Таким образом, в ходе данной работы был выделен, очищен и изучен флуоресцирующий пигмент бактерий *P. putida* КМБУ 4308 пиовердин P_m . Установлено, что в состав пептидной части пигмента входят восемь аминокислот: треонин, серин, лизин, оксиаспарагиновая кислота и N^{δ} -оксиорнитин в молярных соотношениях 3:2:1:1:1 соответственно, а молекулярная масса пигмента равна 1211 г/Моль. Показано, что антирадикальная активность пиовердина P_m близка к таковой биофлавоноидов, а концентрация, необходимая для 50%-го ингибирования свободнорадикальных процессов в системе перекисного восстановления НТВ составляет около 20 мкМ. Антирадикальная активность исследуемого флуоресцирующего пигмента зависит от иона металла, с которым взаимодействует данный сидерофор. Установлено также, что кроме уже известных в этом отношении ионов (Fe^{3+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , W^{6+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Mo^{6+} , Sn^{2+}) пиовердин P_m способен связывать ионы Mn^{2+} .

Литература

1. 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.
2. Кулешова, Ю.М. Определение антирадикальных свойств бактериального сидерофора пиовердина P_m / Ю.М. Кулешова, Н.П. Максимова, В.А. Костюк // Новости медико-биологических наук. – 2005. – № 2. – С. 46–49.
3. Кулешова, Ю.М. Характеристика антирадикальной активности бактериального пигмента пиовердина P_m / Ю.М. Кулешова, Н.П. Максимова // Вестн. Белорусс. гос. ун-та. Сер.2, Химия. Биология. География. – 2006. – №1. – С.57–60.
4. Максимова, Н.П. Видовая идентификация метанолутилизирующих бактерий *Pseudomonas sp.* М / Н.П. Максимова // Вестн. Белорусс. гос. ун-та. Сер.2, Химия. Биология. География. – 1991. – №3. – С.40–45.
5. Штамм бактерий *Pseudomonas putida* – биостимулятор роста растений: пат. 2051586, РФ, МКИ 6 A01 N 63/00, C12 N1/20, C12 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.
6. Budzikiewicz, H. Secondary metabolites from fluorescent *Pseudomonas* / H. Budzikiewicz // FEMS Microbiol. Rev. Buyer J., Wright J., Leong J. – 1993. – Vol.104, № 3-4. – P. 209–217.
7. Buyer, J. Structure of Pseudobactin A214, a siderophore from a bean-deleterious *Pseudomonas* / J. Buyer, J. Wright, J. Leong // Biochemistry – 1986. – Vol. 25, №19. – P. 5492–5499.
8. Cody, Y.S. Characterization of pyoverdin PSS, the fluorescent siderophore produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* / Y.S. Cody, D.C. Gross // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – Vol. 53, № 2. – P.928–934.
9. Demange, P. *Pseudomonas* siderophores: Structure and physicochemical properties of pyoverdins and related peptides / P. Demange [et. al] // Second Forum on Peptides. – 1989. – Vol. 174, №1. – P. 95–98.
10. Kaneda, T. A methanol utilizing bacterium / T. Kaneda, J. Roxburg // Canad. J. Microbiol. – 1959. – Vol. 5, № 2. – P.187–198.
11. Kostyuk, V.A. Antiradical and chelating effects in flavonoid protection against silica-induced cell injury / V.A. Kostyuk, A.I. Potapovich // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1998. – Vol. 355, № 1. – P. 43–48.
12. Meyer, J.M. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescent*: biosynthesis, purification and physicochemical properties / J.M. Meyer, M.A. Abdallah // J. Gen. and Appl. Microbiol. – 1978. – Vol. 107, №1. – P. 319–328.
13. Teintze, M. Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *pseudomonas* / M. Teintze [et al.] // Biochemistry. – 1981. – Vol. 20, №36. – P.6446–6457.