

ШТАММ *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA* – ПРОДУЦЕНТ УГЛЕВОДОВ, ЯВЛЯЮЩИХСЯ ПРОИЗВОДНЫМИ ДИГАЛАКТУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

В. Е. Мямин, А. Г. Песнякевич

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь, pesnyakevich@bsu.by

Производные дигалактуроновой кислоты 5-кето-4-дезоксиглюконат, 2,5-дикето-3-дезоксиглюконат и 2-кето-3-дезоксиглюконат образуются в клетках фитопатогенных бактерий в процессе использования ими пектинов - полимеров, входящих в клеточную стенку растительных организмов. Эти вещества способны влиять на продукцию основных факторов патогенности возбудителей болезней растений, обеспечивая через ряд посредников специфическую экспрессию структурных генов ферментов пекто-, целлюло- и протеолитических комплексов. Кроме того, от этих веществ зависит не только синтез, но и секреция этих внеклеточных ферментов.

В настоящее время уделяется большое внимание изучению сложных систем регуляции продукции и секреции факторов патогенности фитопатогенных бактерий и грибов, поскольку получаемые в таких исследованиях сведения необходимы для разработки мер борьбы с возбудителями болезней сельскохозяйственных растений. Для проведения экспериментов подобного рода используются промежуточные метаболиты пути утилизации пектинов, получаемые либо с помощью ферментов бактериального происхождения, либо путем химической модификации углеводов без участия ферментов.

Неферментативный способ получения 2-кето-3-дезоксиглюконата либо его аналогов более затратен и трудоемок, в силу чего менее популярен, и большинство исследователей использовали клеточные экстракты или же очищенные ферменты бактерий. Исходными веществами в таких процессах были глюкуроновая, альтроновая кислоты и 2,5-дикето-3-дезоксиглюконат для получения 2,5-дикето-3-дезоксиглюконата - ненасыщенная дигалактуроно́вая кислота и 5-кето-4-дезоксиглюконат. В большинстве описанных случаев в качестве субстратов использовались химически чистые продукты и очищенные препараты ферментов.

В ходе проводимых в лаборатории молекулярной генетики бактерий при кафедре микробиологии Белгосуниверситета исследований нами были получены мутантные по гену *kduD* - одному из генов пути утилизации пектиновых веществ - бактерии *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* JN42 P177. Одной из особенностей этих бактерий является накопление в культуральной жидкости продуктов деградации дигалактуроновой кислоты при выращивании в средах, содержащих пектин или полигалактуроно́вую кислоту. Общее количество этих веществ в культуральной жидкости выращенных до стационарной фазы в минимальной среде с глицерином и 0,5% полипектата натрия бактерий, определенное с использованием окисления углеводов периодатом и последующей реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), составляло 8,5 μM /мл. Нисходящая хроматография на бумаге показала, что накапливающиеся углеводы представляют собой смесь 5-кето-4-дезоксиглюконата, 2-кето-3-дезоксиглюконата и 2,5-дикето-3-дезоксиглюконата с преобладанием последнего из этих соединений. Это и послужило основанием для использования культуральной жидкости бактерий данного штамма для получения очищенных метаболитов.

Для разделения накапливающихся в культуральной жидкости углеводов использовали метод ионообменной хроматографии на анионообменной смоле Dowex 1 x 8 в формиатной форме. С целью концентрирования 2,5-дикето-3-дезоксиглюконата

проводили его переосаждение на такую же ионообменную смолу, но в колонке меньшего объема. Для этого из раствора следовало удалить муравьиную кислоту, что можно было сделать путем ее экстракции кратным объемом диэтилового эфира. Поскольку растворимость муравьиной кислоты в воде выше, чем у эфира, для ее максимального удаления требовались большие количества диэтилового эфира, что делало такой путь не экономичным. Поэтому мы применили метод регенерации использованного эфира, для чего синтезировали палладиевый катализатор, в присутствии которого муравьиная кислота разлагается даже при комнатной температуре. Регенерированный таким образом эфир использовали для экстракции муравьиной кислоты из водного раствора многократно, что и позволило при минимальных затратах эфира в течение 16 этапов экстракции снизить концентрацию муравьиной кислоты с 0,48 mM/мл до 0,025 mM/мл без снижения концентрации 2,5-дикето-3-дезоксиглюконата.

Следующим этапом работы было получение 2-кето-3-дезоксиглюконата путем восстановления 2,5-дикето-3-дезоксиглюконата в присутствии пиридиннуклеотид-связанной 2,5-дикето-3-дезоксиглюконатдегидрогеназы (KduD). Поскольку нами уже было установлено накопление при культивировании мутантных по гену *kduD* бактерий *E. coli* P177 значительных количеств 2,5-дикето-3-дезоксиглюконата, решено было и для этих целей использовать культуральную жидкость, а в качестве содержащего 2,5-дикето-3-дезоксиглюконатдегидрогеназу ферментативного препарата - экстракт клеток штамма *E. coli* 3-2 JN42, выращенного для индукции синтеза KduD в жидкой питательной среде с полипектатом натрия. Такой клеточный экстракт при содержании белка 12,8 мг/мл имел специфическую активность фермента KduD 800 единиц/мг белка. Очистку и концентрирование 2-кето-3-дезоксиглюконата проводили по схеме, аналогичной таковой для очистки 2,5-дикето-3-дезоксиглюконата.

Применение полученных препаратов в экспериментах по изучению генетической регуляции факторов патогенности у бактерий *Erwinia carotovora* и *Erwinia chrysanthemi* показало, что качество полученных таким образом препаратов позволяет выявить особенности экспрессии генов, участвующих во взаимодействии этих фитопатогенов с растениями-хозяевами. Поскольку и у других обладающих пектолитическими свойствами фитопатогенных и сапротрофных бактерий промежуточные метаболиты пути утилизации пектиновых веществ могут играть регуляторную роль, использование таких препаратов для изучения их метаболизма может найти широкое применение.

Проведенное нами получение промежуточных метаболитов пути утилизации пектинов не потребовало никаких существенных затрат на подготовительных этапах благодаря использованию легко нарабатываемой культуральной жидкости бактерий *E. coli* P177, клеточного экстракта бактерий *E. coli* 3-2 JN42 и, фактически, в качестве исходного вещества доступного и относительно дешевого полипектата натрия или пектина.