



УДК 547.996.021/22:577.1.02

© 1992 Г.Б.Еляков, В.А.Стоник, Т.А.Кузнецова,
В.В.Михайлов

НЕКОТОРЫЕ ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ МОРСКОЙ БИОХИМИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
Владивосток*

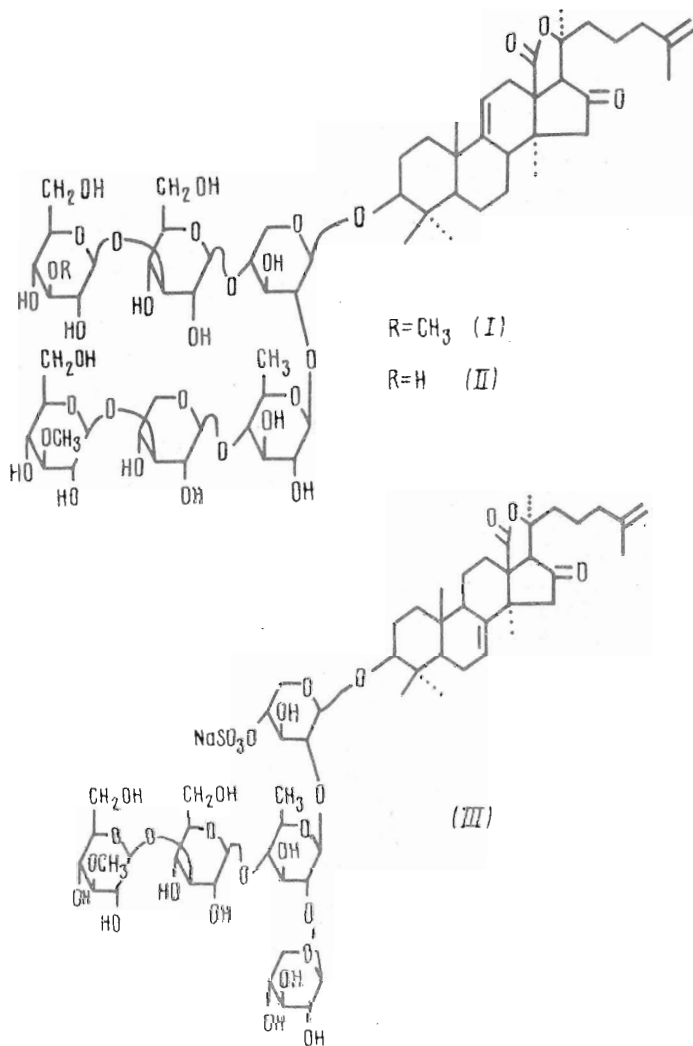
Приведены литературные и собственные данные, касающиеся исследований биологически активных веществ морских макро- и микроорганизмов. Показано, что морские природные соединения имеют ряд структурных особенностей по сравнению с соответствующими соединениями из других источников. Высказаны соображения о перспективах развития морской биохимии и биотехнологии.

В последние годы быстро развиваются исследования в области химии морских природных соединений и биохимии морских организмов, возникла морская биотехнология [1-4]. Если еще 10-15 лет назад достижения химиков-природников, изучающих морское природное сырье, представлялись как ряд совершенно неожиданных и уникальных находок, то к настоящему времени эта область превратилась в один из продуктивных и наиболее обширных разделов биоорганической химии.

Большое внимание ученых к этой области живой природы связано, очевидно, со следующими обстоятельствами. Во-первых, известно более 500 тысяч видов морских животных и растений, химическое изучение которых еще совсем недавно было явно недостаточным. Во-вторых, условия обитания морских организмов, а именно высокая соленость среды, недостаточная освещенность, значительное давление толщи воды, узкий диапазон температур и т.п., сильно отличаются от таковых для наземных организмов, что выражается в существовании ряда особенностей биосинтеза и метаболизма биомолекул в морских организмах. В-третьих, большинство из них является филогенетически значительно более древними, чем обитатели суши. За длительное время эволюции морских беспозвоночных возникли мощные и разнообразные химические средства борьбы за существование, в том числе: токсины, вещества, тормозящие рост опухолей, сигнальные соединения, противовирусные агенты и т.п.

1. Биологически активные вещества из морских макроорганизмов

Целенаправленный поиск физиологически активных веществ в экстрактах морских беспозвоночных привел к обнаружению и выделению высокоактивных по отношению к различным биосистемам соединений. Так, из нескольких видов асцидий получены производные β -карболина (так



называемые эудистомины) и циклические пептиды — дидемнины, проявляющие высокую противовирусную активность. Ряд эффективных противовирусных соединений найден в губках и водорослях [5]. Обладающие высокой токсичностью для опухолевых клеток бриостатины из мшанок, арабинонуклеозиды из губок и другие морские метаболиты интересны как основа для создания соответствующих лекарств нового поколения. В частности, дидемнин В и бриостатин-1 успешно проходят в США клинические испытания в качестве антираковых средств [5].

Большое внимание фармакологов привлекли и тритерпеновые гликозиды из морских огурцов — животных, относящихся к типу Echinodermata (Иглокожие). В частности, голотоксин — сумма гликози-

дов (I, II) из дальневосточного трепанга *Stichopus japonicus*, строение которых определено японским профессором Китагава и нами [6, 7], применяется в Японии в качестве антигрибкового средства, а другое родственное вещество, кукумариозид A₂-2 (III) [8], используется в нашей стране в ветеринарии как сильный иммуностимулятор.

Значительный прогресс, достигнутый в изучении токсинов морского происхождения, имел важное значение при выяснении механизмов проведения нервного импульса. Без таких важных биохимических инструментов, как тетродотоксин, сакситоксин и другие морские токсины, практически невозможно представить теперь исследования натриевой проводимости, других процессов, протекающих на возбудимых мембранах.

Удалось не только установить полную структуру одного из самых токсичных и сложных по химическому строению небелковых низкомолекулярных метаболитов — палитоксина, но и синтезировать его. Несомненно, что соответствующие работы Хирата, Мура и Киши представляют собой подлинный триумф современной биоорганической химии [9—11].

Успешно развивались в последние годы исследования токсинов морских микроводорослей и симбионтных последних бактерий. В частности, с помощью рентгеноструктурного анализа определена уникальная, включающая в себя 11 кислородсодержащих циклов структура бреветоксинов [12].

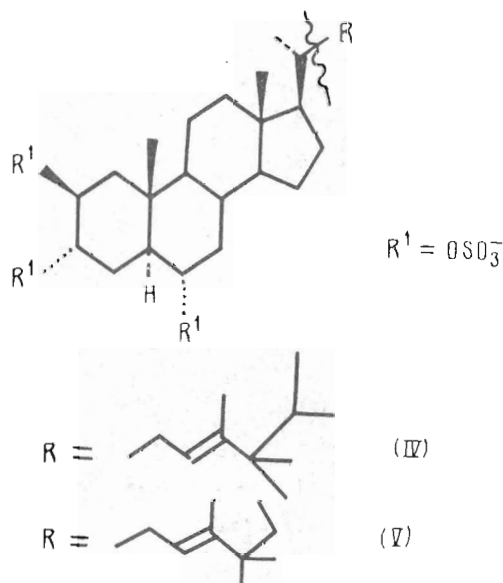
Из нескольких тысяч полученных за последние 10 лет морских природных соединений самая многочисленная группа принадлежит к так называемым экологически активным веществам. К ним относятся морские алломоны (вещества, с помощью которых одни организмы морских сообществ воздействуют на другие) и морские кайромоны (сигнальные вещества, дающие преимущества тем видам, которые их воспринимают). Алломоны и кайромоны морских организмов представляют собой стабильные, в основном низкомолекулярные соединения, действующие на межвидовом уровне. К алломонам кроме токсинов принадлежат также разнообразные отпугивающие вещества — репелленты. Отпугивающим действием обладает значительное количество недавно полученных морских терпеноидов, имеющих в своем составе атомы галогенов или такие редкие функциональные группы, как изонитрильная, изотиоцианатная, карбамидная и др. [3]. Из стероидных производных следует упомянуть так называемые павонины из рыбы *Pardachirus marmoratus*, обладающие способностью эффективно отпугивать акул [13].

Среди морских кайромонов известны вещества, выделяемые хищниками и предупреждающие реципиентов об опасности, вещества, привлекающие к пище, и др. Предполагается, что эти соединения, как и морские феромоны, удастся использовать в аквакультуре для ускорения развития гидробионтов и регуляции их поведения. Примерами морских сигнальных соединений — кайромонов являются якоренон из некоторых видов водорослей, вызывающий оседание личинок морского гребешка, и алкалоиды из морских звезд, которые воспринимаются жертвами этих животных — моллюсками, вызывая у последних так называемую реакцию убежания [14].

Интересно, что зрение и слух не играют у морских животных столь большой роли, как у наземных организмов. Слабое развитие этих органов чувств во многом компенсируется у морских беспозвоночных их высокой чувствительностью к выделяемым в воду сигнальным соединениям.

Оба фактора — и обитание в специфической морской среде, и повышенная потребность в химической регуляции межвидовых и внутривидовых отношений — наложили свой отпечаток на особенности химического строения вторичных метаболитов морского происхождения. Во многих ра-

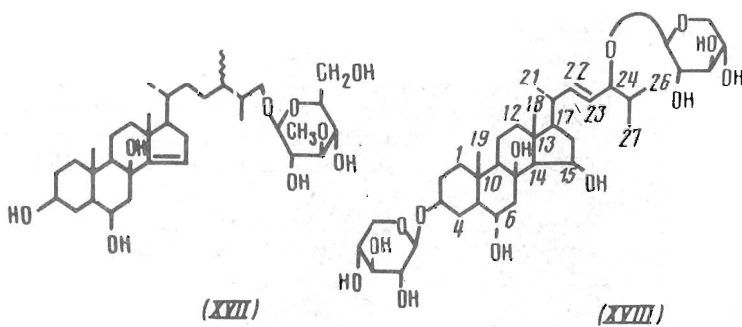
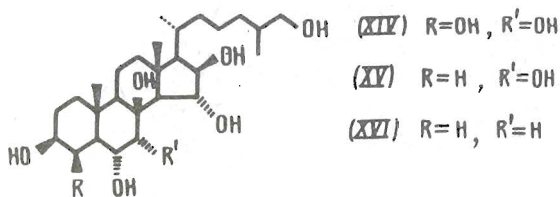
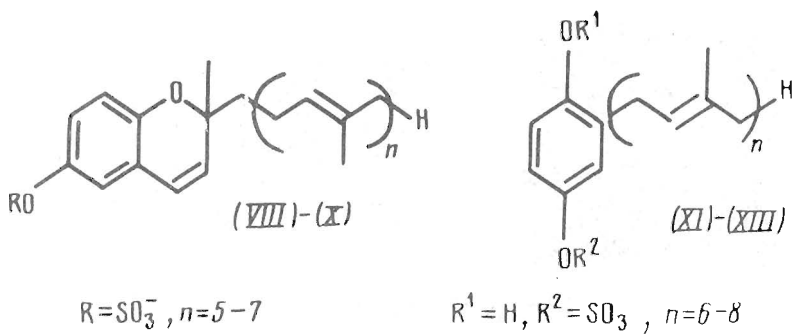
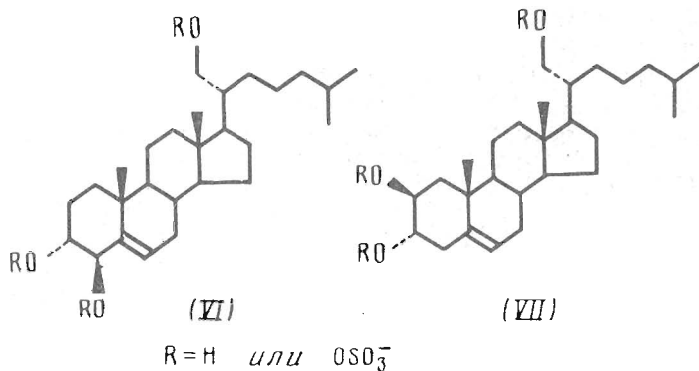
ботах показана способность морских организмов утилизировать некоторые растворенные в морской воде компоненты и включать их в состав своих метаболитов. К таким компонентам относятся галогены, прежде всего бром, а также сульфат-анион. Содержание галогенированных соединений, например, в водорослях бывает очень высоким и достигает 5% сухого веса. Многочисленные сульфатированные соединения, также широко представленные в морских организмах, на протяжении многих лет изучались в нашем институте. Так, сульфатированные метаболиты из губок семейства *Halichondriidae* оказались мощными ингибиторами некоторых ферментов, а сульфатированные стероидные полиолы из офиур проявили сильный иммуномодулирующий эффект [15–20].



К первой группе относятся такие необычные полиолсульфатированные стероиды, как сокотрастеринсульфат (IV) и норсокотрастеринсульфат (V), в молекулах которых не только присутствуют три сульфатные группы, но и имеются уникальные высокоалкилированные боковые цепи, существенно отличающиеся от соответствующих фрагментов других стероидов. Среди полученных нами стероидных сульфатов из экстрактов офиур можно отметить соединения общих формул (VI) и (VII), имеющие от одной до трех сульфатных групп.

Интересные по строению и обладающие антиоксидантными свойствами нестероидные сульфаты (VIII–XIII) мы получили недавно из экстрактов губки *Sarcotragus spinulosus* [21].

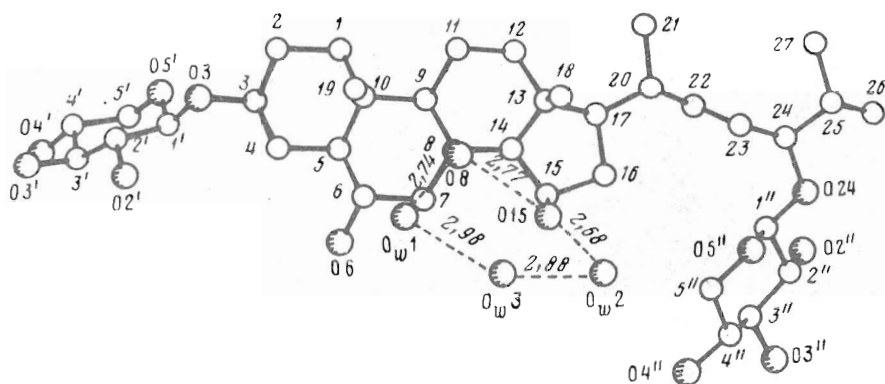
Сульфатированные вторичные метаболиты морских организмов относятся к так называемым бифильным соединениям и обладают гидрофильными и гидрофобными структурными фрагментами, что позволяет такого рода веществам, с одной стороны, иметь хорошую растворимость в



воде и быстро в ней диффундировать, а с другой — взаимодействовать с мембранами соответствующих рецепторов у реципиентов.

Необходимая бифильность может достигаться не только за счет сульфатирования, но и другими способами — гликозилированием, глубоким гидроксильрованием и т.п. Действительно, в морских беспозвоночных нами найдено много высокоокисленных стероидных и нестероидных производных, например стероидных полиолов типа (XIV)–(XVI) [22, 23], астеросапонинов, например (XVII), (XVIII) и др. [23, 24].

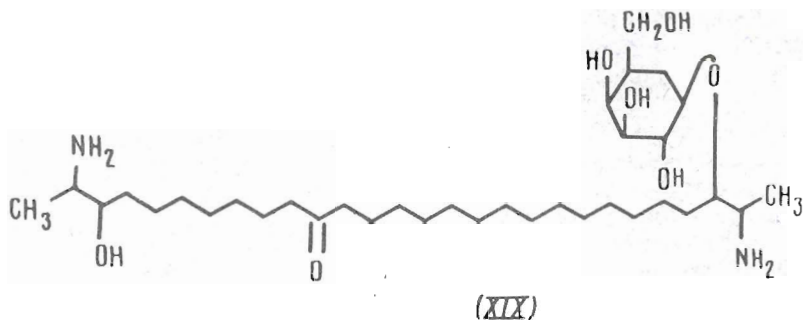
С помощью рентгеноструктурного анализа показано, что для большинства этих и подобных им соединений благодаря особенностям их стереохимии вдоль оси молекулы может быть проведена плоскость, которая четко разделяет гидрофобный и гидрофильный структурные фрагменты, как показано на рисунке.

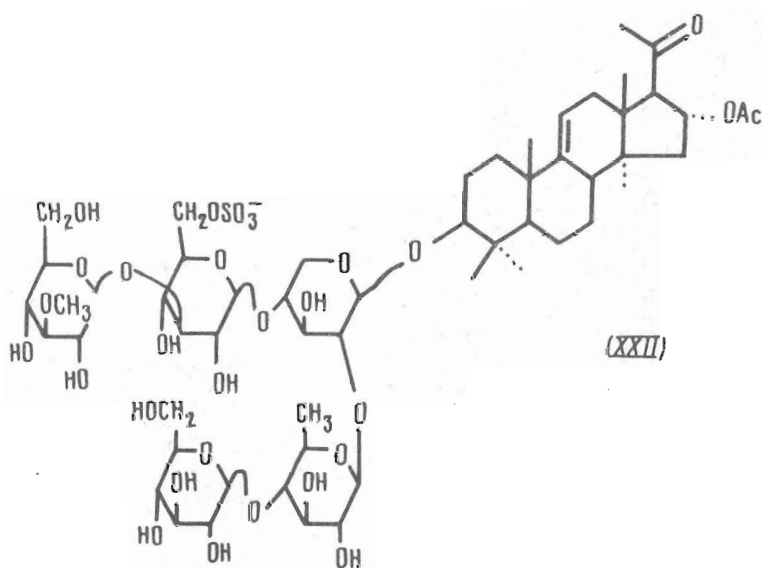
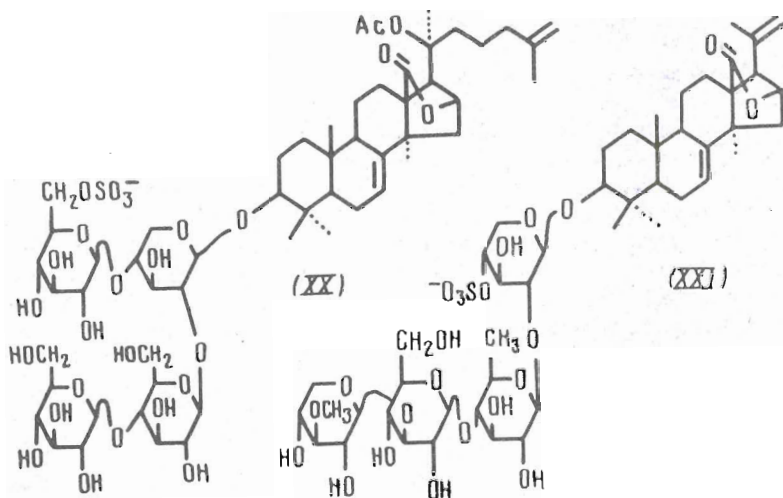


Пространственная структура молекулы соединения (XVIII) и нумерация атомов

Часто оптимальная бифильность достигается и при участии аминогрупп, как в полученном нами необычном липиде — ризохалине (XIX) из губки *Rhizochalina incrustata* [25].

Во многих случаях вторичные метаболиты морских беспозвоночных и водорослей принадлежат к ранее неизвестным циклическим системам. Характерной особенностью биохимии морских организмов можно считать





протекание необычных циклизаций, инициируемых ионами бромония, хлорония или протекающих под действием окислительных ферментов. Так, окисление ланостановых предшественников в организме голотурий по C-18 и C-20 ведет к образованию 18→20-лактонов и биосинтезу так называемых голостановых гликозидов (типа соединений I–III), которые известны своей физиологической активностью. Кроме таких соединений мы обнаружили в голотуриях еще несколько новых структурных серий тритерпеновых гликозидов. Их представителями являются псолусозид В (XX) из голотурии *Psolus fabricii* [26], кукумаризид G₂ (XXI) из голотурии *Eupentacta fraudatrix* и курилозид А (XXII) из голотурии *Duasmiodactyla kurilensis* [26–28].

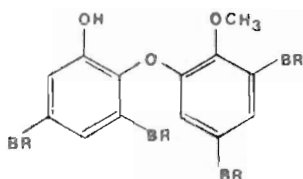
Таким образом, в результате интенсивных исследований в области морской биоорганической химии удалось не только получить значительное число новых высокоактивных природных соединений, но и определить ряд отличий в биохимии морских организмов по сравнению с наземными. Успешно идет "инвентаризация" морских растений и животных, прежде всего промысловых видов, в качестве источников биологически активных веществ. Уже сейчас достаточно широко используются отходы их переработки, а иногда и сами эти виды для получения некоторых полисахаридов и ферментов. Совершенно очевидными стали большие перспективы создания на основе полученной информации нового поколения биопрепаратов для медицины и сельского хозяйства. Более того, появились первые лекарственные и ветеринарные средства такого типа. Некоторые морские физиологически активные вещества нашли достаточно широкое применение в качестве "биохимических инструментов" в лабораториях биомедицинского профиля. Начато изучение механизма физиологического действия для большой группы вторичных метаболитов, обладающих интересной, с точки зрения фармакологов и физиологов, биологической активностью.

Наиболее перспективным представляется развитие исследований по морским природным соединениям из животных и растений в следующих направлениях. Во-первых, много обещает продолжение уже начавшегося смещения интересов от изучения преобладающих в экстрактах морских организмов химических компонентов к исследованию минорных, но высокоактивных соединений при их поиске и контроле за выделением с помощью различных биотестов. Во-вторых, все более масштабными будут, по-видимому, работы на морских сигнальных соединениях, в том числе феромонах, алломонах и кайромонах. Большое внимание при этом привлекут, очевидно, вещества, участвующие в регуляции симбионтных отношений, поскольку симбионтные комплексы широко представлены в морских биоценозах. В-третьих, вероятно возвращение внимания к морским биополимерам, особенно ферментам и полисахаридам. В настоящее время работы, посвященные морским биополимерам, составляют незначительный процент от общего числа работ по морским природным соединениям, хотя раньше их доля была более весомой.

2. Биологически активные вещества из морских микроорганизмов

Большой вклад в развитие морской биотехнологии могут дать исследования морских микроорганизмов, ассоциированных с морскими макро гидробионтами. Изучение симбионтных микроорганизмов привело к сенсационным открытиям бактериальных продуцентов таких "морских" соединений, как тетродотоксин [30, 31], сакситоксин [32], эйкозопентаеновая кислота [33, 34], просуругатоксин [35], дикетопиперазины [36]. Есть предположения, что некоторые вторичные метаболиты мшанок синтезируются также микроорганизмами-ассоциантами [37].

В Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН в 1985 г. были начаты исследования вторичных метаболитов морских микроорганизмов, выделенных из губок, асцидий, мягких кораллов, голотурий, морских звезд, рыб и моллюсков. Прежде всего объектами наших исследований стали бактерии тех морских организмов, которые достаточно хорошо изучены в химическом плане. Так, было известно, что в губках рода *Dysidea* содержится большое количество физиологически активных соединений [38-40]. Среди бромсодержащих метаболитов этого рода губок описан 3,5-дибром-2-(3',5'-дибром-2'-метокси-



(XXIII)

фенокси)фенол (XXIII), проявляющий цитотоксическую и антимикробную активности.

Нами из двух образцов губок *Dysidea* sp., собранных во время 9-го экспедиционного рейса на НИС "Академик Опарин" в районах островов Тутуила и Офу (Восточное Самоа), выделено 8 штаммов бактерий родов *Photobacterium*, *Vibrio*, *Arthrobacter*, *Micrococcus* [41].

Культивирование бактерий на искусственных средах приводит к накоплению в культуральных жидкостях штаммов 88-1 (*Vibrio* sp.), 88-3 (*Vibrio* sp.) бромсодержащих соединений. Используя масс-спектрометрию резонансного захвата электронов [42], мы показали, что фракция бромированных соединений содержит производное (XXIII) и его аналог [41]. Биосинтез бромированных соединений, по-видимому, является характерной особенностью штаммов 88-1 и 88-3. Во всяком случае, кроме тетрабромдифениловых эфиров мы получили серию бромсодержащих производных, структуры которых находятся в стадии изучения. Таким образом, нами была показана способность штаммов вибрионов синтезировать бромированные метаболиты, один из которых ранее был выделен из организма-хозяина.

Наши исследования, а также появляющиеся в последнее время публикации [43—46] показывают, что морские микроорганизмы могут служить перспективными источниками физиологически активных соединений.

Биоценозы Океана имеют отличную от суши биоту и являются древнейшими на Земле. Четкое определение таксономического положения и трофических связей морских микроорганизмов показывает, что морской среде обитания присущи особые виды и роды микроорганизмов и отделение морских форм от форм суши — пресноводных, почвенных и т. д. — осуществляется как на уровне высоких таксонов, так и на штаммовом уровне. Это свидетельствует об особом пути эволюции морских микроорганизмов и противоречит широко распространенному мнению, что большинство микроорганизмов привнесены в море с суши посредством золотого переноса и со стоком рек [47].

В последние годы все чаще сообщалось о многочисленных случаях симбиоза бактерий с морскими макрогидробионтами. Внешние и внутренние поверхности морских животных и растений несут большое количество бактерий, иногда они находятся в качестве симбионтов в их тканях и органах. Важным следствием такой тесной связи является синтрофия, метабиоз и обмен сигнальными веществами в морских сообществах. Различного рода биоактивные вещества находили в морских растениях и животных, в особенности беспозвоночных, таких, как губки, кораллы, асцидии и т. д. Мы полагаем, что многие из них являются продуктами биосинтеза микроорганизмов, ассоциированных с этими животными.

Количественный и качественный состав микроорганизмов, обитающих в морских животных, существенно отличается от состава морской воды и грунта в местах их обитания. Это говорит о специфичности взаимодействия микро- и макробионтов. Один из механизмов этого взаимодействия может быть предложен на основании следующих данных. При сравнительном изучении микроорганизмов мидии (*Crenomytilus grajanus*) и среды ее обитания [48] в моллюске были идентифицированы два лектина, не обнаруженные в среде. Показано, что эти лектины способны агглютинировать микроорганизмы, ассоциированные с моллюском-хозяином, и не агглютинируют многие патогенные для человека и животных бактерии. Данный феномен может отражать вспомогательную роль лектинов в регуляции макроорганизмами количественного и таксономического состава популяций микроорганизмов. Один лектин взаимодействует исключительно с грамположительными бактериями, другой — чаще всего с грамотрицательными [49, 50].

Предположение о реализации у морских микроорганизмов необычных биохимических процессов было подтверждено выделением таких соединений, которые не были известны среди метаболитов наземных источников. Так, у морских бактерий была открыта способность биосинтезировать супербромированные соединения [51, 52]. Это было показано также на примере антибиотиков из морских актиномицетов. Некоторые их структурные отличия от известных типов антибиотиков обусловили необычность их физиологического действия. Так, борсодержащий макролидный антибиотик аплазмомидин (аналог боромидина) из *Streptomyces griseus* [53, 54] был активен против малярийного плазмодия. Группа аминокликозидных антибиотиков истамицинов из *S. tenjimariensis* [55] подавляла рост патогенных микроорганизмов, устойчивых к другим антибиотикам. Кроме этого для истамицинов была показана противоопухолевая активность *in vivo*, и они проходят предклинические испытания. Антибиотик SS-228У из актиномицета *Chainia* sp. [56] помимо антибиотического действия против грамположительных бактерий ингибировал активность дофамин- β -гидроксилазы.

Более 150 штаммов морских актиномицетов родов *Nocardia*, *Streptomyces*, *Micromonospora* и *Promicromonospora* стали объектами наших химических и биохимических исследований. По данным 9-го экспедиционного рейса на НИС "Академик Опарин" мы отобрали штамм КММ АсI, *S. pluricolorescens*, который продуцировал антибиотик с минимальной ингибирующей концентрацией 0,1–1 мкг/мл по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*. Соединение не обладало цитостатическим действием и не показывало протеолитической активности. После хроматографических очисток был получен гомогенный препарат антибиотика — пальмиромидин с молекулярной массой 85 кДа [57]. Ранее из актиномицетов этого вида не были выделены пептидные антибиотики со свойствами пальмиромидина. Поэтому его дальнейшие химические и биохимические исследования представляют интерес.

Изучение метаболитов другого вида актиномицетов, *S. parvulus*, выделенного из морского грунта литоральной полосы острова Д'Аррос (Республика Сейшельские Острова), привело к обнаружению антибиотика — ингибитора роста грамположительных бактерий и грибов. Хроматографическая очистка антибиотического концентрата позволила получить высокоактивный препарат с действующей концентрацией менее 1 мкг/мл. Сравнение спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР актиномицинов, описанных в литературе, со спектральными данными нашего антибиотика свидетельствовало об идентичности его с актиномицином D. Однако полученное значение удельного вращения нашего соединения существенно отличается от

такового у актиномицина D. Поэтому требуется более тщательная идентификация выделенного нами антибиотика. Необходимо сказать, что наши первые работы по химическому исследованию низкомолекулярных антибиотиков из морских актиномицетов не привели к обнаружению новых, неописанных типов структур. Возможно, они будут открыты при изучении метаболитов редких родов актиномицетов (*Promicromonospora*, *Oerskovia*), имеющих в нашей коллекции.

Дальнейший прогресс в морской биотехнологии связан с организацией широкого поиска среди симбионтных и свободноживущих микроорганизмов — продуцентов физиологически активных соединений. В ТИБОХ ДВО РАН создана Коллекция морских микроорганизмов. Возможность работы на НИС "Академик Опарин" и на морской экспериментальной станции института позволила собрать микроорганизмы из тропических и бореальных областей Мирового океана. Официальный акроним коллекции — КММ. КММ является членом Мировой федерации коллекций культур микроорганизмов (WFCC). В коллекции поддерживаются гетеротрофные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, выделенные из морских животных, морской воды и донных осадков. В настоящее время КММ имеет около 10 000 штаммов микроорганизмов, в основном бактерий. КММ ТИБОХ ДВО РАН — первая и единственная коллекция морских микроорганизмов в Российской Федерации. КММ послужила основой широкого скрининга микробов — продуцентов физиологически активных веществ: внеклеточных РНКаз, ДНКаз и их ингибиторов, новых рестриктаз, α -галактозидазы, эластазы, щелочной фосфатазы, ингибиторов вирусной ревертазы, α - и β -глюкозидазы, антиопухолевых веществ, антивирусных соединений, антибиотиков, кардиотоников и иммуномодуляторов.

Проведенное нами тестирование 8000 морских микроорганизмов на способность синтезировать активные метаболиты позволило сделать заключение о распространении микробных продуцентов. Наиболее часто встречающимися метаболитами микроорганизмов всех изученных групп животных являются цитотоксические соединения. Анализ цитостатической активности был сделан по способности изолятов из морских микроорганизмов ингибировать биосинтез ДНК и РНК в культуре опухолевых клеток карциномы Эрлиха. Среди цитостатических соединений были отобраны для химических исследований pH-зависимые цитотоксины. Такие вещества были обнаружены в экстрактах микроорганизмов из донных осадков, мягких кораллов и морских звезд.

Из штамма 8-Д-2, выделенного из *Palythoa* sp., была получена сумма пептидов с цитотоксической активностью, которая увеличивалась в 100 раз при изменении pH среды от 7,0 до 5,6. Масс-спектрометрический анализ показал, что выделенные вещества являются короткими пептидами с молекулярными массами от 1000 до 1460 Да. Химическая структура этих соединений находится в стадии исследования.

Большой процент микроорганизмов — продуцентов антибиотических соединений отмечен для штаммов асцидий, горговарий, морской воды и донных осадков. В нашей коллекции имеются бактериальные штаммы, синтезирующие антибиотики против грамотрицательных бактерий, правда процент таких микроорганизмов незначителен. Антибиотикпродуцирующие бактерии были выделены нами из мадагаскарской губки *Dendrilla* sp. (3-й рейс НИС "Академик Опарин", 1986). Две из них, *Bacillus pumilus* Д-7 и Д-12, были интересны тем, что синтезировали высокоактивные антибиотики, подавляющие в низких концентрациях развитие патогенных для растений микроорганизмов *Xanthomonas bardii*. Антибиотический препарат из *B. pumilus* показывал также антидепрессорную активность.

Структура двух выделенных антибиотиков была доказана на основании данных ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. Они оказались идентичными амикуоумацинам В и F, выделенным ранее из почвенного штамма *B. pumilus* A I-77 [58, 59].

Большое количество (30–50%) продуцентов иммуотропных соединений обнаружено в ассоциативных комплексах альционарий, асцидий, ракообразных, в то время как они меньше распространены среди микрофлоры губок и морской воды.

Важным направлением в развитии морской биотехнологии может стать использование морских бактерий для выделения противовирусных препаратов. Предпосылкой для поиска среди морских бактерий таких соединений послужило утверждение, что некоторые вирусы инактивируются в морской среде [60–62]. Работами многих авторов [63–66] показано, что ингибирование энтеровирусов связано с метаболической деятельностью морских *Vibrio marinus*, бактерий родов *Flavobacterium*, *Pseudomonas*. Камеи с коллегами показал, что 52% штаммов микроорганизмов из прибрежной зоны острова Хоккайдо имели заметную и 11% очень высокую активность по отношению к патогенным для рыб вирусам IHNV, OMV [67].

Мы проводили отбор источников соединений с противовирусными свойствами по способности метаболитов ингибировать действие ферментов репродуктивного цикла вирусов. Наиболее часто для этой цели применяются вирусная обратная транскриптаза, РНК-полимераза и тимидинкиназа [68]. Показано, что из 535 исследованных штаммов 72 (13,5%) ингибируют тимидинкиназу на 50–100%. Это штаммы бактерий из губок (13,3%), донных осадков (26,5%), асцидий (17,6%), кишечнорастворимых (14,6%), морской воды (10,6%). Препараты 16 штаммов (из 224 исследованных) оказались эффективными в отношении обратной транскриптазы. Наибольшее количество (33,3%) продуцентов таких ингибиторов обнаружено среди микроорганизмов морской воды. 12 штаммов из 224 ингибировали РНК-полимеразу на 50–90%. Наибольшее количество их (14,3%) обнаружено у микроорганизмов из кишечнорастворимых. Эти данные были получены для микроорганизмов, выделенных из морских источников австралийского побережья.

Морские микроорганизмы обладают различными признаками, некоторые из них, например барофильность и галофильность, не встречаются у наземных микроорганизмов. Эти признаки бывают обусловлены ферментами, заслуживающими тщательного исследования.

Японскими авторами из психрофильного бактериального штамма, изолированного из пробы воды в Антарктике, была выделена термолabile фосфатаза [69], а из галофильного штамма *Pseudomonas* sp. — протеиназа, проявляющая максимальную активность при концентрации NaCl в среде 18%. Этот фермент используется в процессе приготовления рыбного соуса [70].

Нами из мидии, обитающей в заливе Петра Великого Японского моря, был выделен штамм *Aalteromonas macleodii* КММ 162, продуцирующий щелочную фосфатазу с уникально высокой активностью — 7000 ед./мг белка [71–73]. Этот фермент проявляет активность в широком диапазоне рН: от 7,5 до 11,0 с максимумом при рН 9,5–9,8 в присутствии 1 мМ MgCl_2 . Фермент термостабилен, но в присутствии некоторых сульфореагентов необратимо инактивируется при 60°C в течение 10 мин. Благодаря своим свойствам фермент нашел широкое практическое применение. Разработан оригинальный способ одновременного получения щелочной фосфатазы и эндо- β -1,3-глюканазы, заключающийся в том, что в питательную среду добавляют ламинарии. Это позволяет получать с

большим выходом оба фермента [74].

С целью обнаружения новых штаммов бактерий, секретирующих эластолитические ферменты, было проанализировано 278 культур [75]. Из губки, обитающей в водах Курильских островов, был выделен штамм *Kurthia* sp., который продуцировал в культуральную среду эластазу в значительных количествах — 150 мг неочищенного фермента на 1 л среды. Фермент конститутивный и выделяется в среду без наличия в ней эластина.

Особенно удачным был поиск среди бактерий КММ микробных продуцентов нуклеинового обмена.

Штамм *Alteromonas haloplanktis* КММ 223, выделенный в 1985 г. из образца воды с глубины 2000 м (северо-западная часть Тихого океана), продуцирует уникальный фермент — уридинспецифическую РНКазу [76]. Фермент состоит из двух идентичных полипептидных цепей, молекулярная масса каждой из которых 26 кДа. Оптимум pH 8,5. Этот белок разрезает РНК по уридиловой петле и может применяться в структурных исследованиях больших молекул РНК, например вирусных.

Штамм *B. pumilus* КММ 61 синтезирует внеклеточную РНКазу с молекулярной массой 14 кДа [77]. Фермент проявляет активность в диапазоне pH 8,5–9,5. Интересной особенностью внеклеточной РНКазы является то, что в отсутствие NaCl фермент инактивируется уже на стадии выделения. Эта РНКаза со сравнимой скоростью гидролизует пуриновые и пиримидиновые гомополирибонуклеотиды. Фермент может быть использован в производстве рибонуклеотидов и рибонуклеозидов из РНК.

Из культуральной жидкости бактерии *B. pumilus* КММ 62 также была выделена внеклеточная РНКаза [78]. Это термостабильный белок с молекулярной массой 12,5 кДа, проявляющий максимальную активность при pH 8,5–9,5. Фермент расщепляет субстраты по эндонуклеазному механизму с образованием олигонуклеотидов различной величины, имеющих 3'-концевые фосфатные группы. При гидролизе полинуклеотидов РНКаза проявляет пуриновую специфичность. По ряду свойств, механизму действия и специфичности фермент аналогичен ранее описанной РНКазе *B. intermedius* [79]. Его предполагается использовать в структурных исследованиях РНК.

Новые эндонуклеазы рестрикции были выделены из двух морских бактерий — *Vibrio nereis* и *Vibrio* sp. [80–83].

V. nereis синтезирует рестриктазу, узнающую последовательность (5')GT↓GCAC, и расщепляет ее в месте, указанном стрелкой. Рестриктаза *Vne* I не является изошизомером известных ферментов и поэтому может найти широкое применение в структурных исследованиях ДНК.

Vibrio sp. синтезирует рестриктазу, узнающую последовательность (5')AT↓TAAT, и расщепляет ДНК в месте, обозначенном стрелкой. Рестриктаза *Vsp* I не является изошизомером известных ферментов и имеет всего одно место узнавания на ДНК pBR 322 в гене β-лактамазы, что позволяет использовать ее для клонирования фрагментов ДНК по признаку потери устойчивости к ампициллину.

Таким образом, перспективы морской микробиологии в биотехнологии просматриваются по крайней мере в двух направлениях: поиск микробных продуцентов биоактивных веществ с необычной структурой и действием и выявление истинных продуцентов метаболитов, ранее отмеченных для макрогидробионтов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives. V. I-VI/ Ed. Scheuer P.J. N.Y.: Acad. Press, 1978—1985.
2. Bioorganic Marine Chemistry. V. I-II/ Ed. Scheuer P.J. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1986—1988.
3. Еляков Г.Б., Стоник В.А. Терпеноиды морских организмов М.: Наука, 1986.
4. Еляков Г.Б., Стоник В.А. Стероиды морских организмов. М.: Наука, 1988.
5. Renchart K.L., Holt T.G., Fregean N.R. et al.// J. Nat. Prod. 1990. V. 53. № 4. P. 771—792 .
6. Kitagawa I., Yamanaka H., Kobayashi M., Nishino T., Yosioka I., Sugawara T.// Chem. Pharm. Bull. 1978. V. 26. № 12. P. 3722—3731.
7. Maltsev I.I., Stonik V.A., Kalinovskiy A.I., Elyakov G.B.// Comp. Biochem. Physiol. 1984. V. 78. № 2. P. 421—426.
8. Авиллов С.А., Стоник В.А., Калиновский А.И.// Химия природ. соединений. 1990. № 6. С. 787—793.
9. Uemura D., Ueda K., Hirata Y. et al.// Tetrahedron Lett. 1981. V. 22. P. 2781—2784.
10. Moore R.E., Bartolini G.// J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. P. 2491—2496.
11. Armstrong R.W., Beau J.-M., Seuong Hoon Cheon et al.// J. Amer. Chem. Soc. 1989. V. 111. № 19. P. 7525—7530.
13. Tachibana K., Sakaitani M., Nakanishi K.// Science. 1984. V. 226. № 4675. P. 703—705.
14. Pathirana C., Andersen R.J.// J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 8288—8290.
15. Makarieva T.N., Shubina L.K., Kalinovskiy A.I., Stonik V.A., Elyakov G.B.// Steroids. 1983. V. 42. № 3. P. 267—281.
16. Макарьева Т.Н., Дмитренко П.С., Шубина Л.К., Стоник В.А.// Химия природ. соединений. 1988. № 3. С. 371—373.
17. Макарьева Т.Н., Шубина Л.К., Стоник В.А.// Химия природ. соединений. 1987. № 1. С. 111—115.
18. Левина Э.В., Калиновский А.И., Стоник В.А., Федоров С.Н., Исаков В.В.// Химия природ. соединений. 1988. № 3. С. 375—379.
19. Левина Э.В., Федоров С.Н., Стоник В.А., Андриященко П.В., Калиновский А.И., Исаков В.В.// Химия природ. соединений. 1990. № 4. С. 483—487.
20. Elyakov G.B., Stonik V.A., Levina E.V.// Pure Appl. Chem. 1990. V. 62. № 7. P. 1259—1262.
21. Stonik V.A., Makarieva T.N., Dmitrenok A.S.// J. Nat. Prod. 1992. In press.
22. Кича А.А., Калиновский А.И., Левина Э.В., Стоник В.А., Еляков Г.Б.// Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. № 7. С. 975—977.
23. Кича А.А., Калиновский А.И., Стоник В.А.// Химия природ. соединений. 1990. № 2. С. 218—221.
24. Ильин С.Г., Решетняк М.В., Щедрин А.П., Стручков Ю.Т., Капустина И.И., Стоник В.А., Еляков Г.Б.// Докл. АН СССР. 1990. Т. 314. № 3. С. 637—639.
25. Makarieva T.N., Denisenko V.A., Stonik V.A., Milgrom Yu.M., Rashkes Ya.V.// Tetrahedron Lett. 1989. V. 30. № 47. P. 6581—6584.
26. Авиллов С.А., Калинин В.И., Калиновский А.И., Стоник В.А.// Химия природ. соединений. 1991. № 3. С. 438—439.

27. Авиллов С.А., Калиновский А.И., Стоник В.А.// Химия природ. соединений. 1991. № 2. С. 221—226.
28. Калиновский А.И., Авиллов С.А., Степанов В.Р., Стоник В.А.// Химия природ. соединений. 1983. № 6. С. 724—727.
29. Stonik V.A., Kalinin V.I., Avilov S.A., Kalinovsky A.I.// Proceeding of the Sixth International Symposium on Marine Natural Products. Dakar, 1989. P. 5.
30. Matsui T., Taketsugu Sh., Kodama K., Ishii A., Yamamori K., Shimizu Ch. // Nippon Suisan Gakkaishi. 1989. V. 55. № 12. P. 2199—2203.
31. Sugita H., Ueda R., Noguchi T., Arakawa O., Hashimoto K., Deguchi Y.// Nippon Suisan Gakkaishi. 1987. V. 53. № 9. P. 1693—1696.
32. Kodama M., Ogata T., Sato S.// Agr. Biol. Chem. 1988. V. 52. P. 1075—1077.
33. Kazunaga Y., Araki K., Watanabe K., Ishikawa Ch., Inoue A., Konda K., Watabe Sh., Hashimoto K. //Nippon Suisan Gakkaishi. 1988. V. 54. № 10. P.1835—1838.
34. Kazunaga Y., Araki K., Okazaki N., Watanabe K., Ishikawa Ch., Inoue A., Numao N., Konda K.// J. Biochem. 1988. V. 103. P. 5—7.
35. Kosuge T., Zenda H., Tsuji K. // Yakugaku Zasshi. 1987. V. 107. № 9. P. 665—675.
36. Stierle A., Cardellina J., Singleton F.// Experientia. 1988. V. 44. P. 1021—1022.
37. Antoni U., Nielsen M., Pereiza M., Christophersen C.// Comp. Biochem. Physiol. 1990. V. 96B. № 3. P. 431—437.
38. Norton R., Croft A., Wells R.// Tetrahedron. 1981. V. 37. P. 2341—2349.
39. Molinskii T.// J. Org. Chem. 1988. V. 53. P. 2103—2105.
40. Hofheinz W., Oberhansli W.// Helv. chim. acta. 1977. V. 60. P. 660—662.
41. Elyakov G., Kuznetsova T., Mikhailov V., Maltsev I., Voinov V., Fedoryev S.// Experientia. 1991. V. 47. P. 632—633.
42. Voinov V., El'kin Yu., Kuznetsova T., Maltsev I., Mikhailov V., Sasunkevich V.// J. Chrom. 1991. V. 586. P. 360—362.
43. Tapiolas D., Roman M., Fenical W., Stoit T., Clardy J.// J. Amer. Chem. Soc. 1991. V. 113. P. 4682—4683.
44. Okutani K.// Bull. J. Ser. Sci. Fish. 1984. V. 50. № 6. P. 1035—1038.
45. Okutani K.// Bull. J. Ser. Sci. Fish. 1984. V. 50. № 8. P. 1407—1409.
46. Okami Y.// Pure Appl. Chem. 1982. V. 54. № 10. P. 1951—1953.
47. Мишустина И.Е., Щеглова И.К., Мицкевич И.Н. Морская микробиология. Владивосток: Изд-во Дальневосточного университета, 1985. С. 4—6.
48. Михайлов В.В., Кочкин А.В., Иванова Е.П.// Микробиология. 1988. Т. 57. Вып. 1. С. 158—159.
49. Лоенко Ю.Н., Глазкова В.Е., Артюков А.А., Михайлов В.В., Курика А.В., Оводова Р.Г., Руцкова Т.А.// Уч. зап. Тартуск. ун-та. 1989. Вып. 869. Т. 1. С. 145—147.
50. Loenko Yu.N., Glazkova V.A., Mikhailov V.V., Artyukov A.A., Rutsikova T.A., Ovodova R.G.// Eleventh Lectin Conference. Tartu Univer. 1989. P. 45.
51. Burkholder P., Pflister R., Leitz F. // Appl.Microbiol. 1966. V. 14. P. 649—653.F.
52. Andersen R., Wolf N., Faulkner D.// Marine Microbiol. 1974. V. 27. P. 281—285.
53. Nakamura H., Iitaka H., Kitahara T., Okazaki T.// J. Ant. 1977. V. 30. P. 714—717.
54. Sato K., Okazaki T., Maeda K., Okami Y.// J. Ant. 1978. V. 31. P. 632—635.
55. Okami Y., Hotta K.// J. Ant. 1979. V. 32. P. 964—966.
56. Kitahara T., Naganawa H., Okazaki T., Okami Y., Umezawa H.// J. Ant. 1975. V. 28. № 4. P. 280—285.
57. Мальцев И.И., Кузнецова Т.А., Михайлов В.В., Еляков Г.Б.// Химия природ. соединений. 1991. № 2. С. 298—299.

58. Itoh J., Omoto Sh., Nishizawa N., Kodama Y., Inouye Sh.// Agr. Biol. Chem. 1982. V. 46. № 11. P. 2659—2665.
59. Itoh J., Shonura T., Omoto Sh., Miyado Sh., Yuda Ya., Shibata U., Inouye Sh.// Agr. Biol. 1982. V. 46. № 5. P. 1255—1259.
60. Akin E., Hill W., Cline G., Benton W. // Water Res. 1976. V. 10. P. 59—63.
61. Shuval M., Axe M., Thompson A., Fattal B., Cymbalista S., Weiner Y.// J. Sanitary Eng. Divis. Amer. Soc. Civil Eng. 1977. V. 5. P. 587—600.
62. La Belle R., Gerba C.// Appl. Env. Microb. 1980. V.39. P. 749—755.
63. Gundersen K., Brandenberg S., Magnussen S., Lycke E.// Acta. Pathol. et Microb. Scand. 1967. V. 71. P. 274—280.
64. Fujioka R., Lok P., Lan L.// Appl. Env. Microb. 1980. V. 39. P. 1105—1110.
65. Katzenelson E.// Indicators of Viruses in Food and Water/ Ed. Berg G. L.: Acad. Press, 1978. P. 39—50.
66. Toranzo A., Barja J., Hetvick F.// Can. J. Microbiol. 1982. V. 28. P. 231—238.
67. Kamei Y., Yoshimizu M., Ezura Y., Kimura T.// Nippon Suisan Gakkaishi. 1987. V. 53. P. 2179—2185.
68. Афиятуллоев Ш., Терентьев Л., Калиновская Н.// Биологически активные вещества гидробионтов — новые лекарственные, лечебно-профилактические и технические препараты/ Ред. Акулин В.Н. и др. Владивосток: ТИПРО, 1991. С. 31—32.
69. Kabori H., Sullivan C.W., Shizuza H.// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 6691—6695.
70. Van Qua D., Simidu U., Taga N.// Can. J. Microbiol. 1981. V. 27. P. 505—510.
71. Федосов Ю.В., Михайлов В.В., Жигалина И.И., Иванова Е.П., Рассказов В.А., Еляков Г.Б. Штамм *Acinetobacter* sp. 40 МС — продуцент щелочной фосфатазы и способ получения щелочной фосфатазы: А.с. 1489182 СССР// Б.И. 1989. № 23. С. 271.
72. Иванова Е.П., Карякин А.А., Жигалина И.И., Михайлов В.В., Федосов Ю.В., Рассказов В.А., Еляков Г.Б.// Микробиол. журн. 1991. Т. 53. № 6. С. 46—50.
73. Федосов Ю.В., Михайлов В.В., Жигалина И.И., Иванова Е.П., Кожемяко В.Б., Оноприенко Н.Б., Рассказов В.А., Еляков Г.Б.// Докл. АН СССР. 1991. Т. 320. № 2. С. 485—487.
74. Федосов Ю.В., Михайлов В.В., Жигалина И.И., Иванова Е.П., Елякова Л.А., Сова В.В., Рассказов В.А., Еляков Г.Б.// Биосинтез ферментов микроорганизмами/ Ред. Халмурадов А.Г., Безбородов А.М. Ташкент: ФАН, 1988. С. 273.
75. Артюков А.А., Кофанова Н.Н., Сахаров И.Ю., Шевченко Л.С., Михайлов В.В.// Методы получения, анализа и применения ферментов. Юрмала, 1990. С. 22.
76. Федосов Ю.В., Михайлов В.В., Плисова Е.Ю., Романенко Л.А., Рассказов В.А., Еляков Г.Б.// Биологически активные вещества гидробионтов при комплексной утилизации ресурсов океана/ Ред. Эпштейн Л.М. и др. Владивосток: ТИПРО, 1988. С. 19—20.
77. Федосов Ю.В., Михайлов В.В., Плисова Е.Ю., Иванова Е.П., Рассказов В.А., Еляков Г.Б.// Биосинтез ферментов микроорганизмами /Ред. Халмурадов А.Г., Безбородов А.М. Ташкент: ФАН, 1988. С. 155—156.
78. Ивайловский В.Л., Федосов Ю.В., Иванова Е.П., Михайлов В.В., Рассказов В.А., Еляков Г.Б.// Биологически активные вещества гидробионтов — новые лекарственные, лечебно-профилактические и технические препараты/ Ред. Акулин В.Н. и др. Владивосток: ТИПРО, 1991. С. 27.
79. Лещинская И.Б.// Бактериальные нуклеазы. Казань: Изд-во КГУ, 1964. С. 39—41.
80. Дегтярев С.Х., Речкунова Н.И., Немцова Н.А., Малыгин Э.Г., Михайлов В.В., Рассказов В.А. Штамм *Vibrio nereis* — продуцент рестриктазы *Vne I*, узнающей и расщепляющей последовательность 5'-GTGCAC-3': А.с. 1413954 СССР// Б.И. 1988. № 28. С.252.

81. Дегтярев С.Х., Речкунова Н.И., Немесова Н.А., Чижиков В.Е., Малыгин Э.Г., Кочкин А.В., Михайлов В.В., Рассказов В.А.// Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 3. С. 422-423.
82. Дегтярев С.Х., Репин В.Е., Гайнуллина М.Н., Речкунова Н.И., Михайлов В.В., Рассказов В.А., Щелкунов С.Н., Малыгин Э.Г. Штамм *Vibrio species* — продуцент рестриктазы, узнающей и расщепляющей последовательность 5'-АТТААТ-3': А.с. 1518372. СССР// Б.И. 1989. № 40. С. 180.
83. Дегтярев С.Х., Репин В.Е., Речкунова Н.И., Чижиков В.Е., Малыгин Э.Г., Михайлов В.В., Рассказов В.А.// Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 3. С. 420—421.

G.B.ELYAKOV, V.A.STONIK, T.A.KUZNETSOVA, V.V.MIKHAILOV
 SOME RESULTS AND PROSPECTS OF STUDIES ON MARINE
 BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry,
 Far East Division, Russian Academy of Sciences,
 Vladivostok*

Recent studies on bioactive metabolites from marine macro- and microorganisms are reviewed with 83 refs. Structures of new sulphated and glycosylated secondary metabolites, which have been reported to have antifungal, immunomodulatory, and cytotoxic properties, are given. Some peculiarities of biosynthesis of natural compounds in marine organisms are revealed. It was shown that some natural products, isolated earlier from sponges, are produced by microbial symbionts. Different physiological activities associated with 8000 marine microbial (mainly symbiotic) strains are discussed as well as some prospects of marine biochemistry and biotechnology development.

Зав. редакцией *Е.Л. Толстикова*
 Научный редактор *Л.И. Мирошникова*
 Редактор *И.Ф. Селютина*
 Макет изготовили: *Т.Н. Бабенкова* и *Ю.Г. Боресков*
 Технический редактор *И.Н. Беляева*

Сдано в набор 20.07.92	Подписано к печати 10.09.92	Формат бумаги 70x100 1/16
Офсетная печать	Усл. печ. л. 14,3	Усл. кр.-отт. 9,9 тыс.
	Тираж 683 экз.	Уч.-изд. л. 13,7
		Бум. л. 5,5
	Зак. 3244	Цена 5 р. 20 к.

Адрес редакции: 117871, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая 16/10, корп. 32, ком. 306
 Телефон: 330-60-38
 2-я типография издательства "Наука", 121099, Москва Г-99, Шубинский пер., 6