



УДК 579.222.3

КАТЕХОЛЬНЫЙ СИДЕРОФОР, ПРОДУЦИРУЕМЫЙ ТЕРМОРЕЗИСТЕНТНЫМ ШТАММОМ *Bacillus licheniformis* VK21

© 2003 г. Ю. В. Темиров[#], Т. З. Есикова*, И. А. Кашпаров**, Т. А. Балашова***,
Л. М. Винокуров*, Ю. Б. Алахов*

*Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Пушкино Московской обл., просп. Науки, 8;

**Институт белка РАН, Пушкино Московской обл.;

***Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 16.09.2002 г. Принята к печати 25.11.2002 г.

Для выявления продуцентов сидерофоров термофильные и терморезистентные штаммы бактерий были скринированы на среде с хром-азуролом S. Обнаружено, что штамм *Bacillus licheniformis* VK21 резко увеличивает секрецию метаболита – хелатора ионов Fe^{3+} в ответ на добавление солей марганца (II). Рост продуцента в минимальной среде с $MnSO_4$ в условиях лимита по железу сопровождался накоплением катехольного продукта, содержание которого достигало максимума в начале стационарной фазы роста культуры. Наличие в среде $FeCl_3$ приводило к значительному снижению количества образующегося катехола. Сидерофор, названный S_{VK21} , был выделен из культуральной жидкости и очищен с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ; его сидерофорная функция доказана тестом на восстановление роста клеток продуцента в среде с EDTA. УФ-спектр сидерофора имеет максимумы поглощения при 248 и 315 нм. По данным аминокислотного анализа и ЯМР-спектроскопии, метаболит S_{VK21} представляет собой 2,3-дигидроксibenzoилглицилтреонин.

Ключевые слова: бактерии рода *Bacillus*, термофильные и терморезистентные бактерии; катехольные метаболиты; сидерофоры.

ВВЕДЕНИЕ

Многие виды бактерий и грибов, а также некоторые виды растений способны синтезировать низкомолекулярные метаболиты, специфически связывающие ионы Fe^{3+} , так называемые сидерофоры [1, 2]. В условиях роста организмов при дефиците в среде доступного им железа происходит индукция биосинтеза таких соединений, их секреция клетками продуцента и поглощение растворимого комплекса лиганда с железом (ферросидерофора) с участием специфических рецепторных и транспортных систем. В клетках ионы железа освобождаются путем модификации либо деградации сидерофорных молекул [3].

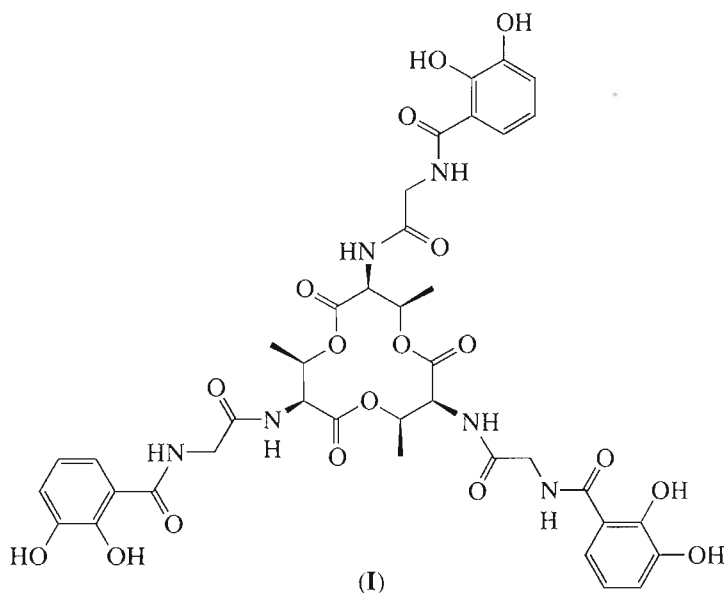
Известно, что в аэробных условиях при физиологических значениях pH среды соединения трехвалентного железа склонны к образованию крайне малорастворимого $Fe(OH)_3$, из-за чего возможность поглощения клетками этого элемента сильно ограничивается при отсутствии систем его активного транспорта. Метаболиты-хелаторы выступают, таким образом, как факторы конкуренции за важный пластический ресурс, обеспечивая своим продуцентам преимущество для выживания и раз-

вития [2]. Сидерофоры некоторых псевдомонад проявляют также антибиотическую активность в отношении других видов бактерий, обусловленную, по-видимому, подавлением размножения их клеток, лишенных железа [4].

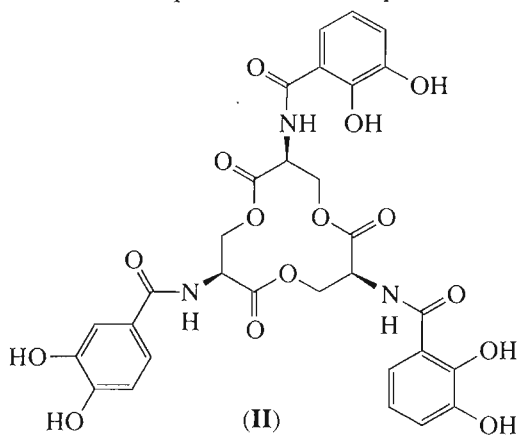
По химическому строению многие сидерофоры представляют собой модифицированные пептиды, в которых определенные группы участвуют в формировании железосвязывающего центра. Гидроксаматные сидерофоры содержат остатки орнитина или лизина, к концевым аминокислотам которых присоединены различные заместители. В молекулах катехольных сидерофоров короткие пептиды N-ацилированы 2,3-дигидроксibenзойной кислотой (ДНВА), а в карбоксилатных наряду с аминокислотами присутствуют также остатки гидроксикарбоновых кислот. У бактерий известны сидерофоры всех трех классов [5]. Биосинтез большинства этих метаболитов, как и ряда других низкомолекулярных пептидов, осуществляется с участием специфических пептидилсинтетаз [6, 7].

Из числа бактериальных хелаторов железа наиболее изученными к настоящему времени являются сидерофоры грамотрицательных бактерий, в особенности псевдомонад [5, 8, 9], а также катехольные и гидроксаматные сидерофоры энтеробактерий [10, 11], агробактерий и близких к ним

[#] Автор для переписки (тел.: (0967)73-06-53; эл. почта: yuri_temirov@rambler.ru).



родов [12, 13]: йерсиний [14] и вибрионов [15]. У грамположительных микроорганизмов описаны в основном продуценты гидроксаматных сидерофоров [16, 17], в то время как катехолы идентифицированы у сравнительно небольшого числа представителей данной группы [18, 19]. Обращает на себя внимание тот факт, что среди многочисленных видов рода *Bacillus* известны только два сидерофорообразующих: *B. megaterium* – продуцент шизокинина [16], а также *B. subtilis*. Недавняя работа [20] посвящена исследованию генетической системы *B. subtilis*, ответственной за биосинтез этим микроорганизмом катехольного сидерофора бациллибактина. Ранее считалось, что данный вид образует только итоговую кислоту – 2,3-дигидроксibenzoилглицин [19]. Бациллибактин (I) по структуре представляет собой циклический трилактон 2,3-дигидроксibenzoилглицилтреонина, сходный с хорошо известным энтеробактином (II), трилактонная структура которого образована остатками 2,3-дигидроксibenzoилсерина [5, 18].



Образование сидерофоров бактериями-термофилами до последнего времени почти не изучалось. Исключение составляют лишь сообщения о наличии железотранспортных систем с участием металлохелаторов у термофильных штаммов *Campylobacter* [21]. В связи с этим целью настоящей работы стало исследование продукции сидерофоров термофильными и терморезистентными бактериями рода *Bacillus*, из которых несколько штаммов относились к виду *B. licheniformis*, систематически близкому *B. subtilis* – продуценту бациллибактина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе были использованы 10 штаммов термофильных и терморезистентных бацилл, растущих в диапазоне температур 45–60°C (табл. 1). Первоначальный скрининг для обнаружения продукции ими сидерофоров был проведен с использованием теста на “синем агаре” – агаризованной минимальной среде, содержащей комплекс Fe³⁺ и цетавлона с красителем хром-азуролом S (CAS), исходная окраска которого меняется на красную, оранжевую или желтую при связывании хелатирующими агентами ионов железа в его составе [22]. Рост всех исследуемых штаммов на CAS-агаре сопровождался появлением различных по интенсивности зон изменения цвета индикатора, что указывало на образование бактериями сидерофоров. При этом было обнаружено, что у одного из штаммов, *B. licheniformis* VK21, уровень секреции железосвязывающего метаболита значительно возрастал при наличии в среде солей марганца (60 мкМ Mn²⁺). Прямое участие этого элемента в биосинтезе сидерофоров у бактерий не выявлено, однако ионы Mn²⁺, как и Fe²⁺, влияют на многие био-

химические процессы у микроорганизмов, в том числе взаимосвязанные либо имеющие общие механизмы регуляции. Так, марганец является ко-фактором репрессии ряда генов, в частности каталазного (*katA*) [23]. В то же время марганецзависимая супероксиддисмутаза (*SodA*), обнаруженная в том числе у *B. subtilis* [24], катализирует образование пероксида водорода, который способен реагировать с ионами Fe^{2+} , образующимися при восстановлении Fe^{3+} в клетке с участием супероксидных радикалов. Продукты данной реакции, радикалы гидроксила ($\cdot OH$), являются наиболее мощными агентами в окислительном стрессе [25]. При ответе на этот стресс у некоторых видов бактерий активируется продукция сидерофоров, роль которых в данном случае предположительно состоит в уменьшении внутриклеточного пула свободных ионов железа [26]. Механизм такой активации к настоящему времени детально не исследован [26, 27].

Штамм *B. licheniformis* VK21 был выбран для изучения образуемого им сидерофора. Тестом с CAS-реактивом было продемонстрировано, что при росте продуцента в жидкой минимальной среде, не содержащей железа, метаболит-хелатор накапливался в культуральной жидкости только при добавлении в среду $MnSO_4$. По аналогии с *B. subtilis* – продуцентом бациллибактина, было предположено, что *B. licheniformis* VK21, родственной этому виду, также образует сидерофор из класса катехолов. Для подтверждения данной гипотезы проводили колориметрическое измерение содержания катехольных соединений в супернатантах культур штамма-продуцента, используя цветную реакцию с цитратом железа-аммония и 1,10-фенантролином, специфичную для ароматических соединений с вицинальными гидроксогруппами [28]. Появление темно-желтой окраски в ходе реакции свидетельствовало о присутствии катехольного метаболита в супернатанте культуры *B. licheniformis* VK21, выращенной в среде с марганцем. То,

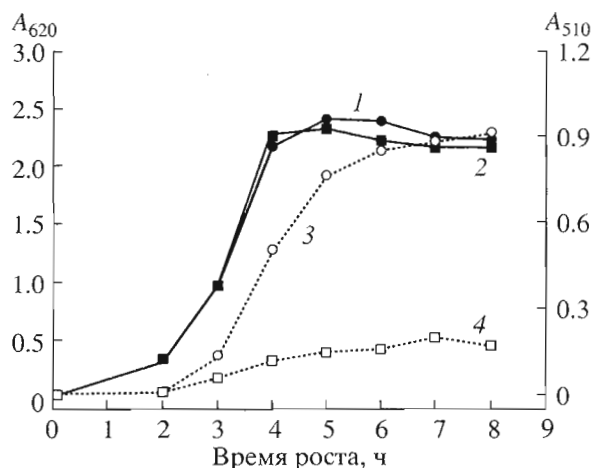


Рис. 1. Рост штамма *B. licheniformis* VK21 в минимальной среде и образование им катехольного метаболита. A_{620} – рост бактерий в среде без железа (1) и с добавлением 50 мкМ $FeCl_3$ (2). A_{510} – образование катехола в среде без железа (3) и с добавлением 50 мкМ $FeCl_3$ (4). Приведены усредненные данные из трех независимых экспериментов.

что эта культуральная жидкость давала также положительный тест с CAS-реактивом, убедительно говорило о продукции штаммом железосвязывающего соединения из группы катехолов.

Для исследования динамики продукции сидерофора при культивировании *B. licheniformis* VK21 в жидкой среде без железа и с добавлением $FeCl_3$ также использовали цветную реакцию на катехолы. Рост штамма в условиях лимита по железу сопровождался накоплением в культуральной жидкости катехольного метаболита, максимальное содержание которого наблюдали после выхода культуры на стационарную фазу роста (рис. 1, кривые 1, 3). Сходная зависимость между количеством сидерофора и фазой роста культуры характерна для многих видов бактерий, образующих разнообразные хелаторы железа [2, 14].

Таблица 1. Основные характеристики штаммов термофильных и терморезистентных грамположительных спорообразующих бактерий, использованных в работе

Название штамма	Анаэробный рост	Оксидаза	Каталаза	Рост при температуре (°C)				
				37	45	50	60	65
<i>Bacillus</i> sp. VK1	–	+	–	–	–	+	+	+
<i>B. licheniformis</i> VK2	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>Bacillus</i> sp. VK6	–	+	–	–	–	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp. VK17	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>Bacillus</i> sp. VK19	–	+	+	+	+	+	+	–
<i>B. licheniformis</i> VK21	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>Bacillus</i> sp. B2101	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>B. licheniformis</i> B431	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>B. licheniformis</i> B432	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>B. licheniformis</i> B433	+	+	+	+	+	+	+	–

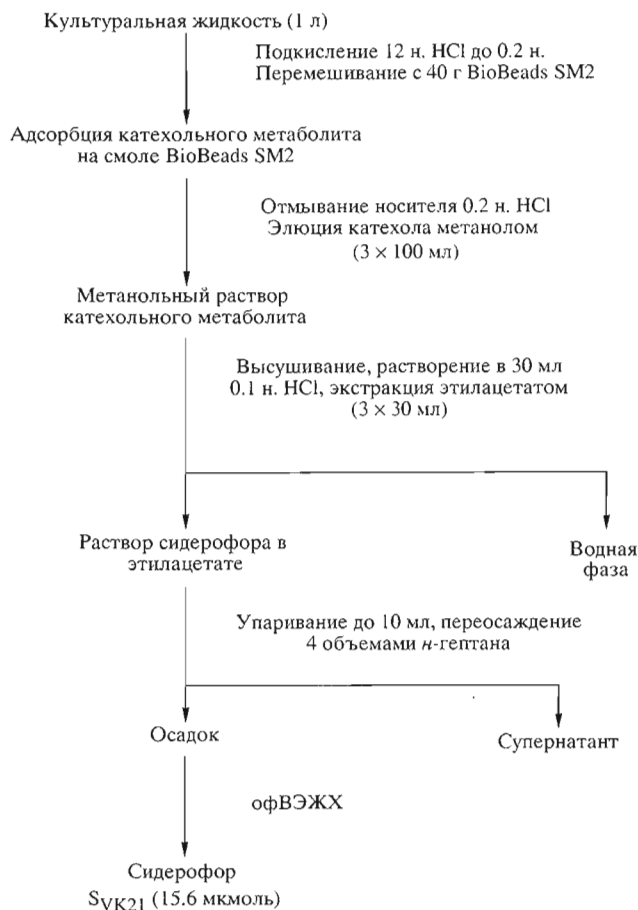


Рис. 2. Схема выделения сидерофора *B. licheniformis* VK21.

Добавление в среду FeCl₃ до концентрации 50 мкМ практически не сказывалось на характере роста штамма, но приводило к резкому снижению количества катехольного продукта в супернатанте культуры *B. licheniformis* VK21 (рис. 1, кривые 2, 4). Известно, что образование сидерофоров у всех организмов-продуцентов контролируется концентрацией доступного клеткам железа и при высоком его содержании биосинтез хелаторов подавляется [1, 2, 5]. Ключевую роль здесь играют белки-репрессоры семейства Fur (ferric uptake regulator), активные в комплексе с Fe²⁺ [23, 27]. Существуют бактерии, у которых осуществляется конститутивный синтез ДНВА и ее секреция в среду с последующим поглощением клетками в виде Fe³⁺-комплекса. Этот метаболит, однако, не относится к сидерофорам [1, 5, 9]. Таким образом, ингибирующее действие FeCl₃ на продукцию *B. licheniformis* VK21 катехольного метаболита являлось важным доказательством его сидерофорной природы.

Необходимым свойством метаболитов как сидерофоров, помимо связывания железа, является также способность транспортироваться внутрь

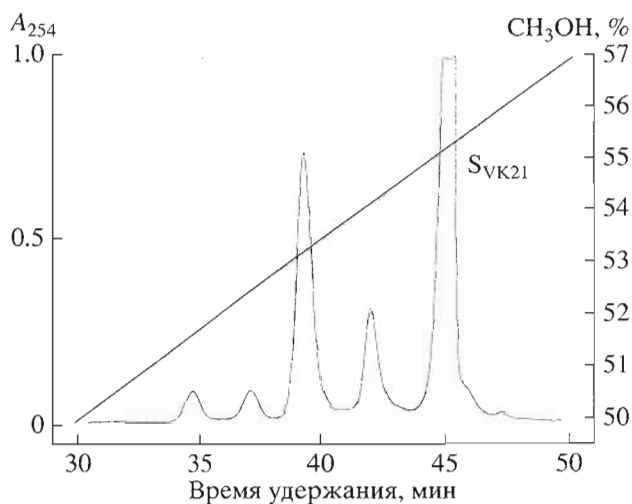


Рис. 3. Очистка сидерофора *B. licheniformis* VK21 обращенно-фазовой ВЭЖХ. S_{VK21} – фракция железосвязывающего метаболита.

клетки в форме комплекса лиганд–ион, обеспечивая ассимиляцию железа организмом. На этом свойстве основан тест функциональной активности сидерофоров, способных восстанавливать рост клеток собственных продуцентов при ингибировании его большими концентрациями других соединений, связывающих ионы Fe³⁺ [1, 4]. Культуральную жидкость *B. licheniformis* VK21, содержащую катехольный продукт, добавляли к клеткам данного штамма, внесенным в агаризованную среду с EDTA в концентрации, подавляющей размножение бактерий. Рост продуцента при этом полностью восстанавливался. Полученный результат подтвердил, что исследуемый метаболит является компонентом системы активного транспорта железа у терморезистентного штамма *B. licheniformis* VK21.

Схема выделения сидерофора, условно названного S_{VK21}, приведена на рис. 2. Полученный препарат очищали с помощью офВЭЖХ, проводя элюцию градиентом концентрации метанола в 0.1% TFA. Проба с CAS-реактивом показала наличие хелатора железа во фракции, соответствующей пику, выходящему со временем удержания 45 мин (рис. 3). Выход продукта, рассчитанный по результатам измерений общего содержания катехолов на разных стадиях очистки, составлял 15.6 мкмоль/л культуральной жидкости, или 26% исходного количества (табл. 2). Не исключено, что кроме S_{VK21} штамм *B. licheniformis* VK21 продуцирует и другие катехольные соединения, способствующие сольюбилизации железа в среде [29].

Выделенное вещество анализировали ТСХ (табл. 3). Хроматограммы окрашивали смесью 1% водных растворов цитрата железа-аммония и гексацианоферрата (III) калия, при этом синяя

Таблица 2. Содержание катехольных соединений в различных этапах выделения сидерофора *B. licheniformis* VK21*

	Содержание катехолов	
	абсолютное, мкмоль	относительное, %
Культуральная жидкость (1 л)	60**	100
Элюат с носителя BioBeads SM2	56	93
Препарат после осаждения <i>n</i> -гептаном	25.8	43
Препарат после ВЭЖХ	15.6	26

* Содержание катехольных соединений определяли колориметрическим методом [30] с использованием 2,3-дигидроксibenзойной кислоты в качестве стандарта.

** Концентрацию катехолов в культуральной жидкости определяли цветной реакцией с цитратом аммония-железа и 1,10-фенантролином [28].

окраска пятна указывала на принадлежность соединения к катехолам [31]. То же пятно окрашивалось CAS-реактивом в красный цвет, что подтверждало способность анализируемого метаболита активно связывать железо. При облучении УФ-светом (254 нм) пятно S_{VK21} на целлюлозных пластинках обнаруживало зеленую флуоресценцию в отличие от голубого свечения ДНВА. Как известно, практически все катехольные сидерофоры флуоресцируют в ультрафиолете, что обусловлено наличием в их молекулах остатка 2,3-дигидроксibenзойной кислоты; при этом длина волны испускаемого света зависит от структуры конкретного соединения [2, 15].

Анализируемое вещество давало окраску также при обработке хроматограмм хлором с последующим проявлением 1% раствором крахмала в 1% КJ. Данный метод специфичен для соединений, содержащих связь N–C [31]. В то же время ninгидрин не окрашивал S_{VK21} , что доказывало отсутствие в его молекуле свободных аминогрупп. Было предположено, что сидерофор штамма *B. licheniformis* VK21 может быть сходен по строению

с известными катехольными сидерофорами *B. subtilis* – итоевой кислотой и бациллибактином, в которых ДНВА *N*-ацилирует глициновый остаток.

Измерение оптического спектра сидерофора S_{VK21} в метанольном растворе показало наличие максимумов поглощения при λ 248 и 315 нм (рис. 4). Характер спектральной кривой S_{VK21} соответствовал спектрам известных катехольных сидерофоров [14, 15, 18], где присутствие остатка ДНВА также обуславливает поглощение в областях длин волн в районе 320 и 250 нм [2].

Для доказательства сидерофорной функции соединения S_{VK21} проводили биотест на восстановление им роста клеток собственного продуцента в среде с EDTA. Как и в эксперименте с культуральной жидкостью, добавление очищенного метаболита снимало ингибирующий эффект EDTA в отношении роста клеток *B. licheniformis* VK21, что показывало участие катехола S_{VK21} в транспорте железа в клетки образующих его бактерий.

Полная структура S_{VK21} была установлена по результатам ЯМР-спектроскопии в сочетании с определением аминокислотного состава. Аминокислотный анализ показал наличие в молекуле сидерофора остатков глицина и треонина в соотношении, близком 1 : 1. На основании анализа ЯМР-спектров COSY, TOCSY, NOESY, (1H - ^{13}C) HMQC и (1H - ^{13}C) HMBC проведено полное отнесение сигналов исследуемого образца (табл. 4), которое соответствовало структуре 2,3-дигидроксibenзоилглицилтреонина (III). Титрованием сидерофора было определено значение *pK* титрующей группы исследуемого соединения, равное 3.22 ± 0.02 , что указывало на титрование C-концевого остатка Thr. Таким образом, анализируемое вещество S_{VK21} является фрагментом известного сидерофора *B. subtilis* – бациллибактина (I), в котором три аналогичных звена соединены в лактонный цикл. Не исключено, что биосинтез S_{VK21} осуществляется ферментом, идентичным синтетазе бациллибактина, но с нарушением функции специфического конденсирующего домена, ответственного за реакцию циклизации [20]. В на-

Таблица 3. Результаты ТСХ-анализа железосвязывающих метаболитов *B. licheniformis* VK21

Вещество	R_f в системах*				Окрашивание пятен			
	А	Б	В	Г	CAS-реактив	Цитрат железа-аммония – гексацианоферрат (III) калия	Cl ₂ с проявлением крахмалом – КJ	Нингидрин
S_{VK21}	0.95	0.95	0.05	0.78	+	+	+	–
ДНВА**	0.88	0.00	0.48	0.57	–	+	–	–

* Системы: см. “Эксперимент. часть”.

** Вещество взято в качестве контроля.

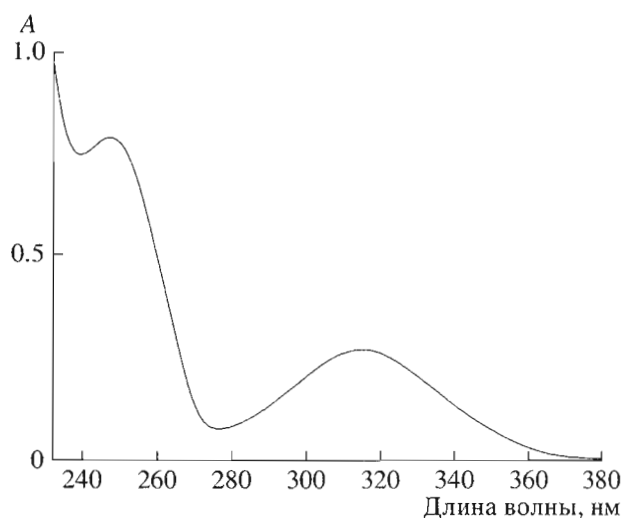
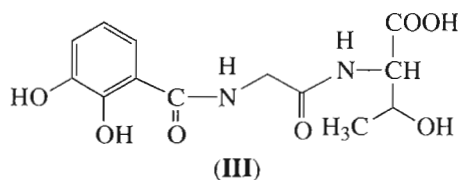


Рис. 4. УФ-спектр 100 мкМ сидерофора S_{VK21} в метаноле.

стоящее время ведется изучение организации генетического локуса, кодирующего синтетазу сидерофора терморезистентного штамма *B. licheniformis* VK21.



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы, условия культивирования. Термофильные и терморезистентные штаммы бацилл были любезно предоставлены: *Bacillus* spp. VK1, VK6, VK19 и *B. licheniformis* VK2 – В.М. Крамаровым (лаборатория биотехнологии ИБХ РАН); *Bacillus* sp. VK17 и *B. licheniformis* VK21 – Н.И. Матвиенко (группа молекулярной биологии Института белка РАН); штаммы *Bacillus* sp. B2101 и *B. licheniformis* B431, B432, B433 были получены из отдела Всесоюзной коллекции микроорганизмов, ИБФМ РАН. Культивирование штаммов проводили при 45°C (VK1 и VK6 – при 55°C) в минимальной среде следующего состава (г/л): казаминовых кислот (Difco, США) – 1.5; KCl – 0.2; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 3; KH_2PO_4 – 1; pH доводили 10 М КОН до 7.3 перед стерилизацией. В качестве источника углерода использовали сахарозу в концентрации 0.4%. Для получения плотной среды добавляли 1.5% агар-агара (Difco, США).

Минимальную среду с CAS-реактивом («синий агар») готовили как описано в работе [22]. Компоненты среды растворяли в 0.1 М буфере PIPES–KOH, pH 6.8. Раствор реактива, содержащий 1 мМ хром-азурол S (Sigma, Германия), 2 мМ цетавлон

(Serva, Германия) и 0.1 мМ $FeCl_3$, стерилизовали автоклавированием, смешивали с девятью объемами расплавленной агаризованной среды и разливали по чашкам.

Культуру штамма *B. licheniformis* VK21 в жидкой среде растили в колбах объемом 700 мл, содержащих по 100 мл исходной среды с добавлением 0.2 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Для крупномасштабного выделения культивирование проводили в 2-л колбах с 0.5 л среды, содержащей также 60 мкМ $MnSO_4 \cdot 5H_2O$. Колбы инкубировали на качалке HT (Infors AG, Швейцария) при 200 об/мин. Плотность культуры измеряли на спектрофотометре Ocean Optics (США) при длине волны 620 нм.

Выделение и очистка сидерофора. Метанольный элюат с носителя BioBeads SM2 (Bio-Rad, США) и органическую фазу после экстракции катехольного метаболита этилацетатом (см. рис. 2) упаривали на роторно-вакуумном испарителе Upran (Польша) при 40°C. Для хроматографии образец растворяли в 30% метаноле с 0.1% TFA и проводили ВЭЖХ на колонке Zorbax C18 (21 × 250 мм, 5 мкм, DuPont, США) в градиенте концентрации метанола в 0.1% TFA при скорости потока 5 мл/мин с элюцией в режиме: 30 → 45% метанола в течение 15 мин; далее 45 → 65% в течение 60 мин. Детектирование вели при длине волны 254 нм.

Биологический тест на восстановление роста клеток проводили методом диффузии в агар. В чашку Петри заливали 10 мл агаризованной минимальной среды, содержащей 300 мкг/мл EDTA и $2-4 \times 10^6$ /мл клеток штамма *B. licheniformis* VK21. Сидерофор S_{VK21} растворяли в 20 мМ калий-фосфатном буфере, pH 6.5. В лунки наносили тестируемые образцы объемом 50 мкл. Чашки инкубировали при 45°C. Функциональную активность сидерофора выявляли по наличию роста бактерий в зонах вокруг лунок.

Тесты с CAS-реактивом на наличие сидерофора проводили как описано в работе [22]. Реактив содержал 150 мкМ хром-азурол S, 15 мкМ $FeCl_3$ и 600 мкМ цетавлона, растворенных в 0.5 М буфере пиперазин-НСl, pH 5.6.

Для количественного анализа катехолов использовали реакцию с цитратом железа-аммония и 1,10-фенантролином [28], а также метод Агнов [30]. Поглощение проб измеряли на спектрофотометре Ocean Optics (США) при длине волны 510 нм. В качестве стандарта для построения калибровочных графиков и определения молярного коэффициента поглощения использовали 2,3-дигидроксисбензойную кислоту (Fluka, Швейцария).

ТСХ проводили: в системах А (*n*-бутанол– $CH_3COOH-H_2O$, 12 : 3 : 5) и Б (*n*-бутанол–ацетон, 3 : 2) – на пластинках Cellulose; в системах В (бензол– $CH_3COOH-H_2O$, 125 : 72 : 3) и Г ($CH_3OH-CHCl_3$, 1 : 1) – на пластинках Silica gel 60 F₂₅₄

Таблица 4. Химические сдвиги (δ , м.д. (± 0.01 м. д.)) сигналов протонов и ^{13}C , КССВ $^3J_{\text{HN}, \text{H}\alpha}$ (Гц) и $^3J_{\text{H}, \text{H}\beta}$ (CD_3OH , pH 3.06, 30°C)

Аминокислотный остаток	^{13}C	^1H	Группа	$^3J_{\text{HN}, \text{H}\alpha}$	$^3J_{\text{H}, \text{H}\beta}^*$
Arg	171.49		C'		
	117.18		C1		
	149.50		C2		
	147.32		C3		
	119.82	6.90	C4 H		
	119.82	6.69	C5 H		
	119.54	7.29	C6 H		
Gly	172.85		C'		
		8.98	NH	5.6	
	44.15	4.01, 4.34	C $^{\alpha}$ H $_2$		16.3
Thr	169.66		C'		
		8.27	NH	7.5	
	59.14	4.51	C $^{\alpha}$ H		1.5
	72.43	5.49	C $^{\beta}$ H		
	17.16	1.27	C $^{\gamma}$ H $_3$		6.6

* Для остатка Gly приведена геминальная $^2J_{\text{H}, \text{H}}$

(Merck, Германия). Для обнаружения веществ применяли: раствор 1% крахмала в 1% KJ после обработки пластинки газообразным Cl_2 в течение 5 мин; 0.2% раствор нингидрина в ацетоне; CAS-реактив; смесь равных объемов 1% водных растворов цитрата железа-аммония и гексацианоферрата (III) калия.

Спектр поглощения сидерофора измеряли на спектрофотометре Ocean Optics (США) с использованием программного пакета OOI Base32.

Аминокислотный состав сидерофора определяли после стандартного кислотного гидролиза на анализаторе Biotronic LC 5000 (Германия).

Спектры ЯМР сидерофора S_{VK21} были получены на спектрометре Avance DRX 500 (Bruker, Германия) с рабочей частотой на протонах 500 МГц. Сидерофор (650 нмоль) растворяли в 0.6 мл CD_3OH или CD_3OD (99.95% дейтерия, Stohler Isotope Chemicals), pH 3.06. Спектры двумерной (2D) корреляционной спектроскопии DQF-COSY [32], 2D (полной) корреляционной спектроскопии TOCSY [33] с $\tau_m = 90$ мс и спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) NOESY ($\tau_m = 400$ мс) [34] были записаны в фазоизбирательном режиме [35]. Для подавления сильного сигнала раствори-

теля использовали методику WATERGATE [36]. Гетероядерные 2D-корреляционные эксперименты (^1H - ^{13}C HMQC [37, 38] и ^1H - ^{13}C HMBC [39]) проводили на образцах с естественным содержанием ^{13}C . Для восстановления равновесного состояния системы ядерных спинов была использована задержка d_1 1.4–2.0 с. Химические сдвиги сигналов измеряли относительно остаточного сигнала CH_3 -группы CD_3OH , химический сдвиг которого считался равным 3.31 м.д. для протонов и 49.30 м.д. для ^{13}C . Константы спин-спинового взаимодействия протонов (H–NC $^{\alpha}$ –H, H–C $^{\alpha}$ –H и H–C $^{\alpha}$ C $^{\beta}$ –H) измеряли в одномерных (1D) спектрах с цифровым разрешением 0.25 Гц на точку. Все спектры ЯМР обрабатывали с помощью стандартного программного обеспечения XWINNMR (Bruker, Германия). Полное отнесение сигналов протонов и ядер ^{13}C было произведено по стандартной методике [40, 41].

Титрование сидерофора в CD_3OH проводили 0.1 М водными растворами DCI и KOD. Значение pH измеряли без поправки на ^2H непосредственно в ампуле.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность И.Л. Родионову и А.Н. Чулину (группа пептидного синтеза ФИБХ РАН) за оказанную техническую помощь и Л.Ф. Марковой (ФИБХ РАН) за проведение аминокислотного анализа.

Исследование структуры катехольного сидерофора выполнено при частичной финансовой поддержке Министерства науки и технологий РФ (проект № 96-03-08).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neilands J.B. // Structure and Bonding. 1984. V. 58. P. 1–24.
2. Neilands J.B. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 26723–26726.
3. Hider R.C. // Structure and Bonding. 1984. V. 58. P. 25–87.
4. Максимова Н.П., Блажевич О.В., Лысак В.В., Фомичев Ю.К. // Микробиология. 1994. Т. 63. С. 1038–1044.
5. Drechsel H., Jung G. // J. Pept. Sci. 1998. V. 4. P. 147–181.
6. Marahiel M.A., Stachelhaus T., Mootz H.D. // Chem. Rev. 1997. V. 97. P. 2651–2673.
7. Konz D., Marahiel M.A. // Chem. Biol. 1999. V. 6. P. R39–R48.
8. Meyer J.-M. // Arch. Microbiol. 2000. V. 174. P. 135–142.
9. Bultreys A., Gheysen I., Maraitte H., de Hoffmann E. // Appl. Env. Microbiol. 2001. V. 67. P. 1718–1727.
10. O'Brian I.G., Gibson F. // Biochem. Biophys. Acta. 1970. V. 215. P. 393–402.

11. Pollack J.R., Neilands J.B. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1970. V. 38. P. 989–992.
12. Ong S.A., Peterson T., Neilands J.B. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. P. 1860–1865.
13. Page W.J., von Tigerstrom M. // J. Gen. Microbiol. 1988. V. 134. P. 453–460.
14. Haag H., Hantke K., Drechsel H., Stojiljkovic I., Jung G., Zähner H. // J. Gen. Microbiol. 1993. V. 139. P. 2159–2165.
15. Yamamoto S., Okujo N., Fujita Y., Saito M., Yoshida T., Shinoda S. // J. Biochem. 1993. V. 113. P. 538–544.
16. Mullis K.B., Pollack J.R., Neilands J.B. // Biochemistry. 1971. V. 10. P. 4894–4898.
17. Wong D.K., Gobin J., Horwitz M.A., Gibson B.W. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. P. 6394–6398.
18. Fiedler H.P., Krastel P., Müller J., Gebhardt K., Zeeck A. // FEMS Microbiol. Lett. 2001. V. 196. P. 147–151.
19. Peters W.J., Warren R.A.J. // J. Bacteriol. 1968. V. 95. P. 360–368.
20. May J.J., Wendrich T.M., Marahiel M.A. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 7209–7217.
21. Guerry P., Perez-Casal J., Yao R., McVeigh A., Trust T.J. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 3997–4002.
22. Schwyn B., Neilands J.B. // Anal. Biochem. 1987. V. 160. P. 47–56.
23. Bsat N., Herbig A., Casillas-Martinez L., Setlow P., Helmann J.D. // Mol. Microbiol. 1998. V. 29. P. 189–198.
24. Inaoka T., Matsumura Y., Tsuchido T. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 3697–3703.
25. Touati D. // Arch. Biochem. Biophys. 2000. V. 373. P. 1–6.
26. Cornish A.S., Page W.J. // Microbiology. 1998. V. 144. P. 1747–1754.
27. Dussurget O., Rodriguez M., Smith I. // Mol. Microbiol. 1996. V. 22. P. 535–544.
28. Rioux C., Jordan D.C., Rattray J.B.M. // Anal. Biochem. 1983. V. 133. P. 163–169.
29. Walsh B.L., Warren R.A.J. // Can. J. Microbiol. 1971. V. 17. P. 175–177.
30. Barnum D.W. // Anal. Chem. Acta. 1977. V. 89. P. 157–166.
31. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: Пер. с англ. М.: Мир, 1991.
32. Rance M., Sorensen O.W., Bodenhausen G., Wagner C., Ernst R.R., Wuthrich K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1983. V. 117. P. 479–485.
33. Bax A., Davis D.G. // J. Magn. Reson. 1985. V. 65. P. 355–366.
34. Wagner R., Berge S. // J. Magn. Reson. 1996. V. 123A. P. 229–232.
35. States D.J., Habercorn R.A., Ruben D.J. // J. Magn. Reson. 1982. V. 48. P. 286–292.
36. Piotto M., Saudek V., Sklenar V. // J. Biomol. NMR. 1992. V. 2. P. 661–665.
37. Bax A., Griffey R.H., Hawkins B.L. // J. Magn. Reson. 1983. V. 55. P. 301–315.
38. Bax A., Subramania S. // J. Magn. Reson. 1986. V. 67. P. 565–569.
39. Bax A., Summers M.F. // J. Am. Chem. Soc. 1986. V. 108. P. 2093–2094.
40. Wishart D.S., Bigam C.G., Yao J., Abildgaard F., Dyson H.J., Oldfeld E., Markley J.L., Sykes B.D. // J. Biomol. NMR. 1995. V. 6. P. 135–140.
41. Wuthrich K. NMR of Proteins and Nucleic Acids. New York: John Wiley and Sons, 1986.

A Catechol Siderophore Produced by the Thermoresistant *Bacillus licheniformis* VK21 Strain

Yu. V. Temirov[#], T. Z. Esikova*, I. A. Kashparov^{**}, T. A. Balashova^{***},
L. M. Vinokurov*, and Yu. B. Alakhov*

[#]Phone: (0967) 73-0653; e-mail: yuri_temirov@rambler.ru

^{*}Pushchino Branch, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 8, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

^{**}Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

^{***}Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

Thermophilic and thermoresistant strains of bacilli were screened on a medium containing Chrome Azurol S for producers of siderophores. It was found that the *Bacillus licheniformis* VK21 strain dramatically increases secretion of the metabolite, a chelator of Fe³⁺, in response to addition of manganese(II) salts. The growth of the producer on a minimum medium containing MnSO₄ under the conditions of iron deficiency is accompanied by the accumulation of a catechol product, the content of which reaches a maximum at the beginning of the stationary growth phase of culture. In the presence of FeCl₃, the amount of the catechol product in the medium considerably decreases. The siderophore, called S_{VK21}, was isolated from the cultural medium and purified by reversed phase HPLC, and its siderophore function was confirmed by the test for the restoration of growth of producer cells in a medium containing EDTA. The UV spectrum of the siderophore has absorption maxima at 248 and 315 nm. According to amino acid analysis and NMR spectrometry, the metabolite S_{VK21} is 2,3-dihydroxybenzoyl-glycyl-threonine. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: Bacillus bacteria, catechol metabolites, siderophores, thermophilic and thermoresistant bacteria