



УДК 577.15.3 + 577.155.2

ПРИРОДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ НУКЛЕАЗЫ ПИГМЕНТНЫХ
И БЕСПИГМЕНТНЫХ ШТАММОВ *SERRATIA MARCESCENS**Киреева Н. А., Юсупова Д. В., Беляева М. И.,
Андреев Л. В.**Казанский государственный университет, кафедра микробиологии;
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов, Пуцино*

Из клеток пигментных и беспигментных штаммов *Serratia marcescens* экстракцией ацетоном с последующим извлечением петролейным эфиром выделены ингибиторы нуклеазы *S. marcescens*. Спектральный анализ, растворимость в неполярных растворителях, изучение подвижности в различных системах для разделения липидов в тонком слое силикагеля и на колонке с окисью алюминия, изучение жирнокислотного состава позволило отнести предварительно «ингибитор I» к глицеридам, а «ингибитор II» — к неполярным жирорастворимым веществам.

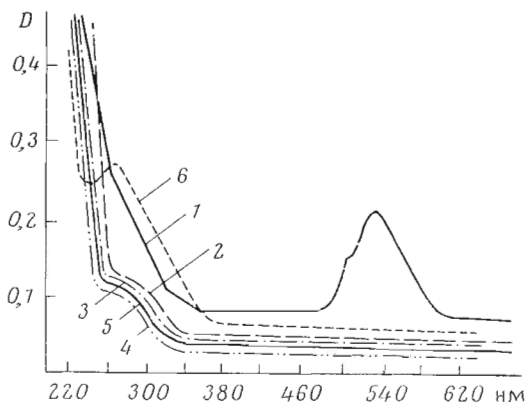
Нами было показано [1], что препараты бактериального пигмента продигозина, полученные по методу Вильямса [2] из клеток *Serratia marcescens*, подавляют активность внеклеточной нуклеазы *S. marcescens*. Применяя методику выделения продигозина, ингибитор удалось выделить и из клеток беспигментного штамма *S. marcescens*, у которого продигозин не обнаруживался спектрофотометрически. Эти данные позволяют считать, что ингибирующее действие препаратов продигозина, полученных по методу Вильямса, связано не с самим продигозином, а с соединениями, экстрагируемыми из клеток ацетоном и петролейным эфиром при его выделении.

С целью идентификации природы обнаруженного нами ингибитора была проведена работа по отделению продигозина от сопутствующих ему при выделении примесей, фракционированию интерферирующих веществ и изучению влияния полученных фракций на нуклеазу *S. marcescens*. Параллельно аналогичная работа была проведена с экстрактами, полученными из клеток беспигментных штаммов по методике выделения продигозина.

В результате тонкослойной хроматографии препаратов пигмента в системе, подобранной для разделения общих липидов (гексан — диэтиловый эфир, 8 : 3), выделены 6 фракций с R_f 0,0; 0,03; 0,45; 0,62; 0,85; 0,96. Продигозин оставался на старте в виде ярко окрашенной полосы.

Как видно из таблицы, где представлено распределение вещества по фракциям в процентах от нанесенного на хроматограмму, наибольшее содержание азота обнаружено во фракциях 1 и 3, фосфор обнаружен только во фракции 1, где обычно при хроматографии в системе для разделения общих липидов остаются фосфолипиды. Спектры всех фракций в видимой и ультрафиолетовой областях (рисунок) идентичны и имеют небольшие пики в областях 260 и 280 нм. Лишь спектр стартового пятна (фракция 1),

Спектры поглощения фракций (1—6), полученных при тонкослойной хроматографии препарата продигиозина в системе гексан — диэтиловый эфир, 8 : 3. Растворитель — подкисленный этанол



имеющего ярко-красную окраску, аналогичен спектру продигиозина, т. е. имеет максимум при 535 нм с коленом при 510 нм.

При воздействии реактивом Эрлиха в кислой среде [3] на фракции, полученные при хроматографии препаратов продигиозина, фракция 3 дала ярко-красное окрашивание, характерное для пирролов и полипирролов с незамещенным α -положением. На основании этой реакции было сделано заключение о наличии во фракции 3 пирролсодержащих предшественников продигиозина. Обнаружение во фракции 3 азота не противоречило сделанному заключению. При окрашивании суданом III присутствие липидов было обнаружено во всех фракциях.

Таким образом, хроматография исходных препаратов свидетельствует об их гетерогенности и наличии в них соединений липидной природы.

Исследование действия полученных фракций на очищенную нуклеазу *S. marcescens* показало, что основная ингибирующая активность препаратов (75%) сосредоточена во фракциях 2 и 6, которые тормозили скорость ферментативной реакции на 98 и 92% при концентрации 0,2 мг/мл. При этой же концентрации фракция 3 ингибировала нуклеазу на 20%. Фракции 2 и 6 составляли 40% от исходного вещества и не содержали пигмента или его пирролсодержащих предшественников. Фракция 2 была обозначена условно как ингибитор I, 6 — как ингибитор II. Стартовая фракция, на долю которой приходилось 25—30% исследуемого вещества и в которой был сосредоточен продигиозин, практически не обладала ингибирующей активностью (таблица).

С целью выяснения гомогенности и дальнейшей очистки фракция 2 была подвергнута рехроматографии (II стадия очистки) и разделилась на 4 пятна. Из них ингибирующей активностью обладала фракция 3 (R_f 0,22, выход по весу 30—35%), которая в концентрации 0,1 мг/мл ингибировала активность фермента на 92%. Эта фракция при дальнейшей хроматографии

Тонкослойная хроматография препаратов продигиозина в системе гексан — диэтиловый эфир, 8:3

Характеристика препаратов	Цельный продигиозин	Фракции					
		1	2	3	4	5	6
R_f		0,0	0,03	0,45	0,62	0,85	0,96
Распределение вещества по фракциям, мг	100	25-30	15-20	10-15	5-10	5-10	15-20
Содержание (%) N	3,43	3,85	Следы	5,11	Следы	1,25	1,28
	Р	Следы	3,61	0	0	0	0
Ингибирующая активность, усл. ед.	160 000	6000	72 000	8000	2000	2000	48 000

на силикагеле в свою очередь разделилась на 5 фракций (III стадия очистки). Из них ингибирующей активностью обладала фракция 3 (R_f 0,28, выход по весу 20—25%), она была однородна при рехроматографии в различных системах, при хроматографии в системе гексан — диэтиловый эфир (8 : 3) имела R_f 0,03. Ингибирующая фракция не окрашивалась реактивом Эрлиха, давала положительную качественную реакцию на глицерин. Методом ГЖХ в составе этой фракции были обнаружены следующие жирные кислоты: $C_{14}:0$, $C_{15}:0$, $C_{16}:0$, $C_{16}:1$, $C_{17}:0$, $C_{17}:\Delta$, $C_{18}:0$, $C_{18}:1$, $C_{19}:\Delta$. На основании полученных данных «ингибитор I» отнесен к глицеридам.

«Ингибитор II» был также подвергнут дальнейшей очистке хроматографией на колонке с окисью алюминия [4] (II стадия очистки). Мы исходили из предположения, что при хроматографии в системе для разделения общих липидов эта фракция может содержать и другие неполярные жирорастворимые вещества, такие, как углеводороды [5]. По методу, предложенному Дедюхиной с соавт. [4], при элюции гексаном на колонке с окисью алюминия углеводороды отделяются от других жирорастворимых компонентов смеси. Оставшиеся на колонке вещества элюировались последовательно хлороформом, ацетоном, смесью гексан — диэтиловый эфир (1 : 1) и диэтиловым эфиром. В результате хроматографии выделено 5 фракций. Исследование действия полученных фракций на активность нуклеазы *S. marcescens* показало, что ингибирующим действием на нуклеазу обладает только фракция, элюированная гексаном, в которой предполагалось присутствие углеводородов. Она ингибировала активность фермента на 88% при концентрации 0,1 мг/мл.

После проверки ряда систем растворителей оказалось, что гексановая фракция при хроматографии в тонком слое силикагеля в эталонном изоктане разделяется на 5 веществ. Выход по весу 10—15, 10—15, 15—20, 20—25, 20—25% соответственно. Пятна, соответствующие веществам, дают небольшие «хвосты», но разделение вполне воспроизводимо, и при контрольной рехроматографии каждого пятна они появляются соответственно значениям R_f 0,0; 0,20; 0,46; 0,65; 0,81.

В результате исследования ингибирующего действия полученных фракций на нуклеазу оказалось, что тормозящей активностью обладают все 5 фракций. Фракция 4 ингибирует активность фермента так же, как и исходная гексановая фракция с колонки. Остальные фракции ингибируют фермент на 61, 43, 72 и 60% (максимальный эффект ингибирования) при концентрации 0,4 мг/мл. По-видимому, в данном случае происходит «размазывание» ингибирующей активности в процессе хроматографии, хотя основная ингибирующая активность сохраняется во фракции 4. Для ИК-спектров «ингибитора II» (I, II, III стадии очистки) характерны полосы поглощения в областях 2860, 2930, 2960 см^{-1} , которые соответствуют валентным колебаниям СН-групп. У всех трех спектров имеются полосы в областях 1380 и 1470 см^{-1} , характерные для зонтичных колебаний CH_2 -групп.

На основании анализа полученных данных «ингибитор II» был отнесен к неполярным жирорастворимым веществам. Окончательная природа «ингибитора II» выясняется.

Таким образом, из клеток *S. marcescens* были выделены и очищены два препарата липидной природы, обладающие ингибирующим действием на внеклеточную нуклеазу *S. marcescens*. «Ингибитор I» отнесен к глицеридам, «ингибитор II» — к неполярным жирорастворимым веществам. Требуются дополнительные исследования для окончательной идентификации природы обнаруженных ингибиторов.

Экспериментальная часть

В работе использовали пигментные штаммы *S. marcescens* ВИ-211 АТСС 9986 и их беспигментные варианты. Продигозин выделяли извлечение из бактериальных клеток ацетоном с последующей экстракцией петролейным эфиром [2].

Нуклеазу *S. marcescens* получали из культуральной жидкости 48-часовой культуры, выращенной на модифицированной среде Бантинг [6]. Фермент выделяли из культуральной жидкости путем осаждения сульфатом аммония, очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-100 с последующей хроматографией на DEAE-целлюлозе [7].

ДНКазную активность определяли вискозиметрическим методом, выражали в вискозиметрических ед./мл [8], а по приросту кислоторастворимых продуктов реакции [9] — в оптических ед./мл/ч. За оптическую единицу активности принимали количество фермента, дающее увеличение оптической плотности в опытных образцах (за счет прироста кислоторастворимых продуктов реакции) на единицу за 1 ч инкубации в пересчете на 1 мл исследуемого раствора. Оптическую плотность измеряли при 260 нм на СФ-4А в 1-см кюветах. Состав реакционной смеси в обоих случаях (общий объем 1 мл): 0,6 мл ДНК (1,2 мг/мл); 0,2 мл 0,2 М Трис-НСl-буфера (рН 8,5), 0,1 мл 0,075 М $MgCl_2$; 0,1 мл ферментного раствора. Инкубацию проводили в течение 20 мин при 37°. Субстратом для определения ДНКазной активности служила натриевая соль ДНК, полученная по методу Кея в модификации Бенинга [10].

Для изучения ингибирующего действия на нуклеазу *S. marcescens* препараты растворяли в небольшом количестве этанола и разводили соответствующим количеством дистиллированной воды. К 9,9 мл полученного раствора добавляли 0,1 мл стандартного раствора испытуемого фермента (активность стандартного ферментного раствора с учетом всех разведений равна 30 виск. ед./мл) и выдерживали 20 мин при 27°. В контроле испытуемые растворы заменяли соответствующим раствором этанола. В контрольных и опытных пробах определяли нуклеазную активность. За единицу активности ингибитора принимали количество, вызывающее уменьшение активности стандартного раствора ДНКазы на 1 %.

ТСХ препаратов продигозина проводили в системе растворителей гексан — диэтиловый эфир (8 : 3), используя силикагель КСК. Отдельные фракции получали методом препаративной ТСХ. Фракции элюировали хлороформом, смесью гексан — диэтиловый эфир (1 : 1), гексан — метанол (1 : 1). «Ингибитор I» очищали дополнительно хроматографией в топком слое силикагеля в системе хлороформ — изопропанол — 15 н. аммиак, 8 : 5 : 0,5 (II стадия очистки), гексан — диоксан — изопропанол — 15 н. аммиак, 5 : 2 : 1 : 0,01 (III стадия очистки). Фракции элюировали смесью хлороформ — метанол, 1 : 1.

Для исследования жирнокислотного состава фракции подвергались кислоте метанолизу в атмосфере азота [11]. Метилловые эфиры жирных кислот очищали методом ТСХ в системе гексан — диэтиловый эфир, 19 : 1. Очищенные метилловые эфиры жирных кислот разделяли методом ГЖХ на хроматографе Packard (Швеция) с пламенно-ионизационным детектором, длина колонки 1,8 м. В качестве неподвижной фазы использовали 10% полиэтиленгликольсукцинат на хромосорбе W (60—80 меш). Температура колонки 170°, скорость газа-носителя (аргона) 36 мл/мин. Для доказательства присутствия в смеси ненасыщенных жирных кислот проведено гидрирование смеси в присутствии платинового катализатора и повторный анализ методом ГЖХ. При идентификации высших жирных кислот использовали стандартные смеси жирных кислот.

Количество вещества во фракциях определяли после элюирования его соответствующим растворителем и высушивания до постоянного веса под вакуумом. Азот определяли микрометодом Дюма [12], фосфор — калориметрически по методу Рота [13].

Спектральный анализ препарата продигозина и его фракций осуществляли в подкисленном этаноле на спектрофотометрах СФ-4 и Specord UV-Vis (ГДР). ИК-спектры были сняты в четыреххлористом углеороде на приборе UR-10 (ГДР).

ЛИТЕРАТУРА

1. Юсупова Д. В., Беляева М. И., Киреева Н. А., Гарейшина А. З. (1975) Тезисы V съезда ВМО (секция физиологии микробов), с. 106—107, Ереван.
2. Williams R., Green G., Harporport D. (1956) *J. Bacteriol.*, **71**, 115—120.
3. Минкевич И. Е. (1949) Бактерии группы кишечной палочки как санитарно-показательные микроорганизмы, с. 148—149, Медгиз, Л.
4. Дедюхина Э. Г., Андреев Л. В., Попков Г. П., Ерошин В. К. (1972) *Микробиология*, **41**, 664—667.
5. Алимova Е. К., Аствацатурьян А. Т. (1967) Исследование жирных кислот и липидов методом хроматографии, с. 83—93, «Медицина», М.
6. Юсупова Д. В., Гарейшина А. З., Беляева М. И. (1972) *Прикл. биохимия и микробиол.*, **8**, 922—926.
7. Лещинская И. Б., Балабан Н. П., Егорова Г. С., Таяншин В. И., Третьяк Т. М. (1974) *Биохимия*, **43**, 116—122.
8. Бенинг Г. П. (1964) Бактериальные нуклеазы, с. 17—38, Изд-во КГУ, Казань.
9. Schmidt G. (1955) in *Methods in Enzymology*, p. 771, Acad. Press, N. Y. — London.
10. Бенинг Г. П. (1969) Бактериальные нуклеазы и их действие на опухолевый рост, с. 226—230, Изд-во КГУ, Казань.
11. Ways P., Reed C., Nanahan D. (1965) *Clin. J. Invest.*, **4**, 1248—1252.
12. Климов В. А. (1975) Основные методы анализа органических соединений, с. 71—90, «Химия», М.
13. Губен-Вейль (1963) *Методы органической химии*, т. 2, с. 203—205, Госхимиздат, М.

Поступила в редакцию
25.XI.1976

NATURALLY-OCCURRING NUCLEASE INHIBITORS FROM PIGMENT AND PIGMENTLESS STRAINS *SERRATIA MARCESCENS*

KIREEVA N. A., YUSUPOVA D. V., BELYAEVA M. I., ANDREYEV L. V.

*Department of Microbiology, V. I. Ulyanov-Lenin State
University, Kazan; Institute of Biochemistry
and Physiology of Microorganisms, Academy of Sciences
of the USSR, Pushchino*

The inhibitors of *Serratia marcescens* nuclease were isolated from the cells, of pigment and pigmentless strains *Serratia marcescens* using consecutive acetone and petroleum ether extractions. Spectral analysis, solubility in nonpolar solvents, chromatographic mobility on silica gel thin-layer or alumina column in the systems for lipid separation, as well as fatty-acid composition were the basis for classifying the «inhibitor I» as a glyceride and «inhibitor II» — as nonpolar fat-soluble substance.