

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
«ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԻՏԱԱՐՏԱԴՐԱԿԱՆ ԿԵՆՏՐՈՆ ՊՈԱԿ

ԱՎԵՏԻՍՅԱՆ ՍՈՆԱ ՈՍԿԱՆԻ

BACILLUS THURINGIENSIS-ի ՋՐԱԼՈՒՅԾ ՄԵԼԱՆԻՆԻ
ՍՏԱՑՈՒՄԸ, ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒՄԸ ԵՎ ՓՈՐՉԱՐԿՈՒՄԸ

Գ.00.14 - «Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

Երևան – 2014

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» ГНКО

АВETИCЯН СОНА ВОСКАНОВНА

ПОЛУЧЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ИСПЫТАНИЕ
ВОДОРАСТВОРИМОГО МЕЛАНИНА
BACILLUS THURINGIENSIS

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.00.14 – «Биотехнология»

Ереван – 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է «Կենսատեխնոլոգիա ԳՀԻ» ՓԲԸ –ում (ներկայում ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ):

Գիտական ղեկավար՝ կ.գ.թ. Ա.Ս. Հովսեփյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կ.գ.դ., պրոֆեսոր Հ.Գ. Հովհաննիսյան
կ.գ.թ. Ե.Ն. Շչերբակովա

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2014 թ. հուլիսի 11-ին, ժամը 16⁰⁰, ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցեն՝ 0056, ՀՀ, Երևան, Գյուրջյան փող. 14, հեռ/ֆաքս՝ (37410) 654180:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2014 թ. հունիսի 11-ին

Մասնագիտական խորհրդի
գիտական քարտուղար, կ.գ.թ.՝ Գ.Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена в ЗАО «НИИ Биотехнологии» (ныне НПП «Армбиотехнология» НАН РА)

Научный руководитель: к.б.н. А.С. Овсепян

Официальные оппоненты: д.б.н., профессор Г.Г. Оганесян
к.б.н. Е.Н. Щербакова

Ведущая организация: Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 11 июля 2014 г. в 16⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НПП «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/факс (37410) 654180.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПП «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 11 июня 2014 г.

Ученый секретарь специализированного совета, к.б.н. Г.Е. Аветисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. В настоящее время исследование и применение биополимеров – высокомолекулярных природных соединений, выполняющих ключевые функции в процессах жизнедеятельности всех живых организмов, является одним из наиболее актуальных направлений фундаментальной и прикладной науки. К числу наиболее часто изучаемых макромолекулярных соединений природного происхождения после белков и нуклеопротеинов относятся углеводные и фенольные биополимеры. Особое место среди природных полимеров занимают меланины. Будучи химически относительно инертными, меланины, в то же время, являются единственными биологическими полимерами со свойствами стабильного свободного радикала. Характерными особенностями меланинов являются наличие высокостабильных парамагнитных центров, разнообразных функциональных групп, а также системы сопряженных связей в их молекулах. Эти особенности структуры определяют их фото- и радиопротекторные, антиоксидантные, а также другие свойства, благодаря которым меланины нашли широкое применение в медицине, фармакологии, косметологии, сельском хозяйстве и пищевой промышленности.

На пути широкого использования меланинов в различных областях существуют некоторые сложности. Производство синтетических меланинов – дорогостоящий процесс. Кроме того, синтетические меланины и большинство природных, выделяемых из различных организмов (растения, микроорганизмы и животные), нерастворимы в воде, что существенно затрудняет приготовление фармакологических и косметических препаратов на их основе.

Известные в литературе штаммы-продуценты меланинов характеризуются низкой активностью, они, в основном, секретируют ДОФА-меланины [Пат. 2278163 РФ, 2006; Пат. 2186105 С2 РФ, 2002]. Описанные в этих работах меланины нерастворимы в воде, имеют внутриклеточную локализацию. Применение меланинов такого типа ограничивается как нерастворимостью их в воде, так и дороговизной процессов выделения и очистки. Крайне ограничены литературные данные относительно штаммов-продуцентов водорастворимого бактериального меланина. Известные штаммы-продуценты меланинов имеют низкую активность. Так, рекомбинантный штамм *Streptomyces lividans* синтезирует 3,3 г/л меланина [Пат. 5814495 США, 1998].

Одной из центральных проблем современной медицинской биотехнологии является получение новых физиологически активных препаратов. В последнее время исследуются возможности использования препаратов, регулирующих каскад процессов, задействованных в регенерации нервной ткани. Как было сказано выше, меланины проявляют протекторные свойства. В связи с этим изучение действия бактериального меланина на регенерацию нервных клеток является важной задачей.

Повышение продуктивности сельского хозяйства путем применения возрастающих доз минеральных удобрений и ядохимикатов привело к опасному загрязнению окружающей среды. И на сегодняшний день усилия ученых направлены на применение экологически чистых стимуляторов роста, полученных биотехнологическим путем.

Известно, что меланиновые пигменты некоторых актино- и микромицетов имеют сходство с гумусовыми веществами и могут стимулировать рост растений [Лях, 1981]. Являясь продуктами внутриклеточного синтеза, меланины, в то же время, близки по многим физическим и химическим свойствам к гуминовым кислотам. Однако сведения по применению меланинодержающих препаратов в качестве активных регуляторов

роста растений ограничены. В связи с этим возникает необходимость исследования меланинов с оценкой его применения в растениеводстве.

Получение дешевого водорастворимого природного меланина сделает этот ценный продукт широко доступным, что может значительно стимулировать и ускорить его использование в медицине, косметологии, а также в сельском хозяйстве.

Исходя из вышесказанного, поиск новых источников меланина, в том числе бактериальных штаммов-продуцентов, синтезирующих водорастворимые меланины, определение биологической активности и расширение спектра их практического применения является важной и актуальной задачей.

Объектом исследований выбраны штаммы *Bacillus thuringiensis*, обладающие высокой инсектицидной активностью.

Целью диссертационной работы является получение высокоактивных меланинсинтезирующих штаммов *B. thuringiensis*, исследование инсектицидной активности этих штаммов, изучение некоторых характеристик бактериального меланина, оценка биологической активности и перспективы его применения.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

- получение путем индуцированного мутагенеза высокоактивных меланинпродуцирующих мутантов на основе инсектицидных штаммов *B. thuringiensis* разных сероваров;
- разработка оптимальных условий культивирования полученных штаммов, обеспечивающих наибольший выход меланина;
- изучение путей биосинтеза меланина у пигментообразующих мутантов *B. thuringiensis*;
- характеристика водорастворимого бактериального меланина;
- определение экологической безопасности бактериального меланина;
- изучение биологической активности бактериального меланина на растительных и животных объектах;
- исследование инсектицидной активности у полученных меланинсинтезирующих мутантов *B. thuringiensis*.

Научная новизна.

- Впервые получены высокоактивные меланинсинтезирующие штаммы *B. thuringiensis* у разных сероваров, обладающие инсектицидной активностью. Показано, что основными лимитирующими факторами биосинтеза меланина являются содержание тирозина в среде и аэрация. Оптимизация условий культивирования по этим параметрам приводит к повышению выхода целевого продукта более, чем 11 г/л.
- Впервые показано, что у полученных меланиногенных мутантов существует прямая связь между устойчивостью к стрептомицину и пигментообразованием.
- Полученный бактериальный меланин (БМ) является водорастворимым пигментом, молекулярная масса которого согласно результатам SDS-PAG электрофореза соответствует 3,5-8,0 кДа.
- Впервые показано, что синтез меланина у меланиногенных штаммов *B. thuringiensis* осуществляется при участии фермента тирозиназы.
- Впервые показана высокая биологическая активность водорастворимого БМ на животных и растительных объектах.
 - В опытах на животных (белые крысы) выявлено, что БМ способствует

усилению васкуляризации, пролиферации глии, подавлению образования рубца при повреждении мозговой ткани у подопытных животных.

– Для ряда растений (овощные, фруктовые и декоративные) установлено, что БМ является сильным фитостимулятором, а также повышает их устойчивость к абиотическим факторам среды.

- Показано повышение инсектицидной активности у меланиногенных мутантов *B. thuringiensis*, что является следствием фотопротекторного свойства пигмента.

Практическая ценность.

- На основе полученных высокоактивных меланиногенных штаммов можно организовать рентабельное безотходное производство, когда биомасса используется в качестве инсектицидного препарата, а культуральная жидкость – для извлечения меланина. Одновременный синтез меланина и инсектицидных токсинов в одном производственном процессе, несомненно, обеспечит высокий уровень эффективности использования этих штаммов.
- Высокоочищенный БМ можно использовать в медицине для восстановления физиологических функций и регенерации нервных структур после травмы.
- БМ можно использовать в растениеводстве в качестве фитостимулятора для получения качественного посадочного материала, а также для повышения устойчивости растений к абиотическим факторам среды.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Получение высокоактивных меланинсинтезирующих продуцентов на основе инсектицидных штаммов *B. thuringiensis* разных сероваров.
- Оптимизация условий культивирования, обеспечивающих наибольший выход конечного продукта.
- Определение характеристик БМ.
- Изучение тирозиназной активности у меланиногенных мутантов *B. thuringiensis*.
- Экологическая безопасность и биodeградируемость водорастворимого БМ.
- Биологическая активность водорастворимого БМ на растительных и животных объектах.
- Инсектицидная активность у полученных меланинсинтезирующих мутантов *B. thuringiensis*.

Связь работы с научными тематиками. Работа выполнена в рамках проектов АBB1-9006-УЕ-08 «Применение бактериального меланина в качестве фитостимулятора в сельском хозяйстве» (2008-2009 г.), ANSEF № 1270-NS-biotech «Перспективы применения бактериального меланина в качестве нового фитостимулятора» (2008 г.), ANSEF № 2077-NS-biotech «Исследование физиологической активности водорастворимого бактериального меланина» (2010 г.).

Личный вклад соискателя. Собственный вклад включает экспериментальную реализацию сформулированных задач, поиск и анализ научной литературы по теме, обобщение результатов исследований, оформление научных статей и диссертационной работы. Постановка основных задач и разработка методологии прорабатывались под руководством к.б.н., ведущего научного сотрудника лаборатории молекулярной биологии Овсепян А.С. Отдельные разделы исследований обсуждались совместно с д.х.н., заведующим сектором выделения и очистки БАВ Агаджаняном А.Е., к.б.н., заведующим лабораторией молекулярной биологии Амбарцумяном А.А., к.х.н.,

старшим научным сотрудником лаборатории технологии биосинтеза Пароняном Р.В., к.б.н., доцентом кафедры «Микробиологии, биотехнологии растений и микроорганизмов» ЕГУ Азарян К.Г.

Апробация работы. Материалы работы доложены на заседании ученого совета НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА; на международной конференции «Успехи биотехнологии: перспективы развития в Армении», Цахкадзор, РА, 2006 г.; на международной конференции «Современное состояние биотехнологии в Армении и роль МНТЦ в ее развитии», Цахкадзор, РА, 2008 г.; на международном научном семинаре «Современное состояние биотехнологических разработок и пути коммерциализации», Ереван, РА, 2012 г.; на 2-ой международной научной конференции молодых ученых «Вклад молодого поколения в развитие биотехнологии», посвященной 70-летию Национальной Академии Наук Армении, Ереван, 2013 г.

Место выполнения работы. Основная часть работы выполнена в НПЦ «Армбиотехнология» ГНКО НАН РА.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 252 источников, и приложения. Работа оформлена на русском языке, изложена на 132 страницах, иллюстрирована 27 рисунками и 20 таблицами.

Публикации. Основные результаты диссертации изложены в 15 научных работах, включая 7 научных статей и один патент РА, опубликованных как в республиканской, так и международной научной прессе.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В этой главе рассматривается меланиногенез у различных организмов, описываются ферменты, участвующие в биосинтезе меланинов. Обобщены современные представления о структуре меланинов разной природы, приведены данные об их характеристиках. Рассмотрена классификация природных меланинов. Представлены данные об антиоксидантном, противовоспалительном, фотопротекторном и других свойствах меланинов. Описаны их биологическая активность и области практического применения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Бактериальные штаммы. В работе использована коллекция музейных культур штаммов *B. thuringiensis* лаборатории молекулярной биологии НПЦ «Армбиотехнология». Валидность таксонов использованных культур сверялась по Euzéby, 2011 [www.bacterio.cict.fr]. В работе получены пигментобразующие (*pig*) штаммы: *B. thuringiensis subsp. gallerae 69-6K1 (Str, pig)*; *B. thuringiensis subsp. kurstaki Z11(Str, pig)*, *B. thuringiensis a8* (не идентифицирован) (*Str, pig*) коллекционный номер по ЦДМ полученных штаммов MDC 11212, MDC 11840 и MDC 11847, соответственно.

Среды. В качестве полноценных питательных сред использовали мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА), гидролизат рыбной муки (РПБ) и агаризованную среду гидролизата рыбной муки (РПА). Составы использованных минимальных (синтетических) сред описаны в работе. Ферментационные и посевные среды для биосинтеза меланина разработаны в настоящей работе.

Мутагенез бактерий осуществляли с помощью 1-метил-3-нитро-1-нитрозуанидина (НГ). Использовали также метод УФ-облучения [Миллер, 1976].

Уровень пигментобразования оценивали по интенсивности окрашивания ростовой среды спектральным методом на спектрофотометре «Perkin Elmer 550S UV-VIS» (США) при длине волны $\lambda = 315$ нм.

Тирозиназную активность определяли спектрофотометрически, регистрируя повышение оптического поглощения при $\lambda = 475$ нм. Концентрацию белка определяли методом Гровса и Дейвиса [Peterson, 1983].

Содержание белков в образцах меланина определяли методом Брэдфорда [Дарбре, 1989].

Содержание аминокислот в образцах меланина (после проведения кислотного гидролиза) определяли на аминокислотном анализаторе АААТ-339 (Чехия).

Содержание липидов в образцах меланина определяли хроматографически, углеводов – антроном методом [Мешкова, Северин, 1979].

Антиоксидантная активность БМ определялась согласно описанной методике [Hovhannisyann, 2004].

Для приготовления стандартных растворов использовали синтетический меланин фирмы Sigma (США), а также полученный нами очищенный препарат водорастворимого меланина.

Принадлежность к меланинам пигментов, синтезированных мутантными штаммами *B. thuringiensis*, была подтверждена качественными реакциями с H_2O_2 , $KMnO_4$, $FeCl_3$.

Молекулярную массу меланина определяли электрофорезом в 15 % PAG в присутствии SDS по методике, предложенной фирмой Фармация («Pharmacia», Швеция) [Pharmacia Uppsala, 1983].

Определение выживаемости вегетативных клеток штамма *B. thuringiensis* K1 в нестерильной и стерильной почве в лабораторных условиях проводили разработанным нами методом, использовали также метод генетической маркировки [Суховицкая, 1998].

Динамику ассимиляции БМ почвенными микроорганизмами проводили разработанным нами методом [Паронян и др., 2006].

Обработку растений БМ проводили согласно описанной методике [Азарян и др., 2008].

Анатомические исследования растений проводились на поперечных срезах нижних междоузлий стеблей по описанной методике [Прозина, 1960].

Изучение действия БМ на морфофункциональное состояние мозга крыс после унилатерального удаления сенсомоторной коры. Процедура удаления сенсомоторной коры проделана согласно методикам, описанным в литературе [Hicks, D'Amato, 1977]. Для морфогистохимических исследований применяли гистоангиологический метод выявления микроциркуляторного русла [Чилингарян, 1986] и модифицированный метод выявления активности кислой фосфатазы [Меликсетян, 2004].

Изучение действия БМ на морфофункциональное состояние мозга белых крыс после одностороннего электролитического разрушения компактной части черной субстанции. Электролитическое разрушение компактной части черной субстанции производили по описанной методике [Hirsch et al., 1988]. Изучение морфофункционального состояния клеточных структур мозга проводили с использованием гистохимического метода для выявления активности Ca^{2+} - зависимой кислой

фосфатазы [Меликсетян, 2007], а также методом выявления микроциркуляторного русла [Чилингарян, 1986]

Оценку споро-кристаллообразования проводили микроскопированием в световом фазово-контрастном микроскопе «БИОЛАМ ЛЮМО» (Россия). Подсчет титра спор осуществляли в счетной камере Горяева.

Биологическую эффективность (инсектицидную, энтомоцидную активность) исследуемых штаммов по отношению к гусеницам златогузки (*Euproctis chrysorrhoea* L.) и непарного шелкопряда (*Ocneria dispar*) разных возрастов определяли по формуле Аббата [Трубникова, 1989], а также по значениям ЛК₅₀ на тутовом шелкопряде (*Bombyx mori*) (ТШ) и златогузке [Лескова и др., 1984; Чил-Акопян и др., 1996].

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили по Бернштейну [Бернштейн, 1968], по определению t-критерия Стьюдента [Иванов, Погорелюк, 1990]. Статистические параметры (средняя величина, стандартное отклонение), используемые в экспериментах, вычислены также при помощи программы Excel.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ПОЛУЧЕНИЕ МЕЛАНИНСИНТЕЗИРУЮЩИХ МУТАНТОВ *B. THURINGIENSIS* SUBSP. *GALLERIAE*

На первом этапе работы для получения меланинсинтезирующих мутантов использовали штамм *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* 69-6 (BTG69-6), обладающий повышенной инсектицидной активностью. На основе штамма BTG69-6 методами химического мутагенеза и УФ-облучения были получены мутанты, синтезирующие темно-коричневый водорастворимый пигмент.

Проверка полученных пигментообразующих мутантов на предмет приобретения других характеристик показала, что все полученные мутанты проявляют устойчивость к стрептомицину. Исходя из этого, в дальнейшем для отбора *pig* мутантов использовали полноценные среды, содержащие 200 мкг/мл стрептомицина. Все колонии выросшие на содержащих стрептомицин полноценных агаризованных средах обладают темно-коричневой окраской, диффундирующей в агар. В результате множественных пересевов была доказана генетическая стабильность полученных *pig* мутантов. Показано, что выделяемый при культивировании этих мутантов пигмент является внеклеточным.

Полученные мутанты были проверены на предмет их меланинсинтезирующей активности в условиях колбочной ферментации на полноценных средах. Из проверенных штаммов для дальнейшей работы был выбран *B. thuringiensis* subsp. *galleriae* 69-6 K1 (BTGK1), продуцирующий до 5,0 г/л водорастворимого меланина.

3.2. ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ ВЫХОДА МЕЛАНИНА У ШТАММА *B. THURINGIENSIS* K1

Для реализации возможности широкого практического применения БМ кроме получения новых, более активных штаммов-продуцентов меланина, необходима также разработка эффективной технологии процесса ферментации для обеспечения рентабельности производства. С этой целью нами проводились работы как по поиску дешевого сырья для синтеза меланина, так и по определению оптимального состава ферментационной среды и условий колбочной ферментации для выявления потенциальной меланинпродуцирующей активности полученного штамма-продуцента BTGK1.

Способность штамма *BTGK1* синтезировать водорастворимый пигмент определялась в жидких синтетических и полноценных средах.

В синтетических средах по отдельности варьировали концентрации глюкозы (рис. 1. А), L-глутаминовой кислоты (рис. 1. Б), никотиновой кислоты, а также неорганических солей – натрия сернокислого, магния сернокислого, марганца хлористого, кальция хлористого. Одновременно проводили количественный анализ синтезируемого меланина (табл. 1).

Из результатов, представленных на рис. 1. А и Б видно, что наиболее высокий уровень роста штамма *BTGK1* и накопления БМ наблюдается при содержании в среде 0,72 % глюкозы и 0,15 % L-глутамата.

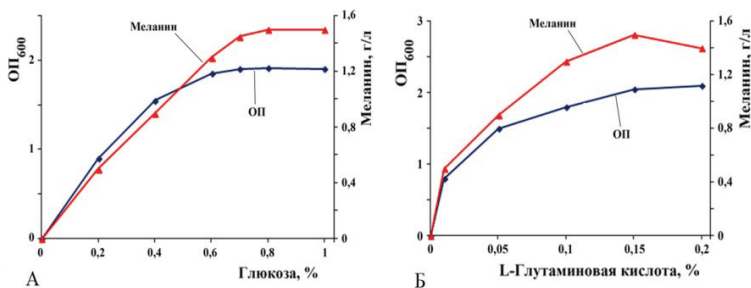


Рис. 1. (А) Влияние концентрации глюкозы на рост штамма *BTGK1* и накопление БМ в минимальной среде; (Б) Влияние концентрации L-глутаминовой кислоты на рост штамма *BTGK1* и накопление БМ в минимальной среде.

В связи с тем, что аминокислота L-тирозин является предшественником меланина [Борщевская, Васильева, 1999; Барабой, 1999], было изучено ее влияние на выход БМ в синтетических средах, содержащих до 300 мкг/мл L-тирозина. Результаты экспериментов показали четкую зависимость уровня биосинтеза меланина от концентрации этой аминокислоты. Во всех испытуемых минимальных средах оптимальной концентрацией L-тирозина является 200-250 мкг/мл (рис. 2 А).

На основе сравнительного анализа полученных результатов синтеза БМ штаммом *BTGK1* в различных средах была отобрана среда № 4, в которой наблюдался наибольший синтез пигмента (табл. 1).

Нами разрабатывался состав посевной среды для проведения ферментации в минимальной среде. В результате проведенных экспериментов была выбрана посевная среда следующего состава, %: глюкоза – 0,3; L-глутаминовая кислота – 0,15; K_2HPO_4 – 0,3; KH_2PO_4 – 0,1 (рН среды 7,5-8,0). Наибольшее накопление меланина в КЖ наблюдается при использовании посевной среды, выращенной в течение 12-16 ч, что соответствует концу экспоненциальной фазы роста культуры.

Пигментообразующая способность штамма *BTGK1* была изучена также на полноценных ферментационных средах, в состав которых входили пептон, дрожжевой экстракт и дешевые источники сырья – пшеничные отруби, пшеничная и кукурузная мука, БВК, гидролизаты БВК и рыбной муки (табл. 2). Полноценные среды отличались как по компонентному составу, так и по количественному содержанию L-тирозина. Как видно из табл. 2, из испытанных 18-ти полноценных сред разного состава наиболее эффективной для синтеза пигмента является среда № 14 (6,1 г/л), содержащая

гидролизат рыбной муки и гидролизат БВК, что коррелирует с высоким содержанием L-тирозина в этих компонентах (1,56 и 2,04 г/л, соответственно).

При подборе условий проведения ферментации проверялись влияние pH, аэрации и температуры на уровень пигментообразования.

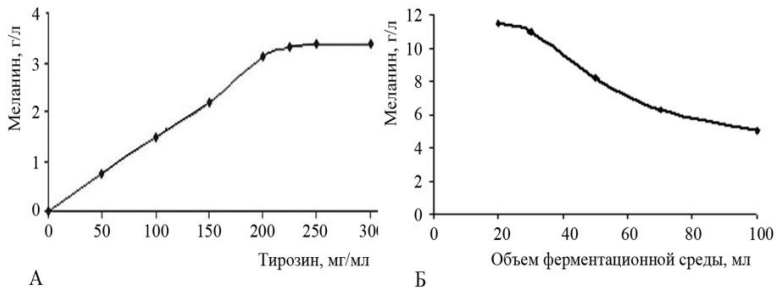


Рис. 2. (А) Зависимость накопления БМ в минимальной ферментационной среде от концентрации L-тирозина; (Б) Зависимость накопления БМ штаммом *BTGK1* в полноценной ферментационной среде от объема ферментационной среды.

Таблица 1.

Уровень синтеза меланина штаммом *BTGK1* в зависимости от состава синтетических питательных сред

Компоненты сред	Состав синтетических ферментационных сред, %			
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
Глюкоза	0,5	0,1	0,5	0,72
K_2HPO_4	0,3	0,05	0,3	0,3
KH_2PO_4	0,1	-	0,1	0,1
NH_4Cl	0,05	-	0,05	-
NH_4NO_3	-	-	0,01	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	0,2	-	-
NH_4COOCH_3	-	-	-	0,23
Na_2SO_4	0,01	-	0,01	0,01
$MgSO_4 \cdot 7H_2O^{**}$	0,025	0,03	0,1	0,025
$MnCl_2 \cdot 4H_2O^{**}$	0,0008	-	0,008	0,002
$MnSO_4 \cdot H_2O^{**}$	-	0,05	-	-
$CaCl_2 \cdot 6H_2O^{**}$	0,0008	0,008	0,009	0,002
$CuSO_4 \cdot 5H_2O^{**}$	-	0,0005	-	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O^{**}$	-	0,00005	-	-
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O^{**}$	-	0,0005	-	-
L-глутамат**	0,147	0,2	0,074	0,15
Цитрат Na **	-	-	0,05	-
Выход меланина, г/л	1,9±0,12	2,9±0,3	1,5±0,11	3,5±0,29

Примечания: * – Кроме указанных компонентов во все среды добавляли никотиновую кислоту (0,001 %) и L-тирозин (0,02 %).** – Готовится и стерилизуется отдельно.

Полученные нами данные показали, что на процесс пигментообразования pH ферментационной среды в интервале 5,5-9,5 и температура проведения ферментации

(в пределах 30°, 32°, 35° и 37°C) существенного влияния не оказывают. Показано, что интенсивная аэрация является необходимым условием для наибольшего синтеза БМ, обеспечивающая выход конечного продукта более, чем 11 г/л (рис. 2 Б).

Таблица 2.

Уровень синтеза меланина штаммом BTGK1 в зависимости от состава полноценных ферментационных сред (P<0,05; n=3)

Питательная среда, №	Состав ферментационной среды, %								Выход меланина, г/л
	Пшеничные отруби	Пшеничная мука (II сорт)	Кукурузная мука	БВК	Гидролизат БВК	Гидролизат рыбной муки	Пептон	Дрожжевой экстракт	
1	1,5	-	-	3	-	-	-	-	5,1±0,45
2	1,5	-	-	-	-	3	-	-	5,2±0,48
3	-	-	1,5	3	-	-	-	-	2,3±0,17
4	-	-	1,5	-	-	3	-	-	3,5±0,31
5	-	1,5	-	-	3	-	-	-	3,7±0,36
6	-	1,5	-	-	-	3	-	-	4,8±0,46
7	1	0,5	-	3	3	-	-	-	5,7±0,58
8	0,25	1,25	-	-	-	-	-	-	4,0±0,42
9	-	1,5	-	-	-	-	3	-	2,2±0,20
10	1,5	-	-	-	-	-	3	-	3,8±0,39
11	-	1,5	-	-	-	-	-	3	2,2±0,22
12	1,5	-	-	-	-	-	-	3	3,2±0,32
13	1	1	-	-	-	4	-	-	5,3±0,53
14	-	1,5	-	-	2,5	2,5	-	-	6,1±0,65
15	1	0,5	-	-	-	4	-	-	5,0±0,52
16	-	1,5	-	3	-	-	-	-	3,0±0,25
17	1	0,5	-	3	-	-	-	-	4,0±0,41
18	1	0,5	-	-	-	3	-	-	4,9±0,47

Примечание: – Кроме указанных компонентов во все среды добавляли NaCl (0,2 %) и CaCl₂ (0,05 %).

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что основными лимитирующими факторами биосинтеза меланина являются концентрация тирозина и аэрация. На основе полученных экспериментальных данных был разработан состав ферментационной среды, а также условия проведения ферментации, обеспечивающие повышение выхода водорастворимого меланина более, чем 11 г/л, который намного выше уровня известных зарубежных аналогов (3,3 г/л) [Пат. 5814495 США, 1998].

3.3. ХАРАКТЕРИСТИКА ВОДРАСТВОРИМОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО МЕЛАНИНА

Основная проблема при микробиологическом способе получения меланина заключается в том, что известные штаммы при ферментации синтезируют

внутриклеточный меланин. В отличие от этих, полученный нами штамм-продуцент синтезирует внеклеточный водорастворимый меланин, что значительно облегчает последующие процессы его выделения и очистки.

Принадлежность полученного пигмента к меланинам была доказана использованием качественных реакций с окислителями (H_2O_2 , $KMnO_4$, $FeCl_3$).

В микробных меланинах белки с пигментом обычно составляют единый комплекс и связаны с ним пептидной связью [Лях, Рубан, 1972].

Проведенные исследования показали, что в составе БМ содержится до 25 % связанного пептида, который в процессе гель-фильтрации не отделяется от пигмента. Выявлено, что водорастворимое свойство пигмента связано именно с наличием в его составе пептида, разрушение которого приводит к потере растворимости пигмента в воде. Наличие пептида, по-видимому, придает меланину гидрофильные свойства, что обеспечивает хорошую растворимость в воде [Борщевская, Васильева, 1999].

В табл. 3 приведены данные аминокислотного состава кислотного гидролизата БМ.

Таблица 3.
Аминокислотный состав кислотного гидролизата БМ

Аминокислота	Содержание, %	Аминокислота	Содержание, %
Аспарагиновая к-та	0,04	Метионин	0,06
Треонин	0,06	Изолейцин	0,02
Серин	0,09	Лейцин	0,08
Глутаминовая к-та	0,74	Тирозин	0,11
Пролин	0,12	Фенилаланин	0,08
Глицин	0,35	Гистидин	0,11
Аланин	0,14	Лизин	0,10
Валин	0,05	Аргинин	0,07

В полученных образцах меланина углеводы и липиды не обнаружены.

С использованием качественной реакции с декстрин-йодин комплексом была установлена антиоксидантная активность водорастворимого БМ.

Методом SDS-PAG электрофореза определена молекулярная масса БМ (рис. 3, А, Б).

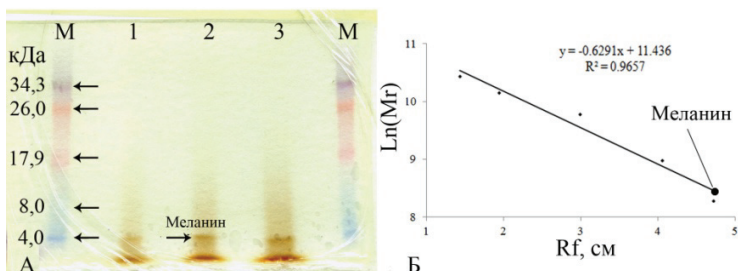


Рис. 3. Определение молекулярной массы меланина методом SDS-PAG электрофореза.

(А) – Электрофореграмма: М – белки с известными молекулярными массами – карбоновая ангидраза (34,3 кДа), ингибитор трипсина из соевых бобов (26 кДа), лизоцим (17 кДа), апротинин (8 кДа), инсулин, цепь Б (4 кДа), 1 – 5 мкг меланина, 2 – 10 мкг меланина, 3 – 20 мкг меланина;

(Б) – Калибровочная кривая для определения молекулярной массы меланина.

Из представленной электрофореграммы (рис. 3, А) следует, что молекулярная масса меланина соответствует 3,5-8 кДа, а основной фракции – около 4,7 кДа.

Однако, из представленных результатов также следует, что в препарате присутствуют также молекулы пигмента как большего, так и меньшего размеров.

3.4. ИЗУЧЕНИЕ ПУТЕЙ БИОСИНТЕЗА МЕЛАНИНА У ПИГМЕНТООБРАЗУЮЩИХ МУТАНТОВ *B. THURINGIENSIS*

Группа ферментов, участвующих в биосинтезе меланинов, включает: пероксидазы и каталазы, полифенолоксидазы (тирозиназы, тирозин гидроксилазы и лакказы) и др. [della-Cioppa и др., 1998].

В литературе отсутствуют данные о путях биосинтеза водорастворимого меланина у бактерий *B. thuringiensis*. Наши исследования показали, что на испытанных субстратах клетки *BTGK1* проявляют полифенолоксидазную активность только в отношении L-тирозина и L-ДОФА (ортодифенол). Неспособность меланиногенного штамма *BTGK1* окислять мета- и пара-дифенолы свидетельствует о том, что он обладает тирозиназной, а не лакказной активностью (табл. 4).

Таблица 4.
ПФО активность обработанных толуолом клеток *BTGK1* (при pH 7,2)

Субстрат	Оптическое поглощение при λ 475 нм		
	24 ч	48 ч	72 ч
L-Тирозин + L-ДОФА	0	0	0,046
L-ДОФА	0,05	0,096	0,160
Гомогентизин	0	0	0
Гидрохинон	0	0	0
Индол	0	0	0,005
4-амино-бензойная	0	0	0,005
Резорцин	0	0	0,005

Изучение тирозиназной активности исследуемых меланиногенных штаммов *B. thuringiensis* показало, что у *pig* мутантов тирозиназная активность увеличивается более чем в 4 раза по сравнению с их родительскими штаммами (табл. 5).

Таблица 5.
Тирозиназная активность *pig*⁻ и *pig* штаммов *B. thuringiensis* (P<0,05; n=3)

Штаммы <i>B. thuringiensis</i>	Условия реакции	Удельная активность, Ед/мг
<i>BTG69-6</i>	–	0,041±0,009
<i>BTG69-6</i>	0,1% Дс-Na	0,011±0,002
<i>BTGK1 (pig)</i>	–	0,189±0,031
<i>BTGK1 (pig)</i>	0,1% Дс-Na	0,029±0,004
<i>BTKZ52</i>	–	0,047±0,010
<i>BTKZ52</i>	0,1% Дс-Na	0,013±0,004
<i>BTKZ11 (pig)</i>	–	0,209±0,043
<i>BTKZ11 (pig)</i>	0,1% Дс-Na	0,037±0,007

Таким образом, из полученных нами данных следует, что образование меланина у pig мутантов *B. thuringiensis* протекает с участием тирозиназы.

3.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ МЕЛАНИНОГЕННОГО ШТАММА *BTGK1* И БАКТЕРИАЛЬНОГО МЕЛАНИНА

Бактериальные инсектицидные препараты на основе *B. thuringiensis* (*Bt*-препараты) содержат споры и параспоральные кристаллы, суспендированные в жидкой среде для опрыскивания. Выживаемость и способность спор *B. thuringiensis* к прорастанию в почве имеют особое экологическое значение [Petras et al., 1985, Ferreira et al., 2003]. Меланиногенный штамм *BTGK1* обладает инсектицидной активностью и может использоваться в качестве *Bt*-препарата.

Исследование выживаемости вегетативных клеток *BTGK1* в нестерильной (рис. 4. А) и стерильной (рис. 4 Б) почвах в лабораторных условиях указывает на то, что в первом случае рост инокулированных клеток подавляется почвенной микрофлорой, которая оказывает антагонистическое действие на вегетативные клетки *BTGK1*. При этом биосинтез меланина не прекращается, и, исходя из того, что существует вероятность накопления БМ в почве, нами проведены исследования по определению уровня ассимиляции БМ почвенными микроорганизмами. Для этого исследовали динамику утилизации БМ в аэробных условиях в стерильной и нестерильной почвах, а также в анаэробных условиях в нестерильной почве.

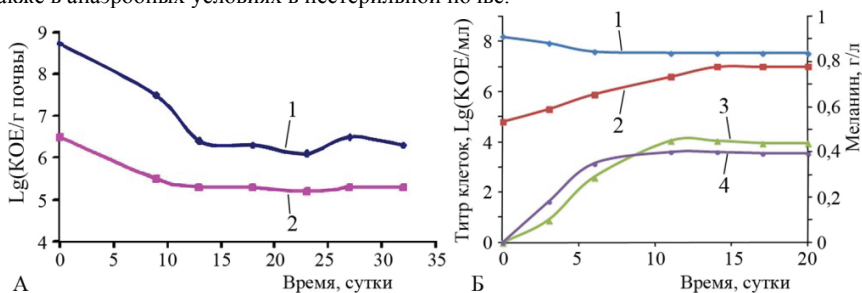


Рис. 4. (А) Динамика изменения численности клеток *B. thuringiensis* в нестерильной почве. Исходный титр: 1 – $4,95 \cdot 10^8$ кл./г почвы; 2 – $3,72 \cdot 10^6$ кл./г почвы; влажность почвы 90 % от ПВП (полная влагоемкость почвы); рН 7,6; **(Б) Динамика изменения численности клеток *B. thuringiensis* и накопления меланина в стерильной почве.** Исходный титр инокулированных клеток: 1 – $5,37 \cdot 10^7$ кл./г почвы; 2 – $5,37 \cdot 10^4$ кл./г почвы; 3,4 – содержание меланина соответственно 1 и 2. Влажность почвы 60 % от ПВП; рН 7,6.

Результаты, приведенные на рис. 5, показывают, что водорастворимый БМ в почве достаточно быстро и эффективно ассимилируется почвенными микроорганизмами как в аэробных, так и анаэробных условиях.

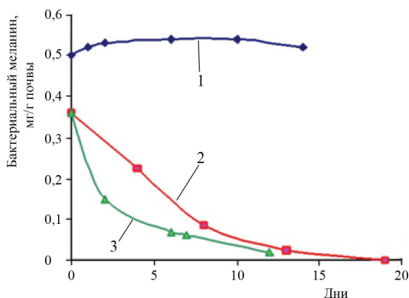


Рис. 5. Ассимиляция БМ почвенной микрофлорой.

1 – в стерильной почве в аэробных условиях,
2 – в нестерильной почве в аэробных условиях,
3 – в нестерильной почве в анаэробных условиях.

Таким образом, меланин, продуцируемый штаммом *BTGK1*, ассимилируется почвенной микрофлорой и, практически, не может быть причиной загрязнения грунтовых вод. Полученные данные свидетельствуют об экологической безопасности использования в сельском хозяйстве как бактериального инсектицидного препарата, приготовленного на основе штамма *BTGK1*, так и БМ в качестве биостимулятора роста растений.

3.6. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНОГО МЕЛАНИНА НА РАСТЕНИЯХ

Для повышения урожайности растений вместо химических средств в последнее время применяются стимуляторы роста, полученные на основе растений, микроорганизмов и грибов. Высокая физиологическая активность природных меланинов давно установлена [Борщевская, Васильева, 1999], однако сфера их практического применения весьма ограничена из-за дороговизны получаемых препаратов.

Изучение биологической активности БМ проводили на ряде овощных, плодовых и декоративных растений. В начале работы для обработки семян испытуемых растений и последующего полива почвы в отдельности определяли оптимальные концентрации БМ, имеющие положительные результаты.

В результате замачивания семян и последующего полива почвы 0,03 % раствором БМ у испытуемых нами бобовых растений – кустовой и вьющейся фасоли, нута – наблюдалось ускорение прорастания, роста и формирование утолщенных, интенсивно ветвящихся в нижней части стеблей с хорошо развитыми проводящими тканями (табл. 6). Переход к интенсивному и длительному плодообразованию приводил к повышению урожайности на 20-25 %.

Такое же стимулирующее действие БМ было показано и для корнеплодов столовой свеклы, картофеля, мелкоплодной моркови, желтоплодного сладкого перца сорта «Валентина», острого перца «Кон». У последнего урожай, по всем показателям, почти в два раза превосходил контрольный (рис.6).

Эффективное действие БМ показано также на нестратифицированных семенах персика, на комнатных цветочных культурах и на других растениях.

Таблица 6.

Влияние 0,03 % раствора БМ на некоторые показатели нута* ($P < 0,05$; $n=3$)

Показатели	Контрольные варианты	Варианты, обработанные БМ	Изменение показателей, %
Высота стебля, см	70,8±6,8	82,5±7,6	16,5
Число боковых побегов, шт.	4,0±0,4	6,0±0,5	50,0
Число семян, шт.	36,0±3,6	60,5±5,1	68,1
Число бобов, шт.	38,6±3,9	57,7±5,4	49,5
Масса 1000 семян, г	201,7±15,5	224,2±20,6	11,2

Примечание: * – Приведенные в таблице показатели усредненные на 1 куст.

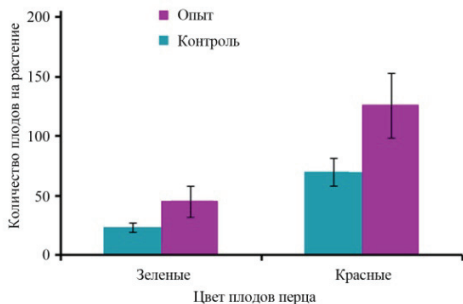


Рис. 6. Влияние БМ на количество зеленых (слева) и красных (справа) плодов острого перца сорта «Кон».

БМ (0,2 % раствор) испытывали при размножении укороченными черенками винограда, у которых через 6-7 месяцев формировалась мощная корневая система, происходили стимуляция роста и вызревание побегов, в результате чего обеспечивалась высокая приживаемость саженцев (рис. 7). Результаты проведенных испытаний показали, что эти саженцы более устойчивы к абиотическим факторам среды (засуха, заморозки и т.д.), в основном, благодаря развитию мощной корневой системы и развитой надземной массы.

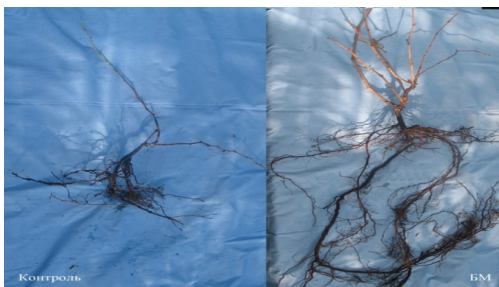


Рис. 7. Влияние БМ на развитие корневой системы винограда сорта «Армения».

1 – контроль;
2 – черенки, обработанные 0,2 % раствором БМ.

Высокая биологическая активность полученного нами БМ в опытах *in vivo* на более, чем 50 видах различных растений показана также другими авторами [Азарян и др., 2005. Рорюв et al., 2005, Азарян и др., 2008. Тоноян и др., 2010].

Таким образом, результаты исследований, проведенных на различных растениях, показали, что БМ обладает биостимулирующим эффектом. Полученные результаты доказывают целесообразность применения БМ, этого экологически безопасного фитостимулятора, в сельском хозяйстве в качестве биостимулятора роста растений.

3.7. ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНОГО МЕЛАНИНА НА ЖИВОТНЫХ ОБЪЕКТАХ

Известно, что нейромеланин в организме играет протекторную роль, блокируя действие токсических молекул в нервной ткани, и уменьшение его количества является причиной возникновения нейродегенерации [Feodorow et al., 2005]. Можно предположить, что БМ благодаря протекторному свойству может ускорить пластические изменения в центральной нервной системе и повлиять на процесс компенсаторного восстановления нарушенных функций после ряда травм.

Для установления данного предположения нами было определено действие БМ на

морфофункциональное состояние мозга белых крыс после унилатерального удаления сенсомоторной коры и компактной части черной субстанции.

При морфологических исследованиях на готовых гистологических препаратах определялась локализация, протяженность и глубина повреждения. На срезах мозга контрольных животных видно образование рубца. У крыс, получивших БМ в концентрациях 6,0 мг/мл и 9,4 мг/мл, этой ограниченности нет и наблюдается тенденция к сближению краев травмы, а при введении БМ в концентрации 4,5 мг/мл – сращение.

Изучено также влияние БМ на процесс восстановления компактной части черной субстанции у крыс после ее унилатерального разрушения. Морфо-гистохимическое исследование срезов мозга показало, что у получивших БМ (6,0 мг/мл) животных на месте разрушения компактной части черной субстанции по ходу введения электрода отсутствовал грубый глиальный рубец, а разрушенный отдел был заполнен нервными клетками.

Полученные результаты свидетельствуют, что при повреждении мозговой ткани БМ препятствует образованию рубца – мощного барьера на пути роста нервных волокон, улучшает трофику нервной ткани вследствие расширения просвета сосудов и образования новых капилляров, способствует повсеместному росту нервных волокон, внося вклад в восстановительные процессы после травмы нервной ткани, как протектор обеспечивает сохранность нервных клеток вокруг места травмы.

3.8. ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ МЕЛАНИНОГЕННЫХ ШТАММОВ *B. THURINGIENSIS*. ИНСЕКТИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ПИГМЕНТООБРАЗУЮЩИХ МУТАНТОВ

С целью получения новых меланиногенных штаммов *B. thuringiensis*, обладающих высокой инсектицидной активностью, были исследованы 73 штамма *B. thuringiensis* (22 серовара) с разным спектром инсектицидного действия.

На основании результатов определения инсектицидной активности в лабораторных условиях (на гусеницах златогузки и тутового шелкопряда) были отобраны штаммы *B. thuringiensis* Z -52, HD-1(*kurstaki*) и 21a (не идентифицирован) для получения пигментообразующих мутантов. После обработки клеток НГ, культуры этих штаммов высевали на содержащие стрептомицин полноценные агаризованные среды. Отобранные *pig* колонии проверялись на предмет меланинсинтезирующей активности. Показано, что вновь полученные мутанты синтезируют меланин на уровне штамма *BTGK1*.

Для определения инсектицидной активности отобранных высокоактивных меланинсинтезирующих мутантов (*BTKZ11* и *BTag8*) и штамма *BTGK1* были проведены испытания на гусеницах непарного шелкопряда и златогузки в полевых условиях (табл. 7).

Результаты проведенных испытаний свидетельствуют, что инсектицидная активность меланиногенных мутантов *B. thuringiensis* по отношению к златогузке не только не уменьшилась, но и заметно возросла по сравнению с исходным штаммом.

Повышение инсектицидной активности наблюдалось и в случае испытания бактериальных суспензий на гусеницах непарного шелкопряда I-III возрастов.

Полученные нами результаты коррелируют с имеющимися в литературе данными: пигмент защищает споры и кристаллы от разрушительного воздействия солнечных лучей, тем самым удлиняя сроки проявления их инсектицидной активности [Saxena et al., 2002, Chen et al., 2004, Ruan et al., 2004, Gislayne et al., 2005].

Таблица 7.

Сравнительная инсектицидная активность исходных штаммов *B. thuringiensis* и их меланиногенных мутантов по отношению к гусеницам златогузки

Штаммы <i>B. thuringiensis</i>		Титр рабочей суспензии, спор/мл	Гибель вредителя по дням учета, % (с поправкой на контроль)			
			3	7	10	12
69-6 <i>subsp.galleriae</i>	исходный	$4,4 \cdot 10^8$	30,2	48,4	67,3	68,2
	<i>K1 pig</i>	$4,2 \cdot 10^8$	32,1	53,1	74,4	76,0
Z-52 <i>subsp.kurstaki</i>	исходный	$4,8 \cdot 10^8$	34,7	55,4	70,6	73,1
	<i>Z11 pig</i>	$5,0 \cdot 10^8$	36,4	58,2	78,5	81,0
Не идентифицирован <i>21a</i>	исходный	$4,4 \cdot 10^8$	32,4	50,2	65,6	70,6
	<i>a8 pig</i>	$4,6 \cdot 10^8$	34,3	51,7	67,7	72,1

Совмещение в одном штамме двух полезных свойств – инсектицидного и меланинсинтезирующего, позволило нам решить задачу стабилизации препарата на основе меланиногенных штаммов, поскольку известно, что споры и кристаллы *B. thuringiensis* высокочувствительны к УФ-радиации и солнечным лучам, а в полевых условиях быстро теряют инсектицидную активность [Toma et al., 2003, Blanco et al., 2002]. Меланины, продуцируемые микроорганизмами, являются природными фотопротекторами и защищают клеточные компоненты, в том числе споры и кристаллы, от УФ-повреждений и отрицательного воздействия солнечных лучей. В результате пролонгируется время действия и, следовательно, биологическая эффективность препаратов на основе инсектицидных штаммов.

Таким образом, на основе бактерий *B. thuringiensis* получены новые высокоактивные штаммы-продуценты водорастворимого БМ, обладающие повышенной инсектицидной активностью. Одновременный синтез двух биологически активных веществ – меланина и инсектицидных токсинов в одном производственном процессе, несомненно, обеспечит высокий уровень эффективности использования этих штаммов. Высокая биологическая активность БМ обеспечит будущий коммерческий успех препарата для его применения в медицине и сельском хозяйстве.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что устойчивые к стрептомицину мутанты *B. thuringiensis*, полученные под действием НГ и УФ-облучения, синтезируют темно-коричневый водорастворимый пигмент.
2. Применением качественных реакций установлена меланиновая природа БМ. Показано, что БМ обладает антиоксидантной активностью. Методом SDS-PAGE электрофореза определена молекулярная масса БМ, которая соответствует 3,5-8 кДа, а основной фракции ~ 4,7 кДа.
3. Разработаны условия культивирования и состав ферментационной среды, позволяющие повысить уровень биосинтеза меланина более, чем в 2 раза – 11,0 г/л. Установлено, что основными лимитирующими факторами биосинтеза меланина являются концентрация тирозина и аэрация.
4. Впервые показано, что биосинтез меланина у *pig* мутантов *B. thuringiensis subsp. galleriae* и *kurstaki* протекает с участием тирозиназы.

5. Показана биодegrадебельность водорастворимого БМ в почве, что свидетельствует об экологической безопасности его использования в сельском хозяйстве.
6. Впервые в опытах *in vivo* на ряде растений – овощных, фруктовых и декоративных культур установлено, что БМ является сильным фитостимулятором. В результате использования БМ наблюдается повышение урожайности овощных культур на 20-50 %, а также устойчивости различных растений к абиотическим факторам среды.
7. Впервые показана высокая биологическая активность БМ на животных объектах (белые крысы). В опытах на животных с повреждениями мозговой ткани было показано, что БМ (4,5-6 мг/мл) препятствует образованию рубца, улучшает трофику нервной ткани, способствует регенерации ткани мозга.
8. Показано, что меланины, продуцируемые *pig* мутантами *B. thuringiensis*, являются природными фотопротекторами и защищают споры и кристаллы от УФ-повреждений и отрицательного действия солнечных лучей, в результате чего повышается биологическая эффективность препаратов, изготовленных на основе пигментообразующих инсектицидных штаммов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Ovsepyan A.S., Chakhalyan A.Kh., Keleshyan S.K., Saghyan A.S., Popov Yu.G., Karabekov B.P., **Avetisyan S.V.** Mutants of *Bacillus thuringiensis*-producers of biological active melanin-like pigment // 1-st International Congress “Biotechnology – State of Art and Prospects of Development”, Moscow, October 14-18, 2002, p. 243-244.
2. Հովսեփյան Ա., Աղաջանյան Ա., Կարաբեկով Բ., Չախալյան Ա., Քելեշյան Ս., Սաղյան Ա., Զիլ-Հակոբյան Լ., Հովհաննիսյան Գ., Միքայելյան Ն., **Ավետիսյան Ս.** Մանրէարանական սինթեզով ջրալուծելի մելանինի ստացման եղանակ: ՀՀ Արտոնագիր № 1385 A2, 2003, 8 էջ:
3. Меликсетян И.Б., Геворкян О.В., Овсепян А.С., **Аветисян С.В.** Изучение влияния ВТ-меланина на пластичность мозга. Структурно-функциональные и нейрхимические закономерности ассиметрии и пластичности мозга // Материалы всероссийской конференции с международным участием. Москва, Издательство ИКАР, 2005, с. 178-181.
4. Azaryan K.G., Petrosyan M.T., **Avetisyan S.V.**, Avetisova G.E., Palazyan T.N., Ghandilyan R.A. Propagation of the arboreal plants using Melanin and “Azotovit-1” // Proceedings of the International Conference “Advanced Biotechnology: Perspectives of Development in Armenia”, Tsakhkadzor, RA, July 12-14, 2006, p. 71.
5. Paronyan R.V., Davtyan A.G., Avetyan A.B., **Avetisyan S.V.** The survival rate of the water-soluble melanin producer of *Bacillus thuringiensis K-1* in soil // Proceedings of the International Conference “Advanced Biotechnology: Perspectives of Development in Armenia”, Tsakhkadzor, RA, July 12-14, 2006, p. 98.
6. Паронян Р.В., Давтян А.Г., Аветян А.Б., **Аветисян С.В.** Экологические аспекты выживаемости продуцента водорастворимого меланина *Bacillus thuringiensis* в почве // “Материалы международной научной конференции посвященной 75-летию основания государственного аграрного университета Армении”, Ереван, 2006, с. 185-188.
7. Геворкян О.В., Меликсетян И.Б., Петросян Т.Р., **Аветисян С.В.**, Овсепян А.С., Агаджанян А.Е., Манвелян Л.Р. Восстановление инструментальных условий

- рефлексов у крыс после разрушения латерального ядра мозжечка и при воздействии бактериального меланина // Материалы Всероссийской конференции с международным участием “Структурно-функциональные, нейрохимические и иммунохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга”, Москва, 25-26 октября, 2007, с. 165-170.
8. **Avetisyan S.V.**, Mikaelyan N.E., Hovsepyan A.S., Hambardzumyan A.A. Study of the paths of melanin biosynthesis in mutant strain *Bacillus thuringiensis* K1 // Book of Abstracts of the International Conference “State-of-the-Art Biotechnology in Armenia & ISTC contribution”, Tsakhkadzor, RA, September 28 – October 02, 2008, p. 66.
 9. **Avetisyan S.V.**, Hovsepyan A.S., Chakhalyan A.Kh., Keleshyan S.K., Aghajanyan A.E., Saghiyan A.S. Study of the influence of the composition of fermentation medium and fermentation conditions on melanin biosynthesis by *Bacillus thuringiensis* K1 strain // Electronic Journal of Natural Sciences, NAS of RA, 2009, № 2 (13), p. 24-27.
 10. **Аветисян С.В.**, Овсепян А.С., Чахалян А.Х., Келешян С.К., Чил-Акопян Л.Р., Саркисян М.А., Сагиян А.С. Получение меланинсинтезирующих мутантов у инсектицидных штаммов разных сероваров *Bacillus thuringiensis* // Биолог. журн. Армении, 2009, 3 (61), с. 50-56.
 11. **Аветисян С.В.** Ассимиляция бактериального меланина почвенными микроорганизмами // ВЕСТНИК МАНЭБ, Санкт-Петербург, 2009, том 14, № 4, вып 1, с. 162-164.
 12. **Avetisyan S.V.**, Hovsepyan A.S., Aghajanyan A.E., Azaryan K.G., Gevorkyan O.V., Petrosyan T.R., Popov Y.G., Saghiyan A.S. Obtaining of Bacterial Water-soluble Melanin and Study of its Biological Activity // The ISTC Scientific Seminar. “Modern state of biotechnological developments and ways of their commercialization”. Yerevan, Armenia, September 11-12, 2012, p. 83.
 13. Azaryan K.G., Popov Yu. G., Hovsepyan A.S., **Avetisyan S.V.** The stimulation of vegetables growth and development by treatment with some biopreparations // Eurasian symposium on vegetables and greens, Yerevan, october 16-20, 2012, p. 22.
 14. **Avetisyan S.V.**, Hovsepyan A.S., Aghajanyan A.E., Azaryan K.G., Petrosyan T.R., Saghiyan A.S. Water-soluble bacterial melanin: obtaining, biological activity, application perspectives // 2nd International Scientific Conference of Young Researchers “Contribution of the young generation in the development of biotechnology” Dedicated to the 70th Anniversary of the National Academy of Sciences of Armenia, Yerevan, October 1-4, 2013, p. 48.
 15. **Avetisyan S.V.**, Hovsepyan A.S., Koloyan H.O., Mikaelyan N.E., Hambardzumyan A.A. Tyrosinase Activity in Melanin Producing Mutants of *Bacillus thuringiensis* // 2nd International Scientific Conference of Young Researchers “Contribution of the young generation in the development of biotechnology” Dedicated to the 70th Anniversary of the National Academy of Sciences of Armenia, Yerevan, October 1-4, 2013, p. 140-143.

Ավետիսյան Սոնա Ոսկանի

BACILLUS THURINGIENSIS-ի ԶՐԱԼՈՒՅԾ ՄԵԼԱՆԻՆԻ USUՅՈՒՄԸ, ԲՆՈՒԹԱԳՐՈՒՄԸ ԵՎ ՓՈՐՉԱՐԿՈՒՄԸ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ *Bacillus thuringiensis*, մուտանտ, պիզմենտ, կենսասինթեզ, ֆերմենտացիա, բակտերիալ մելանին, ջրալույծ, թիրոզինազ, կենսաբանական ակտիվություն, միջատասպան ակտիվություն:

Ատենախոսական աշխատանքը նվիրված է միջատասպան ակտիվությամբ օժտված *B. thuringiensis*-ի մելանին սինթեզող բարձրակտիվ շտամների ստացմանը, ջրալույծ բակտերալ մելանինի բնութագրմանը և դրա կենսաբանական ակտիվության ուսումնասիրությանը:

B. thuringiensis շտամների մոտ ՆԳ և ՈւՄ ինդուկցված մուտանտներ ստանալու փորձերում հայտնաբերվել է, որ ստրեպտոմիցին պարունակող լիարժեք միջավայրերի վրա աճած բոլոր գաղութներն օժտված են ազար ներթափանցող մուգ շագանակագույն գույնով: Բազմաթիվ վերացանքսերի արդյունքում ապացուցվել է ստացված պիզմենտ առաջացնող (*pig*) մուտանտների գենետիկական կայունությունը: Յույց է տրվել, որ *pig* մուտանտների կուլտիվացման ընթացքում անջատված պիզմենտն արտաբջջային է: Սինթեզված ջրալույծ պիզմենտի ելքը կազմում է մինչև 5,0 գ/լ:

Ստացված պիզմենտի պատկանելությունը մելանիններին ապացուցվել է օքսիդիչներով (H_2O_2 , $KMnO_4$, $FeCl_3$) որակական ռեակցիաների կիրառմամբ: Յույց է տրվել, որ բակտերիալ մելանինի կազմում պարունակվում է մինչև 25% կապված պեպտիդ, որը հեկֆիլտրացիայի պրոցեսում պիզմենտից չի անջատվում: Պարզվել է, որ պիզմենտի ջրալույծ հատկությունը մասնավորապես պայմանավորված է իր կազմում պեպտիդի առկայությամբ, որի քայքայումը բերում է պիզմենտի ջրի մեջ լուծվելու հատկության կորստին: Ստացված բակտերիալ մելանինի մոլեկուլային զանգվածն ըստ SDS PAG էլեկտրոֆորեզի տվյալների կազմում է 3,5-8 կԴա, իսկ հիմնական ֆրակցիայինը՝ մոտ 4,7 կԴա: Դեքստրին-յոդին կոմպլեքսի հետ որակական ռեակցիաների կիրառմամբ հաստատվել է ջրալույծ բակտերալ մելանինի հակաօքսիդանտ հատկությունը:

Ուսումնասիրվել է ֆերմենտացիայի պայմանների (pH, ջերմաստիճան, աերացիա) և լիարժեք սննդարար միջավայրի կազմի ազդեցությունը մելանինի սինթեզի վրա: Յույց է տրվել, որ մելանինի կենսասինթեզի սահմանափակող գործոններն են համարվում աերացիան և ֆերմենտացիոն միջավայրում L-թիրոզինի կոնցենտրացիան: Մշակվել է L-թիրոզինի բարձր պարունակությամբ էժան հումքից բաղկացած լիարժեք սննդարար միջավայրի կազմ: Նշված միջավայրում և ինտենսիվ աերացիայի դեպքում մելանինի ելքը սրվակային ֆերմենտացիայի պայմաններում կազմում է ավելի քան 11 գ/լ:

B. thuringiensis մելանինոզեն շտամներում ջրալույծ բակտերիալ մելանինի կենսասինթեզի ուղիների ուսումնասիրության արդյունքում պարզվել է, որ դրանք

փորձարկված սուբստրատներից պոլիֆենոլօքսիդազային ակտիվություն են ցուցաբերում միայն L-թիրոզինի և L-ԴՕՖԱ-ի (օրտոֆենոլ) նկատմամբ: Մետա-(ռեզորցին) և պարա-դիֆենոլներն (հիդրոխինոն) օքսիդացնելու անկարողությունը վկայում է թիրոզինազային ակտիվության առկայության մասին: Ծնողական շտամների համեմատ *pig* մուտանտների մոտ այդ ֆերմենտի ակտիվությունն ավելի քան 4 անգամ բարձր է:

Գյուղատնտեսության մեջ *B. thuringiensis*-ի մելանինոզեն շտամները որպես միջատասպան պատրաստուկ, և բակտերիալ մելանինը որպես բույսերի կենսախթանիչ կիրառելու նպատակով որոշվել է նրանց էկոլոգիական անվտանգությունը:

Լաբորատոր պայմաններում *pig* շտամի վեգետատիվ բջիջների կենսունակության ուսումնասիրությունն ախտահանված և ոչ ախտահանված հողերում ցույց է տվել, որ այդ շտամի բջիջների աճը ճնշվում է հողի միկրոֆլորայի կողմից: Հողում բակտերիալ մելանինի ասիմիլյացիայի դինամիկայի որոշման արդյունքում պարզվել է, որ այն բավականին արագ և էֆեկտիվորեն ասիմիլյացիայի է ենթարկվում հողի միկրոօրգանիզմների կողմից և չի կարող պատճառ հանդիսանալ արտեզյան ջրերի աղտոտման համար:

Ուսումնասիրվել է բակտերիալ մելանինի մաքրված պատրաստուկի կենսաբանական ակտիվությունը կենդանական և բուսական օբյեկտների վրա *in vivo* պայմաններում:

Բանջարանոցային մշակաբույսերի (լոբի, սիսեռ, պղպեղ, կարտոֆիլ, բազուկ, մանրապտուղ գազար) վրա բակտերիալ մելանինի ցածր կոնցենտրացիաներով լուծույթի (0,03-0,08 %) կիրառումը բերում է սերմերի միաժամանակյա ծվանը, աճի արագացմանը, խոշոր, մսալի, բազմաթիվ խոշոր սերմերով պտուղների առաջացմանը: Մելանինի 0,2 % լուծույթով մշակված խաղողի կարճ կտրոնների մոտ 6-7 ամիս հետո ձևավորվում է հզոր արմատային համակարգ, խթանվում է աճը և ընձյուղների հասունացումը, ինչն էլ ապահովում է տնկիների բարձր կաշողականությունը: Բակտերիալ մելանինը զգալիորեն բարձրացնում է բույսերի բերքատվությունը (20-50 %) և դիմադրողականությունն անբարենպաստ պայմանների նկատմամբ:

Ուղեղի վնասված հյուսվածքով կենդանիների (սպիտակ առնետների) վրա կատարված փորձերում ցույց է տրվել, որ մելանինը նպաստում է ուղեղի հյուսվածքի վերականգմանը կանխում է նյարդաթելերի աճի համար հզոր պատնեշ հանդիսացող սպիի գոյացումը, անոթների լուսանցքի լայնացման և նոր մազանոթների առաջացման շնորհիվ բարելավում է նյարդային հյուսվածքի սնուցումը, նպաստում է նյարդաթելերի լայնատարած աճին, դրանով իսկ աջակցում է նյարդային հյուսվածքի վնասվածքից հետո վերականգնողական գործընթացներին, որպես պաշտպանիչ ապահովում է նյարդային բջիջների անվտանգությունը վնասվածքի հատվածի շուրջը:

Դաշտային պայմաններում անցկացրած փորձարկումները ցույց են տվել, որ *B. thuringiensis*-ի մելանինոզեն մուտանտների միջատասպան ակտիվությունը վնասատուների նկատմամբ համեմատած ծնողական շտամների հետ զգալիորեն

բարձրացել է: Մա ցույց է տալիս, որ պիգմենտը պաշտպանում է սպորները և բյուրեղներն արևի ճառագայթների քայքայիչ ազդեցությունից՝ դրանով իսկ երկարացնում է իրենց միջատասպան ակտիվության դրսևորման ժամանակը:

Այսպիսով, կատարված աշխատանքի ընթացքում ստացվել են միջատասպան բարձր ակտիվությամբ օժտված մելանինոգեն նոր շտամներ: Ցույց է տրվել ջրալույծ բակտերիալ մելանինի կենսաբանական բարձր ակտիվությունը բուսական և կենդանական օրգանիզմների վրա, ինչը կարող է ապահովել բակտերիալ մելանինի հիման վրա ստեղծված պատրաստուկի ապագա կոմերցիոն հաջողությունը բժշկության և գյուղատնտեսության մեջ կիրառման համար:

Avetisyan Sona

OBTAINING, CHARACTERISTIC AND TESTING OF WATER-SOLUBLE MELANIN *BACILLUS THURINGIENSIS*

Summary

Key words: *Bacillus thuringiensis*, mutant, pigment, biosynthesis, fermentation, bacterial melanin, water-soluble, tyrosinase, biological activity, insecticidal activity.

The thesis is devoted to the production of highly active melanin-synthesizing strains of *B. thuringiensis* having insecticidal activity, characteristic of water-soluble bacterial melanin and study of its biological activity.

In experiments on obtaining NG- and UV-induced mutants in *B. thuringiensis* strains it was detected that all colonies grown on streptomycin-containing agar media had deep-brown coloring diffusing into agar. As a result of numerous re-inoculations genetic stability of the produced chromogenic (*pig*) mutants was proved. The pigment isolated upon cultivation of *pig* mutants was shown to be extracellular. The yield of synthesized water-soluble pigment was up to 5.0 g/l.

The belonging of the produced pigment to melanins was confirmed by qualitative reactions with oxidants (H_2O_2 , $KMnO_4$, $FeCl_3$). It was shown that bacterial melanin contained up to 25% of associated peptide, which in the process of gel-filtration did not separate from the pigment. It was detected that water-soluble property of the pigment was directly connected with the presence of peptide in its composition, the destruction of which led to the loss of water solubility of the pigment. The molecular mass of the obtained bacterial melanin according to the data of SDS-PAG electrophoresis corresponded to 3.5-8 kDa, and the basic fraction was about 4.7 kDa. The antioxidant activity of water-soluble bacterial melanin was established by a qualitative reaction.

The influence of fermentation conditions (pH, aeration and temperature) and nutrient medium composition on melanin synthesis was studied. It was shown that aeration and the concentration of L-tyrosine in fermentation medium were limiting factors influencing the activity of a producing strain. The composition of the nutrient medium consisting of inexpensive raw component with high content of tyrosine was developed. In flask fermentation on the mentioned medium and at intensive aeration, the yield of melanin was more than 11 g/l.

As a result of study of the routes of water-soluble bacterial melanin biosynthesis in melaninogenic *B. thuringiensis* strains it was revealed that out of the tested substrates they showed polyphenoloxidase activity only in relation to L-tyrosine and L-DOPA (orthodiphenol). Inability of melaninogenic *B. thuringiensis* strains to oxidize meta-(resorcinol) and para-diphenols (hydroquinones) proved their tyrosinase activity. The activity of this enzyme in *pig* mutants was more than fourfold higher as compared to their parent strains.

To use melaninogenic strains of *B. thuringiensis* in agriculture as insecticidal preparation and bacterial melanin as a biostimulator of plants growth, their environmental safety was determined.

Study of survival of vegetative cells of *pig* strain in non-sterile and sterile soils under laboratory conditions showed that the growth of inoculated cells was suppressed by the soil microflora. The results of dynamics of bacterial melanin assimilation in the soil showed that it was quickly enough and efficiently assimilated by soil microorganisms and could not cause contamination of ground waters.

The biological activity of purified melanin preparation was studied on animal and plant objects *in vivo*.

In vegetables (bean, chick pea, pepper, potato, beet, small-fruited carrot) application of low concentrations (0.03-0.08%) of bacterial melanin solution led to an increase in seed germination, growth stimulation, ripening of large, pulpy fruits with lots of large seeds. In shortened vine grafts treated with melanin solution in 6-7 months a mighty root system developed, growth stimulation and maturing of sprouts occurred that ensured high survival of seedlings. Bacterial melanin significantly increased crop yield of plants (20-50%) and their resistance to environmental abiotic factors.

Experiments conducted on animals (albino rats) with brain lesion revealed that melanin promoted brain tissue regeneration: it suppressed scar formation, which is a mighty barrier on the way to nerve fiber growth; improved trophicity of nervous tissue due to dilation of vessels lumens and formation of new capillaries; promoted overall growth of nerve fibers contributing to the recovery processes after nervous tissue lesions; as a neuroprotector ensured preservation of nerve cells in the lesion area.

The results of field tests showed that the insecticidal activity of melaninogenic mutants of *B. thuringiensis* towards pests distinctly increased as compared to the parent strains. This indicates that the pigment protects spores and crystals from a destructive action of sunbeams, thus prolonging the time of their insecticidal activity manifestation.

Thus, in the course of the performed work new melaninogenic strains with increased insecticidal activity have been obtained. High biological activity of water-soluble bacterial melanin was shown on plant and animal objects, which would provide future commercial success of bacterial melanin -based preparation for its application in medicine and agriculture.