

УДК 582.28:57.083

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КАТИОНОВ МЕТАЛЛОВ ТРИАДЫ ЖЕЛЕЗА НА АКТИВНОСТЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛЕКТИНОВ *LENTINUS EDODES*

О.М. Цивилева, А.Н. Панкратов*, Е.А. Лощинина, В.Е. Никитина

(Лаборатория микробиологии и микологии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов)

Показано, что активность внеклеточных лектинов базидиомицета *Lentinus edodes* зависит от присутствия в синтетической жидкой среде культивирования двухзарядных катионов металлов. Влияние Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} на лектиновую активность изменяется симбатно с энергиями реакций хелатообразования гексааквокомплексов металлов с модельным бидентатным лигандом этиленгликолем. На начальных этапах биосинтеза лектинов влияние катионов металлов на лектиновую активность *L. edodes* наиболее выражено.

Базидиомицет *L. edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler], или шиитаке, – один из самых популярных культивируемых грибов. Его биомассу широко используют в качестве защитного и профилактического средства, обладающего высокой биологической активностью [1]. В развитии этих грибов важную роль играют лектины [2–4] – белки неиммунноглобулиновой природы, способные к специфическому узнаванию и обратимому связыванию с углеводной частью гликоконъюгатов без нарушения ковалентной структуры последних [5]. Активность внеклеточных лектинов *L. edodes* зависит от различных физико-химических факторов, в том числе от состава среды культивирования [6–8].

В настоящей работе исследованы эффекты двухзарядных катионов биологически значимых металлов в составе жидкой синтетической среды культивирования, проявляющиеся в изменении активности внеклеточных лектинов *L. edodes*, и сделана попытка объяснить влияние катионов металлов на лектиновую активность с позиций квантовой химии.

Экспериментальная часть

В работе использован штамм *L. edodes* F-249 из коллекции высших базидиальных грибов кафедры микологии и альгологии Московского государственного университета. При глубинном культивировании *L. edodes* использовали синтетические среды с источником углерода (концентрация 300 мМ по углероду): -глюкозу, L-арабинозу, сахарозу; источником азота служил L-аспарагин (10 ммоль/л). В качестве компонентов (добавок к среде выращивания) использовали соли металлов (0–10 ммоль/л): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $NiSO_4 \cdot 6H_2O$, $SnCl_2 \cdot 2H_2O$.

Синтетическая среда для изучения процессов хелатообразования состояла из глюкозы (50 мМ) и аспарагина (10 мМ) с включением добавок Fe(II), Co(II), Ni(II) (4 мМ) и этиленгликоля (2 мМ или 4 мМ). Температура выращивания, как оптимальная температура роста мицелия для данного вида [9], составляла 26°C. Инокуляцию жидких сред осуществляли стандартными блоками, вырезанными из зоны роста колонии штамма на агаризованном пивном сусле. Лектиновую активность определяли известным методом [10], используя трипсинизированные эритроциты кролика.

Расчеты *ab initio* проводили по программе из пакета HyperChem [HyperChem (TM), Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, U. S. A.] с полной оптимизацией геометрии при использовании алгоритма Полака–Рибера [11]. Предварительную оптимизацию геометрии осуществляли методом RM3 [12, 13] с помощью программы из того же пакета. Квантовохимические расчеты проводили при таком условии, чтобы норма градиента не превышала 0,02 ккал/(моль·Å).

Результаты определения лектиновой активности культуральной жидкости *L. edodes* F-249 при использовании солей девяти металлов в степени окисления +2 (M^{2+}) представляли в виде графиков зависимости титра гемагглютинации от продолжительности выращивания. Среда выращивания с кальцием (источник углерода – глюкоза (рис. 1, а), сахароза (рис. 1, б), арабиноза (рис. 1, в)) различаются как величинами титров гемагглютинации (максимальные значения со-

*Кафедра аналитической химии и химической экологии химического факультета Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского, г. Саратов

ставляют 1024 для глюкозы и арабинозы, 256 — для сахарозы), так и периодами проявления наибольшей лектиновой активности. Так, титр 1024 наблюдается при содержании Ca^{2+} 1 ммоль/л на 9-е и 16–28-е сут культивирования в случае глюкозы и только на 21–28-е сут в случае арабинозы. Максимальная лектиновая активность (титр 256) на среде с сахарозой наблюдается лишь на 3-и и 5-е сут (1 ммоль/л).

Более высокое содержание магния (2 ммоль/л) способствует проявлению наибольшей для среды с этим катионом активности внеклеточных лектинов *L. edodes* F-249 с титром гемагглютинации культураль-

ной жидкости 1024 в течение самого длительного из вышеупомянутых периодов выращивания (13–28 сут).

В случае марганца, как и в случае кальция, наиболее благоприятна для проявления лектиновой активности концентрация катиона 1 мМ; возраст культуры 21–28 сут, титр не превышает 512 (единственный случай, когда эта величина титра соответствует концентрации 2 ммоль/л M^{2+} имеет место на 5-е сут).

Интересно, что при использовании в качестве добавки к синтетической среде культивирования *L. edodes* F-249 двухзарядных катионов меди имела место зависимость “лектиновая активность—концентрация M^{2+} ”, противоположная наблюдаемой в настоящей работе для других металлов. Наибольшая активность внеклеточных лектинов проявлялась на среде с максимальным содержанием меди; титр гемагглютинации 1024 при возрасте культуры 5-е и 21–28-е сут. И если до 3 сут выращивания оптимальна концентрация 6–8 ммоль/л Cu^{2+} (титр 256 по сравнению с 128 для 10 ммоль/л Cu^{2+}), то в течение всего периода культивирования 5–28-е сут титр гемагглютинации жидкой среды наиболее высок при 8–10 ммоль/л Cu^{2+} . Обсуждаемые выше для других металлов концентрации (1 и 2 ммоль/л) в случае Cu^{2+} способствуют проявлению максимальной для этих концентраций лектиновой активности с титром 256 и 512 соответственно при возрасте культуры 21–28 сут.

Результаты исследования влияния двухзарядных катионов железа, цинка, олова, никеля и кобальта на активность внеклеточных лектинов *L. edodes* F-249 показаны на рис. 2, 3. Максимальная лектиновая активность в случае железа и цинка характеризуется титром 128 (единственное исключение — 14-сут культура, концентрация Me^{2+} 10 ммоль/л). Лектиновая активность выше в том случае, если компонентом среды является Fe^{2+} , а не Zn^{2+} . После 3 сут выращивания увеличение концентрации катиона от 4 до 10 ммоль/л не сказывается на величине титра гемагглютинации в случае Zn^{2+} и приводит к снижению титра в 2 раза при возрасте культуры 14 сут на среде с железом.

При увеличении концентрации катиона металла лектиновая активность снижается. Небольшое возрастание титра (в 2 раза) можно отметить только в случае Sn^{2+} после 10 сут выращивания. В случае Co^{2+} при концентрации катиона 10 ммоль/л титр гемагглютинации культуральной жидкости ниже в 4 раза, чем при концентрации 4 ммоль/л. Наибольший отрицательный эффект добавки в среду культивирования двухзарядных катионов имеет место в случае никеля: лектиновая активность проходит через максимум на 10-е сут культивирования (титр 32) при 4 ммоль/л Ni^{2+} и не проявляется совсем

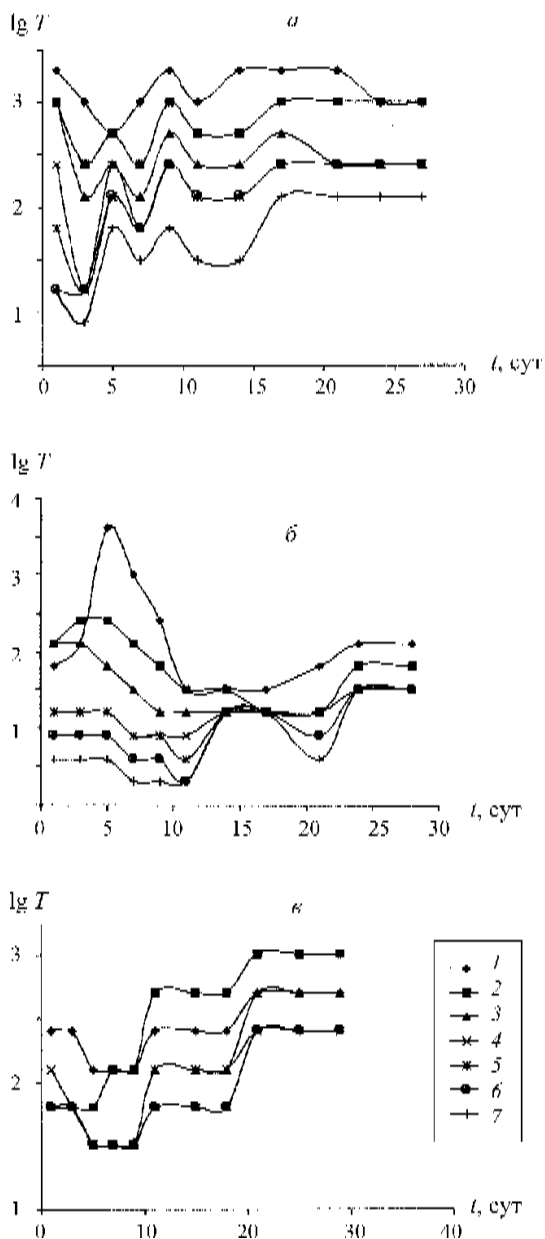


Рис. 1. Зависимость титра гемагглютинации культуральной жидкости *L. edodes* F-249 с добавкой Ca^{2+} при использовании D-глюкозы (а), сахарозы (б), L-арабинозы (в) в качестве источника углерода от времени культивирования; концентрация Ca^{2+} , ммоль/л: 1 – 0; 2 – 1; 3 – 2; 4 – 4; 5 – 6; 6 – 8; 7 – 10

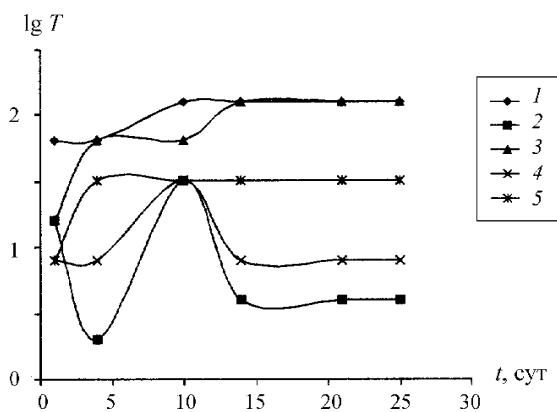


Рис. 2. Зависимость титра геагглютинации культуральной жидкости *L. edodes* F-249 с добавками катионов металлов M^{2+} (4 ммоль/л) при использовании *D*-глюкозы в качестве источника углерода от времени культивирования; концентрация M^{2+} : 1 – Fe^{2+} ; 2 – Ni^{2+} ; 3 – Zn^{2+} ; 4 – Co^{2+} ; 5 – Sn^{2+}

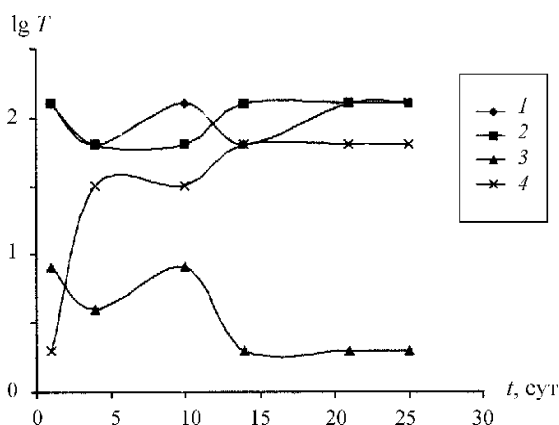
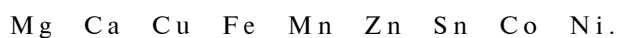


Рис. 3. Зависимость титра геагглютинации культуральной жидкости *L. edodes* F-249 с добавками катионов металлов M^{2+} (10 ммоль/л) при использовании *D*-глюкозы в качестве источника углерода от времени культивирования; концентрация M^{2+} : 1 – Fe^{2+} ; 2 – Zn^{2+} ; 3 – Co^{2+} ; 4 – Sn^{2+}

при 10 ммоль/л (по этой причине на рис. 3 отсутствует кривая для Ni^{2+}).

Принимая во внимание величины титров геагглютинации и продолжительность периода их существования, на основе полученных данных можно сделать вывод, что активность внеклеточных лектинов *L. edodes* F-249 в зависимости от присутствия в синтетической жидкой среде культивирования двухзарядных катионов металлов изменяется в ряду:



Представляет интерес объяснение влияния катионов металлов на лектиновую активность с позиций квантовой химии. Вероятный механизм положительного влияния катионов металлов на лектиновую активность состоит в том, что они образуют смешанно-

лигандные комплексы с гидроксильными группами лектинов и гликоконъюгатов, способствуя обратимому связыванию гликоконъюгатов лектинами. Почему же двухзарядные ионы железа, кобальта и никеля, составляющие ряд близких по важнейшим характеристикам катионов металлов со сходной электронной конфигурацией, так сильно различаются по своему влиянию на лектиновую активность? Скорее всего, различия в гораздо большей степени определяются термодинамикой реакций комплексообразования и прочностью связи металл–кислород, чем электростатическими предпосылками комплексообразования M^{2+} с кислородсодержащими лигандами.

Для проверки этого предположения мы провели квантовохимическое *ab initio* исследование термодинамики реакций гексааквокомплексов железа (II), кобальта (II) и никеля (II) с модельной системой – этиленгликолем как типичным хелатообразующим реагентом и простым аналогом углеводов. Квантовохимические расчеты проводили неограниченным методом Хартри–Фока (UHF) в базисе 3-21G(d,p) (UHF/3-21G(d,p)) [14, 15]. Корреляционные поправки к хартри–фовским энергиям рассчитывали для оптимизированной геометрии (Single Point) в рамках теории возмущений Меллера–Плессе второго порядка (MP2) [14, 15] в том же базисе (подход MP2/3-21G(d,p)//UHF/3-21G(d,p)). Трактовка катионов Fe^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} и комплексов с этиленгликолем как аддуктов, содержащих молекулы воды во внутренней координационной сфере, позволяет достаточно адекватно учесть гидратацию. При расчетах принимали во внимание то, что молекулы воды и органического реагента как лиганды создают достаточно слабое поле [16], и спиновая мультиплетность смешаннолигандных комплексов такая же, как у аквоионов [17] 5, 4 и 3 для соединений $Fe(II)$, $Co(II)$ и $Ni(II)$ соответственно. В качестве примеров приведены графические образы оптимизированных методом UHF/3-21G(d,p) гексааквокомплекса никеля (II) (рис. 4) и смешаннолигандного комплекса никеля (II) с водой и этиленгликолем (рис. 5).

Возможны варианты комплексообразования с участием как ионов гидроксония, так и гидроксид-ионов. Чтобы отразить тенденцию изменения (ΔE) значений полной энергии молекулярных систем в ряду металлов независимо от того, по какому брутто-уравнению протекает реакция, целесообразно представить энергетические эффекты в виде относительных величин (табл. 1). Величина ΔE является аналогом свободной энергии (ΔG) реакции без учета энтропии. Использование величины ΔE вместо ΔG корректно (см., например, [18–26]). Учет электронной корреляции сглаживает, делает более реалистичными различия в ΔE для разных катионов ме-

таллов. Ряд уменьшения склонности катионов к комплексообразованию с этиленгликолем $\text{Fe}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$, полученный из квантовохимических расчетов, согласуется с рядом уменьшения влияния этих катионов на лектиновую активность: $\text{Fe}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$.

Наряду с описанным выше квантовохимическим *ab initio* исследованием термодинамики реакций гексааквокомплексов Fe(II) , Co(II) и Ni(II) с этиленгликолем проведено экспериментальное исследование поведения моделируемой системы. Для этого определяли в динамике лектиновую активность культуральной жидкости *L. edodes* в разных вариантах опыта. Во-первых, соли перечисленных металлов и этиленгликоль вводили в состав стерильных питательных сред перед их засевом мицелием. Во-вторых, изучаемые химические добавки, стерилизованные в тонком слое, вводили в состав бесклеточной культуральной жидкости, асептически отобранной из среды выращивания *L. edodes* при возрасте культуры, характеризующемся высоким титром гемагглютинации. По-нашему мнению, активность внеклеточных лектинов шитате в описанных экспериментальных условиях позволила бы судить о степени участия катионов железа, кобальта и никеля в процессах биосинтеза лектинов, предположительно опосредованных хелатообразованием с соединениями – носителями гидроксильных групп.

Удобно представить полученные данные в виде отношения $\text{TGA}_{\text{add}}/\text{TGA}$, где TGA_{add} – титр гемагглютинации в присутствии Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} или этиленгликоля как компонентов питательной среды, TGA – титр гемагглютинации в отсутствие этих добавок. Результаты показаны в табл. 2. Прежде всего отметим, что величины $\text{TGA}_{\text{add}}/\text{TGA}$ равны единице для

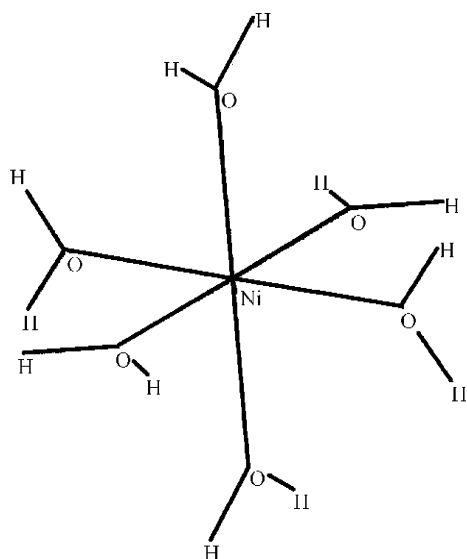


Рис. 4. Графический образ оптимизированной методом UHF/3-21G(d,p) молекулы и акваиона $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$

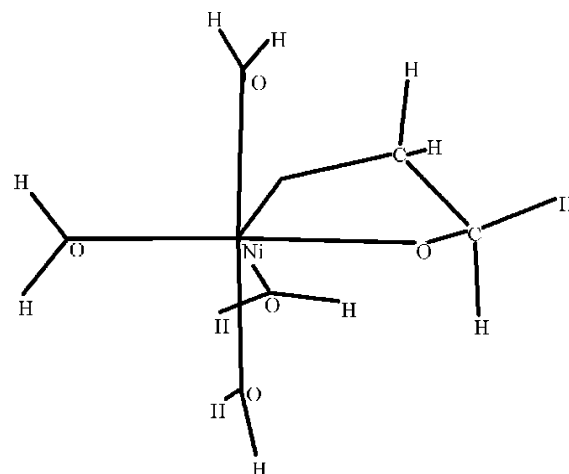


Рис. 5. Графический образ оптимизированной методом UHF/3-21G(d,p) молекулы смешаннолигандного комплекса никеля (II) с водой и этиленгликолем $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})]$

всех возрастов культуры и вариантов опыта, когда к среде добавлен только этиленгликоль, что говорит об отсутствии заметного влияния последнего на лектиновую активность и правомерности использования этого соединения в качестве модельного хелатообразующего реагента.

Данные, представленные в табл. 2 для разной продолжительности инкубирования бесклеточной жидкости с добавками M^{2+} , показывают, что предполагаемое нами взаимодействие катионов металлов с лектинами, присутствующими в среде, само по себе оказывает достаточно малое влияние на активность этих белков. Отношение $\text{TGA}_{\text{add}}/\text{TGA}$ бесклеточной жидкости равно единице во всех случаях до 3 сут инкубации. Однако к 7-м сут эта величина для Co(II) и Ni(II) значительно снижается (до

Таблица 1

Значения DE реакции по отношению к $\text{M} = \text{Fe}$



M	ΔE , ккал/моль	
	UHF/3-21G(d,p)	MP2/3-21G(d,p)//UHF/3-21G(d,p)
Fe	0	0
Co	6	33
Ni	261	185

Т а б л и ц а 2

Влияние добавок к среде культивирования на лектиновую активность культуральной жидкости *L. edodes* F-249 (ТГА_{add}/ТГА)

Добавка к среде ^b	Возраст культуры [продолжительность инкубирования с добавкой] ^a , сут						
	3	7	10	14	17	21	25
Fe(II)	1 [1]	1 [1]	1 [1]	1 [1]	1/2	1/4	1/4
Fe(II)+EG ^c	1 [1]	2 [1]	1 [1]	1 [1]	1/2	1/4	1/4
Fe(II)+2EG ^d	2 [1]	4 [1]	1 [1]	1 [1]	1	1/2	1/2
Co(II)	1/8 [1]	1/8 [1/8]	1/16 [1/2]	1/16 [1]	1/16	1/32	1/32
Co(II)+EG	1/2 [1]	1/4 [1]	1/16 [1]	1/16 [1]	1/16	1/32	1/32
Co(II)+2EG	1 [1]	1 [1]	1/4 [1]	1/16 [1]	1/16	1/16	1/16
Ni(II)	1/32 [1]	1/64 [1/64]	1/128 [1/16]	1/128 [1/8]	0	0	0
Ni(II)+EG	1/32 [1]	1/64 [1/32]	1/128 [1/8]	1/128 [1/4]	0	0	0
Ni(II)+2EG	1/8 [1]	1/64 [1/32]	1/128 [1/8]	1/128 [1/2]	0	0	0
EG	1 [1]	1 [1]	1 [1]	1 [1]	1	1	1
2EG	1 [1]	1 [1]	1 [1]	1 [1]	1	1	1

Примечания. ^a в квадратных скобках приведены данные для бесклеточной культуральной жидкости (см. пояснения в тексте); ^b состав сред более подробно указан в тексте; ^c среда с этиленгликолем (2 ммоль/л); ^d среда с этиленгликолем (4 ммоль/л)

1/8 и 1/64 ТГА соответственно) и становится одинаковой в случаях растущей культуры и бесклеточной культуральной жидкости. Несколько “исправляет” ситуацию присутствие этиленгликоля, повышая ТГА_{add}/ТГА в 8 раз для Со(II) и в 2 раза для

Ni(II), по-видимому, благодаря обратимому, протекающему в различной степени (см. выше теоретическое рассмотрение) комплексообразованию М²⁺. Интересно, что для большинства добавок на 14-е сут величина ТГА_{add}/ТГА возвращается к единице (да-

лее наблюдения не проводились, так как имело место уменьшение величины ТГА из-за естественного снижения активности лектинов во времени). При длительном инкубировании M^{2+} с лектинами даже Ni^{2+} не оказывает такого резко отрицательно влияния на TGA_{add} , как при добавлении его перед инокуляцией питательной среды мицелием. По-видимому, катионы металлов участвуют в процессах биосинтеза лектинов на начальных этапах, что вполне подтверждается данными табл. 2. Наиболее благоприятны добавки Fe^{2+} : в присутствии этих катионов этиленгликоль оказал значительное положительное влияние на лектиновую активность культуры (отношение TGA_{add}/TGA составило 4 на 7-е сут

культивирования). Наибольшая склонность к комплексообразованию содержащими гидроксогруппы соединениями именно для этого M^{2+} подтверждена квантовохимическими расчетами.

Таким образом, одним из факторов, влияющих на лектиновую активность глубинной культуры *L. edodes*, является присутствие в среде культивирования солей металлов в степени окисления +2. Гипотеза об обратимом связывании катионов металлов в непрочные смешаннолигандные комплексы с лектинами и гликоконъюгатами, разумно объясняющая различное влияние катионов металлов на лектиновую активность, получила квантовохимическое обоснование на примере трех металлов (Fe, Co, Ni).

Работа поддержана грантом РФФИ № 03-04-48129.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Molitoris H.P. // Folia Microbiol. 1994. **39**. P. 91.
2. Kocourek J., Horejsi V. Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. 3. Berlin; N.Y., 1983. P. 3.
3. Jeune K.H., Moon I.J., Kim M.K., Chung S.R. // Planta Med. 1990. **56**. P. 592.
4. Цивилева О.М., Никитина В.Е., Гарибова Л.В. и др. // Микробиология. 2000. **69**. С. 38.
5. Tsvileva O.M., Nikitina V.E., Garibova L.V., Ignatov V.V. // Intern. Microbiol. 2001. **4**. P. 41.
6. Цивилева О.М., Панкратов А.Н., Никитина В.Е., Гарибова Л.В. // Микробиология. 2004. **73**. С. 486.
7. Цивилева О.М., Никитина В.Е., Гарибова Л.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. **41**. С. 200.
8. Цивилева О.М., Никитина В.Е., Панкратов А.Н. и др. // Биотехнология. 2005. **2**. С. 56.
9. Przybylowicz P., Donoghue J. Shiitake Growers Handbook: The Art and Science of Mushroom Cultivation. Dubuque, 1991.
10. Луцук М.Д., Панасюк Е.Н., Луцук А.Д. Лектины. Львов, 1981.
11. Дэннис Дж., Шнабель Р. Численные методы безусловной оптимизации и решения нелинейных уравнений. М., 1988.
12. Stewart J.J.P. // J. Comput. Chem. 1989. **10**. P. 209.
13. Stewart J.J.P. // J. Comput. Chem. 1989. **10**. P. 221.
14. Hehre W.J., Radom L., Schleyer P.v.R., Pople J.A. Ab Initio Molecular Orbital Theory. N.Y., 1986.
15. Кларк Т. Компьютерная химия. Практическое руководство по расчетам структуры и энергии молекулы. М., 1990.
16. Хьюи Дж. Неорганическая химия. Строение вещества и реакционная способность. М., 1987.
17. Лидин П.А., Андреева Л.Л., Молочко В.А. Справочник по неорганической химии. Константы неорганических веществ. М., 1987.
18. Днепровский А.С., Темникова Т.И. Теоретические основы органической химии. Строение, реакционная способность и механизмы реакций органических соединений. Л., 1991.
19. Дьюар М. Теория молекулярных орбиталей в органической химии. М., 1972.
20. Pankratov A.N., Shchavlev A.E. // Canad. J. Chem. 1999. **77**. P. 2053.
21. Pankratov A.N., Tsvileva O.M., Nikitina V.E. // J. Biochem. and Mol. Biol. 2000. **33**. P. 37.
22. Pankratov A.N., Uchaeva I.M. // J. Mol. Struct. Theochem. 2000. **498**. P. 247.
23. Pankratov A.N. // J. Mol. Struct. Theochem. 2000. **507**. P. 239.
24. Pankratov A.N. // Helvetica Chim. Acta. 2004. **87**. P. 1561.
25. Pankratov A.N. // Heteroatom Chemistry. 2002. **13**. P. 229.
26. Shchavlev A.E., Pankratov A.N., Shalabay A.V. // J. Phys. Chem. A. 2005. **109**. P. 4137.

Поступила в редакцию 13.12.05

EXPERIMENTAL AND THEORETICAL STUDIES OF THE EFFECT OF FERRUM TRIAD METAL CATIONS ON THE ACTIVITY OF EXTRACELLULAR LECTINS OF *LENTINUS EDODES*

O.M. Tsviliova, A.N. Pankratov, Ye.A. Loshchinina, V.Ye. Nikitina

(Laboratory of Microbiology and Mycology, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms of RAS, Saratov)

The activity of extracellular lectins of the basidiomycete *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] has been shown to be related to the presence of definite double-charged metal cations in the synthetic liquid medium of cultivation. The effect of Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} on the lectin activity has been demonstrated to change with a symbate character in respect to the energies of chelating reactions of metals hexaaqua complexes with the model ligand ethylene glycol. At the initial steps of the lectins biosynthesis, the above metals cations exert the greatest influence upon the lectin activity of *L. edodes*.