ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА НА ПРОДУКЦИЮ МЕЛАНИНА ШТАММОМ STREPTOMYCES LIVIDANS 66 (pIJ 702)

Т.Воейкова, к.б.н., **Б.Тяглов,** к.х.н., **Л.Новикова,** к.б.н., **Л.Емельянова,** к.б.н., **С.Антонова,** к.х.н.
ФГУП "ГосНИИгенетика"
antonovasvetlanavladimirovna@gmail.com

Факторы космического полета, такие как микрогравитация, изменение электромагнитных полей, различные виды излучений могут оказывать значительное воздействие на метаболизм и стабильность генетического материала у микроорганизмов. В работе изучено влияние факторов космического полета на синтез меланина у штамма Streptomyces lividans 66 (pIJ 702) методом количественной тонкослойной хроматографии.

Многолетние сроки эксплуатации орбитальных космических станций выдвинули на первый план экологические проблемы, среди которых важнейшее место занимает характер формирования микробного сообщества среды обитания. Количественные и качественные характеристики микроорганизмов внутренних обитаемых отсеков могут значительно изменяться под действием условий космического полета. Жизнедеятельность микроорганизмов в среде космического объекта сопровождается возникновением как медицинских, так и весьма серьезных технологических рисков. В их основе лежит резидентное заселение конструкционных и декоративно-отделочных материалов оборудования и интерьера бактериально – грибными ассоциациями, обладающими способностью переживать неблагоприятные условия в стадии покоя.

Исследование процессов жизнедеятельности микроорганизмов в космических кораблях необходимо для получения информации о воздействии факторов космического полета (ФКП) на штаммы, являющиеся симбионтами человека, с целью оценки микробиологического риска для космонавтов в будущих длительных космических экспедициях. Кроме того, часть обнаруженных бактерий и значительное число выявленных грибов известны как потенциальные биодеструкторы материалов, способные вызывать биоповреждения различного оборудования. При этом у микроорганизмов, обитающих внутри космического объекта, происходит быстрая адаптация к условиям полета, изменяются такие характеристики как скорость роста, способность к потреблению новых питательных субстратов, уровень синтеза биологически активных веществ. Поэтому изучение влияния ФКП на процессы жизнедеятельности микроорганизмов – актуальная теоретическая и практическая задача.

Цель настоящей работы состояла в анализе влияния ФКП на биосинтез пигмента меланина, синтезируемого штаммом

Streptomyces lividans 66 (pIJ 702). Эксперимент проводили на борту российского беспилотного аппарата "Фотон М-3" в 2007 году по программе международных космических исследований. Продолжительность полета составляла 16 суток, температура инкубации штамма – 30°С. В задачи работы входили:

- количественный анализ меланина, синтезированного при росте на агаризованной среде в полете и в лабораторных условиях с последующей оценкой фракционного состава образцов пигмента;
- анализ физиологических и ростовых характеристик полетного образца штамма при культивировании в лабораторных условиях с последующим выделением и анализом пигмента меланина.

В качестве инструментального метода для оценки уровня синтеза и фракционного состава меланина выбрана количественная тонкослойная хроматография (ТСХ) с последующей денситометрией. Метод ТСХ прост в исполнении, не требует дорогостоящего оборудования и больших затрат времени для проведения анализа. Он широко применяется для исследования продуктов, получаемых с помощью актиномицетов в промышленной биотехнологии.

В работе использовали отечественные реактивы. Органические растворители очищали согласно методикам [1]. Воду получали на установке Super Q фирмы Millipore (США).

Для получения меланина выбрана культура Streptomyces lividans 66 (pIJ 702). Штамм содержал мультикопийную плазмиду pIJ с геном mel, определяющим синтез пигмента меланина. Условия и состав сред для ферментации описаны ранее в [2].

Ферментацию проводили в колбах объемом 750 мл на круговой качалке Newbrunswick-G20 (США) с частотой вращения 240 об./мин при температуре 30°С в течение четырех суток.

Мицелий осаждали центрифугированием при 8200g в течение 20 мин. Супернатант объединяли и выделяли из него меланин, подкислением супернатанта 2н HCl (в соотношении 5:1 по объему) до выпадения осадка, который затем промывали водой до величины pH 6,5. Полученный меланин растворяли в 1н NaOH и снова осаждали 2н HCl и затем промывали водой. Эти операции повторяли еще три раза [3]. Полученный меланин использовали в качестве стандартного образца. Стандартные растворы в концентрациях 1,0; 2,5; 5,0 и 7,5 мг/мл готовили в смеси: этанол – 25%-ный водный аммиак – вода (9:2:12 по объему) и хранили при температуре 4°С. Срок хранения растворов две недели.

Согласно программе эксперимента "Фотон М-3" проведена количественная оценка фракционного состава меланина, образовавшегося непосредственно на чашках Петри и диффундировавшего в агаризованную среду. Рост штаммов в полетном и контрольных экспериментах проходил в течение 16 суток. Затем из чашек Петри диаметром 55 и 40 мм извлекли агаризованную минимальную среду с выросшей культурой Streptomyces lividans 66 (pIJ 702). Чашки пронумеровали следующим образом: I и II – лабораторный контроль (ИМБП)*, III и IV – лабораторный контроль (ФГУП "ГосНИИгенетика"), V и VI – полетный эксперимент.

Агар взвесили, тщательно измельчили, после чего элюировали меланин с помощью разработанной нами системы растворителей: этанол – 25%-ный водный аммиак – вода (12:2:9 по объему). Экстракцию меланина проводили последовательно за пять циклов, с заменой растворителя после каждого цикла. После этого экстракты объединяли и упаривали на роторном испарителе. Полнота экстракции меланина из геля подтверждена данными модельного эксперимента "введено → получено".

Разделение осуществляли на ТСХ-пластинках Cellulose F254 Merck (Art. 15035). Подвижная фаза: метанол – 25%-ный водный аммиак – вода (6:2:9 по объему). Растворы стандартных и опытных проб меланина наносили на пластинки с помощью микрошприца МШ-1М вместимостью 1,0 мкл производства ОАО "Цвет" (Россия). Объем наносимых проб – 0,5 мкл.

Хроматографию осуществляли восходящим методом в стеклянной камере (22,5×29,0×16,0 см) производства НТЦ "Ленхром" (Россия). Насыщение камеры – 1 ч. Время разделения составило 20–25 мин. После элюирования хроматограмму выдерживали 10 мин в вытяжном шкафу при 20°С. Визуализацию пятен меланина на хроматограммах осуществляли в видимой области спектра.

Количественное определение меланина проводили на денситометрах CS-920 фирмы Shimadzu (Япония) и UVP-800 фирмы UVP-products (США) при длине волны 350 нм. Статистическую обработку полученных результатов выполняли согласно методике [4].

* Институт медико-биологических проблем РАН.

Для оценки молекулярных масс фракций меланина, как в лабораторных, так и в полетных образцах, индивидуальные фракции элюировали с хроматограммы. Затем элюаты этих фракций подвергали процедуре ультрафильтрации с помощью фильтрационных микроцентрифужных приборов Microco YM-30, YM-50 и YM-100 с мембранами из регенерированной целлюлозы фирмы Millipore (США). Использовали центрифугу MiniSpin фирмы Eppendorf (Германия) при 16100g 30 мин. Полученные фильтраты использовали для хроматографического анализа.

Анализ работ, опубликованных в ведущих хроматографических журналах, таких как Journal of Chromatography, Journal of liquid Cromatography, Journal of Planar Cromatography, Analytical Chemistry, Electrophoresis, Journal of Camag Bibliography Service и других показал отсутствие данных по применению ТСХ для разделения и анализа меланинов. Этот факт, скорее всего, объясняется использованием меланинов в косметологии, где аналитическое обеспечение процессов производства является коммерческой тайной фирм-производителей.

В процессе работы решены следующие задачи: растворение, ТСХ меланина и валидация методики количественного определения меланина методом хроматоденситометрии.

РАСТВОРЕНИЕ МЕЛАНИНА

Известно, что все меланины (рис.1) – плохо растворимые соединения. Для их растворения, как правило, используют 2–5%-ные водные растворы гидроксидов натрия или калия [3].

Разработана система, состоящая из этанола – 25%-ного водного аммиака – воды (12:2:9 по объему), которая позволяла осуществить растворение 10 мг меланина кристаллического (очищенного по вышеуказанной методике [3]) в 1,0 мл этой смеси растворителей при комнатной температуре в течение 2 ч в условиях интенсивного перемешивания.

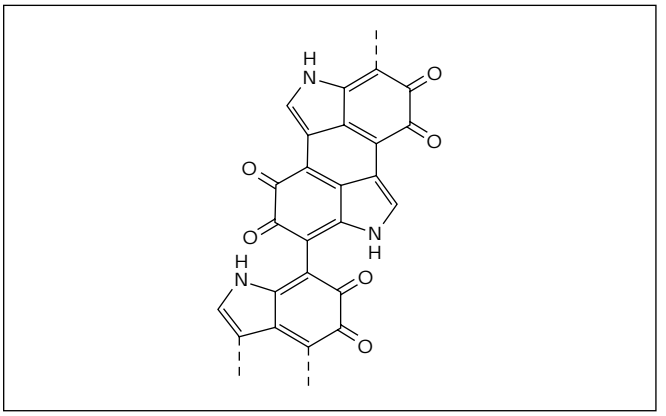

Рис.1. Структурная формула меланина

ТСХ МЕЛАНИНА

Ввиду отсутствия литературных данных по разделению меланинов методом ТСХ мы с помощью модели "Призма" [5, 6], разработали подвижную фазу следующего компонентного состава: метанол – 25%-ный водный раствор аммиака – вода (6:2:9 по объему). Эта система позволила провести разделение меланина, продуцируемого Streptomyces lividans 66 (pIJ 702), на три основные фракции. Разделение проведено на ТСХ-пластинках Cellulose F254 Merck (Art. 15035), время разделения составило 20–25 мин (l=70 мм) при температуре 20°С.

Количественную обработку хроматограмм осуществляли с помощью денситометров CS-920 фирмы Shimadzu (Япония) и UVP-8000 фирмы UVP-Products (США) при длине волны 350 нм сразу же после элюирования. Установлено, что зависимость величин денситометрических сигналов пятен фракций меланина линейна в диапазоне от 1,0 до 7,5 мкг в пятне. Градуировочный график выполнен по четырем точкам веществ-стандартов, взятых в трех повторностях (1,0; 2,5; 5,0 и 7,5 мкг в пятне), r=0,9939. Предел количественного определения меланина 1,0 мкг в пятне.

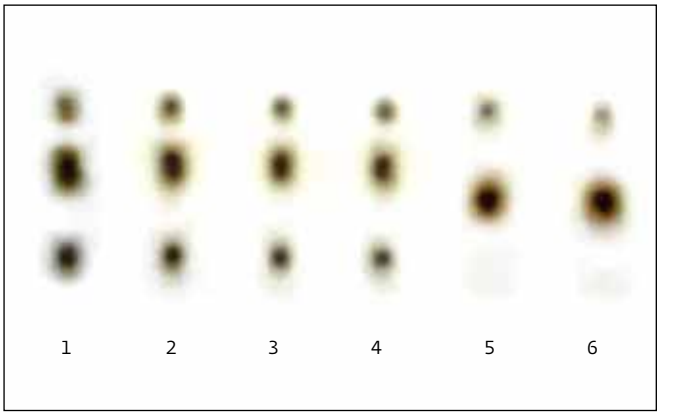

Рис.2. Хроматограмма меланина. ТСХ-пластинки Cellulose F254 Merck, подвижная фаза метанол – 25%-ный водный аммиак – вода (6:2:9 по объему). Внеполетные образцы: лабораторный контроль ИМБП (дорожки 1 и 2); лабораторный контроль ФГУП "ГосНИИгенетика" (дорожки 3 и 4); полетный эксперимент (дорожки 5 и 6)

На рис.2 представлены хроматограммы внеполетных образцов: лабораторный контроль ИМБП (дорожки 1 и 2), лабораторный контроль ФГУП "ГосНИИ генетики" (дорожки 3 и 4), а также полетный эксперимент (дорожки 5 и 6). На полученных хроматограммах наблюдали три основных пика меланинов с величинами Rf 0,85±0,03; 0,80±0,03; 0,64±0,03 с интенсивностью (выражена в %) 15,0±2,3; 46,0±3,1; 33,0±2,7 (n=5; P 0,95). На хроматограммах полетных образцов наблюдали только два пика меланинов с величинами Rf 0,82±0,03 и 0,51±0,03 с интенсивностью (выражена в %) 9,1±1,1 и 84,0±3,3 (n=5; P 0,95). Эти хроматографические зоны принадлежат полимерным фракциям, которые различаются по молекулярной массе, причем она увеличивается с уменьшением величины Rf [7].

Для оценки величин молекулярных масс меланина, содержащегося в этих хроматографических зонах, меланин был элюирован с сорбента. Элюаты подвергли ультрафильтрации с помощью фильтрационных микроцентрифужных приборов Microcon YM-30, YM-50 и YM-100 с мембранами из регенерированной целлюлозы фирмы Millipore (США) с номинальными порогами отсечения 30, 50 и 100 kDa, соответственно. Установлено, что молекулярные массы фракций меланина лежат в интервале от 100 до 30 kDa, причем хроматографические зоны, имеющие большие величины Rf, характеризуются меньшей молекулярной массой [7].

Проведено количественное определение содержания меланина в хроматографических зонах, принадлежащих контрольным и полетным образцам (табл.1). Эксперименты выполняли в чашках Петри. Как видно из таблицы, содержание меланина в полетных и контрольных образцах различается. Таким образом, было установлено, что ФПК влияют как на продукцию, так и на фракционный состав меланина, полученного с помощью штамма Streptomyces lividans 66 (pIJ 702).

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕЛАНИНА МЕТОДОМ ХРОМАТОДЕНСИТОМЕТРИИ

Согласно нормативам ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, неотъемлемая часть современного количественного анализа – валидация (оценка пригодности) используемых аналитических методик. Она включает в себя следующие характеристики: специфичность, линейную зависимость, правильность

Таблица 1. Содержание меланина в мг/г агарозного геля в полетных и контрольных образцах

Номер образца	Источник материала	Диаметр чашки Петри, мм	Содержание меланина, мг/г
I II	Контроль ИМБП	55 40	0,55 0,34
III IV	Контроль ФГУП "ГосНИИгенетика"	55 40	0,51 0,30
V VI	Полетный образец	55 40	0,46 0,26

(точность), предел обнаружения, предел количественного определения, пригодность системы [5, 8, 9]. Для доказательства устойчивости стандартного препарата меланина на слое силикагеля проведены следующие предвалидационные тесты:

- двумерная хроматография каждой фракции меланина. Показано, что после двумерного элюирования он дает только одно пятно. Условия проведения анализа для меланина: элюент – метанол – 25%-ный водный раствор аммиака – вода (6:2:9 по объему), температура 20°С, насыщение камеры 1 ч, содержание меланина в пятне 2,5 мкг;
- хроматография растворов одних и тех же проб меланина в следующие промежутки времени: 5, 30, 60, 180, 240 и 360 мин. Установлено, что каждая фракция меланина элюируется одним пятном и интенсивность этих пятен не изменяется. Условия проведения анализа такие же, как и в первом пункте;
- нанесены пробы меланина на пластинки с последующим элюированием этих пластинок через 5, 30, 60, 180, 240 и 360 мин. Перед проведением элюирования пластинки выдерживались в лабораторном помещении при комнатной температуре 20–25°С в незащищенном от света месте. Обнаружено, что каждая фракция меланина элюируется одним пятном и интенсивность этого пятна не изменяется. Условия проведения эксперимента такие же, как и в первом пункте.

Таблица 2. Относительная погрешность результатов анализа стандартных растворов меланина, % , выполненных в разное время

С, мкг		1,0	2,5	5,0	7,5
ε,%	I	4,1	3,2	3,0	1,9
	II	4,6	3,4	2,9	2,2
r (I и II)		n = 5, P 0,95; r = 0,9904			

Примечание. В течение одного дня – I, через пять дней – II, С – содержание меланина в пятне, мкг. Использован денситометр Shimadzu CS-920.

Таблица 3. Относительная погрешность измерения содержания стандартных образцов меланина, % , выполненных в различных лабораториях в разное время

С, мкг		1,0	2,5	5,0	7,5
ε,%	I	3,9	2,7	2,3	1,9
	II	4,0	2,9	2,2	1,7
r (I и II)		n = 5, P 0,95; r = 0,9928			

Примечание. I – денситометр Shimadzu CS-920, II – денситометр UVP-800, λ=350 нм, С – содержание меланина в пятне, мкг.

Полученные таким образом экспериментальные данные свидетельствуют о том, что меланин устойчив на тонких слоях целлюлозы в течение 360 мин.

Разработанная подвижная фаза для разделения фракций меланина весьма селективна, величины ΔRf >> 0,05. Таким образом, показана специфичность разработанной методики, поскольку она позволяет достоверно определять фракции меланина. Установлено, что аналитическая область методики, в пределах которой соблюдается линейная зависимость, охватывает интервал для меланина от 1,0 до 7,5 мкг в пятне, включая эти пределы. Правильность (точность) разработанной методики, в пределах аналитической области, иллюстрируют результаты, представленные в табл.2. Кроме того, следует отметить хорошую внутрилабораторную воспроизводимость результатов.

Проверена межлабораторная воспроизводимость результатов (табл.3).

Из табл.3 видно, что результаты, полученные на межлабораторных испытаниях хорошо коррелируют друг с другом. Предел обнаружения меланина составляет 0,5 мкг. Предел количественного определения меланина 1,0 мкг в пятне (S/N=30).

Проведено исследование зависимости селективности разделения от величины объемного содержания метанола и 25%-ного водного аммиака, входящих в состав подвижной фазы. Установлено, что величины ΔRf пятен фракций меланина практически не изменяются ΔRf (±0,05, n =5, P 0,95) в интервале содержания метанола от 5,5 до 7,0% по объему и 25%-ного водного аммиака от 1,5 до 2,8% по объему.

Температура в интервале от 15 до 35°С и время насыщения камеры от 30 до 120 мин также не оказывают влияния на величины ΔRf (±0,05, n = 5, P 0,95) фракций меланина. Использование ТСХ-пластинок Cellulose F254 Merck (Art. 15035) различных партий также не вызывает изменений селективности разделения.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о пригодности разработанной нами методики для количественного определения меланина.

Авторы выражают благодарность ст. научн. сотр., к.б.н. К.В.Лобанову за помощь в работе. Исследования выполнены при поддержке Российского космического агентства, Института медико-биологических проблем РАН, национального агентства по аэронавтике и исследованию космического пространства США (NASA). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ФГУП "ГосНИИгенетика".

ЛИТЕРАТУРА:

1. **Perrin D.D.** Purification of Laboratory Chemicals. – N-Y-London, Pergamon Press, 1988.
2. Pigment Cell Research (ed. S. Ito), N.-Y. – Academic Press, 2003, v.16, p.112–135.
3. **Лях С.П., Рубин Е.Л.** Микробные меланины. – М.: Наука, 1972.
4. Государственная фармакопея СССР, 11-е изд-е. – М.: Медицина,1987.
5. **Красиков В.Д.** Основы планарной хроматографии. – СПб.: Химиздат, 2005.
6. **Nyiredy S.Z., Evdelmeier S.A.** TLC mobile phase optimization procedure using “PRIZMA” model. – Planta Medica, 1985, №2, p.241–252.
7. **Беленький Б.Г., Виленик А.Т.** Хроматография полимеров. – М.: Наука, 1990.
8. **Sun S.W., Fabry H.** Test procedure validation for the TLC assay of degradation products in pharmaceutical formulation. – Journal Liquid Chromatography, 1994, v.17, p.2495–2509.
9. **Renger B., Vegh Z.** Validation of thin layer and high performance thin layer chromatographic methods. – Journal of Chromatography, 2011, v.1218, p.2712–2721.