

## СКРИНІНГ ЦВІЛЕВИХ ГРИБІВ НА ЗДАТНІСТЬ ДО СИНТЕЗУ КРЕАТИНІНДЕІМІНАЗИ

О. Демків<sup>1\*</sup>, Н. Стасюк<sup>1</sup>, А. Закальський<sup>1,2</sup>, О. Закальська<sup>1</sup>,  
Т. Прокопів<sup>1,2</sup>, Ю. Борецький<sup>2</sup>, М. Гончар<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Інститут біології клітини НАН України  
вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна

<sup>2</sup>Львівський державний університет фізичної культури імені І. Боберського  
вул. Костюшка, 11, Львів 79007, Україна

<sup>3</sup>Дрогобицький державний педагогічний університет імені Івана Франка  
вул. Івана Франка, 24, Дрогобич 82100, Україна  
e-mail: demkiv@yahoo.com

Визначення концентрації креатиніну в біологічних рідинах набуває дедалі більшої актуальності як клінічний тест. Для визначення вмісту креатиніну в біологічних зразках запропоновано різні хімічні та фізико-хімічні методи, включно з добре відомою кольоровою реакцією Яффе в різних модифікаціях. Однак її недоліками є низька специфічність і чутливість до позитивної та негативної інтерференції з боку супутніх речовин. Окрім того, наявні методи потребують значних затрат часу, тривалості та складної підготовки проб, дорогих реактивів, висококваліфікованого персоналу і, найголовніше, не дають змоги проводити аналіз у режимі реального часу.

Тому все більшу увагу приділяють ензиматичним методам визначення креатиніну, зокрема, з використанням мікробної креатиніндеїмінази. У зв'язку з цим пошук нових мікроорганізмів – ефективних продуцентів специфічних креатиніндеїміназ – є актуальним завданням мікробної ензимології та аналітичної біотехнології. Нами проведено аналіз креатиніндеїмінної активності 10 штамів різних видів грибів: *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma lignorum*, *Aspergillus glaucus*, *Trichothecium roseum*, *Fusarium* sp., *Monilia fructicola*, *Penicillium chrysogenum*, *Chaetonium globosum*, *Aureobasidium pullulans* та *Botrytis allii*. Серед досліджених штамів активність ферменту виявлено у таких видів: *M. fructicola*, *A. pullulans*, *B. allii*, *T. roseum* і *C. globosum*, хоча здатність використовувати креатинін як єдине джерело азоту проявляли тільки два штами – *B. allii* та *C. globosum*. Активність креатиніндеїмінази під час вирощування цих штамів у середовищі з глюкозою та креатиніном як єдиними джерелами вуглецю й азоту була у 2,5 та 1,5 рази вищою, ніж у середовищі з глюкозою та нітратом натрію, відповідно. Отже, штами *B. allii* та *C. globosum* можуть бути використані для виділення й очищення креатиніндеїмінази з метою дослідження субстратної специфічності ферменту і конструювання ензиматичних біосенсорів для аналізу креатиніну.

*Ключові слова:* креатинін, креатиніндеїміназа, цвілеві гриби, скринінг

В останнє десятиліття зростає попит на прості й надійні тести для виявлення важливих метаболітів, які можуть слугувати показниками стану здоров'я. Продукт розпаду креатину – креатинін – є прикладом такого метаболіту.

Креатинін є одним із найбільш значущих біоаналітів у сучасному клінічному аналізі, оскільки його концентрація у крові та сечі є важливим показником, що застосовується для оцінки функції нирок [10, 14], а також характеристики фізіологічного стану спортсменів [4]. Нормальний вміст креатиніну в крові становить: для жінок – 44–97 мкМ, для чоловіків – 62–115 мкМ. За умови функціонування тільки однієї нирки цей показник зростає

до 159–168 мкМ. Підвищена понад норму концентрація креатиніну в сироватці крові (для дітей – понад 177 мкМ, для дорослих – понад 885 мкМ) свідчить про серйозну ниркову недостатність. Гіперкреатинінемія може бути пов'язана з хронічними або гострими нирковими захворюваннями й ураженням нирок токсичними чинниками, зокрема, медикаментами (рентгеноконтрастні засоби, аміноглікозиди, цефалоспорини, статини тощо). Також підвищення рівня креатиніну в сироватці крові спостерігають у разі споживання великої кількості м'яса або застосування препаратів креатину спортсменами (крім того, має місце підвищений вміст креатиніну в сечі). Рівень креатиніну зростає також за зневоднення організму та ураження м'язів [3, 4].

Незважаючи на низьку специфічність і чутливість, реакцію із пікриною кислотою (реакція Яффе) широко використовують у медичній практиці для оцінки вмісту креатиніну в плазмі (сироватці) крові та визначення швидкості клубочкової фільтрації – інтегрального показника видільної функції нирок. Для аналізу вмісту креатиніну запропоновано різні хімічні та фізико-хімічні методи [2, 9]: рідинна хроматографія високого тиску, хроматографія з використанням флуоресцентних індикаторів, іонна хроматографія, міцелярна електрокінетична хроматографія і тандемна мас-спектрометрія. Однак усі ці методи є дуже витратними, потребують складної підготовки проб, дорогих реактивів, висококваліфікованого персоналу і непридатні для вимірювання вмісту креатиніну в режимі реального часу, наприклад, під час контролю процесу тренувань спортсменів. Тому є потреба у простих, неінвазивних методах аналізу цього метаболіту в біологічних рідинах, в т. ч. у поті та слині [3, 10]. Одним із таких підходів може бути використання ферменту креатиніндемінази, що гідролізує креатинін до метилгідантоїну й аміаку. Креатиніндеміназа (КДІ) (КФ 3.5.4.21) належить до родини гідролаз і здійснює гідроліз циклічних амідів. У різних мікроорганізмів КДІ беруть участь у метаболізмі цитозину та креатиніну [15]. Одним із добре вивчених представників цієї родини є КДІ, виділена з *Corynebacterium lilium*. Молекулярна маса ферменту становить 195 кДа. Він є специфічним до креатиніну і нездатний гідролізувати креатин, сечовину, цитозин чи гуанін, зберігає стабільність при 5 °С у 0,02 М фосфатному буфері, рН 7,0 упродовж тижня [6, 12, 13]. Оскільки продуктивність синтезу КДІ у вказаних бактерій є невисокою – як для клітин дикого типу, так і для рекомбінантного штаму, що містить експресійну касету з геном ферменту [15], пошук інших мікроорганізмів із високою активністю КДІ є актуальним завданням. Перспективними об'єктами для такого пошуку є штами грибів, які здатні засвоювати різноманітні азотовмісні органічні сполуки (наприклад, креатинін). Метою даної роботи було дослідити креатиніндеміназну активність наявних штамів цвілевих грибів.

#### Матеріали та методи

У роботі використовували такі штами мікроорганізмів: *Aspergillus oryzae* Г-1-А, *Trichoderma lignorum* Г-3-Тр., *Aspergillus glaucus* ХС9, *Trichothecium roseum* Г-18-Тр., *Fusarium Sp* F31 (люб'язно надані з колекцій культур мікроорганізмів ЛНУ ім. І. Франка), *Monilinia fructicola* RU22, *Penicillium chrysogenum* BW 1890, *Chaetonium globosum* F0142, *Aureobasidium pullulans* AP-3 (Жешівського університету, Польща) та *Botrytis allii* 100(5) (з колекцій культур мікроорганізмів Інституту біології клітини НАН України).

Мікроорганізми вирощували в мінеральному середовищі такого складу (г/л):  $\text{KNO}_3$  – 2,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2;  $\text{NaCl}$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5; дріжджовий екстракт – 0,2, глюкоза – 10,0; мікроелементи у кінцевій концентрації: 0,2 мкМ  $\text{CuSO}_4$ ; 4,5 мкМ  $\text{MnSO}_4$ ; 2,0 мкМ  $\text{NaMoO}_4$ ; 0,75 мкМ  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 17,5 мкМ  $\text{ZnSO}_4$ . Культури зберігали на агаризованому (20 г/л) середови-

щі аналогічного складу. У низці експериментів замість нітрату натрію середовище містило креатинін у концентрації 2,5 г/л.

Мікроорганізми вирощували аеробно за температури 28 °С у колбах об'ємом 500 мл (по 100 мл середовища) на орбітальному шейкері за 200 об./хв упродовж 3 діб.

Міцелій відділяли від середовища фільтруванням, промивали послідовно водою та 50 мМ фосфатним буфером (рН 7,0) і використовували для отримання безклітинних екстрактів.

Безклітинні екстракти отримували розтиранням міцелію з кварцовим піском на холоді. Незруйнований міцелій і клітини відділяли центрифугуванням за 6000 g 15 хв і 5 °С.

Визначення активності КДІ проводили у 50 мМ К,Na-фосфатному буфері, рН 7,5 (ФБ), який містив 5 мМ креатинін. Реакцію запускали внесенням досліджуваного препарату безклітинного екстракту й інкубували реакційну суміш (об'ємом 0,5–1,0 мл) упродовж 15–30 хв за 37 °С. До проб додавали 2,0 мл 15 мМ розчину *o*-ортофталевого альдегіду (ОФА), що містить 0,16 мМ сульфід натрію; суміш прогрівали за 60 °С упродовж 15 хв. Інтенсивність забарвлення продукту реакції аміаку з ОФА (жовтий колір) характеризувала активність КДІ [8].

Для кількісного визначення активності КДІ реєстрували оптичну густину проб (за довжини хвилі 360 нм) або інтенсивність флуоресценції (за довжини хвилі емісії 415 нм та хвилі збудження 360 нм) кінцевого продукту реакції щодо контрольної проби (реакційна суміш без додавання ферменту). Визначення оптичної густини проб проводили за допомогою спектрофотометра SHIMADZU UV-1650 PC із використанням стандартного програмного забезпечення "UVProbe 2.20". Інтенсивність флуоресценції визначали за допомогою флуориметра «TECAN Infinite M-200».

За одиницю активності КДІ приймали кількість ферменту, яка забезпечує утворення 1 мкмоль продукту (амонію) за 1 хв за описаних вище умов.

Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програмні пакети Microsoft Excel та Origin. Обчислювали основні статистичні показники за безпосередніми даними (середнє арифметичне –  $M$ ; стандартна похибка середнього арифметичного –  $m$ ). Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками трьох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента [1]. Достовірною вважалася різниця за показника достовірності  $P > 0,95$ .

### Результати і їхнє обговорення

КДІ каталізує розщеплення креатиніну до метилгдантоїну й амонію. Обидва продукти реакції утворюються в еквімолярній кількості, яка відповідає кількості розкладеного креатиніну. Принципова схема реакцій, що лягли в основу запропонованого нами методу визначення активності КДІ, представлена на рис. 1. На першій, ензиматичній, стадії реакції за участю КДІ відбувається гідроліз креатиніну до *N*-метилгдантоїну й амонію. Утворений амоній реагує з ОФА (друга стадія реакції, хімічна) з утворенням 2*H*-ізоіндол-1-тіолу, який кількісно оцінюють спектрофотометрично або флуориметрично.

Коефіцієнт молярної екстинкції ( $\epsilon_m$ ) 2*H*-ізоіндол-1-тіолу ( $(7,0 \pm 0,15) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) забезпечує достатню для рутинного аналізу чутливість визначення активності КДІ.

Як видно з рис. 2, амоній утворює забарвлений продукт (2*H*-ізоіндол-1-тіол) у реакції із ОФА за наявності сульфід натрію. Після інкубації за 37 °С упродовж 30 хв інтенсивність кольору проб корелювала з концентрацією амонію.

У разі потреби чутливість запропонованого методу визначення активності КДІ можна значно збільшити (у  $\approx 30$  разів) за рахунок визначення флуоресценції проб, а не оптичної густини (рис. 3).

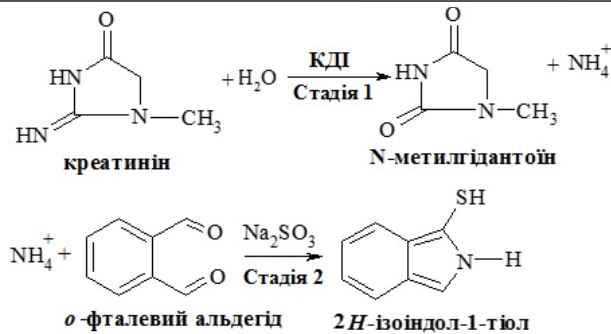


Рис. 1. Схема реакцій визначення активності КДІ

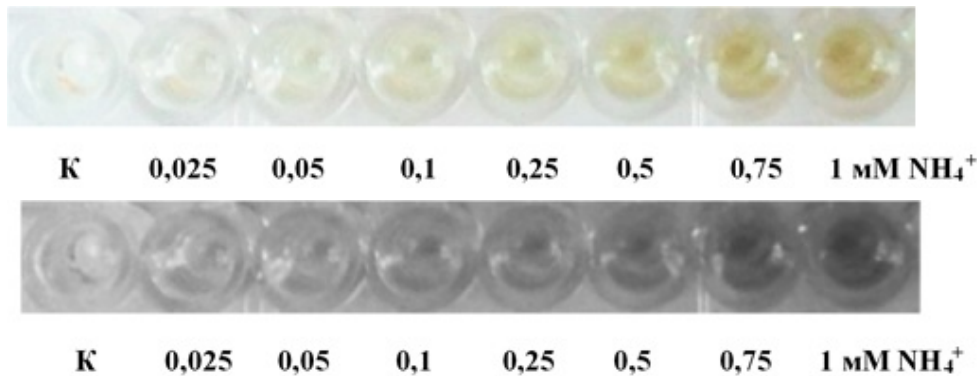


Рис. 2. Утворення 2H-ізоіндол-1-тіолу за взаємодії амонію з ОФА у присутності сульфїту натрію

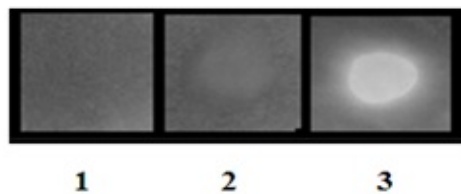


Рис. 3. Флуоресценція 2H-ізоіндол-1-тіолу за ультрафіолетового опромінення. На фільтрувальний папір, змочений 15 мМ розчином ОФА, що містив 0,16 мМ сульфїт натрію, наносили по 0,01 мл проб та інкубували у термостаті за 60 °С упродовж 15 хв: 1 – без амонію; 2 – 0,01 М хлорид амонію; 3 – 0,1 М хлорид амонію.

Використовуючи запропонований підхід, проведено тестування 10 видів грибів на здатність до синтезу КДІ. Для цього міцелій грибів вирощували в мінімальному середовищі з глюкозою та нітратом натрію як єдиними джерелами вуглецю й азоту, відповідно. Якісний аналіз активності КДІ у безклітинних екстрактах, отриманих із досліджуваних штамів, проводили у планшеті. Для цього у лунки вносили послідовно 0,1 мл ФБ, що містив 5 мМ креатинін і 0,025 мл безклітинного екстракту (приблизно 0,2 мг білка) й інкубували за 37 °С упродовж 30 хв. Після цього додавали 0,2 мл 15 мМ розчину ОФА, що містив 0,16 мМ сульфїт натрію та інкубували суміш за 37 °С упродовж 30 хв. Як видно із рис. 4, появу жовтого забарвлення, яке свідчить про утворення 2H-ізоіндол-1-тіолу із амонію, вивільненого при гідролізі креатиніну, спостерігали тільки для 5-ти із 10 досліджених видів: *M. fructicola*, *A. pullulans*, *B. allii*, *T. roseum*, *Ch. globosum*. У пробах без креатиніну забарвлення не розвивалося (дані не наведено).

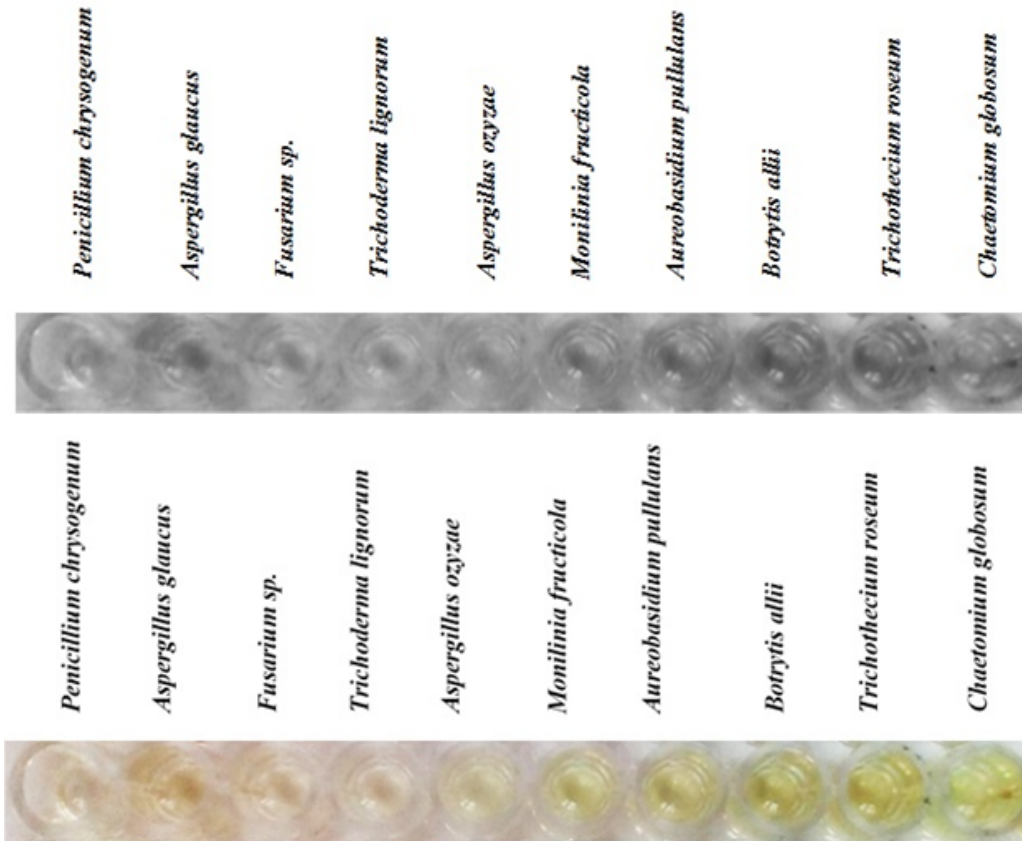


Рис. 4. Якісний аналіз активності КДІ у безклітинних екстрактах досліджуваних штамів грибів

На наступному етапі роботи для визначення активності КДІ було застосовано флуоресцентний метод. Виявилось, що у *M. fructicola*, *A. pullulans*, *B. allii*, *T. roseum* та *C. globosum* активність КДІ становила 0,06–0,15 од/мг (рис. 5), а це співрозмірно з результатами, отриманими під час дослідження бактерій (див. таблицю). У решти штамів активність КДІ була на межі чутливості методу.

#### Активність і субстратна специфічність КДІ деяких видів мікроорганізмів

Мікроорганізми	Субстратна специфічність	Питома активність безклітинних екстрактів, [Од./мг]	Літературні посилання
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Креатинін	0,014	[11, 12]
<i>Flavobacterium filamentosum</i>	Креатинін, цитозин	0,142	[5]
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Креатинін, цитозин	0,0112	[7]
<i>Pseudomonas putida 77</i>	Креатинін, цитозин	0,0729	[7]
<i>Proteus mirabilis</i>	Креатинін	0,0051	[7]

Тільки два із усіх досліджених штамів (*B. allii* та *C. globosum*,) виявилися здатними до утилізації креатиніну як джерела азоту. У безклітинних екстрактах *B. allii* та *C. globosum*, вирощених у середовищі з креатиніном як єдиним джерелом азоту, активність КДІ була відповідно у 2,5 та 1,5 разу вищою, ніж за вирощування у середовищі з глюкозою та нітратом натрію (рис. 6).

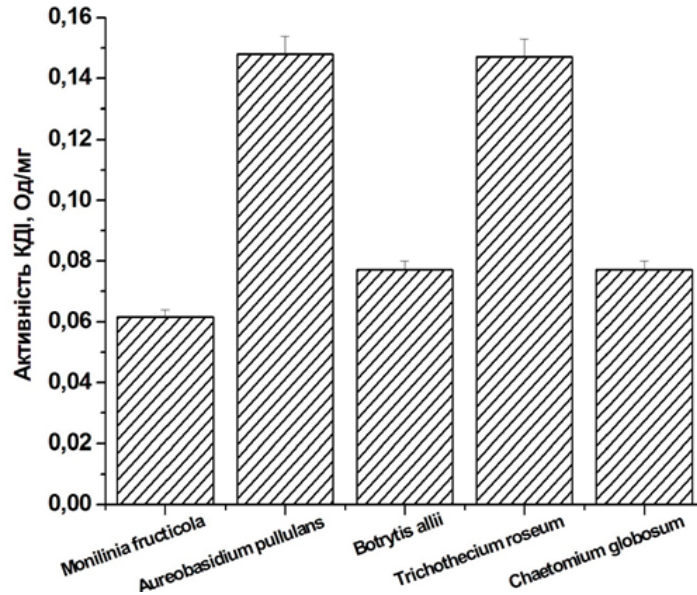


Рис. 5. Активність КДІ у безклітинних екстрактах досліджуваних штамів грибів

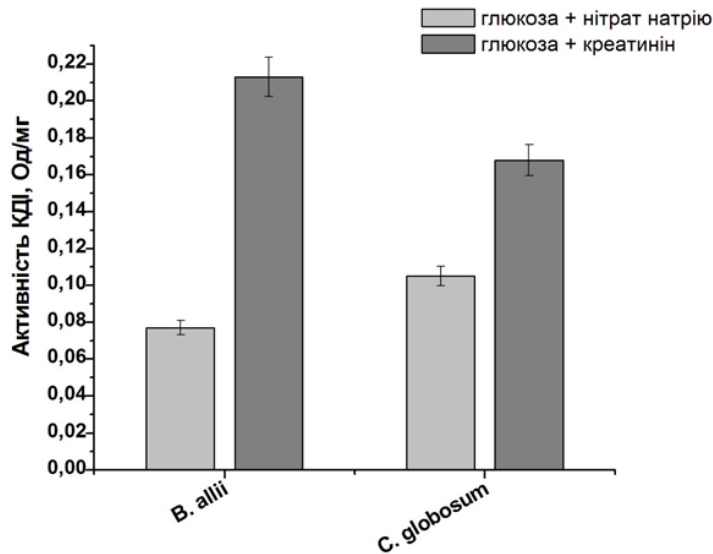


Рис. 6. Активність КДІ в безклітинних екстрактах грибів *B. allii* та *C. globosum*, вирощених у середовищі з глюкозою та креатиніном, а також із глюкозою та нітратом натрію як єдиними джерелами Карбону і Нітрогену

Усі досліджувані штами грибів аналізували на здатність секретувати КДІ в культуральне середовище. Однак жоден із перевірених штамів не виявляв позаклітинної активності КДІ (дані не наведено).

КДІ виділено й охарактеризовано для деяких видів бактерій і грибів (див. таблицю). Ферменти *P. putida*, *P. chlororaphis*, *E. coli*, *P. mirabilis* та *F. filamentosum* виявляють також цитозиндеаміназну активність [5, 7]. КДІ *C. glutamicum* ATCC 15990 [11] і анаеробних бак-

терій *Clostridium* sp. виявляє строгу субстратну специфічність і не каталізує дезамінування цитозину, тоді як відповідні ферменти *P. ovalis*, *Alcaligenes denitrificans* і *Arthrobacter* не здатні використовувати креатинін як субстрат [14]. Нами проведено скринінг штамів мікроорганізмів і виявлено креатиніндеїміназну активність у *M. fructicola*, *A. pullulans*, *B. allii*, *T. rosea* та *C. globosum*. *B. allii* та *C. globosum* мали вищу активність ферменту порівняно з іншими штамми. Додаткове зростання креатиніндеїміназної активності у *B. allii* та *C. globosum*, відповідно, у 2,5 та 1,5 разу виявлено за вирощування культур у середовищі, яке містило креатинін як єдине джерело азоту. Обидва штами можуть бути потенційними продуцентами КДІ за умови, що ферменти цих грибів виявляють строгу субстратну специфічність стосовно креатиніну. Отже, актуальним є дослідження цього питання, що передбачає отримання високоочищених препаратів КДІ із *B. allii* та *C. globosum*.

Робота виконана за підтримки МОН України в рамках програми «Наука в університетах» (проект 0118U000809) та НАН України в рамках науково-технічної програми «Смарт-сенсорні пристрої нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (проект № 13).

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гумецький Р. Я., Паляниця Б. М. Математичні методи в біології: теоретичні відомості, програмований практикум, комп'ютерні тести: навч. посіб. Львів: Видавничий центр ЛНУ ім. І. Франка, 2004. 112 с.
2. Марченко С. В., Зінченко О. А. Біосенсор на основі креатиніндеїмінази та рН-чутливого польового транзистора для аналізу креатиніну в сироватці крові // *Biotechnologia Acta*. 2013. Т. 6. № 5. С. 79–86.
3. Назаренко О. А., Сергеева Т. А., Солдаткін О. П. Креатинін та методи його визначення // *Біотехнологія*. 2009. Т. 2. № 1. С. 107–116.
4. Vanfi G. Serum creatinine concentrations in athletes: are they normal? // *Brazilian Journal of Biomotricity*. 2010. Vol. 4. N 3. P. 157–164.
5. Esders T. W., Lynn S. Y. Purification and properties of creatinine iminohydrolase from *Flavobacterium filamentosum* // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. N 7. P. 3915–3922.
6. Hermann M., Knerr H. J., Mai N. et al. Creatinine and N-methylhydantoin degradation in two newly isolated *Clostridium* species // *Arch. Microbiol.* 1992. Vol. 157. N 5. P. 395–401.
7. Kim J. M., Shimizu S., Yamada H. Cytosine deaminase that hydrolyzes creatinine to N-methylhydantoin in various cytosine deaminase-forming microorganisms // *Arch. Microbiol.* 1987. Vol. 147. P. 58–63.
8. Kuo C. T., Wang P. Y., Wu C. H. Fluorometric determination of ammonium ion by ion chromatography using postcolumn derivatization with *o*-phthalaldehyde // *J. Chromatogr. A*. 2005. Vol. 1085. N 1. P. 91–97.
9. Narayanan Sh., Appleton H. O. Creatinine: A Review // *Clin. Chem.* 1980. Vol. 26. N 8. P. 1119–1126.
10. Sant W., Pourciel-Gouzy M. L., Launay J. et al. Development of a creatinine-sensitive sensor for medical analysis // *Sens. Actuator B-Chem.* 2004. Vol. 103. P. 260–264.
11. Uwajima T., Terada O. Properties of crystalline creatinine deiminase from *Corynebacterium lilium* // *Agric. Biol. Chem.* 1980. Vol. 44. N 8. P. 1787–1792.
12. Uwajima T., Terada O. Crystallization and some properties of creatinine deiminase from *Corynebacterium lilium* // *Agric. Biol. Chem.* 1976. Vol. 40. P. 1055–1056.
13. Uwajima T., Terada O. Production, purification and crystallization of creatinine deaminase of *Corynebacterium lilium* // *Agric. Biol. Chem.* 1977. Vol. 41. P. 339–344.

14. Wyss M., Kaddurah-Daouk R. Creatine and Creatinine Metabolism // *Physiological Reviews*. 2000. Vol. 80. N 3. P. 1107–1213.
15. Zakalskiy A. E., Stasyuk N. E., Gonchar M. V. Creatinine deiminase: characterization, using in enzymatic creatinine assay, and production of the enzyme // *Curr. Protein Pept. Sci*. 2019. Vol. 20. N 5. P. 465–470.

Стаття надійшла до редакції 04.09.19

доопрацьована 14.11.19

прийнята до друку 27.11.19

### SCREENING MOLD STRAINS FOR AN ABILITY TO SYNTHESIZE CREATININE DEIMINASE

O. Demkiv<sup>1</sup>, N. Stasyuk<sup>1</sup>, A. Zakalskiy<sup>1,2</sup>, O. Zakalska<sup>1</sup>, T. Prokopiv<sup>1,2</sup>,  
Y. Boretsky<sup>2</sup>, M. Gonchar<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine  
14/16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

<sup>2</sup>*Ivan Bobersky Lviv State University of Physical Culture  
11, Kostyushko St., Lviv 79000, Ukraine*

<sup>3</sup>*Drohobych Ivan Franko State Pedagogical University  
24, Ivan Franko St., Drohobych 82100, Ukraine  
e-mail: demkiv@yahoo.com*

Determination of creatinine concentration in biological fluids is becoming increasingly relevant as a clinical test. Various chemical and physico-chemical methods have been proposed to determine creatinine concentration in biological samples, including various modifications of the well-known Jaffe color reaction, although it has several drawbacks, namely, a low specificity and sensitivity to positive and negative interference from related substances. In addition, the available methods are time consuming, require a complicated sample preparation procedure, expensive reagents, highly qualified personnel and, most importantly, do not allow real-time analysis. Therefore, increasing attention has been paid to enzymatic methods for the determination of creatinine, particularly, using microbial creatinine deiminase. In this regard, the search for new microorganisms – effective producers of specific creatinine deiminases – is an actual task for microbial enzymology and analytical biotechnology. We have analyzed creatinine deiminase activity for 10 strains of different molds: *Botrytis aclada*, *Botrytis allii* 100(5), *Monilinia fructicola*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Totula* sp., *Stachybotris chartarum*, *Pichiapini*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma lignorum*, *Aspergillus glaucus*, *Trichothecium roseum*, *Aureobasidium pullulans*. Among the strains tested, the enzyme activity was detected in the following species: *M. fructicola*, *A. pullulans*, *B. allii*, *T. roseum*, and *C. globosum*, although only two fungi, *B. allii* and *C. globosum*, were able to use creatinine as the sole nitrogen source. Creatinine deiminase activity in cell free extracts of *B. allii* and *C. globosum*, grown in glucose medium supplemented with creatinine (as the sole carbon and nitrogen source, respectively) was 2.5 and 1.5 times higher, related to that for the strains grown in glucose-sodium nitrate medium. Therefore, the fungi *B. allii* and *C. globosum* can be used for isolation of creatinine deiminase to be used in construction of biosensors selective to creatinine.

*Keywords:* creatinine, creatinine deiminase, molds, screening