СОДЕРЖАНИЕ

-

Том 58, номер 4, 2022

Участие пролина в адаптации растений к действию стресс-факторов и его использование в агробиотехнологии (обзор)	
И. А. Тарчевский, А. М. Егорова	315
Оценка эффективности функционального обращения β-окисления жирных кислот в <i>Escherichia coli</i> при действии различных нативных ацил-КоА дегидрогеназ	
А. Ю. Гулевич, А. Ю. Скороходова, В. Г. Дебабов	330
Аллельный полиморфизм генов факторов патогенности возбудителя сибирской язвы как метод оценки микробиологических рисков при изменении климата	
Ю. О. Гончарова, А. Г. Богун, И. В. Бахтеева, Г. М. Титарева, Р. И. Миронова, Т. Б. Кравченко, Н. А. Остарков, А. В. Брушков, В. С. Тимофеев, С. Г. Игнатов	338
Роль антигенов Yersinia pestis в адгезии к макрофагам J774, оцененная методом оптической ловушки	
И. В. Конышев, С. А. Иванов, П. Х. Копылов, А. П. Анисимов, С. В. Дентовская, А. А. Бывалов	352
Малые PHK Mcr11 и DrrS Mycobacterium tuberculosis как возможные регуляторы метаболизма глицерина	
А. А. Острик, А. С. Григоров, И. В. Бочарова, А. С. Капрельянц, Т. Л. Ажикина, Е. Г. Салина	360
Новый ферментный препарат, содержащий полисахаридмонооксигеназу и β-глюкозидазу — синергетические добавки к целлюлазам	
М. В. Семенова, А. В. Гусаков, В. Д. Телицин, В. Ю. Матыс, Т. В. Бубнова, В. А. Немашкалов, А. М. Рожкова, А. П. Синицын	366
Выделение, очистка и идентификация секретируемого соединения Pantoea brenneri AS3, обладающего фунгицидной активностью	
Д. Л. Иткина, А. Д. Сулейманова, М. Р. Шарипова	374
Сравнительное выщелачивание медно-никелевых концентратов и металлургического шлака биогенным раствором трехвалентного железа	
Н. В. Фомченко, А. Е. Панюшкина, В. С. Меламуд, М. И. Муравьёв	382
Бактериальная целлюлоза как матрица для микроорганизмов в биоэлектрокаталитических системах	
С. Е. Тарасов, Ю. В. Плеханова, А. Е. Китова, А. Г. Быков, А. В. Мачулин, В. В. Колесов, Н. А. Кленова, В. В. Ревин, О. Н. Понаморева, А. Н. Решетилов	388
Изменения в протеоме мышечной ткани птицы при включении в рацион различных белковых добавок	
Д. Ю. Исмаилова, О. С. Савинова, Т. В. Фёдорова, Д. В. Васина, В. Г. Волик, В. С. Лукашенко, И. П. Салеева	400
Влияние хитозана в составе биологически активной подкормки "БиХит" на хозяйственно полезные признаки пчел	
А. И. Албулов, М. А. Фролова, В. П. Варламов, Э. И. Ковалева, А. К. Елисеев	414

CONTENTS

_

_

Vol. 58, No. 4, 2022

1

Participation of Proline in Plant Adaptation to Stress Factors and Its Application in the Agrobiotechnology	
I. A. Tarchevsky and A. M. Egorova	315
Evaluation of the Efficiency of Functional Reversal of the Fatty Acid β-Oxidation in <i>Escherichia coli</i> upon the Action of Various Native Acyl-CoA Dehydrogenases <i>A. Yu. Gulevich, A. Yu. Skorokhodova, and V. G. Debabov</i>	330
Allelic Polymorphism of Genes of Pathogenicity Factors of the Anthrax Causative Agent as a Method for Assessing Microbiological Risks during Climate Change	
Y. O. Goncharova, A. G. Bogun, I. V. Bahtejeva, G. M. Titareva, R. I. Mironova, T. B. Kravchenko, N. A. Ostarkov, A. V. Brushkov, V. S. Timofeev, and S. G. Ignatov	338
The Role of Yersinia Pestis Antigens in Adhesion to J774 Macrophages: an Optical Trapping Study	
I. V. Konyshev, S. A. Ivanov, P. H. Kopylov, A. P. Anisimov, S. V. Dentovskaya, and A. A. Byvalov	352
Small RNAS Mcr11 and DrrS of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> as Possible Regulators of Glycerol Metabolism	
A. A. Ostrik, A. S. Grigorov, I. V. Bocharova, A. S. Kaprelyants, T. L. Azhikina, and E. G. Salina	360
A New Enzyme Preparation Containing Polysaccharide Monooxygenase and β -Glucosidase – Synergistic Additives to Cellulases	
M. V. Semenova, A. V. Gusakov, V. D. Telitsin, V. Y. Matys, T. V. Bubnova, V. A. Nemashkalov, A. M. Rozhkova, and A. P. Sinitsyn	366
Isolation, Purification and Identification of the Secrete Compound <i>Pantoea brenneri</i> AS3 with Fungicidal Activity	
D. L. Itkina, A. D. Suleimanova, and M. R. Sharipova	374
Comparison of Leaching of Copper-Nickel Concentrates and Metallurgical Slag with Biogenic Ferric Iron	
N. V. Fomchenko, A. E. Panyushkina, V. S. Melamud, and M. I. Muravyov	382
Bacterial Cellulose as a Matrix for Microorganisms in Bioelectrocatalytic Systems	
S. E. Tarasov, Yu. V. Plekhanova, A. E. Kitova, A. G. Bykov, A. V. Machulin, V. V. Kolesov, N. A. Klenova, V. V. Revin, O. N. Ponamoreva, and A. N. Reshetilov	388
Changes in the Bird Muscle Tissue Proteome When Including Various Protein Supplements in the Diet	
D. Yu. Ismailova, O. S. Savinova, T. V. Fedorova, D. V. Vasina, V. G. Volik, V. S. Lukashenko, and I. P. Saleeva	400
Effect of Chitosan as Part of Biologically Active Feeding "BiHit" on Economically Useful Features of Bees	
A. I. Albulov, M. A. Frolova, V. P. Varlamov, E. I. Kovaleva, and A. K. Eliseev	414

УДК 577.112.388.2

УЧАСТИЕ ПРОЛИНА В АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ К ДЕЙСТВИЮ СТРЕСС-ФАКТОРОВ И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В АГРОБИОТЕХНОЛОГИИ (ОБЗОР)

© 2022 г. И. А. Тарчевский^{1,} *, А. М. Егорова¹

¹Казанский институт биохимии и биофизики Федеральный исследовательский центр Казанский научный центр РАН, Казань, 420111 Россия *e-mail: tarchevsky@kibb.knc.ru Поступила в редакцию 12.10.2021 г. После доработки 15.12.2021 г. Принята к публикации 28.02.2022 г.

Статья посвящена роли иминокислоты пролина в защите растений от действия абиотических и биотических стрессоров. Содержание пролина в клетках зависит от реакций его синтеза, деградации, экспорта в другие клетки, синтеза белков, обогащенных пролином, а также освобождения из них с помощью пролин-иминопептидаз. Возможность использования пролина в агробиотехнологии для повышения устойчивости растений иллюстрируется примерами их обработки растворами пролина и создания генетически модифицированных растений с повышенным содержанием пролина и обогащенных пролином белков.

Ключевые слова: пролин, защита растений, устойчивость, фитоиммунитет, агробиотехнология **DOI:** 10.31857/S055510992204016X

Большие потери урожаев в результате воздействия биотических и абиотических стресс-факторов заставляют проводить поиск новых и совершенствование уже используемых способов предотвращения ущерба, в том числе с использованием таких природных защитных соединений, как иминокислота пролин.

Содержание свободного пролина в клетках растений контролируется многими процессами пролинового метаболизма: синтезом и деградацией пролина, транспортом в другие клетки, ткани и органы, использованием для синтеза "обычных" белков и белков, обогащенных пролином, освобождением пролина при протеолизе "обычных" белков тривиальными протеазами и обогащенных пролином белков — специфическими пролин-иминопептидазами.

В предлагаемом обзоре эти процессы будут вкратце охарактеризованы для понимания того, почему на их изменение направлен ряд приемов агробиотехнологии.

Сильное повышение содержания пролина под влиянием обезвоживания было обнаружено более 60 лет тому назад у райграса [1] и под влиянием почвенной засухи — в листьях, стеблях и колосьях пшеницы [2]. В обеих работах считали пролиновый эффект способом адаптации тканей к обезвоживанию вследствие высокой осмофильности пролина, но авторы диаметрально противоположным образом объясняли причину его накопления. Первые [1] предположили, что это происходит за счет усиления его синтеза, а второй [2] — за счет деградации белков. В дальнейшем многими авторами было доказано, что причинами накопления пролина при действии неблагоприятных факторов могут быть как его синтез, так и освобождение из белков.

Было обнаружено, что повышение содержания пролина происходит при действии не только обезвоживания и засухи у рапса [3] и у пшеницы [4], но и засоления у рапса [5], повышенной температуры у растений табака [6] и пониженной температуры у табака [7], у озимого рыжика [8], ржи [9], тяжелых металлов у красавки [10], у кукурузы [11], фосфатного голодания, ультрафиолета и др. (рис. 1).

Пролиновый "взрыв" стали считать одним из наиболее важных защитных механизмов, а сам пролин — уникальным защитным соединением [12–15]. Была детально описана совокупность не свойственных для других аминокислот защитных свойств пролина, которые были охарактеризованы в работах с использованием отличающихся стрессоров, видов растений (в том числе генетически модифицированных) и методов исследования (транскриптомного и протеомного анализа и др.).



Рис. 1. Влияние различных факторов среды на содержание пролина в растениях.

Повышение устойчивости растений обуславливается следующими свойствами пролина.

1. В качестве сильного осмолитика он способен повышать осмотическое давление в клетках [16].

2. Пролин предотвращает окислительный стресс. Общепринято, что одним из ранних ответов растений на действие абиогенных и биогенных стрессоров является окислительный стресс – повышение содержания активных форм кислорода (**АФК**) [17, 18]. Структура молекулы пролина позволяет ему непосредственно взаимодействовать с некоторыми видами АФК, нейтрализуя их, снижать их содержание, а также предотвращать окислительный стресс, повышая активность антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, каталазы, аскорбат-пероксидазы [18–23].

3. Пролин выступает в роли хелатора металлов, образуя с ними нетоксические металл-пролиновые комплексы.

4. Подобно белковым шаперонам (HSPs), пролин способен предотвращать денатурацию и агрегацию белков, вызываемую стрессорами, что приводит к стабилизации клеточных структур при стрессе. При взаимодействии с антиоксидантными ферментами он предохраняет их от денатурации [24, 25]. Это свойство пролина было продемонстрировано в опытах и с другими белками [26, 27]. Кроме того, пролин способен также оказывать и непрямое защитное действие на структуру белков, контролируя активность самих шаперонов [20].

5. Пролин является протеиногенной иминокислотой, участвует в синтезе белков и в месте своего нахождения вызывает "излом" их структуры. Находясь внутри альфа-спиральных и бета-ленточных фрагментов белков, обеспечивает жесткость и стабильность их структуры в области изломов. Считается, что это защищает белки от неспецифической протеолитической деградации [28].

Участие пролина в синтезе обогащенных пролином белков клеточных стенок обеспечивает их барьерную функцию при защите от неблагоприятных климатических факторов и от патогенов. 6. Пролин проявляет сигнальные свойства, активируя экспрессию генов, кодирующих ферменты, от которых зависит защита растений от действия стрессоров. Например, он способен индуцировать экспрессию генов антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, аскорбатпероксидазы, каталазы и др.) [18].

Сигнальная активация накопления пролина. Активация реакций накопления пролина вызвана восприятием абиотических стрессоров сенсорами [9], а биотических – рецепторами, которые "включают" сигнальные потоки с участием стрессовых фитогормонов [29], таких, как абсцизовая кислота [30, 31], брассиностероиды [32], салициловая кислота [33, 34], жасмоновая кислота [35], а также таких медиаторов, как NO [36] и Ca²⁺ [37].

Эти гормоны и медиаторы активируют представителей ряда семейств транскрипционных факторов (bZIP, MYB, MYC и др.) [38, 39], которые вызывают экспрессию генов, в том числе имеющих отношение к изменению пролинового метаболизма, например, к синтезу ферментов, участвующих в изменении его содержания [40, 41].

Было показано, что абсцизовая кислота (**АБК**) способна оказывать влияние на индукцию ферментов, катализирующих синтез пролина [30].

В зависимости от объекта исследований и условий проведения опытов АБК или повышала [42], или снижала содержание пролина. Последовательность событий, обеспечивающих положительное влияние АБК на содержание пролина, можно представить следующим образом. Повышение уровня АБК в клетках приводит к ее взаимодействию с присутствующими в различных компартментах клеток тремя видами белков-рецепторов: PYR, PYL и RCAR [43]. Активированные формы рецепторов "включают" сигнальную последовательность: рецепторы — протеинфосфатазы РР2С — протеинкиназы SnRK2 \rightarrow факторы транскрипции bZIP, МҮВ, МҮС [44, 45] → активация экспрессии АБК-зависимых генов — образование защитных белков, а также ферментов, катализирующих синтез пролина [42]. Мутанты, дефектные в синтезе



Рис. 2. Упрощенная схема синтеза и деградации пролина (на основе [22] с модификациями). P5CS – пирролин-5-карбоксилат синтаза; P5CR – пирролин-5-карбоксилат редуктаза; P2CR – пирролин-2-карбоксилат редуктаза; ProDH – пролиндегидрогеназа; P5CDH – пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназа; δ-OAT – орнитин – δ-аминотрансфераза.

АБК, как было показано, были более чувствительны к действию стрессоров [46], возможно, в связи с неспособностью вызывать повышение содержания пролина.

В защите от абиотических стрессоров участвуют брассиностероиды. Обработка ими растений рапса [5] и сои [47] приводила к повышению содержания пролина и солеустойчивости, а растений пшеницы — к повышению содержания пролина и устойчивости к обезвоживанию [4].

Давно известно, что салициловая кислота (**СК**) участвует в защите растений от стрессоров. Обработка растений СК вызывала накопление пролина [29, 33], что связывали с активацией ферментов его синтеза [34, 48], а также с подавлением ферментов его деградации – [34].

Один из эффективных механизмов повышения содержания пролина под влиянием СК был описан в работе [34]. Экзогенная СК вызывала у китайской капусты одновременно как усиление экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза пролина, так и торможение экспрессии гена фермента его деградации.

Было обнаружено, что обработка растений ячменя жасмоновой кислотой (ЖАК) не приводила к повышению содержания пролина [35], возможно, в связи с подавлением салицилатной сигнализации. В то же время, у арабидопсиса ЖАК вызывала накопление пролина. Известно, что в ответе на действие стрессоров могут принимать участие не только фитогормоны, но также NO и кальциевая сигнальные системы. Было установлено значительное повышение содержания пролина как под влиянием NO [49, 50], так и кальция [51].

Синтез пролина. Многие исследователи объясняют повышение содержания пролина при стрессе активацией его синтеза. Основным субстратом синтеза пролина является глутамат, который превращается в пролин с помощью реакций, катализируемых пирролин-5-карбоксилат синтазой (P5CS) и пирролин-5-карбоксилат редуктазой (P5CR). У многих видов растений фермент P5CS кодируется двумя генами P5CS1 и P5CS2, а P5CR – одним геном [52, 53].

Пролин может также синтезироваться из орнитина с помощью орнитин-дельта-аминотрансферазы (**δ-OAT**) с образованием пирролин-5-карбоксилата (**P5C**), который затем превращается в пролин с помощью P5CR. Эти реакции представлены на рис. 2, который не претендует на оригинальность. Многими авторами были предложены отличающиеся степенью детализации схемы синтеза или синтеза и деградации пролина [41, 54, 55].

Установлено, что вклад глутаматного и орнитинового пути в синтез пролина зависит от вида растений и стрессора [56—58]. Например, засуха вызывала накопление пролина у злаковых растений, активируя глутаматный путь, в то время как

у бобовых - орнитиновый путь [59]. Имеются данные о возможной конкуренции между этими путями синтеза пролина, что проявляется при действии на растения стрессоров. Например, засоление индуцировало глутаматный путь и супрессировало орнитиновый у мотыльковой фасоли Vigna aconitifolia [54] и у артишока [60], кадмий – у побегов люцерны [61]. P5CS и P5CR индуцировались абиотическими стрессорами, например, засолением у арабидопсиса [53, 62], опунции [63] и шелковицы [64]. Вызываемая абиотическими стрессорами индукция генов P5CS и P5CR [22, 65, 66] и орнитин-аминотрансферазы [67] явились основанием для подтверждения решающей или важной роли синтеза пролина в его накоплении [14, 41, 68]. Это мнение подтверждалось тем, что у мутантов гена P5CS наблюдались снижение содержания пролина и пониженная устойчивость к действию стрессоров [69].

Патогены также вызывали индукцию экспрессии генов ферментов синтеза пролина и его накопление [70, 71]. Инфицирование арабидопсиса патогеном Pseudomonas syringae индуцировало P5CS2, но не влияло существенно на P5CS1 [70]. Однако в работе [72] авторы приходят к выводу, что у арабидопсиса P5CS2 не вносит вклад в защиту от этого патогена, в отличие от участия в защите от засоления. Распространено мнение, что у арабидопсиса в оптимальных условиях пролин синтезируется главным образом в шитозоле, в то время как при стрессе – в хлоропластах с помощью стресс-индуцируемой P5CS1 [53, 73]. В противоположность этому было установлено, что у арабидопсиса и P5CS1 и P5CS2 локализованы в цитозоле, но не в хлоропластах, причем, и в оптимальных условиях, и при стрессе [72].

Отмеченная выше зависимость путей синтеза пролина от видов растений и стрессоров осложняется и тканевой специфичностью.

Деградация пролина. Процессу деградации пролина, его регуляции и влиянию на него абиотических и биотичесих стрессоров уделяется большое внимание, так как от него зависит содержание свободного пролина.

Деградация пролина осуществляется в митохондриях, где он с помощью двух изоформ пролиндегидрогеназы (ProDH1 и ProDH2) окисляется в пирролин-5-карбоксилат (P5C), а последний с помощью дегидрогеназы (P5CDH) превращается в глутамат (рис. 2). ProDH1 и ProDH2 лимитируют скорость процесса деградации пролина, что было подтверждено в опытах с двойным мутантом *prodh1/prodh2* арабидопсиса, у которого деградация пролина митохондриями была почти полностью прекращена [74]. Было обнаружено, что абиотические стрессоры могут подавлять экспрессию *ProDH*, что приводит к повышению содержания пролина [73, 75] и снижению чувствительности растений к стрессорам [59, 76, 77].

У арабидопсиса был обнаружен индуцируемый засухой и охлаждением митохондриальный белок, способный подавлять активность пролиндегидрогеназы [77]. У мутантного растения проявлялась сверхчувствительность к стрессорам, вызываемая деградацией пролина.

Было установлено, что прекращение действия стрессоров повышало активность ProDH, что усиливало деградацию пролина. Последнее происходило и при обработке растений растворами с повышенными концентрациями пролина. Патогены также могут вызывать изменение активности ProDH и, вследствие этого, содержания пролина, что приводит к изменению восприимчивости к инфицированию [78–81].

Отсутствие экспрессии *ProDH1* и *ProDH2* у мутантов арабидопсиса приводило к активации защиты против бактериального *Pseudomonas syringae* и грибного патогена *Botrytis cinerea* [80].

Транспорт пролина. Считается, что в выживании растений в условиях стресса важную роль играет не только повышение содержания пролина. но и его внутриклеточный и межклеточный транспорт [81]. Наиболее интенсивно пролин синтезируется в листьях, и это может объяснять причину низкого содержания пролина в корнях [2]. В основном транспорт пролина осуществляется из фотосинтезирующих клеток в нефотосинтезирующие, а в случае дальнего транспорта — из листьев в корни. Регуляция транспорта пролина осуществляется с помощью специализированных пролиновых транспортеров (ProT) [65, 82]. У арабидопсиса обнаружено три изоформы ProT [83, 84]. Стресс-факторы усиливали экспрессию генов ProT, например, обезвоживание – у клевера [85] и фасоли [86]. Установлено, что разные виды ProT отвечали на стрессор специфически [84].

О важной роли пролиновых транспортеров свидетельствует факт более ранней индукции ProT у ячменя при солевом стрессе, по сравнению с индукцией фермента синтеза пролина P5CS [87], т.е., потенциально еще до активации повышения содержания пролина создавались условия для его транспорта.

Было показано, что в транспорте пролина через плазмалемму могут участвовать и менее специализированные представители семейств аминокислотных транспортеров [88]: лизин/ гистидиновых, пролин/бетаиновых, полиамин/холиновых и аминокислотно/ауксиновых пермеаз. Считается, что эти транспортеры могут в разной степени участвовать в переносе пролина в различных органах и тканях и в зависимости от условий существования растений [84].

Белки, обогащенные пролином. Основным потребителем пролина у растений являются белки, обогащенные пролином (**БОП**), локализованные, главным образом, в клеточных стенках. Повышение содержания свободного пролина приводило в большинстве случаев к активации синтеза БОП [89].

БОП содержат N-концевые остатки пролина и подразделяются на несколько обширных семейств [90, 91] в зависимости от состава внутренних периодически повторяющихся и содержащих пролин (и гидроксипролин) достаточно консервативных доменов аминокислот, а также присоединяющихся к ним в ходе пост-трансляционной модификации углеводных остатков. К этим семействам относятся гидроксипролин/пролиновые БОП; экстенсины; арабино-галактановые; гибридные, химерные, а также обогащенные глицином и пролином белки.

Гидроксипролин/пролиновые БОП содержат сравнительно небольшие гидроксипролин/пролиновые домены внутри полипептидных цепей. Для остальных семейств БОП характерны значительно более сложные по составу аминокислот домены и специфические углеводные остатки.

В качестве примера последовательности аминокислот в консервативных доменах БОП можно привести некоторые из них: {-Сер-Про-Про-Про-Про-}, {-Про-Про-Вал-Тир-Лиз}, {-Лей-Про-ВалгПро-гПро-Вал-Тре-Вал-гПро-}, {-Гли-Фен-Асп-Гис-Про-Фен-Про-Лей-Про-гПро-гПро-Лей-Глу-Про-гПро-Фен-Лей-Лиз-}, в которых гПро остатки гидроксипролина, часть из которых может гликозилироваться.

Экстенсины содержат до 4 арабинозильных остатков на каждый из гликозилирующихся остатков гидроксипролина в пролин/гидроксипролиновых доменах.

У сверхгликозилированных арабино-галактановых БОП основная углеводная линейная или разветвленная цепь может насчитывать на каждый из гликозилируемых гидроксипролинов от 1 до 20 остатков галактозы, соединенных β -1,6 связями. Для этих БОП характерны и β -1,3-галактозные связи, а также арабинозильные, глюкозильные и др. остатки. К гибридным относят белки, в составе которых имеются домены, относящиеся к различным семействам БОП, например, к экстенсинам и арабино-галактановым.

Химерные белки содержат не только домены, характерные для БОП, но и домены из других, не относящихся к БОП, семейств белков. Например, у химерных белков, построенных из БОП и из липид-переносящих белков, на С-конце содержится характерный для последних домен {-Цис-Х-Цис-Х-Цис-Х-Цис-Х-Цис-Х-Цис-Х-Цис-}.

Привлекает внимание информация об идентификации у растений сорго патоген-индуцируемого относительно небольшого (147 аминокислот) обогащенного пролином и глицином белка, который обладал способностью экспортироваться из клеток и вызывать дисфункцию бактериальных мембран патогенов [92].

Исследованию БОП посвящено много работ с использованиемарабидопсиса ихозяйственно важных видов растений — сои, риса, хлопчатника, гороха, бобов, табака, картофеля, томатов и др. Сделан вывод о видо-, органо- и тканеспецифичности БОП. О многообразии изоформ БОП клеточных стенок можно судить по идентифицированным у арабидопсиса 166 генам БОП: 85 арабиногалактановым, 59 экстенсиновым, 18 гидроксипролин/пролиновым и 4 гибридным (арабиногалактан/экстенсиновым) [93].

"Новорожденные" БОП клеточных стенок содержат транспортные сигнальные пептиды, с помощью которых они выводятся из цитозоля через систему ЭПР/АГ в апопласт. В ЭПР/АГ осуществляется гидроксилирование пролина и гликозилирование части образовавшихся остатков гидроксипролина. Выведенные в клеточную стенку БОП способны взаимодействовать с другими БОП с помощью ковалентных связей между остатками тирозина и с пектинами и гемицеллюлозами с образованием сложной динамичной архитектуры клеточных стенок.

Было обнаружено, что абиотические стрессоры, бактериальные и грибные элиситоры могут влиять на экспрессию генов БОП и в большинстве случаев повышать, но также и снижать содержание представителей различных семейств БОП [94–98]. Выявлено влияние на БОП засухи [96], обезвоживания [99], засоления [100] и охлаждения [100, 101].

На различные виды БОП могут оказывать влияние и биотические стрессоры. Например, инфицирование картофеля вирусом РVУ приводило к тому, что содержание экстенсинов повышалось, но при этом экспрессия одного из видов экстенсинов активировалась, в то время как другого - подавлялась [102]. У трансгенных растений арабидопсиса, сверхэспрессирующих экстенсин, усиливалась устойчивость к Pseudomonas syringae, возможно, связанная с повышением жесткости клеточных стенок [103]. Содержание различных гибридных обогащенных пролином белков клеточных стенок также по-разному изменялось в зависимости от видов растений и действующих на них патогенных микроорганизмов [97, 104-106]. Участие в формировании системного иммунитета против патогенов было характерно и для локализованных в хлоропластах гибридных БОП [107].

При инфицировании растений вирусами происходило повышение содержания обогащенных гидроксипролином гликопротеинов и модификация клеточных стенок в ходе защитного ответа [108].

Считается, что усиление синтеза БОП и изменение их спектра при стрессе приводят к адаптивной модификации структуры клеточных стенок и повышению их устойчивости [38], причем, в большей степени, чем изменение других компонентов клеточных стенок. Зарегистрированы случаи и противоположного влияния стрессоров на экспрессию генов и синтез БОП [96, 101], которое могло повысить содержание свободного пролина и, в связи с этим, устойчивость растений к действию стрессоров.

Видо-, органо- и тканеспецифичность БОП, их различная реакция на виды стрессоров и изменение при этом их взаимодействия с небелковыми компонентами клеточных стенок, не позволяют составить достоверную картину роли изменения спектра БОП в защитной функции клеточных стенок. Имеющаяся информация может считаться лишь началом пути в этом направлении.

Однако в жизнедеятельности растений принимают участие БОП, локализованные не в клеточных стенках, а в ядрах клеток. К ним относится найденный у арабидопсиса обогащенный гидроксипролином белок, который оказывал влияние на участие микроРНК в регуляции экспрессии генов и, в связи с этим, на устойчивость к засолению и охлаждению [109]. Обнаружены также ядерные обогащенные глицином и пролином небольшие (менее 200 остатков аминокислот) белки [110], участвующие в адаптации к изменяющимся условиям существования, но молекулярные механизмы этого эффекта остаются неясными.

Важную роль в устойчивости растений к неблагоприятным факторам играют также причисляемые к гормонам содержащие пролин пептиды, участвующие в клеточной сигнализации [111, 112]. К ним относятся системин и несколько его аналогов, образующиеся из просистемина в ходе посттрансляционной модификации и состоящие из 18–20 аминокислот, содержащих от двух до четырех рядом расположенных остатков гидроксипролина. Обработка системином повышала устойчивость растений к личинкам травоядных насекомых и фитопатогенам [113].

У трансгенных растений томата со сверхэкспресссией просистемина была повышена устойчивость к тле, личинкам хлопковой совки, фитопатогенным грибам [114]. Гликозилирование (арабинозилирование) этих пептидов повышало их активность [112].

Депролинизация белков. Наличие концевого пролина делает БОП клеточных стенок недоступными для большинства "тривиальных" протеаз. В то же время депролинизация БОП может осуществляться пролиниминопептидазами (ПИП) (ЕС 3.4.11.5), обладающими достаточно узкой субстратной специфичностью [52, 53]. Это относится и к экзо-ПИП, отщепляющим концевой остаток пролина от полипептидной цепи обогащенных пролином и оксипролином белков, и к эндо-ПИП, мишенью которых являются обогащенные пролином фрагменты, находящиеся внутри белков [115].

Имеется большой фактический материал, свидетельствующий о возможности усиления под влиянием абиотических и биотических стрессоров экспрессии генов ПИП и, вследствие этого, повышения содержания и активности ПИП у различных видов растений [90, 116–119]. В активации экспрессии ПИП при стрессе принимают участие сигнальные медиаторы, например, NO. Было обнаружено, что обработка корней гороха донором NO – нитропруссидом натрия вызывает повышение содержания ПИП и накопление пролина [36].

Генетически модифицированные растения арабидопсиса с усиленной экспрессией ПИП накапливали больше пролина, по сравнению с контрольными [116, 117], и повышали устойчивость к засухе и засолению, в то время как у растений с нокаутом гена ПИП – снижали содержание пролина [116]. К ферментам деградации БОП относятся и пролилгликозилазы [120], катализирующие удаление остатков сахаров из гликозилированных доменов БОП.

По-видимому, возможно существование в клеточных стенках резервных форм БОП, которые в обычных условиях недоступны для ПИП благодаря экранированию пролина остатками сахаров (подобно резервным гликозилированным формам салициловой кислоты, также содержащимся в клеточных стенках), но при стрессе активируются пролил-гликозилазы, превращающие эти БОП в мишени для ПИП.

Степень специфичности ПИП для БОП клеточных стенок остается неясной вследствие обширного спектра БОП. Этим определяется и практически отсутствие информации о роли ПИП в изменении барьерной функции клеточных стенок при стрессе. Мишенью ПИП являются БОП не только клеточных стенок. В митохондриях и хлоропластах [121] были обнаружены специфические пролин-иминопептидазы (соответственно, РАР2 и РАР1), от активности которых зависела устойчивость к осмотическому стрессу. Делеция в гене РАР2 вызывала повышенную чувствительность к стрессам.

Депролинизация БОП клеточных стенок может осуществляться не только собственными ПИП, но и ферментами, продуцируемыми патогенными бактериями и грибами для разрушения БОП клеточных стенок растений и, вследствие этого, нарушения их защитной функции [122, 123]. Эти ПИП относятся к факторам вирулентности патогенов, что было подтверждено в опытах с мутацией генов пролиниминопептидаз у фитопатогенных бактерий [124, 125].

Результатом действия ПИП микроорганизмов на растения является как модификация клеточных стенок, так и освобождение пролина в окружающую среду. Повышение уровня пролина при стрессе в цитозоле также может привести к его выходу из клеток. Было обнаружено, что накопление пролина при солевом [56, 57] или температурном [56] стрессах приводило к его освобождению в ризосферу растений.

В ризосфере пролин может использоваться микроорганизмами в качестве источника азота, углерода, энергии, для синтеза антимикробных обогащенных гидроксипролином пептидов, для образования циклических антибиотиков, главным образом, почвенными стрептомицетами. Было обнаружено, что микроорганизмы способны непосредственно использовать экзогенный пролин для синтеза антибиотиков [126, 127], обладающих антибактериальными и антигрибными свойствами. Образующиеся антибиотики могут оказывать влияние как на микробных конкурентов, так и на растения. Например, продуцируемый почвенным стрептомицетом Streptomyces griseus антибиотик циклогексимид вызывал усиленное образование фенольных фитоалексинов корнями гороха [128, 129].

Важную роль во взаимоотношениях в ризосфере играют и секретируемые обогащенные пролином арабиногалактановые белки растений [98], способные, например, оптимизировать установление симбиоза корней с микроорганизмами [130].

Механизмы влияния на население ризосферы изменений в пролиновом метаболизме растений остаются еще не изученной и важной для практики областью исследований.

Использование пролина в агробиотехнологии. Имеющиеся сведения о защитной роли пролина привели к разработке методов его использования для повышения устойчивости различных видов растений к неблагоприятным климатическим факторам и болезням, вызываемым патогенными микроорганизмами. К этим методам относятся обработка растений пролином и создание генетически модифицированных растений (ГМР) с повышенным содержанием пролина, а также обогащенных пролином белков. Во многих работах эти методы использовались не только для повышения устойчивости сельскохозяйственных растений, но и для понимания молекулярных механизмов ответа растений на обработку пролином и на повышение уровня эндогенного пролина у ГМР с усиленной или подавленной экспрессией ферментов пролинового метаболизма.

Обработка растений растворами пролина. Одной из важных проблем современного сельского хозяйства является негативное влияние применения химических пестицидов. Это заставляет уделять все большее внимание перспективам использования в агротехнологии природных защитных соединений, например, пролина. Работы в этом направлении началась еще в прошлом веке и их результатам посвящен ряд обзорных статей [34, 130, 131]. Растворами пролина действовали на различные виды растений: рис [132, 133], сорго [134, 135], кукурузу [136–138], пшеницу [130, 139], сахарный тростник [140], сою [141], фасоль [142], бобы [143], томаты [144], огурцы [145], баклажаны [146], табак [147], виноградную лозу [148], арабидопсис [149], горчицу [150] и др.

Использовались различные способы обработки пролином растений — замачивание семян в его растворах [151, 152], опрыскивание надземной части растений [135, 144], действие на корни растворами пролина [131, 153].

Оптимальные концентрации пролина отличались в зависимости от видов растений и условий их произрастания [131]. Они были выше при действии на однодольные растения (у мягкой пшеницы – 6 мМ), чем на двудольные (у чечевицы – 2 мМ) [130]. Высокие концентрации пролина (30, 50, 100 мМ) могут также быть токсичными для растений несмотря на то, что у них имеются механизмы снижения степени токсичности. Например, при обработке растений сорго пролином (30 мМ) наблюдали сочетание снижения активности фермента синтеза пролина – пирролин-5-карбоксилат-синтазы (P5CS) и повышение активности фермента его деградации – пролиндегидрогеназы ProDH [135]. Это явление наблюдалось также у эурии [154], кукурузы [138] и пшеницы [139]. Обработка растений растворами пролина приводила к повышению устойчивости к неблагоприятным условиям: к обезвоживанию [143, 155, 134], засолению [136, 140, 156], тяжелым металлам [157, 158] и др.

Экзогенный глутамат – субстрат синтеза пролина, вызывал у рапса снижение неблагоприятного действия засухи [3].

Более эффективной, чем только пролином, была обработка растений последовательностью аскорбат-пролин-глутатион, что проявлялось в усилении антиоксидантной защиты и повышении устойчивости кукурузы к солевому стрессу [159] и огурцов — к кадмию [158].

Защитное действие экзопролина связывают главным образом с его антиоксидантными свойствами [159]. Различные проявления защиты от окислительного стресса экзопролином были обнаружены у табака [147, 160, 161], риса [132], фасоли [162], маша [162], дыни [163], шалфея [22] и др. Экзопролин, проникая в клетки, может не только сам проявлять перечисленные в статье защитные свойства, но и выступать в роли сигнального агента, вызывая экспрессию генов стрессового ответа [164, 165].

Несмотря на признание сигнальной роли пролина, опубликовано мало работ, посвященных механизму пролиновой сигнализации. Неясно, какие сигнальные медиаторы, факторы транскрипции и гены индуцируются пролином у разных видов растений в оптимальных условиях и при действии стрессоров и т.д. Было показано, что у растений табака и арабидопсиса экзогенный пролин вызывает повышение содержания внутриклеточного Ca²⁺ и "включение" кальциевой сигнализации, которая активирует салицилатную сигнализацию, что, в свою очередь, индуцирует экспрессию генов защитных белков. Так как пролин не индуцировал жасмонатную сигнализацию (которая характерна для ответа растений на инфицирование некротрофными патогенами), то был сделан вывод о сходстве сигнального ответа на действие пролина с салицилатной сигнализацией, активируемой биотрофными патогенами.

Обработка растений пролином приводила также к активации симбиотической азотфиксации клубеньковыми бактериями у бобовых растений [141, 166] за счет повышения числа клубеньков, содержания леггемоглобина и нитрогеназной активности. Это наблюдалось и у ГМР с повышенным содержанием эндогенного пролина [77].

Можно считать перспективной обработку растений для защиты от патогенных микроорганизмов содержащими пролин препаратами в сочетании с фенольными и терпеноидными фитоалексинами, а также антибиотиками. Известно, что совместное действие фенольных соединений и антибиотиков может вызывать не только аддитивное, но и синергическое подавляющее действие на бактерии [167]. Это предполагает возможность использования меньших концентраций каждого из входящих в состав препаратов защитных соединений.

Генетически модифицированные растения с повышенным содержанием пролина. Защитные свойства пролина не могли не привлечь внимания специалистов в области генной инженерии. Так как повышение содержания пролина может осуществляться за счет регуляции клетками процессов его синтеза, деградации, межклеточного транспорта, синтеза и депролинизации БОП, то были созданы ГМР с усиленной экспрессией генов, от которых зависят эти процессы и, вследствие этого, устойчивость к действию биотических и абиотических стрессоров. Опубликован ряд обзоров, посвященных этой проблеме [168–170].

Сконструированные устойчивые к действию стрессоров "пролиновые" ГМР можно подразделить на следующие группы.

1) Растения с повышенной экспрессией генов ферментов синтеза пролина из глутамата и орнитина, в том числе арабидопсис [171–173], рис [169, 174, 175], сорго [176], просо [177], пшеница [178], соя [179], сахарный тростник [180], люцерна [61], ковыль [181], горох [182], картофель [23, 183], табак [68, 184–187], морковь [188] и др.

2) Растения с "молчанием" генов ферментов деградации пролина (ProDH) – арабидопсис [62, 77, 189], кукуруза [190], пшеница [191], табак [192,

193] и др. Сходный эффект был обнаружен у растений арабидопсиса с сверхэкспрессией гена белка ингибитора ферментов деградации пролина [77].

3) Растения с сверхэкспрессией генов пролиновых транспортеров [194], у которых обеспечивается эффективный транспорт пролина в те органы, у которых синтез пролина недостаточен для повышения устойчивости к действию стрессоров [81].

4) Растения с усиленным синтезом обогащенных пролином белков [91, 92], в том числе растения риса [97] и арабидопсиса [195].

5) Растения арабидопсиса [116–118, 124] со сверхэкспрессией генов ПИП.

Повышение содержания пролина и устойчивости наблюдалось и у ГМР с повышенной экспрессией генов синтеза сигнальных предшественников генов пролинового метаболизма, например, АБК – ключевого сигнального медиатора ответа растений на действие абиотических стрессоров [196-198]. К ближайшим сигнальным предшественникам генов пролинового метаболизма относятся факторы транскрипции семейств bZIP, МҮВ, МУС и др. У ГМР с их повышенной экспрессией наблюдалось накопление пролина и повышение устойчивости [170, 199, 200]. Необходимо заметить, что эти медиаторы регулируют не только пролиновый метаболизм, но и образование отличных от пролина участников защитного метаболизма растений.

Затрудняет анализ пролинового метаболизма и агробиотехнологических возможностей управления содержанием пролина взаимодействие между различными сигнальными путями при стрессе. Особенная сложность и уникальность защитного ответа растений должна возникать при действии на них более чем одного абиотических стрессоров [201-203], биотических стрессоров [204] или их совокупности [205-207]. Считается, что абиотические стрессоры подавляют ответы растений на действие биотических стрессоров и что это является отражением противодействия АБК- и салицилатной сигнализаций. Но на исход протводействия могут влиять и другие причины. Например, у старых листьев арабидопсиса абиотические стрессы подавляли иммунность, в то время как у молодых приоритетным был биотический стресс [207].

* * *

Приведенные выше примеры использования экзопролина и ГМО-растений для снижения вызываемых неблагоприятными факторами потерь урожая свидетельствуют о перспективности работ в этом направлении. Имеются и трудности, связанные, например, с тем, что для использования экзопролина необходимо предварительно находить его оптимальные концентрации для каждого вида растений и стрессора.

Очевидно, что защитные изменения пролинового метаболизма являются лишь частью ответа растений на действие стрессоров. Степень ее значимости зависит от многих факторов: видовая специфика растений, вид, напряженность и последовательность действия стрессоров и др. Однако это не снижает важности дальнейшего исследования молекулярных механизмов регуляции пролинового метаболизма и использования результатов этих исследований в агробиотехнологии для предотвращения потерь урожаев сельскохозяйственных культур.

Выражаем благодарность проф. Ю.Е. Колупаеву за участие в обсуждении статьи.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Kemble A.R., Macpherson H.T. // Biochemistry. 1954. V. 58. № 1. P. 46–49.
- 2. Тарчевский И.А. // Ученые записки Казанского государственного университета. 1958. № 118. C. 111–153.
- 3. La V.H., Lee B-R., Md. Islam T., Md. Manum A., Park S.-H., Bae D.-W., Kim T.-H. // Plants. 2020. V. 9. № 4. P. 512. https://doi.org/10.3390/plants9040512
- 4. Лубянова А.Р., Масленникова Д.Р., Шакирова Ф.М. // Biomics. 2021. T. 13. № 1. C. 47-53. https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2021-5
- 5. Ефимова М.В., Мануйлова А.В., Малофий М.К., Карташов А.В., Кузнецов Вл.В. // Вестн. Томского гос. ун-та. Биология. 2013. № 1(21). С. 118-128.
- 6. Kuznetsov V.V., Shevyakova N.I. // Physiologia Plantarum. 2006. V. 100. № 2. P. 320-326.
- 7. Konstantinova T., Parvanova D., Atanassov A., Djilianoiv D. // Plant Sci. 2002. V. 163. № 1. P. 157-164. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00090-0
- 8. Семенова Е.Ф., Преснякова Е.В. // Сельскохозяйственная биология. 2007. № 3. С. 106-109.
- 9. Колупаев Ю.Е., Горелова Е.И., Ястреб Т.О., Рябчун Н.И., Кириченко В. // Физиология растений. 2019. T. 66. № 4. C. 277–285.
- 10. Стеценко Л.А., Шевякова Н.И., Ракитин В.Ю., Кузнецов Вл.В. // Физиология растений. 2011. Т. 58. № 2. C. 275-282.
- 11. Sofy M.R., Seleiman M.F., Alhammad B.A., Alharbi B.M., *Mohamed H.I.* // Agronomy. 2020. V. 10. № 5. 699. https://doi.org/10.3390/agronomy10050699
- 12. Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. // Физиология растений. 1999. Т. 46. № 2. С. 321-336.
- 13. Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О. // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия Биология. 2014. Т. 2. № 32. С. 6-22.
- 14. Dutta T., Neelapk N.R.R., Wani S.H., Surekha C. // Plant Signaling Molecules. Role and Regulation Under Stressful Environvents. /Ed. M. Igbal R. Khan,

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

P. Sudhakar Reddy, A. Ferrante, N. Khan. Elsevier, 2019, P. 459-477. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00029-0

- 15. Kaur G., Asthir B. // Biol. Plant. 2015. V. 59. № 4. P. 609-619.
- 16. Yoshiba Y., Kiyosue T., Nakashima K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. // Plant Cell Physiol. 1997. V. 38. № 10. P. 1095–1102. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029093
- 17. Suzuki N. ROS as Key Players of Abiotic Stress Responses in Plants // Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress. Switzerland: Springer Int. Publ., 2015. P. 57-82.
- 18. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода, антиоксиданты и устойчивость растений к действию стрессоров. Киев: Логос, 2019. 277 с.
- 19. Matysik J., Alia B., Bhalu B., Mohanty P. // Curr. Sci. 2002. V. 82. № 5. P. 525-532.
- 20. Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., Becker D.F. // Antioxid. Redox Signal. 2013. V. 19. № 9. P. 998–1011. https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074
- 21. Signorelli S., Coitiño E.L., Borsani O., Monza J. // J. Phys. Chem. B. 2014. V. 118. № 1. P. 37–47. https://doi.org/10.1021/jp407773u
- 22. Радюкина Н.Л., Шашукова А.В., Макарова С.С., Кузнецов Вл.В. // Физиология растений. 2011. T. 58. № 1. C. 49–57.
- 23. Kavi Kishor P.B., Sreenivasulu N. // Plant Cell Environ. 2014. V. 37. № 2. P. 300-311. https://doi.org/10.1111/pce.12157
- 24. Verslues P.E., Sharma S. // Arabidopsis Book. 2010. V. 8. e0140 https://doi.org/10.1199/tab.0140
- 25. Havat S., Havat Q., Alvemeni M.N., Wani A.S., Pichtel J., Ahmad A. // Plant Signal. Behav. 2012. V. 7. № 11. P. 1456-1466. https://doi.org/10.4161/psb.21949
- 26. Mishra S., Dubey R.S. // J. Plant Physiol. 2006. V. 163. № 9. P. 927-936. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.08.003
- 27. Yang S.L., Lan S.S., Gong M. // J. Plant Physiol. 2009. V. 166. № 15. P. 1694–1699. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.04.006
- 28. *Markert Y., Köditz J., Ulbrich-Hofmann R., Arnold U. //* Protein Eng. 2003. V. 16. № 12. P. 1041–1046. https://doi.org/10.1093/protein/gzg136
- 29. Sharma A., Shahzad B., Kumar V., Kohli S.K., Sidhu G.P.S., Bali A.S., Handa N., Kapoor D., Bhardwaj R., Zheng B. // Biomolecules. 2019. V. 9. № 7. P. 285. https://doi.org/10.3390/biom9070285
- 30. Vishwakarma K., Upadhyay N., Kumar N., Yadav G., Singh J., Misra R.K., Kumar V., Verma R., Upadhyay R.G., Pandey M., Sharma S. // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. P. 161.

https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00161

- 31. Cao X., Wu L., Wu M., Zhu C., Jin Q., Zhang J. // BMC Plant Biol. 2020. V. 20. № 1. 198. https://doi.org/10.1186/s12870-020-02414-3
- 32. Takahashi F., Kuromori T., Urano K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11.

2022 том 58 Nº 4

P. 1407.

https://doi.org/10.3389/fpls.2020.556972

- 33. Shakirova F.M., Sakhabutdinova A.R., Bezrukova M.V., Fashutdinova R.A., Fashutdinova D.R. // Plant Sci. 2003. V. 164. № 3. P. 317–322. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00415-6
- La V.H., Lee B.-R., Zhang Q., Park S.-H., Islam M.T., Kim T.-H. // Hortic. Environ. Biotechnol. 2019. V. 60. № 1. P. 31–40.
- 35. *Bandurska H., Stroiński A., Kubiś J.* // Acta Physiol. Plant. 2003. V. 25. № 3. P. 279–285.
- 36. *Егорова А.М., Тарчевский И.А.* // Доклады Академии наук. 2021. Т. 500. № 1. С. 474–477. https://doi.org/10.31857/S2686738921050085
- Parre E., Ghars M.A., Leprince A.-S., Thiery L., Lefebvre D., Bordenave M., Richard L., Mazars C., Abdelly C., Savoure A. // Plant Physiol. 2007. V. 144. № 1. P. 503–512.

https://doi.org/10.1104/pp.106.095281

- Fichman Y., Gerdes S.Y., Kovács H., Szabados L., Zilberstein A., Csonka L.N. // Biol. Rev. 2015. V. 90. № 4. P. 1065–1099. https://doi.org/10.1111/brv.12146
- 39. Заикина Е.А., Румянцев С.Д., Сарварова Е.Р., Кулуев Б.Р. // Генетические основы эволюции экосистем. 2019. Т. 17. № 3. С. 47–58. https://doi.org/10.17816/ecogen17347-58
- Iqbal M., Fatma M., Khan N.A., Umar S. // Plant Signaling Molecules. Role and Regulation Under Stressful Environments. 2019. P. 437–448. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00027-7
- Meena M., Divyanshu K., Kumar S., Swapnil P., ZehraA., Shukla V., Yadav M., Upadhyay R.S. // Heliyon. 2019. V.5. № 12. e02952. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02952
- 42. *Verslues P.E., Bray E.A.* // J. Experimental Botany. 2006. V. 57. № 1. P. 201–212. https://doi.org/10.1093/jxb/erj026
- 43. Park S.Y, Fung P., Nishimura N., Jensen D.R., Fujii H., Zhao Y. et al. // Science. 2009. V. 324. № 5930. P. 1068–1071. https://doi.org/10.1126/science.1173041
- 44. Aleksza D., Horváth G.V., Sándor G., Szabados L. // Plant Physiology. 2017. V. 175. № 1. P. 555–567. https://doi.org/10.1104/pp.17.00791
- 45. Kang S.M., Shahzad R., Bilal S., Khan A.L., Park Y.G., Lee K.E., Asaf S., Khan M.A., Lee I.-J. // BMC Microbiol. 2019. V. 19. 80. https://doi.org/10.1186/s12866-019-1450-6
- 46. Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.K. // Plant Cell. 2002. V. 14 Suppl(Suppl):S165-83. https://doi.org/10.1105/tpc.000596
- 47. Alam P., Albalawi T.H., Altalayan F.H., Bakht M.A., Ahanger M.A., Raja V., Ashraf M., Ahmad P. // Biomolecules. 2019. V. 9. № 11. P. 640. https://doi.org/10.3390/biom9110640
- Misra N., Misra R., Singh O.P. // Nigerian Journal of Technological Research. 2010. V. 5 https://doi.org/10.4314/njtr.v5i0.90312
- 49. Cechini I., Cardoso G. S., de Fátima Fumis T., Corniani N. // Plant Protection. Bragantia. 2015. V. 74.

№ 2. P. 200-206.

https://doi.org/10.1590/1678-4499.353

- 50. *Mohamed A.A., Khan E.A., Misra A.N.* // J. Phys.: Conf. Ser. 2019. V. 1294. № 5. 052008. https://doi.org/10.1088/1742-6596/1294/5/052008
- Thiery L., Leprince A.-S., Lefebvre D., Ghars M.A., Debarbieux E., Savouré A. // J. Biochem. Chem. 2004. V. 279. № 15. P. 14812–14818. https://doi.org/10.1074/jbc.M308456200
- 52. *Verbruggen N., Villarroel R., Van Montagu M.* // Plant Physiol. 1993. V. 103. № 3. P. 771–781. https://doi.org/10.1104/pp.103.3.771
- 53. Strizhov N., Abraham E., Okresz L., Blickling S., Zilberstein A., Schell J., Koncz C., Szabados L. // Plant J. 1997. V. 12. № 3. P. 557–569. https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.00557.x
- 54. *Delauney A.J., Verma D.P.S.* // The Plant J. 1993. V. 4. Nº 2. P. 215–223. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04020215.x
- Trovato M., Mattioli R., Constantino P. // Rend. Fis. Acc. Lincei. 2008. V. 19. № 4. P. 325–346. https://doi.org/10.1007/s12210-008-0022-8
- 56. Vives-Peris V., Gomez-Cadenas A., Perez-Clemente R.M. // Plant Cell Rep. 2017. V. 36. № 12. P. 1971–1984. https://doi.org/10.1007/s00299-018-2328-z
- 57. Xie E., Wei X., Ding A., Zheng L., Wu X., Anderson B. // Water. 2020. V. 12. № 2. P. 569. https://doi.org/10.3390/w12020569
- 58. Alotaibi M.O., Saleh A.M., Sobrinho R.L., Sheteiwy M.S., El-Sawah A.M., Mohammed A.E., AbdElgawad H. // J. Fungi (Basel). 2021. V. 7. № 7. P. 531. https://doi.org/10.3390/jof7070531
- Stránská J., Kopečný D., Tylichová M., Snégaroff J., Šebela M. // Plant Signal. Behav. 2008. V. 3. № 11. P. 929–935. https://doi.org/10.4161/psb.6771
- Huang Z., Zhao L., Chen D., Liang M., Liu Z., Shao H., Long X. // PLoS One. 2013. V. 8. № 4. e62085. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062085
- 61. *De la Torre V.S.G., de la Peña T.C., Lucas M.M., Pueyo J.J.* // Front. Plant Sci. 2022. V. 13. P. 26. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.829069
- Stein H., Honig A., Miller G., Erster O., Eilenberg H., Csonka L.N., Szabados L., Koncz C. // Plant Sci. 2011.
 V. 181. № 2. P. 140–150. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.013
- 63. Silva-Ortega C.O., Ochoa-Alfaro A.E., Reyes-Agüero J.A., Aguado-Santacruz G.A., Jiménez-Bremont J.F. // Plant Physiol. Biochem. 2008. V. 46. № 1. P. 82–92. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.10.011
- 64. *Chaitanya K.V., Rasineni G.K., Reddy A.R.* // Acta Physiol. Plant. 2009. V. 31. № 3. P. 437–443. https://doi.org/10.1007/s11738-008-0251-6
- 65. *Repkina N., Talanova V., Ignatenko A., Titov A. //* Biol. Plantarum. 2019. V. 6. P. 70–77. https://doi.org/10.32615/BP.2019.009
- 66. Qin L., Chen E., Li F., Yu X., Liu Z., Yang Y., Wang R., Zhang H., Wang H., Liu B., Guan Y., Ruan Y.// Int. J. Mol. Sci. 2020.V. 21. № 22. P. 8520. https://doi.org/10.3390/ijms21228520

- 67. Anwar A., She M., Wang K., Riaz B., Ye X. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 11. 3681. https://doi.org/10.3390/ijms19113681
- 68. Kishor K.P.B., Hong Z., Miao G.H., Hu C.A.A., Verma D.P.S. // Plant Physiol. 1995. V. 108. № 4. P. 1387–94. https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1387
- 69. Nguyen M.L., Kim G.-B., Hyun S.-H., Lee S.Y., Lee C.-Y., Choi H.-K., Choi H.-K., Nam Y.-W. // Euphytica. 2013. V. 193. № 1. P. 101–120. https://doi.org/10.1007/s10681-013-0957-4
- Fabro G., Kovacs I., Pavet V., Szabados L., Alvarez M.E. // Mol. Plant Microbe Interact. 2004. V. 17. № 4. P. 343–350. https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.4.343
- 71. *Senthil-Kumar M., Mysore K.S.* // Plant Cell Environ. 2012. V. 35. № 7. P. 1329–1343. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02492.x
- 72. Funck D., Baumgarten L., Stift M., von Wirén N., Schönemann L. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. 565134. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.565134
- 73. Szabados L., Savouré A. // Trends Plant Sci. 2010.
 V. 15. № 2. P. 89–97. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009
- 74. Cabassa-Hourton C., Schertl P., Bordenave-Jacquemin M., Saadallah K., Guivarc'h A., Lebreton S., Planchais S. et al. // Biochem. J. 2016. V. 473. № 17. P. 2623–2634. https://doi.org/10.1042/BCJ20160314
- 75. *Trovato M., Forlani G., Signorelli S., Funck D.* / Osmoprotectant-mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants. Cham: Springer, 2019. P. 41–72. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27423-8_2
- 76. Xue X., Liu A., Hua X. // BMB Rep. 2009. V. 42. № 1. P. 28–34.
- 77. *Ren Y., Miao M., Meng Y., Xiao F., Liu Y., Cao S. //* Cell Reports. 2018. V. 23. № 13. P. 3960–3974. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.011
- 78. Qamar A., Mysore K.S., Senthil-Kumar M. // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 503. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00503
- 79. Monteoliva M.I., Rizzi Y.S., Cecchini N.M., Hajirezaei M.R., Alvarez, M.E. // BMC Plant Biol. 2014.
 V. 14. № 1. P. 21. https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-21
- Rizzi Y.S., Monteoliva M.I., Fabro G., Grosso C.L., Larovere L.E., Alvarez M.E. // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. P. 572. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00572
- Hossain A., Azeem F., Shahriar S.M., Islam T. // Transporters and Plant Osmotic Stress. Academic Press, 2021. P. 291–306.
- Lin J.-H., Xu Z.-J., Peng J.-S., Zhao J., Zhang G.-B., Xie J., Yi Z.-X., Zhang J.H., Gong J.-M., Ye N.H., Meng S. // Rice. 2019. V. 12. № 1. P. 79. https://doi.org/10.1186/s12284-019-0341-7
- 83. Lehmann S., Gumy C., Blatter E., Boeffel S., Fricke W., Rentsch D. // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. № 2. P. 787–796. https://doi.org/10.1093/jxb/erq320

- Kavi Kishor P.B., Hima Kumari P., Sunita M.S., Sreenivasulu N. // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. 544. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00544
- 85. *Ourry A., Kim T.H.* // New Phytol. 2009. V. 182. № 2. P. 654–663. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02795.x
- Chen J., Wu J., Lu Y., Cao Y., Zeng H., Zhang Z., Wang L., Wang S. // Crop J. 2016. V. 4. № 5. P. 384–390. https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.05.009
- 87. Ueda A., Shi W., Sanmiya K., Shono M., Takabe T. // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. № 11. P. 1282–1289. https://doi.org/10.1093/pcp/pce166
- 88. Rentsch D., Schmidt S., Tegeder M. // FEBS Letters. 2007. V. 581. № 12. P. 2281–2289. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.013
- 89. Kim T.H., Lee B.R., Jung W.J., Kim K.Y., Avice J.C., Qurry A. // Funct. Plant Biol. 2004. V. 31. № 8. P. 847–855. https://doi.org/10.1071/FP04059
- 90. Hijazi M., Roujol D., Nguyen-Kim H., Del Rocio Cisneros Castillo L., Saland E., Jamet E., Albenne C. // Ann. Bot. 2014. V. 114. № 6. P. 1087–1097. https://doi.org/10.1093/aob/mcu038
- 91. Gujjar R.S., Pathak A.D., Karkute S.G., Supaibulwatana K. // Biologia Plantarum. 2019. V. 63. № 1. P. 448–454. https://doi.org/10.32615/bp.2019.078
- 92. Halder T., Upadhyaya G., Roy S., Biswas R., Das A., Bagchi A., Agarwal T., Ray S. // Plant Mol. Biol. 2019.
 V. 101. № 1–2. P. 95–112. https://doi.org/10.1007/s11103-019-00894-y
- 93. Showalter A.M., Keppler B., Lichtenberg J., Gu D., Welch L.R. // Plant Physiol. 2010. V. 153. № 2. P. 485–513. https://doi.org/10.1104/pp.110.156554
- 94. Nguema-Ona E., Vicre-Gibouin M., Cannesan M.A., Driouich A. // Trends Plant Sci. 2013. V. 18. № 8. P. 440–449. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.03.006
- 95. Mellacheruvu S., Tamirisa S., Vudem D.R., Khareedu V.R. // Front. Plant Sci. 2016. V. 6. P. 1167. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01167
- 96. Gujjar R.S., Karkute S.G., Rai A., Singh M., Singh B. // Curr. Sci. 2018. V. 114. № 4. P. 915–920. https://doi.org/10.18520/cs/v114/i04/915-920
- 97. Kapoor R., Kumar G., Arya P., Jaswal R., Jain P., Singh K., Sharma T.R. // Plants. 2019. V. 8. № 9. 343. https://doi.org/10.3390/plants8090343
- 98. Hromadová D., Soukup A., Tylová E. // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. P. 856. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.674010
- 99. Battaglia M., Solórzano R.M., Hernández M., Cuéllar-Ortiz S., García-Gómez B., Márquez J., Covarrubias A.A. // Planta. 2007. V. 225. № 5. P. 1121–1133. https://doi.org/10.1007/s00425-006-0423-9
- 100. *Qin Y., Tian Y., Han L., Yang X.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2013. V. 441. № 2. P. 476–81.
- 101. Peng T., Jia M.M., Liu J.H. // Front. Plant Sci. 2015. V. 6. 808. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00808

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

том 58 № 4 2022

- 102. Otulak-Kozieł K., Kozieł E., Lockhart B.E.L., Bujarski J.J. // Viruses. 2020. V. 12. № 1. 66. https://doi.org/10.3390/v12010066
- 103. Wei G., Shirsat A. H. // Mol. Plant Pathol. 2006. V. 7.
 № 6. P. 579–592. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00363.x
- 104. *Yeom S., Seo E., Oh S., Kim K.W., Choi D.* // Plant J. 2012. V. 69. № 5. P. 755–768. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04828.x
- 105. Neto B.L., de Oliveira R.R., Wiebke-Strohm B., Bencke M., Weber R.L.M., Cabreira C. et al. // Genet. Mol. Biol. 2013. V. 36. № 2. P. 214–224. https://doi.org/10.1590/S1415-47572013005000017
- 106. Yang J., Zhang Y., Wang X., Wang W., Li Z., Wu J. et al. // BMC Plant Biol. 2018. V. 18. № 1. P. 339. https://doi.org/10.1186/s12870-018-1565-1
- 107. Banday Z.Z., Nicolás M., Cecchini N.M., Scott A.T., Ciara T., Hu C.T., Rachael C., Filzen R.C., Agbo E., Greenberg J.T. // bioRxiv. 2021. 08.26.457806 https://doi.org/10.1101/2021.08.26.457806
- 108. Kozieł E., Otulak-Kozieł K., Bujarski J.J. // Front. Microbiol. 2021. V. 12. P. 495. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.656809
- 109. Zhan X., Wang B., Li H., Liu R., Kalia R.K., Zhu J.-K., Chinnusamy V. // PNAS. 2012. V. 109. № 44. P. 18198–18203. https://doi.org/10.1073/pnas.1216199109
- 110. Liu X., Wang X., Yan X., Li S., Peng H. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 17. 6168. https://doi.org/10.3390/ijms21176168
- 111. Corrado G., Arena S., Araujo-Burgos T., Coppola M., Rocco M., Scaloni A., Rao R. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2016. V. 125. № 3. P. 509–519. https://doi.org/10.1007/s11240-016-0967-8
- 112. Ганчева М.С., Маловичко Ю.В., Полюшкевич Л.О., Додуева И.Е., Лутова Л.А. // Физиология растений. 2019. Т. 66. № 2. С. 83–103.
- 113. Banerjee A., Roychoudhury A // Emerging Plant Growth Regulators in Agriculture. Academic Press. 2022. P. 415–422. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91005-7.00003-5
- 114. Coppola M., Corrado G., Coppola V., Cascone P., Martinelli R., Digilio M.C., Pennacchio F., Rao R. // Plant Mol. Biol. Rep. 2015. V. 33. № 5. P. 1270–1285. https://doi.org/10.1007/s11105-014-0834-x
- 115. Беседин Д.В., Руденская Г.Н. // Биорганическая химия. 2003. Т. 29. № 1. С. 3–20.
- 116. Sun X., Wang F., Cai H., Zhao C., Ji W., Zhu Y. // Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2013. V. 114. № 3. P. 325–338. https://doi.org/10.1007/s11240-013-0328-9
- Zdunek-Zastocka E., Grabowska A., Branicki T., Michniewska T. // Plant Physiol. Biochem. 2017. V. 116. P. 18–26. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.04.026
- 118. Wang L., Zhang L., Geng Y., Xi W., Fang R., Jia Y. // Cell Research. 2011. V. 21. № 7. P. 1131–1142. https://doi.org/10.1038/cr.2011.64
- 119. Zhang J., Kan J., Zhang J., Guo P., Chen X., Fang R., Jia Y. // Applied Environmental Microbiol. 2012.

V. 78. № 19. P. 19.

https://doi.org/10.1128/AEM.01726-12

- 120. Hussaini A.M., Morimoto K., Chandrasekar B., Kelly S., Kaschani F., Palmero D., Jiang J., Kaiser M., Ahrazem O., Over-Kleeft H., van der Hoom R. // Plant Physiol. 2018. V. 177. № 1. P. 24–37. https://doi.org/10.1104/pp.18.00250
- 121. *Ghifari A.S., Teixeira P.F., Kmiec B., Singh N., Glaser E., Murcha M.W.* // J. Exp. Bot. 2022. V. 73. № 1. P. 78–93. https://doi.org/10.1093/jxb/erab397
- 122. Gonzalez J.F., Venturi V. // Trends Plant Sci. 2013. V. 18. № 3. P. 167–174. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.09.007
- 123. Mahon C.S., O'Donoghue A.J., Goetz D.H., Murray P.G., Craik C.S., Tuohy M.G. // Microbiol. 2009. V. 155. № 11. P. 3673–3682. https://doi.org/10.1099/mic.0.030940-0
- 124. *Kan J., An L., Wu Y., Long J., Song L., Fang R., Jia Y. //* Mol. Plant Pathol. 2018. V. 19. № 8. P. 2011–2024. https://doi.org/10.1111/mpp.12677
- 125. Feng L., Schaefer A.L., Hu M., Chen R., Greenberg E.P., Zhou J. // Applied Envir. Microbiol. 2019. V. 85. № 23. e01611-19.
- 126. Roege K.E., Kelly W.L. // Org Lett. 2009. V. 11. № 2. P. 297–300. https://doi.org/10.1021/ol802422n
- 127. Maharjan S., Aryal N., Bhattarai S., Koju D., Lamichhane J., Sohng J.K. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 93. № 2. P. 687–696. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3567-x
- 128. Егорова А.М., Тарчевский И.А. // Доклады РАН. 2015. Т. 461. № 4. С. 468–471.
- 129. Тарчевский И.А., Агеева М.В., Петрова Н.В., Акулов А.Н., Егорова А.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 5. С. 497–501. https://doi.org/10.7868/S0555109917050166
- 130. Brewin N.J. // Critical Reviews in Plant Sciences. 2004. V. 23. № 4. P. 293–316. https://doi.org/10.1080/07352680490480734
- Moukhtari A.E., Cabassa-Hourton C., Mohamed Farissi M., Savouré A. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 1127. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01127
- 132. Bhusan D., Das D.K., Hossain M., Murata Y., Hogue A. // Australian J. Crop Science. 2016. V. 10. № 1. P. 50–56.
- 133. Teh C.-Y., Shaharuddin N.A., Ho C.-L., Mahmood M. // Acta Physiol. Plant. 2016. V. 38. № 6. P. 151. https://doi.org/10.1007/s11738-016-2163-1
- 134. Nawaz K., Talat A., Hussain K., Majeed A. // World Appl. Sci. J. 2010. V. 10. № 1. P. 93–99.
- 135. de Freitas P.A.F., de Carvalho H.H., Costa J.H., de Souza Miranda R., da Cruz Saraiva K.D., de Olivera F.D.B., et al // Plant Cell Rep. 2019. V. 38. № 3. P. 403–416. https://doi.org/10.1007/s00299-019-02382-5
- Rady M.M., Hemida K.A // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2016. V. 133. P. 252–259. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.028
- 137. Alam R., Das D.K., Islam M.R., Murata Y., Hoque M.A. // Progressive Agriculture. 2016. V. 27. № 4. P. 409–417.

- 138. de Freitas P.A.F., de Souza Miranda R., Marques E.C., Prisco J.T., Gomes-Filho E.// J. Plant Growth Regul. 2018. V. 37. № 3. P. 911–924. https://doi.org/10.1007/s00344-018-9787-x
- Rady M., Kusvuran A., Alharby H.F., Alzahrani Y., Kusvuran S. // J. Plant Growth Regul. 2019. V. 38. № 2. P. 449–462. https://doi.org/10.1007/s00344-018-9860-5
- 140. Medeiros M.J.L., Silva M.M.A., Granja M.M.C., De Souza Silva Júnior G., Camara T., Willadino L. // Acta Biológica Colombiana. 2015. V. 20. №. 2. P. 57–63.
- 141. Sabagh E.L., Sorour S., Ragab A., Saneoka H., Islam M. // J. Agric. Biotechnol. 2017. V. 2. № 1. P. 1–5. https://doi.org/10.20936/JAB/170101
- 142. Abdelhamid M., Rady M.M., Osman A.S., Abdalla M.A. // J. Hortic. Sci. Biotechnol. 2013. V. 88. № 4. P. 439– 446. https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11512989
- 143. Dawood M.G., Taie H.A.A., Nassar R.M.A., Abdelhamid M.T., Schmidhalter U. // S. Afr. J. Bot. 2014. V. 93. P. 54–63.
 - https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.03.002
- 144. Kahlaoui B., Hachicha M., Teixeira J., Misle E., Fidalgo F., Hanchi B // J. Stress Physiology & Biochemistry. 2018. V. 9. № 3. P. 357–365.
- 145. Huang Y., Bie Z., Liu Z., Zhen A., Wang W. // Soil Sci. Plant Nutr. 2009. V. 55. № 5. P. 698–704. https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2009.00412.x
- 146. Singh M., Singh V.P., Dubey D., Prasad S.M. // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2015. V. 117. P. 164–173. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.021
- 147. Hoque M.A., Banu M.N.A., Nakamura Y., Shimoishi Y., Murata Y. // J. Plant Physiol. 2008. V. 165. № 8. P. 813–824.
 https://doi.org/10.1016/j.j.htl.2007.07.012
 - https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.07.013
- 148. Ozden M., Demirel U., Kahraman A. // Scientia Horticulturae. 2009. V. 119. № 2. P. 163–168. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.07.031
- 149. Suekawa M., Fujikawa Y., Esaka M. // Plant Physiol. Biochem. 2019. V. 142. P. 1–7. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.06.032
- 150. *Wani A.S., Ahmad A., Hayat Sh., Tahir I. //* Plant Physiol. Biochem. 2019. V. 135. P. 385–394. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.01.002
- 151. *Kamran M., Shahbaz M., Ashraf M., Akram N.A.* // Pakistan J. Botany. 2009. V. 41. № 2. P. 621–632.
- 152. Deivanai S., Xavier R., Vinod V., Timalata K., Lim O. // J. Stress Physiol. Biochem. 2011. V. 7. № 4. P. 157–174.
- 153. Bisen K., Keswani C., Patel J.S., Sarma B.K., Singh H.B. // In: Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants. /Ed. D.K. Choudhary, A. Verma. Singapore: Springer, 2016. P. 185–195. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0388-2 12
- 154. *Zheng J.L., Zhao L.Y., Wu C.W., Shen B., Zhu A.-Y.* // Acta Physiol. Plant. 2015. V. 37. № 9. 181. https://doi.org/10.1007/s11738-015-1921-9
- 155. Kibria M.G., Farzana K.M.D., Matin A., Hoque Md.A. // Fundamental and Applied Agriculture. 2016. V. 1. № 3. P. 118–123.

- 156. Shahid M.A., Balal R.M., Pervez M.A., Abbas T., Aqeel M.A., Javaid M.M., Garcia-Sanchez F. // Turk. J. Bot. 2014. V. 38. № 5. P. 914–926. https://doi.org/10.3906/bot-1312-13
- 157. Rasheed R., Ashraf M.A., Hussain I., Haider M.Z., Kanwal U., Iqbal M. // Brazilian J. Botany. 2014. V. 37. № 4. P. 399–406. https://doi.org/10.1007/s40415-014-0089-7
- Semida W.M., Hemida K.A., Rady M.M. // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2018. V. 154. P. 171–179. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.036
- 159. Rady M.M., Hemida K.A. // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2016. V. 133. P. 252–259. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.028
- 160. Kumar V, Shriram V, Hossain M.A., Kavi Kishor P.B. // Managing Salt Tolerance in Plants. Molecular and Genomic Perspectives. Boca Raton; Taylor & Francis Group, 2016. P. 353–372.
- 161. Islam M.M., Hoque M.A., Okuma E., Banu M.N., Shimoishi Y., Nakamura Y., Murata Y. // J. Plant Physiol. 2009. V. 166. № 15. P. 1587–1597. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.04.002
- 162. Hossain M.A., Fujita M. // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2010. V. 16. № 1. P. 19–29. https://doi.org/10.1007/s12298-010-0003-0
- 163. Yan Z., Guo S., Shu S., Jun J., Tezuka T. // Afr. J. Biotechnol. 2011. V. 10. № 80. P. 18381–18390. https://doi.org/10.5897/AJB11.1073
- 164. Benitez L.C., Vighi I.L., Auler P.A., do Amaral M.N., Peres Moraes G., dos Santos Rodrigues G. et al. // Acta Physiol. Plant. 2016. V. 38. № 11. P. 267. https://doi.org/10.1007/s11738-016-2291-7
- 165. Ghosh U.K., Islam M.N., Siddiqui M.N., Cao X., Khan M.A.R. // Plant Biol. (Stuttg). 2022. V. 24. № 2. P. 227–239. https://doi.org/10.1111/plb.13363
- 166. Alyemeni M.N., Hayat Q., Hayat S., Faizan M., Faraz A. // Legume Research. 2016. LR-240. P. 221–227. https://doi.org/10.18805/lr.v0iOF.9291
- 167. Amin M.U., Khurram M., Khattak B., Khan J. // BMC Complement. Altern. Med. 2015. V. 15. https://doi.org/10.1186/s12906-015-0580-0
- 168. Колодяжная Я.С., Куцоконь Н.К., Левенко Б.А., Сютикова О.С., Рахметов Д.Б., Кочетов А.В. // Цитология и генетика. 2009. Т. 43. № 2. С. 72–81.
- 169. Dutta T., Neelapu N.R.R., Wani S.H. // Biochemical, Physiological and Molecular Avenues for Combating Abiotic Stress Tolerance in Plants. 2018. P. 221–254. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813066-7.00012-7
- 170. Khanna-Chopra R., Semwal V.K., Lakra N., Pareek A. // Plant Tolerance to Environmental Stress. 2019. CRC Press. P. 22. https://doi.org/10.1201/9780203705315
- 171. Ma L., Zhou E., Gao L., Mao X., Zhou R., Jia J. // S. Afr. J. Bot. 2008. V. 74. № 4. P. 705–712. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.05.003
- 172. *Chen J.B., Zhao L.Y., Mao X.G.* // Acta Agronomica Sinica. 2010. V. 36. P. 147–153.
- 173. Chen J.B., Yang J.W., Zhang Z.Y., Feng X.F., Wang S.M. // J. Genetics. 2013. V. 92. № 3. P. 461–469. https://doi.org/10.1007/s12041-013-0292-5

том 58 № 4 2022

- 174. You J., Hu H., Xiong L. // Plant Science. 2012. V. 197.
 P. 59–69. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.09.002
- 175. Guan C., Huang Y.H., Cui X., Liu S.J., Zhou Y. Z., Zhang Y.W. // Plant Cell Rep. 2018. V. 37. № 8. P. 1187–1199. https://doi.org/10.1007/s00299-018-2304-7
- 176. Su M., Li X.F., Ma X.Y., Peng X.J., Zhao A.G., Cheng L.Q., Chen S.Y., Liu G.S. // Plant Sci. 2011. V. 181. № 6. P. 652–659. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.03.002
- 177. Guan C., Cui X., Liu H., Li X., Li M., Zhang Y. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 46. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00046
- 178. *Sawahel W.A., Hassan A.H.* // Biotechnol. Lett. 2002. V. 24. № 9. P. 721-5. https://doi.org/10.1023/A:1015294319114
- 179. Ren X.W., Yu D.W., Yang S.P., Gai J.Y., Zhu Y.L. // Legume Res. 2018. V. 41. № 5. P. 675–680. https://doi.org/10.18805/LR-386
- 180. Molinari H.B.C., Marura C.J., Daros E., De Campos M.K.F., Carvalho J.F.R.P., Filho J.C.B., Pereira L.F.P., Vieira L.G.E. // Physiol. Plant. 2007. V. 130. № 2. P. 218–229. https://doi.org/10.1111/i.1399-3054.2007.00909.x
- 181. Yang D., Ni R., Yang S., Pu Y., Qian M., Yang Y., Yang Y. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 17. 9599. https://doi.org/10.3390/ijms22179599
- 182. Surekha C., Kumari K.N., Aruna L.V., Suneetha G., Arundhati A., Kavi Kishor P.B. // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2014. V. 116. № 1. P. 27–36. https://doi.org/10.1007/s11240-013-0378-z
- 183. Liu D., He S., Zhai H., Wang L., Zhao Y., Wang B., Li R., Liu Q. // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2014. V. 117. № 1. P. 1–16. https://doi.org/10.1007/s11240-013-0415-y
- 184. Konstantinova T., Parvanova D., Atanassov A., Djilianoiv D. // Plant Sci. 2002. V. 163. № 1. P. 157–164. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00090-0
- 185. Титов С.Е., Кочетов А.В., Коваль В.С., Шумный В.К. // Успехи совр. биол. 2003. Т. 123. № 5. С. 487–494.
- 186. *Zhang X., Tang W., Liu J., Liu Y. //* Chin. J. Appl. Environ. Biol. 2014. V. 4. P. 717–722.
- 187. Roosens N.H., Al Bitar F., Loenders K., Angenon G., Jacobs M. // Molecular Breeding. 2002. V. 9. № 2. P. 73–80. https://doi.org/10.1023/A:1026791932238
- 188. Han K.H., Hwang C.H. // J. Plant Biotechnol. 2003. V. 5. № 3. P. 157–161.
- 189. Sharma S., Villamor J.G., Verslues P.E. // Plant Physiol. 2011.V. 157. № 1. P. 292–304. https://doi.org/10.1104/pp.111.183210
- 190. Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Матвеева А.Ю., Коберник Н.И., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н., Моргун В.В. // Физиология растений и генетика. 2014 Т. 46. № 6. С. 482–489.
- 191. Morgun B.V., Dubrovna O. V. // Cytol. Genet. 2019. V. 53. № 5. P. 46–55. https://doi.org/10.3103/S0095452719050116
- 192. Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Коваль В.С., Макарова Н.Н., Ильин-

ский Ю.Ю., Трифонова В.А., Шумный В.К. // Генетика. 2004. Т. 40. № 2. С. 282–285.

- 193. Ибрагимова С.С., Колодяжная Я.С., Герасимова С.В., Кочетов А.В. // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 1. С. 99–107.
- 194. Shen Y.G., Zhang W.K., Yan D.Q., Du B.X., Zhang J.S., Chen S.Y. // Acta Bot. Sin. 2002. V. 44. P. 956–962.
- 195. Palm-Forster M.A.T., Eschen-Lippold L., Uhrig J., Scheel D., Lee J. // Plant Mol. Biol. 2017. V. 95. № 1–2. P. 123–140. https://doi.org/10.1007/s11103-017-0641-5
- 196. He R., Zhuang Y., Cai Y., Agüero C.B., Liu S., Wu J., Deng S., Walker M.A., Lu J., Zhang Y. // Front. Plant Sci. 2018. V. 9. P. 970. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00970
- 197. Sato H., Takasaki H., Takahashi F., Suzuki T., Iuchi S., Mitsuda N., Ohme-Takagi M., Ikeda M., Seo M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. № 47. P. E11178–E11187. https://doi.org/10.1073/pnas.1811491115
- 198. Verma R.K., Santosh Kumar V.V., Yadav S.K., Pushkar S., Rao M.V., Chinnusamy V. // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 1488. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01488
- 199. Ying S., Zhang D.F., Fu J., Shi Y.S., Song Y.C., Wang T.Y., Li Y. // Planta. 2012. V. 235. № 2. P. 253–266. https://doi.org/10.1007/s00425-011-1496-7
- 200. Xing L., Di Z., Yang W., Liu J., Li M., Wang X., Cui C., Wang X., Wang X., Zhang R., Xiao J., Cao A. // Front. Plant Sci. 2017. V. 8. 1948. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01948
- 201. *Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S., Mittler R.* // Plant Physiol. 2004. V. 134. № 4. P. 1683– 1696. https://doi.org/10.1104/pp.103.033431
- 202. Lopez-Delacalle M., Camejo D.M., García-Martí M., Nortes P.A., Nieves-Cordones M., Martínez V., Rubio F., Mittler R., Rivero R.M. // Front. Plant Sci. 2020. V. 17. № 10. P. 1702. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01702
- 203. Zandalinas S.I., Fritschi F.B., Mittler R., Lawson T. // J. Exp. Bot. 2020. V. 71. № 5. P. 1734–1741. https://doi.org/10.1093/jxb/erz486
- 204. *Malik N.A.A., Kumar I.S., Nadarajah K.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 3. 963. https://doi.org/10.3390/ijms21030963
- 205. Xu P., Chen F., Mannas J.P., Feldman T., Sumner L.W., Roossinck M. // J. New Phytol. 2008. V. 180. P. 911–921. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02627.x
- 206. *Gupta A., Senthil-Kumar M.* // Sci. Rep. 2017. V. 7. Nº 1. P. 9124. https://doi.org/10.1038/s41598-017-09135-y
- 207. Berensa M.L., Wolinska K.W., Spaepen S., Ziegler J., Nobori T., Nair A. et al. // PNAS. 2019. V. 116. № 6. P. 2364–2373. https://doi.org/10.1073/pnas.1817233116

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ том 58 № 4 2022

328

Participation of Proline in Plant Adaptation to Stress Factors and Its Application in the Agrobiotechnology

I. A. Tarchevsky^{*a*, *} and A. M. Egorova^{*a*}

^a Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Kazan, 420111 Russia *e-mail: tarchevsky@kibb.knc.ru

The article is devoted to the role of the imino acid proline in plant defense from the abiotic and biotic stressors. The proline content in cells depends of its synthesis, degradation, export to other cells, synthesis of proline enriched proteins, as well as release from them by proline iminopeptidases. The possibility of using proline in agrobiotechnology to increase plant resistance is illustrated by examples of their treatment with proline solutions and the development of genetically modified plants with an increased content of proline and proline-rich proteins.

Keywords: proline, plant defense, agrobiotechnology, plant resistance, phytoimmunity

УДК 577.121

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ОБРАЩЕНИЯ β-ОКИСЛЕНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В *Escherichia coli* ПРИ ДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ НАТИВНЫХ АЦИЛ-КоА ДЕГИДРОГЕНАЗ

© 2022 г. А. Ю. Гулевич^{1,} *, А. Ю. Скороходова¹, В. Г. Дебабов¹

¹Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 117312 Россия *e-mail: andrey.gulevich@gmail.com Поступила в редакцию 25.02.2022 г. После доработки 01.03.2022 г. Принята к публикации 03.03.2022 г.

С использованием, в качестве базового, штамма Escherichia coli MG1655 lacl^Q, $\Delta ackA$ -pta, $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta fadE$, P_L -SD_{$\phi10^-$}atoB, $P_{trc-ideal-4}$ -SD_{$\phi10^-$}fadB, P_L -SD_{$\phi10^-$}tesB, $\Delta yciA$ исследована эффективность обращения β -окисления жирных кислот при действии нативных клеточных ферментов, способных служить в качестве ацил-KoA-дегидрогена3. Повышенная экспрессия генов fadE, fabI и ydiO/ydiQRST, кодирующих соответствующие ферменты, была обеспечена в производных базового штамма при замене их нативных регуляторных областей искусственным регуляторным элементом $P_{trc-ideal-4}$ -SD_{$\phi10^-}. Продемонстрировано трехкратное обращения цикла в сконструированных рекомбинантах, сопровождающееся значимой секрецией масляной, капроновой и каприловой кислот. Максимальный уровень продукции шести- и восьмиуглеродных карбоксилатов достигнут при повышенной экспрессии гена fabI, тогда как минимальные уровни секреции соответствующих соединений демонстрировал штамм с усиленной экспрессией reнов ydiO и ydiQRST. Рекомбинантный штамм с индивидуально усиленной экспрессией уdiO не продуцировал детектируемых количеств производных полного обращения <math>\beta$ -окисления жирных кислот.</sub>

Ключевые слова: ацил-КоА дегидрогеназа, β-окисление жирных кислот, метаболическая инженерия, *Escherichia coli*

DOI: 10.31857/S0555109922040195

Актуальной тенденцией современной биотехнологии является разработка микробных биосинтетических платформ для получения промышленно значимых химикатов. Действительно, многие из этих веществ могут быть получены в результате серий относительно простых превращений ограниченного набора интермедиатов центрального метаболизма клетки, таких как пировиноградная кислота, шавелевоуксусная кислота и ацетил-КоА. Таким образом, биосинтез ряда структурно родственных соединений может быть обеспечен при вовлечении того или иного ключевого интермедиата центрального метаболизма в целевой платформенный биохимический путь на основе единого базового рекомбинантного штамма, вместо создания серии специализированных продуцентов. На сегодняшний день перспективность данного подхода продемонстрирована на основе клеток Escherichia coli, подвергнутых направленной метаболической инженерии для синтеза метилкетонов [1], гидроксикислот [2], алифатических спиртов [3] и алифатических функционализированных карбоновых кислот [4, 5]. В общем случае,

платформенный биосинтетический путь представляет собой конечную последовательность реакций, один из интермедиатов которой может служить ключевым предшественником в биосинтезе целевых продуктов [6]. Однако, потенциально, в качестве подобных путей могут использоваться итеративные биохимические пути, обеспечивающие приращение углеродной цепи формируемых молекул на каждом новом функциональном раунде. Такое свойство итеративных биохимических путей является их дополнительным преимуществом, кратно расширяющим спектр возможных конечных продуктов биосинтеза. Одной из немногих удобных и эффективных итеративных биосинтетических платформ, потенциал которых для микробиологического синтеза целевых групп веществ различных классов полтвержден экспериментально, является обращенное β-окисление жирных кислот (БОЖК) [7].

При форсированной инверсии БОЖК в сторону биосинтеза, последовательность соответствующих реакций инициируется конденсацией двух

молекул ацетил-КоА, прямого производного пировиноградной кислоты, и, в дальнейшем, протекает через поэтапное формирование 3-кетоацил-, 3-гидроксиацил-, 2-еноил- и ацил- производных КоА, что подразумевает возможность конверсии соответствующих интермедиатов цикла в линейные алифатические 3-кето-, 3-гидроксифункционализированные, насыщенные и ненасыщенные карбоновые кислоты, а также нормальные спирты и 1,3-диолы в результате гидролиза тиоэфирной связи и/или же восстановления карбоксильной группы под действием подходящих терминирующих тиоэстераз или альдегид/алкоголь дегидрогеназ. Первичную и последующие этапы конденсации ацетил-КоА и ацил-КоА в клетках E. coli способна катализировать ацетил-КоА-С-ацетилтрансфераза AtoB ($K\Phi$ 2.3.1.9), а дальнейшее восстановление 3кетоацил-КоА в 3-гидроксиацил-КоА и формирование 2-еноил-КоА – бифункциональная (S)-3гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа/еноил-КоА-редуктаза FadB (КФ 1.1.1.35/КФ 4.2.1.17). Восстановление 2-еноил-КоА в соответствующее ацил-КоА производное могут обеспечивать как гетерологичные транс-еноил-КоА-редуктазы Ter (КФ 1.3.1.38) Treponema denticola и Euglena gracilis, так и нативные для E. coli ацил-КоА-дегидрогеназа FadE (КФ 1.3.99.3) и еноил-АЦП редуктаза/ацил-КоА-дегидрогеназа FabI (КФ 1.3.1.9) [8-10]. В катализе соответствующей реакции потенциально может принимать участие и ацил-КоА-дегидрогеназа YdiO [11].

В ранее опубликованных работах многократно подтверждена эффективность использования в качестве ферментов, катализирующих начальные стадии обращенного БОЖК, белков E. coli AtoB и FadB. Вместе с тем, возможность и эффективность многократного обращения цикла напрямую зависят от активности ферментов, катализирующих его финальную стадию. При этом данные об эффективности участия Ter, FadE, FabI и YdiO в обращении БОЖК разнятся, не позволяя сделать однозначного выбора в пользу одного из этих ферментов. Это связано с тем, что эффект усиления экспрессии генов, кодирующих соответствующие белки, на продукцию рекомбинантными пролуцентами маркерных соединений оценивался в штаммах не являющихся изогенными и с использованием разных источников углерода [8-10].

Цель работы – оценка эффективности функционального обращения БОЖК в Escherichia coli при действии различных нативных ацил-КоА-дегидрогеназ в едином ранее сконструированном базовом штамме, способном к эффективной продукции 3-гидроксимасляной кислоты из глюкозы в результате однократного частичного обращения цикла.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали рестриктазу Bg/II, ДНК-полимеразу Тад, Т4 ДНК-лигазу ("Thermo Scientific", Литва), а также высокоточную ДНК-полимеразу Кара НіГі ("Roche", Швейцария). ПЦР-продукты очищали электрофорезом в агарозном геле и выделяли с помощью QIAquick Gel Extraction Kit ("Qiagen", США). Олигонуклеотиды ("Евроген", Россия) представлены в табл. 1. Компоненты питательных сред, соли и другие реактивы были произведены фирмами "Panreac" (Испания) и "Sigma" (США).

Бактериальные штаммы, плазмиды и среды. Штамм E. coli K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195) и ранее сконструированный штамм E. coli BOX3.1 Δ4 P_I -atoB P_I -tesB $\Delta yciA$ [12], обозначенный как BOX3.3 ∆4, с измененной регуляцией экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты аэробного β-окисления жирных кислот и тиоэстеразу II, а также лишенный путей смешанно-кислотного брожения и активности неспецифичной тиоэстеразы YciA, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе штаммов. Использованные в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл. 2. Для культивирования бактерий применяли полноценные среды LB, SOB, SOC и минимальную среду М9 [13], при необходимости в них добавляли ампициллин (100 мкг/мл) или хлорамфеникол (30 мкг/мл).

Конструирование штаммов. Введение целевых модификаций в хромосому E. coli осуществляли с использованием методики, описанной ранее [14].

Конструирование фрагментов ДНК для замены нативных регуляторных областей генов fadE, fabI, ydiO и ydiQRST искусственным генетическим элементом $P_{trc-ideal-4}$ -SD $_{\phi 10}$, содержащим сильный LacIзависимый промотор и эффективный сайт связывания рибосом гена о10 из фага Т7, осуществляли в несколько стадий. На первой стадии, с помощью ПЦР были получены фрагменты ДНК, содержащие на 5'-конце участок узнавания Bg/II, затем промотор $P_{trc-ideal-4}$, последовательность SD гена $\phi 10$ из фага T7 и, наконец, 36 нуклеотидов, комплементарных 5'-концам кодирующих областей генов fadE, fabI, ydiO и ydiQRST. Фрагменты получали в два этапа. На первом этапе, с использованием в качестве матрицы плазмиды pMW-O_{lac-ideal}-P_{trc}/O_{lac-ideal}-lacZ [15], был получен фрагмент ДНК, содержащий на 5'-конце участок узнавания Bg/II, затем промотор $P_{trc-ideal-4}$ и часть последовательности SD гена $\phi 10$ из фага Т7. ПЦР проводили с использованием праймеров Р1 и Р2. Полученный ПЦР-продукт служил матрицей в следующих раундах ПЦР с использованием пар праймеров Р1 и Р3, Р1 и Р4, Р1 и Р5, Р1 и Р6. Праймеры Р3, Р4, Р5 и Р6 содержали область комплементарную 3'-концу промотора $P_{trc-ideal-4}$, последовательность SD гена $\phi 10$ из

Таблица 1.	Олигонуклеотидные праймеры, использова	анные в работе
		· · · · · · · · ·

N⁰	Последовательность
P1	5'-tgcgacagatctgaattgtgagcgctcacaattggatc-3'
P2	5'-cttcgctcacaattccacacattataattgtgagcgctcacaatgtcaac-3'
P3	5'-caggacaaccgtagcgagaatactcaaaatcatcatatgtatatctccttcgctcacaattccacacattata-3'
P4	5'-ggttaccagaatgcgcttaccggaaagaaaacccatatgtatatctccttcgctcacaattccacacattata-3'
P5	5'-cagcagttcttgttcttcagttaaagaaaaatccatatgtatatctccttcgctcacaattccacacattata-3'
P6	5'-ttcaggcaccagcttaaagcaggttattattttcat-atgtatatctc-cttc-gctcacaattccacacattata-3'
P7	5'-ctagtaagatcttgaagcctgcttttttatactaagttgg-3'
P8	5'-gtggtcagacctcctacaagtaaggggcttttcgtt-cgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
Р9	5'-caggcacaacaagcatcaacaataaggattaaagctcgctc
P10	5'-tcctgcctgaagcggctcattaacaggagtataatgcgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P11	5'-cggagatggttccgtatgcgactcacaggagaaatccgctcaagttagtataaaaaagctgaac-3'
P12	5'-catcacaagtggtcagacctcc-3'
P13	5'-cagactgctgataaataagctcac-3'
P14	5'-gcaactatagctactcacagccag-3'
P15	5'-gtaggtgaatgccagttcagctc-3'
P16	5'-gaagcggctcattaacaggag-3'
P17	5'-gaaataccgttatccgccag-3'
P18	5'-gcaccgctatcgcacac-3'
P19	5'-gcattgagatcgaactggctg-3'

Таблица 2. Штаммы и плазмиды

Объект	Генотип	Ссылка
Штамм		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
BOX3.3 Δ4	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , $\Delta ackA$ - <i>pta</i> , $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta fadE$, P_L -SD _{$\varphi 10^-$} <i>atoB</i> , $P_{trc-ideal-4}$ -SD _{$\varphi 10^-$} <i>fadB</i> , P_L -SD _{$\varphi 10^-$} <i>tesB</i> , $\Delta yciA$	[12]
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -fadE	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , $\Delta ackA$ - <i>pta</i> , $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, P _L -SD _{$\varphi 10^{-}$} <i>atoB</i> , P _{<i>trc</i>-ideal-4} -SD _{$\varphi 10^{-}$} <i>fadB</i> , P _L -SD _{$\varphi 10^{-}$} <i>tesB</i> , $\Delta yciA$, P _{<i>trc</i>-ideal-4} -SD _{$\varphi 10^{-}$} <i>fadE</i>	Данная работа
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -fabI	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fabI</i>	Данная работа
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4} - y diO$	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , $\Delta ackA$ - <i>pta</i> , $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, P _L -SD _{$\varphi 10^{-}$} <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{$\varphi 10^{-}$} <i>fadB</i> , $\Delta fadE$, P _L -SD _{$\varphi 10^{-}$} <i>tesB</i> , $\Delta yciA$, P _{trc-ideal-4} -SD _{$\varphi 10^{-}$} <i>ydiO</i>	Данная работа
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -ydiO $P_{trc-id-4}$ -ydiQRST	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>ydiO</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>ydiQRST</i>	Данная работа
Плазмида		
pMW118-($\lambda attL$ -Cm- $\lambda attR$)	pSC101, bla, cat, $\lambda attL$ -cat- $\lambda attR$	[16]
$pMW-O_{lac-ideal}-P_{trc}/O_{lac-ideal}-lacZ$	pSC101, bla , $O_{lac-ideal}$ - $P_{trc}/O_{lac-ideal}$ - $lacZ$	[15]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , P _{araB} -λgam-bet-exo	[14]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P _R -λ <i>xis-int</i> , c <i>I</i> ts857	[17]

фага Т7 и 36 первых нуклеотидов из рамок считывания генов fadE, fabI, vdiO и vdiORST, соответственно. Параллельно осуществляли вторую стадию конструирования фрагментов ДНК. Фрагменты ДНК, содержащие участок узнавания BglII, маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген cat) и 36 нуклеотидов, гомологичных участкам ДНК, непосредственно предшествующим кодирующим областям генов fadE, fabI, ydiO и ydiQRST, были получены при помощи ПЦР с использованием пар праймеров Р7 и Р8, Р7 и Р9, Р7 и Р10, Р7 и Р11, и плазмиды pMW118-(attL-Cm-attR) [16] в качестве матрицы. Полученные фрагменты ДНК были обработаны эндонуклеазой рестрикции Bg/II и лигированы Т4 ДНК-лигазой. Продукты лигирования амплифицировали с использованием пар праймеров Р3 и Р8, Р4 и Р9, Р5 и Р10, Р6 и Р11.

Сконструированные фрагменты ДНК были индивидуально интегрированы в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46. Соответствие запланированных и экспериментально полученных нуклеотидных последовательностей нового регуляторного элемента, введенного перед кодирующими областями генов *fadE, fabI, ydiO* и *ydiQRST*, было подтверждено секвенированием с помощью пар праймеров P12 и P13, P14 и P15, P16 и P17, P18 и P19.

Соответствующие индивидуальные генетические модификации были введены в состав хромосом целевых рекомбинантных штаммов с помощью Р1-зависимых трансдукций [13]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [17]. Трансформацию штаммов плазмидами осуществляли по стандартной методике.

Культивирование штаммов. Рекомбинантные штаммы выращивали в течение ночи в среде М9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37°С. По 5 мл полученных ночных культур разбавляли в 10 раз, добавляя 45 мл среды М9, содержащей 10 г/л глюкозы и 10 г/л дрожжевого экстракта. Полученные культуры выращивали в колбах объемом 750 мл на роторной качалке при 250 об./мин в течение 8 ч при 37°С. Для индукции экспрессии генов, находящихся под контролем LacI-зависимого промотора Р_{trc-ideal-4}, спустя 3 ч от начала инкубации в среды культивирования добавляли изопропил-β-Dтиогалактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1.0 мМ. Клеточные суспензии центрифугировали в течение 15 мин при 2000 g при 4°C. Осадки ресуспендировали в 15 мл среды М9, содержащей 10 г/л глюкозы и 1.0 мМ ИПТГ. В дальнейшем культуры инкубировали анаэробно в течение 24 ч в пробирках объемом 15 мл, закрытых завинчивающимися крышками, при 37°С на роторной качалке при 250 об./мин. Клеточные суспензии центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин,

в полученных супернатантах определяли концентрации секретированных метаболитов и остаточной глюкозы. Все эксперименты повторялись не менее трех раз.

Аналитические методы. Концентрации органических кислот в культуральных жидкостях, освобожденных от биомассы центрифугированием, определяли методом ВЭЖХ с использованием системы "Waters" HPLC system (США). Применяли ион-эксклюзионную колонку Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) ("Phenomenex", США) с детекцией при длине волны 210 нм. В качестве подвижной фазы использовали водный раствор серной кислоты (2.5 мМ) со скоростью потока 0.5 мл/мин. Для измерения концентрации глюкозы, система была укомплектована рефрактивным детектором "Waters" 2414 и колонкой Spherisorb-NH2 ("Waters", США). Подвижной фазой служила смесь ацетонитрил-вода в соотношении 75/25 об./об. при скорости потока 1.0 мл/мин.

Концентрации этанола в культуральных жидкостях определяли методом газовой хроматографии на колонке OmegaWax (30 м, 0.25 мм в.д., 0.25 µм толщина пленки, "Supelco", США). Использовали хроматограф GC-17A ("Shimadzu", Япония), оснащенный пламенно-ионизационным детектором и автосамплером AOC-20i.

Для количественного анализа содержания в культуральных жидкостях карбоновых кислот продуктов обращения БОЖК использовали газовый хроматограф GC-2010 Plus ("Shimadzu", Япония), укомплектованный капиллярной колонкой Stabilwax-DA ("Restek", США) длинной 30 м с внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки 0.25 мкм. В качестве газа-носителя служил гелий при постоянной объемной скорости 1.2 мл/мин. Пробы, объемом 0.5 мкл, вводили в испаритель в режиме деления потока 1:20. Температура испарителя и пламенно-ионизационного детектора составляла 150 и 250°С, соответственно. Температурная программа термостата колонки: начальная изотерма – 2 мин при 90° C с последующим линейным градиентом до 200°С со скоростью 10°С/мин и конечной изотермой – 2 мин при 200°С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве базового для оценки эффективности функционального обращения БОЖК при действии различных нативных ацил-КоА-дегидрогеназ был использован ранее сконструированный штамм *E. coli* BOX3.3 Δ 4 [12] (табл. 2). В данном штамме были инактивированы гены *ackA*, *pta, poxB, ldhA* и *adhE*, кодирующие ферменты путей смешанно-кислотного брожения, вовлекающие в побочные реакции пировиноградную кислоту и ее прямое производное — ацетил-КоА —

том 58 № 4 2022

Штамм	Глюкоза, мМ	Пировино- градная кислота, мМ	Уксусная кислота, мМ	Молочная кислота, мМ	Янтарная кислота, мМ	Этанол, мМ
BOX3.3 Δ4	19.8 ± 1.4	0.39 ± 0.04	10.1 ± 0.8	7.0 ± 0.6	2.6 ± 0.2	6.2 ± 0.4
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -fadE	19.6 ± 1.3	0.35 ± 0.03	10.4 ± 0.7	6.8 ± 0.5	2.5 ± 0.2	6.4 ± 0.5
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -fabI	20.3 ± 1.5	0.40 ± 0.03	10.6 ± 0.8	6.6 ± 0.4	2.9 ± 0.3	6.0 ± 0.4
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -ydiO	20.0 ± 1.3	0.47 ± 0.04	9.9 ± 0.7	7.2 ± 0.6	2.7 ± 0.3	6.6 ± 0.5
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -ydiO P _{trc-id-4} -ydiQRST	19.2 ± 1.4	0.45 ± 0.03	9.7 ± 0.7	6.9 ± 0.7	2.6 ± 0.2	6.3 ± 0.5

Таблица 3. Концентрации потребленного субстрата и основных метаболитов, секретированных исследованными штаммами при анаэробной утилизации глюкозы*

* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.

ключевой метаболит прелшественник в реакциях обращенного БОЖК. Кроме того в штамме была усилена экспрессия генов *atoB* и *fadB*, кодирующих ферменты БОЖК, которые обеспечивают формирование 3-гидроксибутирил-КоА из ацетил-КоА, а также экспрессия гена тиоэстеразы II, tesB, способной служить терминирующим ферментом, обеспечивающим формирование карбоновых кислот из ацил-КоА-интермедиатов БОЖК. В штамме был инактивирован ген неспецифичной тиоэстеразы YciA с целью дополнительного снижения конкурентной конверсии ацетил-КоА в уксусную кислоту, а также инактивирован ген основной ацил-КоА-дегидрогеназы, *fadE*, с целью предотвращения множественного обращения БОЖК. В результате, при ферментации в пробирках штамм был способен к синтезу из глюкозы до ~6 мМ 3-гидроксимасляной кислоты в микроаэробных и до ~4 мМ 3-гидроксимасляной кислоты в анаэробных условиях за счет частичного однократного обращения БОЖК [12].

Реакции обращенного БОЖК, катализируемые 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназой и ацил-КоА дегидрогеназой, являются НАДН-потребляющими. Таким образом, анаэробные условия, исключающие интенсивное окисление восстановленных эквивалентов в дыхательной электрон-транспортной цепи с участием кислорода в качестве терминального акцептора электронов, являются более предпочтительными для поддержки многократного обращения цикла. Поэтому эффективность обращения БОЖК в исследуемых штаммах оценивали по концентрациям маркерных соединений, секретированных рекомбинантами в анаэробной стадии двух-фазной аэробно-анаэробной ферментации. Соответствующий процесс культивирования, включающий аэробную стадию накопления биомассы с последующей анаэробной продуктивной стадией, был выбран потому, что штаммы *Е. coli*, дефицитные по путям смешанно-кислотного брожения, не способны к анаэробному росту [17],

однако сохраняют метаболическую активность в отсутствие аэрации.

При анаэробной утилизации глюкозы базовый штамм BOX3.3 $\Delta 4$ синтезировал уксусную и молочную кислоты, а также этанол (табл. 3) в качестве основных продуктов потребления углеродного субстрата, не секретируя при этом, в силу делеции гена *fadE*, детектируемых количеств продуктов полного и, тем более, многократного обращения БОЖК (табл. 4).

Следует отметить, что секреция штаммом карбоновых кислот производных ацил-КоА отсутствовала, несмотря на наличие в хромосоме интактных генов fabI и ydiO. Это указывало на то, что природные уровни экспрессии соответствуюших генов не могли обеспечить в клетке активность ацил-КоА-дегидрогеназы достаточную для полного функционального обращения БОЖК. Действительно, в случае FabI ацил-КоА-дегидрогеназная активность является побочной по отношению к основной еноил-АЦП-редуктазной активности этого белка [18] и для обеспечения эффективного восстановления кротонил-КоА, необходимого для обращения БОЖК в рекомбинантных штаммах, требуется усиление экспрессии гена fabI [10]. С другой стороны, экспрессия гена vdiO, кодирующего ацил-КоА дегидрогеназу анаэробного БОЖК [11], может быть репрессирована в присутствии кислорода [19]. Аэробные условия, использованные для накопления биомассы штамма BOX3.3 $\Delta 4$, препятствовали, таким образом, формированию в клетках в стадии роста такого уровня соответствующего белка, который был бы достаточен для его эффективного действия в последующей биосинтетической стадии. Кроме того, при отсутствии в среде жирных кислот экспрессия генов fad-регулона, в том числе fadE, репрессируется в E. coli транскрипционным регулятором FadR и активность соответствующих ферментов в клетке резко ограничена [20]. В совокупности, это указывало на то, что для

Штамм	Масляная кислота, мкМ	Капроновая кислота, мкМ	Каприловая кислота, мкМ
ΒΟΧ3.3 Δ4	—	—	—
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -fadE	510.7 ± 48.5	14.6 ± 1.9	11.1 ± 1.5
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -fabI	471.3 ± 40.1	55.9 ± 6.7	28.8 ± 3.8
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -ydiO	—	—	—
BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -ydi $O P_{trc-id-4}$ -ydi $QRST$	162.1 ± 15.4	9.6 ± 1.2	7.2 ± 1.0

Таблица 4. Концентрации алифатических четырех- — восьмиуглеродных карбоновых кислот, секретированных исследованными штаммами при анаэробной утилизации глюкозы в результате функционального обращения бета-окисления жирных кислот*

* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.

обеспечения в клетках рекомбинантов активностей ацил-КоА-дегидрогеназ, необходимых для эффективного обращения БОЖК, усиление экспрессии соответствующих генов являлось обязательным условием.

В штамме BOX3.3 Δ4 экспрессия генов ацетил-КоА-С-ацетилтрансферазы, *atoB*, и тиоэстеразы II, tesB, контролировалась промотором P_{I} фага лямбда, являющегося одним из "сильнейших" для E. coli, в то время как перед геном 3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы, *fadB*, был расположен промотор Р_{trc-ideal-4}, несколько уступающий по "силе" Р_L-промотору [15]. Соответствующие промоторы, в составе искусственных регуляторных элементов, содержащих эффективный сайт связывания рибосом гена $\varphi 10$ из фага T7, были расположены перед указанными генами для обеспечения, в первую очередь, возможности эффективной инициации обращения БОЖК и последующего формирования детектируемых продуктов из КоА-интермедиатов цикла, тогда как интенсивность протекания промежуточных реакций могла быть несколько снижена. Таким образом, с целью предотвращения потенциального дисбаланса между инициацией обращения БОЖК, формированием интермедиатов цикла и синтезом конечных продуктов, природные регуляторные области генов fadE, fabI и ydiO в штаммах производных ВОХ3.3 Δ4 были также заменены искусственным регуляторным элементом $P_{trc-ideal-4}$ -SD_{ϕ 10}.

Все соответствующие рекомбинанты формировали при анаэробной утилизации глюкозы профили основных секретированных метаболитов, сходные с таковым, продемонстрированным родительским штаммом ВОХЗ.З $\Delta 4$ (табл. 3). Основными продуктами утилизации глюкозы, сформированными штаммами, являлись уксусная кислота и этанол, выходы которых составляли ~0.5 и ~0.3 моль/моль, а также молочная кислота, выход которой достигал ~0.35 моль/моль.

Секреция штаммами значительной доли потребленной глюкозы в виде уксусной кислоты и

дило количество сформированных ими шести- и восьмиуглеродных карбоксилатов. По-видимому, это было связано, в первую очередь, с недостаточно высокой специфичностью ацетил-КоА-С-ацетилтрансферазы АtoВ к ацил-КоА-субстратам, содержащим в углеводородной цепи более 4 атомов углерода [21]. Действительно, этот фермент предпочтительно принимает участие в катализе терминальных стадий деградации липидов, тогда как в расщепление более высокомолекулярных интермедиатов вовлекается 3-кетоацил-КоА-тиолаза FadA [21].
 Использованные в настоящей работе рекомбинантные продуценты являлись модельными, тогда как при конструировании промышленных штаммов указанная проблема может быть решена при совместном усилении в клетках экспрессии генов *atoB* и *fadA* под контролем промоторов обладающих различной силой и регуляцией. Тем не менее, полученные данные позволяли заключить, что использование FabI в качестве ацил-КоА-дегидро-

погда как при конструировании промышленных штаммов указанная проблема может быть решена при совместном усилении в клетках экспрессии генов *atoB* и *fadA* под контролем промоторов обладающих различной силой и регуляцией. Тем не менее, полученные данные позволяли заключить, что использование FabI в качестве ацил-КоА-дегидрогеназы в большей степени способствует многократному обращению БОЖК, нежели применение с данной целью FadE. Действительно, количество синтезированных штаммом BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -*fabI* капроновой и каприловой кислот в 3.8 и 2.6 раз превосходило аналогичные показатели штамма BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -*fadE*. Однако, в настоящее время фер-

этанола, являющихся прямыми производными

ацетил-КоА, ключевого предшественника в ре-

акциях обращенного БОЖК, а также молочной

кислоты, являющейся, наряду с этанолом, про-

дуктом НАДН-потребляющих реакций, указывала на невысокую интенсивность функционирования в

рекомбинантах целевого биосинтетического пути.

Тем не менее, штаммы BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -fadE и

ВОХ3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -fabI секретировали заметные ко-

личества масляной, капроновой и каприловой кис-

лот (табл. 4), являющихся четырех-, шести- и вось-

миуглеродными продуктами полноценного однократного, двухкратного и трехкратного обращений БОЖК. При этом количество синтезированной

штаммами масляной кислоты кратно превосхо-

ментативные свойства FadE и FabI, как ацил-КоА-дегидрогеназ/еноил-КоА-редуктаз, изучены мало. Сообщалось о значительно различающихся показателях специфической ацил-КоА-дегидрогеназной активности для этих белков, составляющей 0.019 и 0.001 мкмоль/мг/мин для FadE и FabI в отношении бутирил-КоА для штаммов, экспрессирующих соответствующие гены в составе идентичных базовых плазмид [10]. При этом данные о константе Михаэлеса в отношении кротонил-КоА, полученные для очищенного варианта рекомбинантного FabI, свидетельствующему субстрату.

Таким образом, с точки зрения прикладной биотехнологии, достижение эффективного обращения БОЖК должно основываться, на наш взгляд, на направленной манипуляции уровнями экспрессии ключевых генов с анализом эффективности конверсии субстрата в целевые продукты для последующего выбора стратегии рационального конструирования промышленных продуцентов, а не на данных об их ферментативной активности. Вместе с тем, сообщалось о специфической активности YdiO в отношении бутирил-КоА, составляющей 0.003 мкмоль/мг/мин, что сравнимо с показателем FabI [10]. Однако, штамм BOX3.3 Д4 Р_{trc-id-4}-ydiO при анаэробной утилизации глюкозы не синтезировал заметных количеств маркерных соединений, свидетельствующих о полном функциональном обращении БОЖК (табл. 4). Ацил-КоА-дегидрогеназа, принимающая участие в E. coli в анаэробном БОЖК, является, по аналогии с клостридиями, сложным ферментативным комплексом, вовлекающим в свое функционирование флавопротеины, обеспечивающие транспорт электронов к терминальному акцептору. Соответствующие белки в *E. coli* кодируют гены оперона ydiQRST [11], поэтому для обеспечения активности анаэробной ацил-КоА-дегидрогеназы YdiO экспрессия генов данного оперона была дополнительно усилена в клетках штамма ВОХЗ.З Δ4 Р_{trc-id-4}-ydiO. Итоговый рекомбинант BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -ydiO $P_{trc-id-4}$ -ydiQRST синтезировал полный спектр продуктов трехкратного обращения БОЖК (табл. 4) с эффективностью, тем не менее, сниженной по отношению к штаммам BOX3.3 Δ4 $P_{trc-id-4}$ -fadE и BOX3.3 Δ 4 $P_{trc-id-4}$ -fabI. В данной связи нельзя было исключить необходимости участия других коллатеральных ферментов в обеспечении максимальной функциональной активности в *Е. coli* анаэробной ацил-КоА-дегидрогеназы YdiO/YdiQRST, аналогичной таковой, принимающей участие в консервации энергии в клетках облигатных анаэробов и требующей скоординированного действия множества ферментов, вовлеченных в поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного гомеостаза [22]. С учетом сложности обеспечения полноценной функциональной активности анаэробной ацил-КоА-дегидрогеназы для обращения БОЖК в клетках рекомбинантов, полученные данные свидетельствовали о предпочтительном использовании аэробных ферментов для форсированной инверсии данного пути в биосинтетическую сторону.

В результате проведенных исследований охарактеризована способность нативных ацил-КоАдегидрогеназ обеспечивать в рекомбинантных штаммах *E. coli* многократное обращение БОЖК для потенциальной продукции востребованных промышленностью соединений. Установлено, что максимальная эффективность оборачиваемости цикла достигается повышением уровня экспрессии в рекомбинантных штаммах гена, кодирующего еноил-АЦП-редуктазу/ацил-КоА-дегидрогеназу FabI. Альтернативой может служить усиление экспрессии гена ацил-КоА дегидрогеназы FadE при соблюдении оптимального баланса между активностями ферментов, вовлеченных в целевой биосинтетический путь.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-08059). (18-29-08059).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Park J., Rodríguez-Moyá M., Li M., Pichersky E., San K.Y., Gonzalez R. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 39. № 11. P. 1703–1712.
- 2. Martin C.H., Dhamankar H., Tseng H.C., Sheppard M.J., Reisch C.R., Prather K.L. // Nat. Commun. 2013. V. 4. № 1414.

https://doi.org/10.1038/ncomms2418

- Zhang K., Sawaya M.R., Eisenberg D.S., Liao J.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 52. P. 20653–20658.
- Clomburg J.M., Blankschien M.D., Vick J.E., Chou A., Kim S., Gonzalez R. // Metab. Eng. 2015. V. 28. P. 202– 212.
- Cheong S., Clomburg J.M., Gonzalez R. // Nat. Biotechnol. 2016. V. 34. № 5. P. 556–561.
- Zhou S., Hao T., Xu S., Deng Y. // Biotechnol. Adv. 2020. V. 43. № 107575. doi.org/ https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107575
- 7. *Kim S., Cheong S., Chou A., Gonzalez R. //* Curr. Opin. Biotechnol. 2016. V. 42. P. 206–215.
- Gulevich A.Y., Skorokhodova A.Y., Sukhozhenko A.V., Shakulov R.S., Debabov V.G. // Biotechnol. Lett. 2012. V. 34. № 3. P. 463–469.
- Clomburg J.M., Vick J.E., Blankschien M.D., Rodríguez-Moyá M., Gonzalez R. // ACS Synth. Biol. 2012. V. 1. P. 541–554.
- Vick J.E., Clomburg J.M., Blankschien M.D., Chou A., Kim S., Gonzalez R. // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. № 4. P. 1406–1416.
- 11. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. // Генетика. 2016. Т. 52. № 10. С. 1210–1214.

- Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 2. С. 117–126.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed., N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
- 14. *Datsenko K.A., Wanner B.L.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
- Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Биотехнология. 2006. Т. 3. С. 6–16.
- Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2005. Т. 39. № 5. С. 823–831.

- Fischer C.R., Tseng H.C., Tai M., Prather K.L., Stephanopoulos G. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 88. Nº 1. P. 265–275.
- Bergler H., Wallner P., Ebeling A., Leitinger B., Fuchsbichler S., Aschauer H., Kollenz G., Högenauer G., Turnowsky F. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. № 8. P. 5493– 5496.
- 19. Cho B.K., Knight E.M., Palsson B.Ø. // Microbiology. 2006. V. 152. № 8. P. 2207–2219.
- 20. 24. Fujita Y., Matsuoka H., Hirooka K. // Mol. Microbiol. 2007. V. 66. № 4. P. 829–389.
- 21. *Clark D.P., Cronan J.E.* // EcoSal Plus. 2005. V. 1 № 2. https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.4.4
- 22. *Buckel W., Thauer R.K.* // Chem. Rev. 2018. V. 118. № 7. P. 3862–3886.

Evaluation of the Efficiency of Functional Reversal of the Fatty Acid β-Oxidation in *Escherichia coli* upon the Action of Various Native Acyl-CoA Dehydrogenases

A. Yu. Gulevich^{a, *}, A. Yu. Skorokhodova^a, and V. G. Debabov^a

^a Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia *e-mail: andrey.gulevich@gmail.com.ru

Using Escherichia coli strain MG1655 lac I^Q , $\Delta ackA$ -pta, $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta fadE$, P_L -SD_{$\varphi 10^-$} atoB, $P_{tre-ideal-4}$ -SD_{$\varphi 10^-$} fadB, P_L -SD_{$\varphi 10^-$} tesB, $\Delta yciA$ as a core strain, the efficiency of the reversal of fatty acid β -oxidation upon the action of native cellular enzymes capable of serving as acyl-CoA dehydrogenases was examined. Increased expression of *fadE*, *fabI*, and *ydiO*/*ydiQRST* genes encoding the corresponding enzymes was ensured in derivatives of the core strain by the substituting of their native regulatory regions with the artificial regulatory element $P_{tre-ideal-4}$ -SD_{$\varphi 10^-$}. A three-turns reversal of the cycle in the engineered recombinants was demonstrated that was accompanied by the considerable secretion of butyric, caproic, and caprylic acids. The highest level of six- and eight-carbon carboxylates production was achieved upon the overexpression of the *fabI* gene, while the lowest levels of secretion of the corresponding compounds were demonstrated by the strain with the enhanced expression of the *ydiO* and *ydiQRST* genes. The recombinant with the individually enhanced expression of *ydiO* solely did not produce detectable amounts of the derivatives of the complete and successful β -oxidation reversal.

Keywords: acyl-CoA dehydrogenase, fatty acid β -oxidation, metabolic engineering, Escherichia coli

УДК 579.69

АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ КАК МЕТОД ОЦЕНКИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ РИСКОВ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ КЛИМАТА¹

© 2022 г. Ю. О. Гончарова^{1, *}, А. Г. Богун¹, И. В. Бахтеева¹, Г. М. Титарева¹, Р. И. Миронова¹, Т. Б. Кравченко¹, Н. А. Остарков², А. В. Брушков^{3, 4}, В. С. Тимофеев¹, С. Г. Игнатов^{1, **}

 ¹Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Серпухов, р. п. Оболенск, Московская обл., 142279 Россия
 ²Востокгосплан Минвостокразвития РФ, Хабаровск, 680000 Россия
 ³МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия
 ⁴Тюменский Государственный университет, Тюмень, 625003 Россия
 *e-mail: iulia.belay@yandex.ru
 **e-mail: ignatov@obolensk.org
 Поступила в редакцию 11.02.2022 г. После доработки 18.02.2022 г.

Принята к публикации 28.02.2022 г.

Климатические изменения приводят к появлению рисков возникновения особо опасных инфекций. На примере изучения аллельного полиморфизма генов факторов патогенности возбудителя сибирской язвы показана возможность оценки патогенного потенциала бактерий, что является необходимым условием оценки микробиологических рисков. Впервые исследован аллельный полиморфизм capBCADE-оперона (гены capB, capC, capA, capD, capE), кодирующего белки биосинтеза капсулы Bacillus anthracis, и генов acpA и acpB, кодирующих регуляторы экспрессии этого оперона. У штаммов исследуемой выборки описан ряд однонуклеотидных замен (SNP): 5 SNP в гене *сарВ*, 3 в *capC*, 4 в *capA*, 14 в *capD*, 2 в *capE*, 15 в *acpB*, а также 7 SNP и одна инсерция в гене *acpA*. В результате выборка разбита на сиквенс-типы по каждому гену и 17 генотипов, которые являются комбинациями выявленных сиквенс-типов. Трансляция in silico обнаруженных аллелей исследуемых генов позволила выявить у белков СарВ и СарА по 3 изоформы, у белков СарС и СарЕ – по 2 изоформы, 6 изоформ у белка CapD, 5 у AcpA и 4 у AcpB. Обнаружено, что SNP *capC* $351A \rightarrow G$ является маркером штаммов группы A.Br.Aust94. Штаммы группы A.Br.Vollum согласно результатам делятся на две подгруппы. Штаммы эволюционных линий В и С отличались от штаммов линии А наличием SNP $acpA 853G \rightarrow A$. Обнаружен ранее не описанный вариабельный тандемный нуклеотидный повтор – VNTR (Variable Number Tandem Repeat) в гене *асрА* и показана возможность его использования для дифференцирования и генотипирования штаммов *B. anthracis*.

Ключевые слова: Bacillus anthracis, аллельный полиморфизм генов, *capBCADE*-оперон, MLVA-генотипирование

DOI: 10.31857/S0555109922040055

Сценарии изменения климата прогнозируют повышение среднегодовой температуры воздуха во всем мире. Эти климатологические изменения могут иметь важные последствия возникновения микробиологических рисков. Из-за особенностей радиационно-теплового баланса Арктика больше, чем другие регионы, подвержена климатическим изменениям. Арктическая экосистема, резервуар генетического микробного разнообразия, представляет собой практически неограниченный источник микроорганизмов, которые могут взаимодействовать с людьми. Повышение температур, таяние вечной мерзлоты и морского льда и связанные с ними преобразования биосферы, в частности, ускорение микробиологических процессов, могут привести к тому, что ранее географически ограниченные заболевания смогут неожиданно возникать в экономически активных арктических зонах. Возникают риски высвобождения из вечной мерзлоты микроорганизмов, к встрече с которыми люди могут быть не готовы, в том числе возбудитель сибирской язвы. В настоящее время имеется мало информации о встречаемости в арктической зоне

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0555109922040055 для авторизованных пользователей.

фенотипов, проявляющих вирулентность. Исследуемые микробные фенотипы позволяют оценить факторы, влияющие на вирулентность штаммов в окружающей среде Арктики, а также потенциальные риски, связанные с изменениями в полярных районах в свете изменения климата [1].

Возбудитель сибирской язвы — Bacillus anthracis — является спорообразующей грамположительной бактерией, которая главным образом поражает копытных млекопитающих, но может передаваться и другим теплокровным животным, в том числе и человеку [2].

Отличительной особенностью B. anthracis является наличие двух плазмид вирулентности рХО1 и рХО2, обуславливающих специфичность возбудителя в отношении организма хозяина и несущих генетические детерминанты основных факторов патогенности [3]. На плазмиде рХО1 расположены гены pagA, lef и cya, кодирующие компоненты сибиреязвенного токсина - протективный антиген, летальный и отечный факторы [4]. На плазмиде рХО2 расположен оперон *сарВ*-*CADE*, кодирующий ферменты синтеза капсулы В. anthracis, состоящей из поли-ү-D-глутаминовой кислоты [5]. Гены сар-оперона располагаются в следующем порядке: *capB*, *capC*, *capA*, *capD*, capE и кодируют соответствующие белки у *B. an*thracis: CapB, CapC, CapA, CapD, CapE [6]. Предположительно, эти белки ответственны за биосинтез капсулы, а также транспорт и прикрепление остатков D-глутаминовой кислоты на поверхности бактериальных клеток [7, 8]. На плазмиде рХО2 также локализованы гены *асрА* и *асрВ*, которые кодируют белки АсрА и АсрВ с частично перекрывающейся функцией. АсрА и АсрВ независимо положительно контролируют транскрипцию cap-oneрона и многих других генов [5, 9]. Штаммы B. anthracis, имеющие в составе генома обе плазмиды, являются вирулентными для людей и животных.

Способность к формированию спор обуславливает важные особенности жизненного цикла B. anthracis. В состоянии споры бактериальные клетки способны пребывать в жизнеспособном состоянии десятки и сотни лет [2]. Помимо формирования почвенных очагов на месте гибели больных сибирской язвой животных, существует риск получения зараженного спорами животного сырья, такого как шерсть или шкуры, и распространения его на большие расстояния антропогенным путем. Все это привело к повсеместному распространению сибирской язвы в районах с развитым животноводством. Кроме того, существует гипотеза об антропогенном распространении спор сибирской язвы вместе с перемещением домашнего скота во времена монгольского нашествия [10].

Особенно важным является увеличение рисков появления вспышек сибирской язвы в Арктической зоне РФ, связанных с климатическими изменениями. Длительная сохраняемость спор в почве и на предметах обихода приводит к возможности возникновения вспышек данного заболевания (особенно при изменении климата), а в некоторых случаях и крупных эпизоотий, как это произошло летом 2016 г. на полуострове Ямал. Данная вспышка стала причиной гибели более 2000 северных оленей и одного человека, а также привела к заболеванию 10 человек [10, 11]. Еще одним интересным событием являлось обнаружение мумий пещерных львят в Якутии, под которыми на различной глубине в почве были выявлены как минимум три штамма вида *B. anthracis* [10].

Климатические изменения приводят к необходимости изучения причин возникновения вспышек и всестороннего исследования микроорганизма с целью предотвращения заболеваемости. Одной из сторон таких исследований является изучение вероятного происхождения штамма, вызвавшего заболевание. Для выяснения происхождения того или иного штамма микроорганизмов используется ряд молекулярных методов диагностики (филогенетические исследования).

В случае с возбудителем сибирской язвой важно учитывать, что микроорганизм возник относительно недавно (примерно 12-26 тыс. лет назад) [12] и большую часть жизненного цикла проводит в состоянии споры. Вследствие этого вид B. anthracis отличается слабовыраженным генетическим полиморфизмом, что не позволяет разделить его на подвиды и составляет большую сложность для филогенетических исследований. Кроме того, *B. anthracis* вместе с другими представителями рода Bacillus является членом группы Bacillus cereus, в состав которой входят девять крайне близкородственных на генетическом уровне видов [13]. Все это приводит к необходимости дифференцирования возбудителя сибирской язвы от других видов, а также выявления различий между штаммами.

В настоящее время существует ряд методов генотипирования, позволяющих составить генетический портрет штамма. К одним из основных относят canSNP-генотипирование, основанное на определении нуклеотида в одном из 14 положений на хромосоме в геноме *B. anthracis* – так называемых канонических SNP (canSNP). С помощью этого метода глобальная популяция возбудителя сибирской язвы была разделена на три основные эволюционные линии – А, В и С, среди которых выделяют 14 canSNP-групп, имеющих в некоторых случаях привязку к географическому региону [14, 15]. Вторым по значимости методом можно назвать подход MLVA-генотипирования

(Multiple Locus VNTR Analysis – мультилокусный анализ вариабельных нуклеотидных тандемных повторов), основанный на определении числа тандемных повторов в ряду описанных VNTR-локусов (Variable Number Tandem Repeat – вариабельные тандемные нуклеотидные повторы), большинство из которых расположено на хромосоме [16]. При этом предложено использовать несколько локусов, имеющих плазмидную локализацию, хотя они имеют небольшую длину повтора, равную двум-трем парам нуклеотидов (п.н), что обуславливает необходимость дорогостоящего оборудования для определения числа таких повторов в локусе. В совокупности эти методы позволяют быстро и с высоким разрешением получить информацию о филогенетическом положении исследуемого штамма [14].

Поскольку B. anthracis является патогенным микроорганизмом, закономерно возникает вопрос о необходимости всестороннего изучения факторов его патогенности. Например, роль различных аминокислотных остатков в последовательностях белков-факторов патогенности и полиморфизм генов, кодирующих эти факторы, в глобальной популяции вида. Такой подход позволил бы не только внести вклад в изучение структур белков-факторов патогенности, но и применить полученные данные для генотипирования штаммов на основе полиморфизма изучаемых генов. В настоящий момент нет работ, в которых был бы описан полиморфизм генов факторов патогенности, расположенных на плазмиде рХО2, у штаммов *B. anthracis*.

Цель работы — описание полиморфизма генов *capBCADE*-оперона, кодирующих белки биосинтеза капсулы, и генов *acpA* и *acpB*, кодирующих регуляторные белки биосинтеза капсулы, на основе данных полногеномного секвенирования *B. anthracis*, а также использование результатов для генотипирования, дифференцирования и филогенетических исследований штаммов.

МЕТОДИКА

Штаммы. В работе исследованы 77 штаммов *B. anthracis* и 2 штамма *B. cereus*, имеющих различное географическое происхождение (табл. 1). При этом 37 штаммов были выделены на территории России и сопредельных государств, и депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора (ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Другие 40 штаммов *B. anthracis*, 1 штамм *B. cereus* biovar *anthracis* и 1 штамм *B. cereus*, геномы которых депонированы в базе данных GenBank, были включены в выборку в качестве аутгруппы. Для всех исследуемых штаммов *B. anthracis* ранее была определена canSNP-группа.

Праймеры. В качестве ПЦР-праймеров для амплификации локуса VNTRacpA использовали VNTRacpAF – 5'-ATAGGGAAACAACATA-ATATAAA-3' и VNTRacpAR – 5'-TATTTGCTTG-CAAAGATTCCTA-3'.

Полногеномное секвенирование. Культуры штаммов *B. anthracis* выращивали на твердой питательной среде ГРМ-агар (ГНЦ ПМБ, Россия) в течение 12 ч при 37°С. Геномная ДНК была выделена с помощью набора "Genomic DNA Purification Kit" ("Thermo Fisher Scientific", США). Библиотеки были подготовлены с помощью набора "Nextera DNA Library Preparation Kit" ("Illumina", США). Полногеномное секвенирование осуществляли с использованием приборов "MiSeq" ("Illumina", США) и "Ion Torrent PGM" ("Thermo Fisher Scientific", США) и соответствующих наборов реагентов: "Miseq Reagent Kit v3" ("Illumina", США), "Ion PGM Reagents 400 Kit", "Ion 318 Chip Kit" ("Thermo Fisher Scientific", США).

Обеззараживание материала проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 и МУ 1.3.2569-2009.

Биоинформатический анализ. Сборки нуклеотидных последовательностей исследуемых генов по результатам полногеномного секвенирования осуществляли с использованием программного пакета Lasergene ("Dnastar", США) (dnastar.com). В качестве референсного генома, на последовательность которого осуществляли сборку, использовали геном штамма *B. anthracis* Ames Ancestor (GenBank: GCA_000008445.1).

Поиск нуклеотидных последовательностей штаммов *B. anthracis* и *B. cereus*, геномы которых депонированы в GenBank, проводили с использованием программы BLAST (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/blast).

Трансляцию *in silico* нуклеотидных последовательностей в аминокислотные и множественные выравнивания осуществляли с помощью программного пакета MEGA 7.0 (http://www.megasoftware.net).

Филогенетический (кластерный) анализ проводили с помощью программного пакета MEGA 7.0. Филогенетические древа (дендрограммы) были построены с использованием метода невзвешенного попарного среднего (UPGMA). Для филогенетического анализа использовали слитые *in silico* последовательности исследуемых генов.

MLVA-генотипирование. MLVA-генотипирование (multiple locus variable number tandem repeats analysis) проводили согласно протоколу, описан-

	Номер доступа в GenBank**	7	GCA_002277915.1	GCA_000512835.2	GCA_001543225.1	GCA_001654475.1	GCA_000742875.1	GCA_000832665.1	GCA_000832465.1	GCA_000534935.2	SRR2968157	GCA_000258885.1	SRR2968187	SRR2968188	GCA_001277955.1	GCA_000833275.1	GCA_000875715.1	GCA_000831505.1	GCA_003227955.1	GCA_002356575.1	GCA_000008445.1	GCA_000022865.1	GCA_000006155.2	GCA_000832505.1
из GenBank	canSNP-группа	9	A.Br.001/002	A.Br.001/002	A.Br.001/002	A.Br.001/002	A.Br.001/002	A.Br.003/004	A.Br.005/006	A.Br.005/006	A.Br.005/006	A.Br.005/007	A.Br.005/006	A.Br.005/006	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.011/009	A.Br.011/009	A.Br.011/009	A.Br.Ames	A.Br.Ames	A.Br.Ames	A.Br.Ames	A.Br.Aust94
IIITaMMbI	Географическое происхождение	5	Германия	Китай	Германия	Бангладеш	Ямайка	CIIIA	ЮАР	Замбия	Танзания	Корея	Танзания	Танзания	Греция	Турция	Аргентина	Италия	Великобритания	Япония	CIIIA	CIIIA	CIIIA	CIIIA
	ШTaMM	4	14RA5914	A16	Stendal	Tangail-1	BFV	BA1015	K3	CZC5	A0135	H9401	A2075	A2079	Larissa	Turkey32	A1144	Pollino	London 499	Shikan-NIID	Ames Ancestor	A0248	A2012	Ohio ACB
	canSNP-rpyIIIIa	3	A.Br.001/002	A.Br.001/002	A.Br.001/002	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011	A.Br.008/011
Штаммы из рабочей коллекции	Географическое происхождение	2	ЯНАО	Казахстан	Чечено-Ингушетия	Волгоградская обл.	<u></u> <u> </u>	Украина	Карачаево-Черкессия	Ставропольский край	Узбекистан	Тульская обл.	Чечено-Ингушетия	Чечено-Ингушетия	Чечено-Ингушетия	Калмыкия	Воронежская обл.	Оренбургская обл.	Украина	Азербайджан	Новгородская область	Татарстан	Чечено-Ингушетия	Якутия
	III TAMM *		I-271	34(738)	52/33	1273	53169	1(14) Stavropol	1030/213	1056/51	219/6	367/17	8 46/27	47/28	48/29	531/17	546/714	555/288	644/268	68/12	7(992)	8(2099)	914/213	LP50/3YA

Таблица 1. Перечень исследуемых штаммов и географические точки их выделения

341

АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ

	Штаммы из рабочей коллекции			Штаммы н	13 GenBank	
III TAMM *	Географическое происхождение	canSNP-rpyIIIIa	ШTaMM	Географическое происхождение	canSNP-группа	Номер доступа в GenBank**
LP51/4YA	Якутия	A.Br.008/011	Kanchipuram	Индия	A.Br.Aust94	GCA_014249775.1
1183	Кабардино-Балкарская республика	A.Br.008/011	K1285	Намибия	A.Br.008/011	SRR2071843
1298	Волгоград	A.Br.008/011	A3716	Намибия	A.Br.Aust94	SRR2968149
1173	Ставропольский край	A.Br.Aust94	SK-102	CIIIA	A.Br.Vollum	GCA_000832565.1
1259	Ставропольский край	A.Br.Aust94	Vollum 1B	CIIIA	A.Br.Vollum	GCA_000832445.1
1199	Дагестан	A.Br.Aust94	Vollum	CIIIA	A.Br.Vollum	GCA_000742895.1
331/214	Азербайджан	A.Br.Aust94	CDC 684	CIIIA	A.Br.Vollum	GCA_000021445.1
822/7	Чечено-Ингушетия	A.Br.Aust94	Canadian bison	Канада	A.Br.WNA	GCA_000833125.1
11(1940)	Туркменистан	A.Br.Vollum	BA1035	ЮАР	B.Br.001/002	GCA_000832725.1
15(1345)	Таджикистан	A.Br.Vollum	HYU01	Корея	B.Br.001/002	GCA_000725325.1
157(B-1107)	Эстония	B.Br. 001/002	SVA11	Швеция	B.Br.001/002	GCA_000583105.1
I-364	Сибирь	B.Br.001/002	Tyrol 4675	Австрия	B.Br.CNEVA	GCA_001936375.1
LP53/5YA	Якутия	B.Br.001/002	RA3	Франция	B.Br.CNEVA	GCA_000832745.1
Yamal-2	Ямал	B.Br.001/002	BF1	Германия	B.Br.CNEVA	GCA_000295695.2
44	Н/Д***	B.Br.CNEVA	170D930	Швейцария	B.Br.CNEVA	GCA_006088855.1
			Pasteur	Π/Н	A.Br.011/009	GCA_000832585.1
			2002013094	CIIIA	C.Br.001	GCA_000832965.1
			2000031021	CIIIA	C.Br.001	GCA_000742655.1
			B. cereus BC-AK	Китай	-	GCA_002117465.1
			B. cereus bv. anthracis CI	Кот-д'Ивуар	Ι	GCA_000143605.1
L *		***			ı ı	

ч номер доступа к последовательности генома или к архиву с необработанными результатами полноге-* Перечислены штаммы *В. апіһracis*, если не указан другой вид; ** номного секвенирования; *** H/J — нет данных.

342

Таблица 1. Окончание

ГОНЧАРОВА и др.

ному в работе [17] с использованием сконструированных в данной работе праймеров.

ПЦР осуществляли для амплификации VNTR-локуса с использованием набора "Taq DNA Polymerase" ("Thermo Fisher Scientific", США). Состав ПЦР-смеси: $10 \times$ ПЦР-буфер; MgCl₂ – 2.5 мM; дНТФ – 0.2 мМ; праймеры – по 10 пмоль каждого на реакцию; Taq-ДНК-полимераза – 1 ед.; в качестве источника матрицы добавляли по 1 мкл раствора ДНК исследуемых штаммов в TE-буфере (5–20 нг); H₂O – до 25 мкл. В качестве отрицательного контроля амплификации использовали TE-буфер. Амплификацию проводили на приборе "T100 Thermal Cycler" ("Bio-Rad", CША).

Определение длины амплифицированного фрагмента проводили методом гель-электрофореза, рассчитывая результаты путем подсчета числа повторов в VNTR-локусе. Гель-электрофорез проводили в 3%-ном агарозном геле ("Хеликон", Россия) в 0.5×TBE-буфере с последующим окрашиванием в водном растворе бромистого этидия (100 мг/л). Результаты регистрировали с использованием трансиллюминатора "ECX-F15.L" ("Vilber ourmat", Франция) при длине волны 254 нм и системы гель-документирования "Взгляд" ("Хеликон", РФ), а также программного обеспечения "IC Measure" ("Imaging Source Europe GmbH", Германия).

Размер фрагмента определяли с помощью маркера молекулярных масс "EZ Load 20 bp Molecular Ruler" ("Bio-Rad", США) с использованием программы "PhotoCamptMw 99.04" ("Vilber Lourmat", Франция).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аллельный полиморфизм. В работе были исследованы 77 штаммов возбудителя сибирской язвы, в том числе штаммы, выделенные на месте крупной эпизоотии среди северных оленей на полуострове Ямал (Россия) летом 2016 г. и штаммы, выделенные из вечной мерзлоты из почвы в Якутии [10, 11]. При этом в выборку также были включены штаммы *B. cereus*, содержащие рХО2подобные плазмиды (*B. cereus* bv. *anthracis* CI и BC-AK). Такие штаммы способны вызывать схожее с сибирской язвой заболевание у человека и человекообразных обезьян [18–20].

Для штаммов исследуемой выборки на основе данных полногеномного секвенирования осуществлена сборка последовательностей генов, локализованных на плазмиде вирулентности pXO2, а именно генов *capBCADE*-оперона (*capB*, *capC*, *capA*, *capD*, *capE*), ответственного за синтез капсулы возбудителя сибирской язвы, а также генов *acpA* и *асрВ*, кодирующих регуляторные белки биосинтеза капсулы.

По результатам работы были выявлены и описаны мутации, а выборка разбита на сиквенс-типы (ST). В исследуемой выборке, состоящей из 79 штаммов, было выявлено 9 ST гена capD (D = 0.3546 [0.2178-0.4915]), no 5 ST rehob *capA* (D = 0.2691 [0.1436-0.3947]), *acpA* (D = 0.3636 [02347-0.4925]) и acpB (D = 0.1654 [0.0542-(0.2767]), 4 ST гена *capC* (D = 0.2293 [0.1073-0.3514]), 3 ST гена capB (D = 0.0731 [-0.0066-0.1529]), и 2 ST гена *capE* (D = 0.0491 [-0.0173-0.1155]). Выявленные ST, с указанием их отличий от ST референсного генома, которые заключаются в наличии ряда мутаций, перечислены в табл. S1-S6. Для каждого гена сиквенс-тип, к которому относится референсный штамм Ames Ancestor, обозначен как ST1. Далее нумерация велась в порядке уменьшения численности входящих в них штаммов *B. anthracis*, после чего нумеровались ST, к которым относятся штаммы B. cereus. При этом все ST отличались между собой нуклеотидными заменами либо инсерцией, как в случае с геном *асрА*.

Для оценки фенотипического проявления выявленного нуклеотидного полиморфизма, то есть того, является ли нуклеотидная замена в каждой выявленной позиции синонимичной или приводит к аминокислотной замене соответствующего белка, либо его инактивации из-за появления стопкодона, была проведена in silico трансляция нуклеотидных последовательностей в аминокислотные (табл. S7-S12). Координаты аминокислотных замен указаны нами для полной последовательности транслированных белков, не учитывая их посттрансляционной модификации, которая описана только для белка СарD и заключается в отщеплении N-концевой сигнальной последовательности размером 28 аминокислотных остатков [21]. В литературе не описаны кристаллические структуры белков, кодируемых исследуемыми генами, за исключением CapD [21, 22], поэтому аминокислотные замены описаны без указания локализации в том или ином домене белка.

Распределение исследованной выборки по последовательностям транслированных белков СарВ, СарС, СарА, СарD, АсрА и АсрВ указано в табл. S13—S18. Распределение штаммов осуществляли аналогично тому, как это было сделано для ST-нуклеотидных последовательностей. Всего выявлено 6 изоформ белка СарD, 5 изоформ белка АсрА, 4 изоформы белка АсрВ, по 3 изоформы белков СарВ и СарА, и по 2 изоформы белков СарС и СарЕ.

В таблицах не приводятся данные для гена *сарЕ*, так как исследованная по последовательно-

ГОНЧАРОВА и др.

MLVST _{pXO2} -GT	Штаммы							
GT1	 Ames Ancestor, CZC5, London_499, 14RA5914, A16, Stendal, Larissa, Shikan-NIID, A1144, Canadian_bison, BA1015, Ohio ACB, K3, Turkey32, BFV, Kanchipuram, A0248, A2012, Pasteur, K1285, A3716, A0135, A2075, A2079, LP50/3ya, 68/12, LP51/4YA, 367/17, 531/17, 7(992), 1199, 53169, I-271, 34(738), 1056/51, 15(1345), 1273, 46/27, 52/33, 546/714, 1030/213, 1183, 219/6, 8(2099), 11(1940), 47/28, 48/29, 914/213, 1298 	49						
GT2	BF1, 17OD930, RA3, Tyrol 4675	4						
GT3	1259, 331/214, 822/7, 1173	4						
GT4	LP53/5YA, I-364, Yamal_2	3						
GT5	Vollum 1B, Vollum, CDC 684	3						
GT6	1(14)Stavropol, 555/288, 644/268	3						
GT7	BA1035, SVA11	2						
GT8	2000031021, 2002013094	2						
GT9	44	1						
GT10	Tangail-1	1						
GT11	H9401	1						
GT12	SK-102	1						
GT13	Pollino	1						
GT14	HYU01	1						
GT15	157(B-1107)	1						
GT16	B. cereus by. anthracis CI	1						
GT17	B. cereus BC-AK	1						

Таблица 2. Распределение исследуемых штаммов по генотипам на основе комбинации сиквенс-типов генов *capB*, *capC*, *capA*, *capD*, *capE*, *acpA* и *acpB*

сти этого гена выборка оказалась мономорфной, за исключением штамма *B. cereus* BC-AK, у которого обнаружено две SNP – 49T \rightarrow G (17L \rightarrow V) и 138C \rightarrow T (синонимичная). Такая низкая вариабельность может быть отчасти объяснена небольшой длиной гена *capE* (всего 144 п.н.), поскольку при равной частоте возникновения мутаций по всему *cap*-оперону вероятность того, что мутация возникнет именно на столь небольшом его отрезке, довольно невелика.

Распределение штаммов исследуемой выборки по генотипам (GT), каждый из которых включает определенную комбинацию ST изучаемых генов указано в табл. 2. Нумерацию генотипов осуществляли по указанному выше принципу – GT, в который вошел референсный штамм, обозначенный как GT1. Последующие GT нумеровались в порядке уменьшения количества штаммов, у которых они были выявлены, последние номера присвоили GT, характерным для *B. cereus*. Всего выявлено 17 GT (D = 0.8908 [0.8604–0.9212]).

Филогенетическое дерево, отражающее отношения выявленных GT приведено на рис. 1.

Таким образом, в настоящей работе был описан аллельный полиморфизм генов капсулообразования *B. anthracis* и регуляторных генов экспрессии *cap*-оперона, локализованных на плазмиде рХО2. Были выявлены их ST и кластеризованы штаммы изучаемой выборки по GT, включающие определенный набор ST отдельных генов. То есть по сути, к возбудителю сибирской язвы был применен метод MVLST (<u>Multi-Virulence-Locus Sequence Typ-</u>



Рис. 1. UPGMA-дендрограмма, иллюстрирующая филогенетические отношения выявленных GT. Скобками и цветом выделены GT, принадлежащие к различным эволюционным линиям *B. anthracis*: А (красный), В (синий) и С (зеленый) или к виду *B. cereus*.

ing). Ранее этот метод был впервые применен авторами по отношению к данному микроорганизму на основе последовательностей генов токсинообразования, расположенных на плазмиде pXO1. Такая схема была обозначена как MVLST_{pXO1}-генотипирование. Соответственно, схему генотипирования, предложенную в данной работе, можно обозначить как MVLST_{pXO2}, а выявленные GT – как MVLST_{pXO2}-GT.

Анализ кластеризации исследуемой выборки на основе MVLST_{pXO2}-GT штаммов показал, что MVLST_{pXO2}-профили коррелируют с видовой принадлежностью (то есть отличаются у *B. anthracis* и *B. cereus*) и с принадлежностью к эволюционным линиям в рамках вида *B. anthracis*. Однако MVLST_{pXO2} не позволило четко разделить выборку в соответствии с принадлежностью штаммов к canSNP-группе. При этом в работе [24] была обнаружена ярко выраженная корреляция между MVLST_{pXO1}-GT и сапSNP-группами штамма, а также, в некоторых случаях их привязка к географической зоне. Надо отметить, что MVLST_{pXO2}-генотипирование, основанное на последовательностях генов, локализованных на плазмиде pXO2, обладало меньшей разрешающей способностью (D = $= 0.6148 \ [0.488-0.7416]$), по сравнению с ранее осуществленном аналогичном подходе, основанном на генах плазмиды pXO1 (D = $0.8951 \ [0.8656-0.9245]$) [24].

Среди линии А наиболее распространен MVL-ST_{pXO2}-GT1, к которому принадлежат штаммы практически всех canSNP-групп. Другие GT линии А отличались от GT1 одной или двумя SNP и содержали один штамм или объединяли небольшие подгруппы штаммов одной canSNP-группы.

Исключение составлял корейский штамм H9401 (canSNP-группа A.Br.005/007), который отличал-ся от MVLST_{pXO2}GT1 двумя SNP – *capD* 796G \rightarrow A

345

 $(266V \rightarrow I)$ и *асрВ* 495А \rightarrow G (синонимичная). Однако однозначно считать эти два маркера специфичными для группы А.Вг.005/007 едва ли возможно, так как они с такой же вероятностью могут оказаться специфичными для штамма H9401 [25]. Проверить наличие этих двух мутаций у других штаммов группы А.Вг.005/007 не представлялось возможным, так как на момент написания работы не было обнаружено данных полногеномного секвенирования штаммов этой canSNP-группы в открытом доступе.

Кроме штамма H9401 уникальными маркерами обладали еще два штамма. Штамм Tangail-1 (A.Br.001/002) обладает SNP *capB* 230T \rightarrow C (77V \rightarrow \rightarrow A). Штамм Pollino (A.Br.011/009) отличается наличием синонимичной SNP *capC* 147T \rightarrow C.

Как указано выше, в нескольких случаях уникальными маркерами обладали не только отдельные штаммы, но и небольшие группы штаммов в рамках canSNP-групп линии А. Так в MVLST_{pXO2}-GT3 вошли четыре штамма австралийской группы А.Br.Aust94, выделенные в Кавказском регионе – Ставропольском Крае, Чеченской республике и Азербайджане. Эти штаммы образуют отдельный GT благодаря наличию уникальной синонимичной SNP *capC* 351A \rightarrow G (*capC*-ST2). Однако данный маркер отсутствует у штамма 1199 группы А.Br.Aust94, выделенного в том же регионе – в Дагестане.

Для проверки специфичности SNP *capC* 351A \rightarrow G для "кавказских" штаммов А.Вг.Аust94 было дополнительно проверено ее наличие в геномах 23 штаммов этой группы, выделенных в различных регионах за пределами Кавказа (табл. 3). В результате искомую SNP не удалось обнаружить ни у одного штамма дополнительной выборки. Таким образом, можно предположить, что подгруппа A.Br.Aust94 *capC* 351A \rightarrow G сформировалась именно на территории Кавказа, где и циркулирует совместно с "родительской" формой, и SNP *capC* 351A \rightarrow G может быть использован как маркер, наличие которого свидетельствует о регионе происхождения штамма.

СапSNP-группа А.Вг.Vollum в исследованной выборке разделилась на три GT. Два штамма, выделенных в Средней Азии принадлежат GT1, общим для линии А. Четыре американских штамма, принадлежащих GT5 (n = 3), отличались от GT1 наличием уникальной SNP *acpB* 1381 A \rightarrow G (4611 \rightarrow V). Для GT5 характерно наличие только этой SNP. У GT12 (n = 1) помимо нее обнаруживается уникальная SNP *acpB* 563C \rightarrow T (188S \rightarrow L). При дополнительном поиске этих SNP мы обнаружили девять штаммов дополнительной выборки группы A.Br.Vollum различного географического происхождения, принадлежащих GT1 (n = 4) и GT5 (n = 8) (табл. 4). Таким образом, можно как минимум говорить о том, что группа A.Br.Vollum разделилась на две подгруппы, обладающие разными GT: GT1 (сюда входят оба штамма этой группы, выделенные на территории бывшего СССР) и GT5. GT12, видимо, является штаммоспецифичным генотипом.

Отдельно стоит остановиться на маркерах, характерных для линий В и С. Было обнаружено, что штаммы линий В и С среди всей исследуемой выборки отличаются от штаммов линии А наличием общей SNP *acpA* 853G \rightarrow A.

Штаммы canSNP-группы B.Br.CNEVA, выделенные в Центральной Европе, обладают синонимичной SNP *capD* 234T \rightarrow C. Однако, у единственного штамма этой группы из ГКПМ-Оболенск данная мутация не выявлена. К сожалению, информация о месте выделения этого штамма не сохранилась, поэтому наличие или отсутствие SNP $capD 234T \rightarrow C$ нельзя однозначно считать маркером, указывающим на географическое происхождение штамма. Однако в тоже время, наличие этого штамма в "ГКПМ-Оболенск" с большой долей вероятности указывает на то, что данный штамм был выделен именно на территории бывшего СССР. В этом случае есть некоторые основания предполагать, что эта SNP все же обладает некоей филогеографической значимостью. Однако штамм 44 — единственный доступный штамм группы B.Br.CNEVA, у которого местом выделения не значится Центральная Европа, поэтому провести дополнительные исследования распространенности SNP *capD* 234T \rightarrow C среди штаммов группы B.Br.CNEVA, выделенных за пределами этого региона, не представлялось возможным.

Эволюционная линия C (canSNP-группа C.Br.001) в исследованной выборке представлена двумя штаммами (2002013094 и 2000031021), выделенными на территории США. Эти штаммы имеют одинаковые нуклеотидные последовательности по всем исследуемым генам и, следовательно, попадают в один GT по результатам филогенетического анализа слитых последовательностей. По результатам проведенного в работе анализа данные штаммы оказались филогенетически ближе к *B. cereus*, чем другие штаммы исследуемой выборки. C неантрацидными (*B. cereus*) штаммами их объединяют SNP *capC* 239C \rightarrow T (80T \rightarrow M), *capD* 208C \rightarrow T (70H \rightarrow Y), *capD* 667A \rightarrow \rightarrow G (223K \rightarrow E), и *capD* 1135T \rightarrow A (379F \rightarrow I).

Одной из задач при написании данной работы являлось рассмотрение возбудителя сибирской язвы как одной из инфекций, возникновение вспышек которой возможно вследствие изменения климата, например, таянии вечной мерзлоты и прорастании спор штаммов, ранее находящихся в

ов группы A.Br.Aust94 различного географического происхождения, $SNP \ capC \ 351A \rightarrow G.$						
Наименование штамма	Место выделения					
	Намибия					
	Намибия					
31103 (Strain 32)	Великобритания					
40863 (SK57)	Великобритания					
)4	Япония					
)4	Япония					
	Япония					
	Дания					

Таблица 3. Дополнительная выборка штаммов исследованная на предмет наличия в геноме S

GCA_001677295	K2	Намибия
GCA_001677305	K1	Намибия
GCA_003367985	2000031103 (Strain 32)	Великобритания
GCA_003368005	2007740863 (SK57)	Великобритания
DRR000184	BA_104	Япония
DRR000186	BA_104	Япония
DRR128184	BA105	Япония
ERR930300	1409	Дания
SRR2071849	K2883	Индия
SRR2071866	K4834	Австралия
SRR2339898	2002721539	ЮАР
SRR2340304	2002734039	Великобритания
SRR2968133	A0088	ЮАР
SRR2968144	A0002	Турция
SRR2968145	A0656	КНР
SRR2968146	A0659	КНР
SRR2968155	A0083	Германия
SRR2968160	A0252	Зимбабве
SRR2968165	A0455	Мозамбик
SRR5811187	2000031009	Таиланд
SRR1739963	2000031027	США
SRR2339639	2000032893	США
SRR2339643	2002013170	США
		·

замороженных слоях почвы [10]. Ранее рядом исследователей высказывались предположения о возможном возникновении вспышек ряда заболевания, в том числе и сибирской язвы, вызванных изменением климата [26-28].

Номер доступа в GenBank

Штаммы, выделенные во время вспышки на Ямале, а также один из штаммов, выделенных из замороженных слоев почвы Якутии, были ранее отнесены к эволюционной линии В. Здесь, а также в предшествующих работах, в геномах этих штаммов был описан ряд мутаций, являющихся филогенетически значимыми маркерами [23, 24]. Интересной представляется находка бацилл си-

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

бирской язвы в аллювиальных отложениях голоцена в Якутии [10]. Хотя наиболее вероятное генетическая датировка указывала на консервацию этих штаммов в период XIII-XVI веков. Геологическое положение находки - ниже слоя сезонного протаивания, возможно, свидетельствует об их возрасте в несколько тысяч лет. Если последнее справедливо, то бациллы сибирской язвы (вероятно, в виде спор) способны предотвращать накопление мутаций в соответствии с ходом "молекулярных часов" в течение длительного сохранения в вечной мерзлоте, создавая эффект "современной ДНК у древней бактерии" [29]. Исследование таких штам-

том 58 **№** 4 2022

Номер доступа в GenBank	Наименование штамма	Место выделения	SNP <i>acpB</i> 563C→T	SNP <i>acpB</i> 1381A→G
GCA_003045745	COVASU	Индия	_	+
SRR1739961	2000031008	США	_	+
SRR2339356	2002734255	США	—	+
SRR2339406	2002734264	США	—	+
SRR2339549	2002734276	США	_	_
SRR2339634	2002013132	Пакистан	—	_
SRR2968161	A0363	Норвегия	_	+
SRR2968162	A0380	Ирландия	—	+
SRR2968173	A0615	КНР	—	_
SRR5811120	2002734049	Великобритания	—	—

Таблица 4. Распространение SNP *acpB* 563C \rightarrow T и SNP *acpB* 1381A \rightarrow G у дополнительной выборки штаммов группы A.Br.Vollum различного географического происхождения

мов интересно не только с точки зрения опасности появления вспышек, являющих следствием климатических изменений, но и для лучшего понимания эволюционной истории возбудителя сибирской язвы и других видов бацилл.

При анализе 40 штаммов *В. anthracis* и двух штаммов *B. cereus*, геномы которых депонированы в GenBank (табл. 1), в процессе MVLST_{рXO2}-генотипирования v некоторых штаммов линии В и линии С нами была обнаружена инсерция размером девять пар нуклеотидов в гене *асрА*, которая при более детальном рассмотрении оказалась частью несовершенного тандемного повтора ATA**GATA. Причем выявлено, что число повторов у штаммов эволюционной линии А равно трем, а у штаммов линии В, принадлежащих группам B.Br.001/002 (*n* = 3) и B.Br.CNEVA (*n* = 4) и линии С – четырем. Таким образом мы обнаружили ранее не описанный VNTR-локус в геноме возбудителя сибирской язвы на плазмиде рХО2, названный нами VNTRacpA.

Сама по себе структура тандемных повторов обуславливает специфический характер наиболее вероятных мутаций этих локусов — инсерций и делеций определенной повторяющейся последовательности. Кроме того, частота таких событий значительно превышает среднюю частоту других мутаций в геноме [30, 31]. Поэтому наличие всего двух аллелей данного тандемного повтора в гене *асрА* в выборке из 42 филогенетически различных штаммов указывает на его низкую вариабельность. Можно предположить, что четыре повтора этого мотива были характерны для "предкового генома" вида *В. anthracis* до разделения на географически и генетически обособленные группы. Воз-

можно, снижение его кратности до трех приводило к экспрессии варианта белка AcpA, обеспечивающего штамму селективное преимущество, например, за счет более эффективной регуляции экспрессии факторов патогенности. При этом архаичная форма с четырьмя повторами сохранилась лишь у штаммов линий В и С (табл. S5).

Ранее для MLVA-генотипирования возбудителя сибирской язвы было предложено использовать ряд VNTR-локусов, в том числе расположенных на плазмиде pXO2. Однако локусы, расположенные на данной плазмиде, представляют участки повторов длиной 2—3 п.н., для определения длины которых требуется дорогостоящее оборудование [32]. Обнаруженный нами локус представляет участок, состоящий из 3 или 4 тандемных повторов длиной 9 п.н., что позволяет разделять амплифицированные фрагменты в агарозном геле.

Полученные результаты показали, что выявленный полиморфизм позволяет использовать число повторов в данном локусе как диагностический признак для дифференцирования эволюционных линий, поэтому в настоящей работе была проведена оценка возможности прикладного использования VNTRacpA для MLVA-генотипирования.

К сожалению, использованный в работе принцип сборки нуклеотидных последовательностей на основе данных полногеномного секвенирования не позволил однозначно определить число повторов в регионе VNTRacpA у штаммов из ГКПМ-Оболенск, в том числе относящихся к линии В. Поэтому были сконструированы ПЦР-праймеры, фланкирующие описанный повтор и протестированы на ДНК коллекции штаммов *B. anthracis* из


Рис. 2. МLVА-генотипирование штаммов *B. anthracis* из коллекции "ГКПМ-Оболенск" с использованием локуса VNTRacpA. Номера дорожек соответствуют штаммам: *1* – 555/288; *2* – 7(992); *3* – 1056/51; *4* – 44; *5* – 531/17; *6* – 822/7; 7 – 1173; *8* – Yamal-2; *9* – I-364; *10* – 157(B-1107); *11* – LP50/3YA; *12* – LP50/3YA; *13* – LP51/4YA; *14* – 1183. Дорожки *4*, *8*, *9* и *10* соответствуют штаммам линии B.

"ГКПМ-Оболенск", вошедших в исследуемую выборку. Был применен подход MLVA-генотипирования путем амплификации локуса VNTRacpA и разделения полученных фрагментов в агарозном геле.

На рис. 2 приведен пример применения локуса VNTRасрА для MLVA-типирования штаммов *В. ап*thracis и дифференцирования эволюционных линий А и В. Результаты анализа с уверенностью позволили дифференцировать штаммы эволюционных линий А и В и подтвердить гипотезу о наличии двух аллелей тандемного повтора, каждая из которых специфична для двух эволюционных линий возбудителя сибирской язвы. Однако в результате проведенного анализа было выявлено, что теоретическая длина амплифицированных фрагментов отличалась от наблюдаемой. Так, теоретическая длина фрагмента, содержащего 3 тандемных повтора, составляла 245 п.н., а четыре – 254 п.н. (рис. 2). Наблюдаемые длины соответствующих фрагментов составляли 300 и 309 п.н.

В результате проделанной работы показано, что разделение исследованной выборки на MVLST_{pXO2}-GT соответствует ее разделению на основные эволюционные линии вида *B. anthracis*. SNP *capC* 351A \rightarrow G является маркером штаммов группы A.Br.Aust94, циркулирующих в Кавказском регионе. Штаммы группы A.Br.Vollum согласно результатам MVLST_{pXO2}-генотипирования делятся на две подгруппы, одна из которых выявлена на территории бывшего СССР. Отсутствие SNP *capD* 234T \rightarrow C у штаммов группы B.Br.CNEVA вероятно является маркером, указывающим на географическое происхождение штамма на территории бывшего СССР. Показана возможность применения локуса VNTRacpA для дифференцирования штаммов возбудителя сибирской язвы эволюционных линий А и В путем MLVA-генотипирования. Такой подход позволяет получить результат в короткие сроки и избежать ошибок при сборке результатов секвенирования. Выявленные микробные генотипы позволяют оценить факторы, связанные с вирулентностью в окружающей среде, а также потенциальные риски, вызванные изменениями климата.

Материал подготовлен в рамках секторальной программы Роспотребнадзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Mogrovejo-Arias D., Brill F.H.H., Wagner D.* // Environ. Earth Sci. 2020. V. 79. P. 109.
- Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Тюрин Е.А., Степанов А.В., Никифоров В.В. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. М.: ЗАО МП "ГИГИЕНА", 2008. 416 с.

том 58 № 4 2022

- Bourgogne A., Drysdale M., Hilsenbeck S.G., Peterson S.N., Koehler T.M. // Infect Immun. 2003. V. 71. № 5. P. 2736–2743.
- 4. *Wu G., Feng C., Cao S., Guo A., Liu Z.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2012. V. 168. № 5. P. 1302–1310.
- Raynor M.J., Roh J.H., Widen S.G., Wood T.G., Koehler T.M. // Mol. Microbiol. 2018. https://doi.org/10.1111/mmi.13961
- Candela T., Fouet A. // Mol. Microbiol. 2006. V. 60. № 5. P. 1091–1098.
- Makino S., Watarai M., Cheun H.I., Shirahata T., Uchida I. // J. Infect. Dis. 2002. V. 186. P. 227–233.
- Makino S., Uchida I., Terakado N., Sasakawa C., Yoshikawa M. // J. Bacteriol. 1989. V. 171. № 2. P. 722–730.
- Drysdale M., Bourgogne A., Hilsenbeck S.G., Koehler T.M. // J. Bacteriol. 2004. V. 186. № 2. P. 307–315.
- 10. Timofeev V., Bahtejeva I., Mironova R., Titareva G., Lev I., Christiany D. et al., // PLoS One. 2019. V. 14. № 5. e0209140. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209140
- 11. Симонова Е.Г., Картавая С.А., Титков А.В., Локтионова М.Н., Раичич С.Р., Толпин В.А. и др. // Пробл. особо опасных инф. 2017. № 1. С. 89–93.
- Kolstø A.B., Tourasse N.J., Økstad O.A. // Annu. Rev. Microbiol. 2009. V. 63. P. 451–476.
- Carroll L.M., Kovac J., Miller R.A., Wiedmann M. // Appl. Environ. Microbiol. 2017. V. 83. № 17. e01096-17. https://doi.org/10.1128/AEM.01096-17
- Keim P, Van Ert M.N., Pearson T., Vogler A.J., Huynh L.Y., Wagner D.M. // Infect. Genet. Evol. 2004. V. 4. № 3. P. 205–213.
- Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J. et al. // PLoS One. 2007. V. 2. e461. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000461
- Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R. et al., // J. Bacteriol. 2000. V. 182. P. 2928–2936.
- Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramisse V. et al. // BMC Microbiol. 2001. V. 1. P. 2. doi.org/ https://doi.org/10.1186/1471-2180-1-2

- Klee S.R., Ozel M., Appel B., Boesch C., Ellerbrok H., Jacob D. et al. // J. Bacteriol. 2006. V. 188. № 15. P. 5333–5344.
- Leendertz F.H., Yumlu S., Pauli G., Boesch C., Couacy-Hymann E., Vigilant L. et al. // PLoS Pathog. 2006. V. 2. № 1. e8. doi
- 20. Hoffmann C., Zimmermann F, Biek R., Kuehl H., Nowak K., Mundry R. et al. // Nature 2017. V. 548. № 7665. P. 82–86.
- Wu R., Richter S., Zhang R.G., Anderson V.J., Missiakas D., Joachimiak A. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. № 3. P. 24406–24414.
- 22. Khavrutskii I.V., Legler P.M., Friedlander A.M., Wallqvist A. // Biochemistry. 2014. V. 53. № 44. P. 6954–6967.
- 23. Гончарова Ю.О., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Миронова Р.И., Кисличкина А.А., Майская Н.В. и др. // Бактериология. 2019. Т. 4. № 2. С. 7–12.
- Goncharova Y., Bahtejeva I., Titareva G., Kravchenko T., Lev A., Dyatlov I., Timofeev V. // Pathogens. 2021. V. 10. № 12. 1556. https://doi.org/10.3390/pathogens10121556
- Derzelle S., Aguilar-Bultet L., Frey J. // Infect. Genet. Evol. 2016. V. 46. P. 50–58. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.019
- 26. *Hellberg R.S., Chu E.* // Crit. Rev. Microbiol. 2016. V. 42. № 4. P. 548–572.
- 27. *Rossati A.* // Int. J. Occup. Environ. Med. 2017. V. 8. № 1. P. 7–20.
- Maksimovic Z., Cornwell M.S., Semren O., Rifatbegovic M. // Rev. Sci. Tech. 2017. V. 36. № 3. P. 959– 963.
- 29. Nickle D.C., Learn G.H., Rain M.W., Mullins J.I., Mittler J.E. // J. Mol. Evol. 2002. V. 4. № 1. P. 134–137.
- 30. Bichara M., Wagner J., Lambert I.B. // Mutat. Res. 2006. V. 598. № 1–2. P. 144–163.
- 31. *Fan H., Chu J.Y.* // Genomics Proteomics Bioinformatics. 2007. V. 5. № 1. P. 7–14.
- 32. Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P., Derzelle S., Dekhil N., Mendy C. et al. // PLoS One. 2014. V. 9. № 6. e95131.

Allelic Polymorphism of Genes of Pathogenicity Factors of the Anthrax Causative Agent as a Method for Assessing Microbiological Risks during Climate Change

Y. O. Goncharova^{*a*}, *, A. G. Bogun^{*a*}, I. V. Bahtejeva^{*a*}, G. M. Titareva^{*a*}, R. I. Mironova^{*a*}, T. B. Kravchenko^{*a*}, N. A. Ostarkov^{*b*}, A. V. Brushkov^{*c*}, ^{*d*}, V. S. Timofeev^{*a*}, and S. G. Ignatov^{*a*}, **

^a State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, 142279 Russia

^b Vostokgosplan of the Ministry for the Development of the Russian Far East, Khabarovsk, 680000 Russia

^c Moscow State University M.V. Lomonosov, Moscow, 119991 Russia

^d Tyumen State University, Tyumen, 625003 Russia

*e-mail: iulia.belay@yandex.ru;

**e-mail: ignatov@obolensk.org

Climate changes lead to the emergence of the risk of particularly dangerous infections. The recent outbreak of anthrax in the Arctic (Yamalo-Nenets autonomous region) indicates the relevance of the emergence of in-

АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ

351

fectious diseases under climate change. On the example of studying the allelic polymorphism of genes of pathogenic factors of the anthrax bacterium, the possibility of assessing the pathogenic potential of bacteria is shown, which is a necessary condition for assessing microbiological risks. In this work, the allelic polymorphism of the *capBCADE*-operon (genes *capB*, *capC*, *capA*, *capD*, *capE*) encoding the proteins of the capsule biosynthesis of *Bacillus anthracis*, and the genes *acpA* and *acpB* encoding the expression regulators of this operon have been studied for the first time. A number of single nucleotide polymorphysms (SNPs) were described in the strains of the studied sample: 5 SNPs in the *capB* gene, 3 in *capC*, 4 in *capA*, 14 in *capD*, 2 in *capE*, 15 in *acpB*, as well as 7 SNPs and one insertion in the *acpA* gene. As a result, the sample is divided into sequence types for each gene and 17 genotypes, which are combinations of the identified sequence types. Translation in silico of the detected alleles of the studied genes revealed 3 isoforms in CapB and CapA proteins, 2 isoforms in CapC and CapE proteins, 6 isoforms in CapD protein, 5 in AcpA and 4 in acpB. SNP capC 351A \rightarrow G is a marker of strains of the A.Br.Aust94 group. According to the results, the strains of the A.Br.Vollum group are divided into two subgroups. Strains of evolutionary lines B and C differ from strains of line A by the presence of SNP $acpA 853G \rightarrow A$. In addition, a previously undescribed variable tandem nucleotide repeat – VNTR (Variable Number Tandem Repeat), was found in the acpA gene and the possibility of using it for differentiation and genotyping of *B. anthracis* strains was demonstrated.

Keywords: Bacillus anthracis, allelic polymorphism of genes, capBCADE-operon, MLVA-genotyping

УДК 579.61,571.27

РОЛЬ АНТИГЕНОВ Yersinia pestis В АДГЕЗИИ К МАКРОФАГАМ J774, ОЦЕНЕННАЯ МЕТОДОМ ОПТИЧЕСКОЙ ЛОВУШКИ

© 2022 г. И. В. Конышев^{1, 2}, С. А. Иванов³, П. Х. Копылов³, А. П. Анисимов³, С. В. Дентовская^{3, **}, А. А. Бывалов^{1, 2, *}

¹Вятский государственный университет, Киров, 610000 Россия ²Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, 167982 Россия ³Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, p.n. Оболенск, Серпухов, Московская обл., 142279 Россия *e-mail: byvalov@nextmail.ru **e-mail: info@obolensk.org Поступила в редакцию 12.10.2021 г.

После доработки 15.12.2021 г. Принята к публикации 28.02.2022 г.

Проведена оценка роли поверхностных антигенов в адгезии Yersinia pestis к мышиным макрофагам J774. С помощью методов оптической ловушки и/ или пассивной адгезии подтверждена способность антигенов Ail и Psa адгезировать к эукариотическим клеткам. Впервые показано, что аутотранспортер YapF является адгезином чумного микроба. Высказано предположение, что указанные антигены не имеют комплементарных рецепторов на поверхности макрофага и их адгезивность носит неспецифический характер. Результаты оценки пассивной адгезии к макрофагам J774 полистироловых микросфер, сенсибилизированных капсульным антигеном F1, позволили предположить, что действие этого антигена в составе микробной клетки, ингибирующее адгезию к макрофагам, определяется не только пространственным экранированием капсулой глубже расположенных адгезинов, но и физико-химическими свойствами этого антигена.

Ключевые слова: Yersinia pestis, макрофаг, адгезия, антиген, оптическая ловушка **DOI:** 10.31857/S0555109922040080

Начальный этап инфицирования макроорганизма, как правило, определяется адгезией патогенных бактерий к эпителию желудочно-кишечного тракта, респираторной или мочеполовой си-Чумной микроб Yersinia pestis может стем. проникать в организм млекопитающего не только в составе вдыхаемого аэрозоля, но и чрескожно в результате укуса инфицированным переносчиком. В последнем случае возбудитель чумы с током крови быстро достигает многих органов и тканей, вступая в контакт с клетками хозяина, включая, помимо профессиональных фагоцитов, эпителиальные, эндотелиальные клетки и фибробласты [1]. Исход такого взаимодействия во многом зависит от оснащенности бактерий адгезинами - специальными поверхностными структурами, способствующими прикреплению микробов к клеткам макроорганизма с последующей их инвазией. Чумной микроб располагает целым набором адгезинов, наличие или степень выраженности которых на наружной мембране зависит от окружающих условий. К числу таких молекул относят прежде всего белки Ail, Pla и Psa Y. pestis.

Родоспецифический белок Ail, кодируемый геном с хромосомной локализацией, имеет у различных видов и штаммов иерсиний незначительные отличия по аминокислотному составу, участвует в обеспечении устойчивости бактерий к комплементу сыворотки крови, их адгезии и инвазии в клетки хозяина [2–4]. Опосредуемая белком Ail адгезия чумного микроба к эукариотической клетке осуществляется путем связывания с компонентами внеклеточного матрикса – ламинином, фибронектином, гепарансульфат-протеогликаном. Это способствует, в частности, доставке в целевые клетки Yops-эффекторных белков наружной мембраны, кодируемых плазмидой кальций-зависимости иерсиний и участвующих в формировании их патогенетического потенциала [5].

Белок Pla (активатор плазминогена), являясь адгезином и протеазой, способствует связыванию возбудителя чумы с белками внеклеточного матрикса [6, 7] с последующей инвазией микроба в эукариотические клетки [8].

Psa (pH6-антиген) экспрессируется преимущественно при слабокислых pH, соответствующих внутриклеточному содержимому. Он может связываться с галактозильными остатками гликосфинголипидов и фосфатидилхолина на поверхности клеток хозяина, проявляя выраженные свойства адгезина [9]. Есть данные, указывающие на то, что Psa способствует адгезии бактерий *Y. pestis* к эпителиальным клеткам респираторного тракта, но препятствует их инвазии [10]. В то же время, показано, что способность к экспрессии Psa не повышает адгезию клеток возбудителя чумы к мышиным макрофагам RAW264.7 и участие в доставке Yops, но придает микробу резистентность к фагоцитозу [11].

Высокая степень структурной гомологии капсульного антигена F1 *Y. pestis* и человеческого интерлейкина lb, а также их высокое сродство к соответствующим рецепторам на поверхности мышиных фибробластов (линии NIH 3T3) позволило авторам цитируемой работы предположить, что F1 может участвовать в адгезии *Y. pestis* к иммунокомпетентным клеткам хозяина [12]. Позднее было показано, что F1, напротив, ингибирует бактериальную адгезию, по-видимому, путем экранирования адгезинов на поверхности микроба, тем самым предотвращая фагоцитоз, ослабляя взаимодействие с фагоцитами [10, 13, 14].

"Мышиный" токсин (Ymt) не рассматривается в качестве адгезина Y. pestis. Вместе с тем, поверхностная локализация белка [15] и доказанная роль в образовании блока в преджелудке блохи [16], процессе, при котором значима адгезивность бактериальных клеток, не исключают вероятности участия этого антигена в непосредственном взаимодействии патогена со структурами и теплокровного хозяина.

Показана значимость ряда поверхностно расположенных аутотранспортеров V_a -типа (около 10) во взаимодействии бактерий *Y. pestis* с клетками хозяина, однако механизм участия этих белков в чумной инфекции, в частности, в адгезии к клеткам млекопитающих, изучен недостаточно [17, 18].

Установлено, что клетки Y. pestis используют коровую область липополисахарида для адгезии к антигенпрезентирующим клеткам посредством взаимодействия с SIGNR1 (CD209b) — рецептором для последующей диссеминации в лимфатические узлы, селезенку, печень хозяина, инициируя системную инфекцию [19].

По-видимому, во всяком случае формально, к числу адгезинов можно отнести V-антиген Y. pestis, один из белков системы секреции 3 типа T3SS, который вступает в непосредственный контакт с клеткой макроорганизма. Установлен рецептор на поверхности иммунокомпетентных клеток человека — N-формилпептид (FPR1), с которым связывается V-антиген, инициирующий транслокацию эффекторных белков микроба в эукариотическую клетку [20]. Участниками этого процесса являются и другие адгезины возбудителя, в частности, белок Ail [5]. Очевидно, что процесс взаимодействия микробной клетки с клеткой хозяина в условиях *in vitro*, и тем более *in vivo*, не может быть описан какой-то одной схемой, так как зависит от типа и особенностей взаимодействующих клеток, а также разнообразия внешних условий. Предполагается, что могут быть идентифицированы и иные, в настоящее время неизвестные механизмы адгезии клеток иерсиний к клеткам макроорганизма [21, 22].

До настоящего времени связь вышеуказанных поверхностных антигенов с адгезивностью чумного микроба к эукариотическим клеткам оценивалась с помощью молекулярно-генетических, микробиологических, а также *in silico* методов.

Цель настоящей работы — изучение адгезивных свойств ряда поверхностных антигенов *Y. pestis* к макрофагам J774 с использованием методов оптической ловушки и пассивной адгезии.

МЕТОДИКА

Эукариотические клетки. Культура клеток макрофагов мыши линии J774 получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, Россия). Пересевы клеток проводились в питательной среде RPMI-1640, содержащей L-глутамин с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки ("Биолот", Россия) в CO₂-инкубаторе (5% CO₂) при температуре 37°C.

Выделение и очистка антигенов. F1-антиген выделяли из супернатанта культуры *Y. pseudotuberculosis*11M/pFSK3-9 (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур "ГКПМ-Оболенск") методом осаждения в изоэлектрической точке 4.1 раствором (NH₄)₂SO₄ (30%) и последовательной гель-фильтрацией [23]. pH6-антиген получали из супернатанта культуры *E. coli* DH5 α /pIG824 (ГПКМ-Оболенск) методом осаждения 30%-ным раствором (NH₄)₂SO₄ [24]. Белок Ymt выделяли из экстракта клеток штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* EV (ГПКМ-Оболенск) фракционированием (NH₄)₂SO₄ с последующей очисткой колоночной хроматографией на сефадексе G-100.

Кодирующую последовательность генов *yapF*, *yapL*, *yapM* и *ail* из штамма *Y*. *pestis* subsp. *pestis* EV НИИЭГ клонировали в составе векторной плазмиды pET32b(+) по сайтам рестриктаз NdeI и XhoI в клетках протеазодефицитного штамма *E. coli* BL21(DE3) ("Novagen", США). Эти рекомбинантные белки (YapF, YapL, YapM и Ail) выделяли методом металло-хелатной хроматографии. Все этапы очистки белков YapF, YapM, YapL и Ail, содержащих His₆, выполняли на хроматографической колонке XK-26 (GE Healthcare Biosciences), упакованной 25 мл Ni⁺⁺-TSK gel AF-Chelate TOYOPEARL 650M ("Tosoh Bioscience", США) в соответствии с рекомендуемым протоколом производителя в условиях денатурации 6 М мочевиной. Фракции, содержащие белки в максимальной концентрации, анализировали методом электрофореза в ПААГ с ДДС-Na и диализировали против буфера, содержащего 20 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, 0.2 мМ ЭДТА, рН 7.4, для хранения.

Получение антисывороток. Антисыворотки к использованным в работе белкам получали путем иммунизации беспородных белых мышей обоего пола массой 18—20 г. Сорбированные на геле гидроокиси алюминия антигены в дозе 10 мкг вводили животным подкожно в область бедра двукратно с интервалом в 30 дней. Через 30 дней после бустерной иммунизации получали кровь путем пункции ретроорбитального синуса.

Сенсибилизация микросфер антигенами. В работе использовали полистироловые микросферы диаметром 1 мкм ("Polysciences", США). К 280 мкл антигенов YapM, YapF, YapL, Psa, F1, Ymt (0.3 мг/мл) в фосфатном буферном растворе (**ФБР**) добавляли 40 мкл 2.5%-ной (вес/об.) суспензии микросфер. После инкубирования на термошейкере при температуре 37°С (250 об./мин) в течение 1 ч суспензию выдерживали в течение 18-20 ч при 4-6°С, центрифугировали (13000 g, 15 мин), осадок ресуспендировали в блокирующем буфере 1%-ного бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0.05%-ного твин-20. Суспензию инкубировали на термошейкере 1 ч при температуре 37°С (250 об./мин), трижды отмывали ФБР. После заключительного центрифугирования осадок ресуспендировали в ФБР до конечной концентрации микросфер 0.5% (вес/об.). В идентичных условиях параллельно готовили суспензию контрольных микросфер, сенсибилизированных 1%-ным БСА.

Препарат белка Ail солюбилизировали в течение 10 мин в буфере TES (100 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 1% ДДС-Na, 5 мМ ЭДТА) в объемном соотношении антиген — буфер 4 : 1 и затем диализовали против карбонат-бикарбонатного буфера, pH 9.5, непосредственно перед добавлением суспензии микросфер. Далее раствор белка Ail в концентрации 0.3 мг/мл использовался для приготовления сенсибилизированных микросфер по вышеописанной схеме.

Для подтверждения факта сенсибилизации микросфер тем или иным антигеном использовали метод истощения комплементарной поликлональной сыворотки путем инкубирования в ней сенсибилизированных микросфер. Для этого к той или иной антисыворотке, предварительно разведенной до нужной концентрации, добавляли суспензию соответствующих микросфер в объемном соотношении 10 : 1. После инкубации в течение 2 ч при температуре 37°С суспензию центрифугировали. Убыль иммунохимической активности полученной надосадочной жидкости по сравнению с сывороткой, инкубированной с микросферами, нагруженными БСА, и этой сывороткой до инкубации свидетельствовала о том, что целевой антиген связан с поверхностью микросфер. Активность истощенных и интактных мышиных сывороток к целевым антигенам, за исключением F1, оценивали стандартным методом иммуноферментного анализа (ТИФА), покрывая дно лунок планшета антигенами в концентрации 10 мкг/мл, с последующим добавлением жидкостей, содержащих антитела к тому или иному антигену, козьего антимышиного конъюгата, о-фенилендиамина в качестве субстрата. Интенсивность иммуноферментной реакции выражали в значениях ОП₄₉₂. Для верификации сенсибилизации микросфер антигеном F1 использовали реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) с комплектом диагностикума чумного антигенного эритроцитарного производства Научноисследовательского института микробиологии МО РФ (Россия), включающего антисыворотку к F1. Результаты выражали в титре антител.

Определение силы взаимодействия между микросферой и макрофагом методом оптической ловушки. Подробное описание процедуры определения силы отрыва сенсибилизированной микросферы от иммобилизованной клетки было приведено ранее [25]. Измерения проводили с использованием лазерного нанопинцета Nano-TrackerTM ("JPK Instruments AG", Германия) со встроенным инвертированным микроскопом Nikon Eclipse ("Nikon", Нидерланды) с объективом 60×, NA = 1.2 и лазером с длиной волны 1064 нм для формирования оптической ловушки и регистрации смещений захваченной микросферы.

На чашку "Fluorodish" диаметром 35 мм ("WPI", USA) с 2 мл среды RPMI-1640, содержащей гентамицин (100 мкг/мл), высевали клетки до конечной концентрации $(10-30) \times 10^3$ кл./мл, инкубировали в СО2-инкубаторе (5% СО2) при 37°С в течение 18 ч. Чашку помещали на термостатируемый пьезостолик нанопиниета и после отмывки ФБР иммобилизованных клеток в нее добавляли суспензию микросфер. После калибровки прибора лазерным лучом захватывали микросферу и к ней пошагово (шаг по 50 нм) по оси "ОХ" подводили чашку с выбранной клеткой до момента их контакта. Через 0.8-1.0 с после остановки чашку отводили с постоянной скоростью 100 нм/с. О факте разрыва связи между микросферой и клеткой судили по появлению на начальном линейном участке отведения скачкообразной инверсии хронограммы сигнала фотодетектора до базисной линии. Сила разрываемой связи соответствовала амплитуде такого скачка сигнала [25].

Схема проведения экспериментов по измерению силы взаимодействия сенсибилизированной



Рис. 1. Схематическое изображение стадий определения силы связи методом оптической ловушки в модельной системе "сенсибилизированная микросфера – макрофаг J774".

антигеном микросферы и клеткой Ј774 представлена на рис. 1.

Определение пассивной адгезии микросфер к макрофагам. В работе использовали полистироловые микросферы диаметром 2 мкм ("Polysciences", США), которые сенсибилизировали целевыми антигенами по вышеописанной методике. Макрофаги J774 высевали на чашки "Fluorodish" диаметром 35 мм ("WPI", USA) с 2 мл среды RPMI-1640, содержащей гентамицин (100 мкг/мл), до концентрации 50×10^3 кл./мл (≈100 × 10³ кл. на чашку), термостатировали в СО₂-инкубаторе (5% СО₂) при 37°С в течение 18 ч. После этого содержимое чашек удаляли, дважды промывали их чистой бессывороточной средой и вносили суспензию тех или иных микросфер, предварительно разведённую в 2 мл среды RPMI-1640 до получения расчетной концентрации $2.84 \times 10^{6} \text{ мл}^{-1}$ (соотношение микросфер и клеток – 57 : 1). После 20 и 60 мин инкубации при температуре 37°С чашки трехкратно отмывали ФБР, вносили глутаровый альдегид до конечной концентрации 2.5% на 30 мин, после отмывки вносили 2 мл ФБР и с помощью микроскопа Nikon Eclipse ("Nikon", Нидерланды) с объективом $60 \times$, NA = 1.2, встроенного в лазерный нанопинцет NanoTrackerTM ("JPK Instruments AG", Германия), подсчитывали количество микросфер, расположенных в проекции случайно выбранной клетки макрофага. Учитывая определенную субъективность учета таких результатов, микроскопию всех препаратов проводил один оператор в слепых опытах с зашифрованными чашками, используя в каждом из них снимки не менее 15 полей зрения. Результаты выражали в средних значениях числа микросфер, приходящихся на одну клетку.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствовали о том, что использованные в работе антигены *Y. pestis* связаны с поверхностью полистирола микросфер.

Как видно из табл. 2, из числа использованных антигенов *Y. pestis* лишь белок Ail проявлял выраженные адгезивные свойства: среднее значение силы отрыва сенсибилизированной этим белком микросферы от иммобилизованного макрофага оказалось существенно более высоким по сравнению с контрольными микросферами, покрытыми БСА (p < 0.01).

Сенситин микросфер	Активность сыворотки до инкубаци с микросферами	Активность сыворотки после инкубации с сенсибилизированными микросферами	Активность сыворотки после инкубации с микросферами "BSA"	
Ail	>3.000	0.892 ± 0.188	2.845 ± 0.104	
YapM	0.650 ± 0.124	0.252 ± 0.043	0.700 ± 0.136	
YapF	1.509 ± 0.280	0.676 ± 0.285	1.748 ± 0.350	
YapL	1.021 ± 0.069	0.478 ± 0.027	1.351 ± 0.007	
F1	1:200000	1:25000	1:200000	
Psa	0.602 ± 0.012	0.361 ± 0.071	0.722 ± 0.051	

Таблица 1. Результаты иммунохимической верификации факта сенсибилизации микросфер целевыми антигенами*

* Активность сывороточных препаратов для микросфер, покрытых антигеном F1, выражена титром антител в РНГА, для остальных микросфер – в виде ОП₄₉₂, по данным ТИФА.

Таблица 2. Сила связи в модельной системе "сенсибилизированная антигеном *Y. pestis* микросфера – макрофаг J774", измеренная методом оптической ловушки

		•		
Сенситин микросфер	Число измеренных отрывов	Средняя сила отрыва*, пН		
Ail	315	10.83 ± 8.49		
YapM	159	8.51 ± 6.63		
YapF	135	7.67 ± 6.66		
YapL	141	8.29 ± 6.58		
Ymt	156	7.22 ± 4.48		
F1	170	7.63 ± 4.93		
Psa	131	7.11 ± 4.95		
BSA	324	8.00 ± 6.23		

* Различия достоверны (p < 0.01) только между микросферами, покрытыми Ail, и микросферами остальных 7 типов.

Эти результаты подтверждают ранее опубликованные данные, полученные с использованием иных методических подходов, о значимости белка Ail в адгезивности чумного микроба к эукариотическим клеткам нескольких линий [26]. Экспрессия Ail определяет также устойчивость к действию сыворотки, опосредует доставку Yops в клетки хозяина, способствующей дальнейшему развитию инфекционного процесса. Инфицирование мышей мутантным штаммом Y. pestis KIM5 (Aail приводит к резкому повышению значения ЛД₅₀ и снижению обсемененности органов, по сравнению с изогенным диким вариантом возбудителя [27, 28]. Адгезивность Ail, по-видимому, определяется наличием в структуре этого поверхностного белка гидрофобной области, а также двух положительно заряженных участков, которые могут индуцировать гидрофобные или электростатические взаимодействия [5]. Учитывая также то, что адгезивность Ail показана в экспериментах с несколькими типами эукариотических клеток и белков внеклеточного матрикса [18], вполне вероятно, для этого белка нет "своего" рецептора, а опосредованная Ail алгезия носит неспецифический характер и определяется физико-химическими особенностями структуры белка.

С помощью метода оптической ловушки не было выявлено способности Psa адгезировать к клеткам J774. Представленные авторами работы [10] результаты экспериментов с использованием рекомбинантного штамма *E. coli*, несущего ген *psa Y. pestis*, и полистироловых микросфер, сенсибилизированных антигеном Psa, показали значимость этого антигена как адгезина в отношении эпителиальных клеток респираторного тракта. При этом степень выраженности адгезивных свойств Psa существенно различалась для трех использованных линий клеток. По данным литературы, этот антиген не является универсальным, конститутивным адгезином бактерий *Y. pestis*, поскольку способен экспрессироваться лишь в структурах макроорганизма, характеризующихся относительно низкими pH, например, макрофагах, участках абсцессов [29]. Этот антиген участвует в связывании микроба преимущественно с клетками респираторного тракта [30]. Вполне вероятно, что несоответствие полученных нами результатов и результатов вышеупомянутой работы [10] объясняется в том числе и использованием эукариотических клеток различных типов.

Представленные экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что F1-антиген не является адгезином чумного микроба, во всяком случае, для макрофагов J774. Как показано ранее с помощью иных методических подходов, этот антиген не способствует адгезии микроба к клеткам не только этой линии [13], но и к клеткам других линий [10]. В обзорных работах, посвященных адгезивности чумного микроба, F1-антиген, как таковой, не рассматривается в качестве адгезина [18, 31].

В условиях настоящего эксперимента не проявлял адгезивности также и антиген Ymt Y. pestis. Являясь токсичным для мышей, этот белок не влиял на вирулентность возбудителя в отношении животных этого вида [32], которая, как правило, коррелирует с адгезивностью микроба к клеткам хозяина. Вместе с тем, участие этого антигена в проявлении патогенных свойств *Y. pestis* для теплокровных животных [33], а также механизмы хронического инфицирования блохи, в частности образование биопленки в пищеварительном тракте переносчика, которое определяется в том числе и адгезивностью микробных клеток, высвобождение возбудителя из биопленки нуждаются в дальнейшем исследовании [16]. Подлежит углубленному изучению значимость в этих процессах и белка Ymt.

Из числа аутотранспортеров V_a -типа мы оценили способность трех белков, YapF, YapL и YapM, адгезировать к клеткам J774. Ни один из них не проявил указанной активности при исследовании методом оптической ловушки и выбранных условиях эксперимента.

Адгезивность к клеткам J774 ряда антигенов *Y. pestis*, представлявших больший интерес, дополнительно оценивали с помощью другого методического подхода. В табл. 3 представлены результаты определения уровня пассивной адсорбции сенсибилизированных микросфер на макрофагах, иммобилизованных на стекле.

Как показывают данные табл. 3, 20-минутной коинкубации недостаточно для адгезии сенсибилизированных микросфер на макрофагах. Исключение составил белок Ail, который проявил выраженную способность адгезировать к макрофагам линии J774 уже в течение этого периода

Время коинкубации микросфер и макрофагов, мин	№ препарата микросфер	Сенситин микросфер	Число оцененных клеток	Число микросфер, адгезированных на одной клетке, $X_{\text{mean}} \pm m^*$	№ препаратов с существенным различием по X _{mean} ± <i>m</i> (<i>p</i> < 0.01)
	1	Ail	202	18.99 ± 2.35	4, 5, 6, 2*
	2	Psa	201	16.07 ± 2.88	4, 5, 3*,6*
60	3	YapF	191	19.29 ± 2.45	4, 5, 6, 2*
	4	YapM	220	12.37 ± 2.01	1, 2, 3, 5
	5	F1-антиген	205	9.84 ± 1.52	1, 2, 3, 4, 6
	6	БСА	216	13.11 ± 1.99	1, 3, 5, 2*
20	7	Ail	84	23.54 ± 4.18	8-12
	8	Psa	93	13.65 ± 2.78	7, 11,12*
	9	YapF	89	10.98 ± 2.49	7
	10	YapM	99	11.93 ± 2.85	7
	11	F1-антиген	99	9.78 ± 1.78	7, 8
	12	БСА	96	10.24 ± 2.38	7,8*

Таблица 3. Пассивная адгезия сенсибилизированных антигенами *Y. pestis* микросфер к иммобилизованным макрофагам J774

* Различие достоверно при *p* < 0.05.

времени. Эти данные подтверждают результаты экспериментов с использованием оптической ловушки (табл. 2), а также результаты, полученные в других лабораториях с применением иных методических подходов. Увеличение времени экспозиции до 60 мин выявило существенное повышение адгезивности еще и для микросфер, сенсибилизированных антигенами Psa и YapF. Учитывая также показанное методом оптической ловушки отсутствие разницы между силой связи с макрофагами микросфер, покрытых двумя этими антигенами, и контрольными микросферами, покрытыми БСА (табл. 2), для проявления их адгезивности с помощью обоих использованных в работе методов требуется значительно большее (и, вероятно, разное) время по сравнению с микросферами, сенсибилизированными белком Ail.

Следует отметить, что если белок YapM не проявил большей адгезивности сравнительно с контролем (БСА) при обоих методах оценки, то антиген F1, скорее всего, придает полистирольной микросфере противоположное свойство. На это указывает достоверно меньшее (p < 0.01) количество микросфер на поверхности макрофагов по сравнению с контрольными микросферами, покрытыми БСА, при 60-минутной коинкубации (табл. 3).

В целом, полученные в работе результаты подтвердили адгезивность антигенов Ail и Psa к ряду эукариотических клеток, а также отсутствие указанного свойства у "капсульного" антигена F1 чумного микроба. Кроме того, установлена способность аутотранспортера YapF Y. pestis адгерировать к макрофагам J774. По нашему мнению, адгезивность этих белков опосредуется не наличием на поверхности эукариотических клеток строго специфических рецепторов, а носит неспецифический характер, в котором могут быть задействованы гидрофобные и электростатические взаимодействия. Об этом можно судить, в частности, по способности антигенов адгезировать к нескольким компонентам поверхностных структур бактериальной клетки или внеклеточного матрикса. Так, Ail связывается с ламинином, фибронектином, гепарансульфат-протеогликаном [5], Psa – с фосфатидилхолином [35], галактозными остатками гликосфинголипидов [36]. Оценивая экспериментальные данные, как ранее опубликованные, так и полученные в настоящей работе, можно утверждать, что адгезивность бактерий Y. pestis к эукариотическим клеткам – это интегральный феномен, определяемый совокупностью особенностей поверхностных структур двух биообъектов и окружающих условий их взаимодействия.

Результаты проведенных исследований расширяют представления об адгезивных свойствах патогенных иерсиний на начальной стадии инфекции клеток хозяина, во многом определяющей последующее течение заболевания. Предложенные и апробированные методические подходы могут быть востребованы в исследованиях, направленных на дальнейшее изучение механизмов патогенеза бактериальных инфекций в целях создания или совершенствования антиадгезивных терапевтических средств.

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг.: "Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней", а также гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых-кандидатов наук (№ MK-3383.2021.1.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ke Y., Chen Z., Yang R. // Front. Cell Infect. Microbiol. 2013. V. 3. 106. https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00106
- Joutsen S., Johansson P., Laukkanen-Ninios R., Björkroth J., Fredriksson-Ahomaa M. // Vet Microbiol. 2020. V. 247. 108798. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108798
- Thomson J.J., Plecha S.C., Krukonis E.S. // Mol. Microbiol. 2019. V. 111. P. 82–95. https://doi.org/10.1111/mmi.14140
- Tsang T.M., Wiese J.S., Felek S., Kronshage M., Krukonis E.S. // PLoS One. 2013. V. 8. № 12. e83621. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083621
- Yamashita S., Lukacik P., Barnard T.J., Noinaj N., Felek S., Tsang T.M., Krukonis E.S., Hinnebusch B.J., Buchanan S.K. // Structure. 2011. V. 19. № 11. P. 1672–1682. https://doi.org/10.1016/j.str.2011.08.010
- Lobo, L. A. // FEMS Microbiol. Lett. 2006. V. 262. № 2. P. 158–162. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00382.x
- Sebbane F., Uversky V.N., Anisimov A.P. // Biomolecules. 2020. V. 10. 1554. https://doi.org/10.3390/biom10111554
- Lahteenmaki, K., Kukkonen M., Korhonen T.K. // FEBS Lett. 2001. V. 504. P. 69–72. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02775-2
- Felek S., Tsang T.M., Krukonis E.S. // Infect. Immun. 2010. V. 78. P. 4134–4150. https://doi.org/10.1128/IAI.00167-10
- Liu F., Chen H., Galván E.M., Lasaro M.A., Schifferli D.M. // Infect. Immun. 2006. V. 74. P. 5636–5644. https://doi.org/10.1128/IAI.00612-06
- 11. *Huang X.-Z., Lindler L.E.* // Infect. Immun. 2004. V. 72. P. 7212–7219.
- Abramov V.M., Vasiliev A.M., Vasilenko R.N., Kulikova N.L., Kosarev I.V., Khlebnikov V.S. et al. // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 6076–6084.

- Du Y., Rosqvist R., Forsberg Å // Infect. Immun. 2002.
 V. 70. P. 1453–1460. https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1453-1460.2002
- Roque A.I., Soliakov A., Birch M.A., Philips S.R., Shah D.S., Lakey J.H. // Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.). 2014. V. 26. P. 2704–2616. https://doi.org/10.1002/adma.201304645
- Fedorova V.A., Golova A.B. // Vestn. Ross Akad Med. Nauk. 2005. V. 10. P. 19–25.
- Hinnebusch B.J., Jarrett C.O., Bland D.M. // Biomolecules. 2021. V. 11. 210. https://doi.org/10.3390/biom11020210
- Lenz J.D., Lawrenz M.B., Cotter D.G., Lane M.C., Gonzalez R.J., Palacios M., Miller V.L. // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 5936–5949. https://doi.org/10.1128/JB.05877-11
- 18. *Chauhan N., Wrobel A., Skurnik M., Leo J.C.* // Proteomics Clin. Appl. 2016. V. 10. № 9–10. P. 949–963. https://doi.org/10.1002/prca.201600012
- Yang K., He Y., Park C.G., Kang Y.S., Zhang P., Han Y., Cui Y. et al. // Front. Immunol. 2019. V. 10. 96. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00096
- Osei-Owusu P., Charlton T.M., Kim H.K., Missiakas D., Schneewind O. // Nature. 2019. V. 574. P. 57–62. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1570-z
- Bohn E., Sonnabend M., Klein K., Autenrieth I.B. // Int. J. Med. Microbiol. 2019. V. 309. P. 344–350. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.05.008
- Eichelberger K.R., Sepúlveda V.E., Ford J., Selitsky S.R., Mieczkowski P.A., Parker J.S., Goldman W.E. // mSphere. 2020. V. 5. e00715-20. https://doi.org/10.1128/mSphere.00715-20
- 23. Dentovskaya S.V., Shaikhutdinova R.Z., Anisimov A.P. // Adv. Exp. Med. Biol. 2003. V. 529. P. 419–421.
- 24. Бахтеева И.В., Кравченко Т.Б., Титарева Г.М., Иванов С.А. // Проблемы особо опасных инфекций. 2007. Т. 94. С. 40-44.
- 25. Byvalov A.A., Kononenko V.L., Konyshev I.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. № 2. P. 234–243. https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-3-4-437-448
- Kolodziejek A.M., Hovde C.J., Minnich S.A. // Front. Cell Infect. Microbiol. 2012. V. 2. 103. https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00103
- Felek S., Krukonis E.S. // Infect. Immun. 2009. V. 77. P. 825–836. https://doi.org/10.1128/IAI.00913-08
- Kolodziejek A.M., Sinclair D.J., Seo K.S., Schnider D.R., Deobald C.F., Rohde H.N., Viall A.K., Minnich S.S., Hovde C.J., Minnich S.A., Bohach G.A. // Microbiology (Reading). 2007. V. 153. P. 2941–2951. https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00103
- 29. *Lindler L.E., Tall B.D.* // Mol. Microbiol. 1993. V. 8. P. 311–324.
- Bao R., Nair M.K., Tang W.K., Esser L., Sadhukhan A., Holland R.L., Xia D., Schifferli D.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 1065–1070. https://doi.org/10.1073/pnas.1212431110

 Brown S.D., Montie T.C. // Infect. Immun. 1977. V. 18. P. 85–93.

31. Leo J.C., Skurnik M. // Adv. Exp. Med. Biol. 2011.

32. Hinnebusch J., Cherepanov P., Du Y., Rudolph A.,

Dixon J.D., Schwan T., Forsberg A. // Int. J. Med. Mi-

https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9 1

crobiol. 2000. 290. P. 483-487.

V. 715. P. 1–15.

- 34. Fan Y., Zhou Y., Feng N., Wang Q., Tian G., Wu X., Liu Z., Bi Y., Yang R., Wang X. // Microbes and Infection. 2016. V. 18. P. 329–335.
- 35. *Galván E.M., Chen H., Schifferli D.M.* // Infect. Immun. 2007. V. 75. № 3. P. 1272–1279. https://doi.org/10.1128/IAI.01153-06
- 36. Payne D., Tatham D., Williamson E.D., Titball R.W. // Infect. Immun. 1998. V. 66. № 9. P. 4545–4548. https://doi.org/10.1128/IAI.66.9.4545-4548.1998

The Role of Yersinia Pestis Antigens in Adhesion to J774 Macrophages: an Optical Trapping Study

РОЛЬ АНТИГЕНОВ Yersinia pestis В АДГЕЗИИ К МАКРОФАГАМ J774

I. V. Konyshev^{*a*, *b*}, S. A. Ivanov^{*c*}, P. H. Kopylov^{*c*}, A. P. Anisimov^{*c*}, S. V. Dentovskaya^{*c*}, **, and A. A. Byvalov^{*a*, *b*, *}

^aThe Vyatka State University, Kirov, 610000 Russia

^bInstitute of Physiology, Komi Scientific Centre, Ural Branch, Russian Federation, Syktyvkar, 167982 Russia ^cState Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology Rospotrebnadzor,

Obolensk, Serpukhov District, Moscow Region, 142279 Russia

*e-mail: byvalov@nextmail.ru **e-mail: info@obolensk.org

One of the key stages in the pathogenesis of infections caused by facultative intracellular parasites, including the plague microbe, is bacterial adhesion to the host cells. The adhesiveness of the pathogen is determined, among other things, by the physicochemical properties of its surface structures. The aim of the present work was to evaluate the role of surface antigens in the adhesion of *Yersinia pestis* to murine macrophages J774. The ability of Ail and Psa antigens to adhere to eukaryotic cells was confirmed using optical trapping and/or passive adhesion methods. The autotransporter YapF was shown for the first time to be an adhesin of the plague microbe. It has been suggested that these antigens do not have complementary receptors on the macrophage surface and their adhesiveness is nonspecific. The results of passive adhesion of polystyrene microspheres sensitized by the capsule antigen F1 to macrophages J774, suggest that the inhibitory effect of this antigen is determined not only by the spatial shielding by the capsule of the adhesins involved but also by the physical and chemical properties of this antigen.

Keywords: Yersinia pestis, macrophage, adhesion, antigen, optical trap

УДК 579.69

МАЛЫЕ РНК Mcr11 И DrrS *Mycobacterium tuberculosis* КАК ВОЗМОЖНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ МЕТАБОЛИЗМА ГЛИЦЕРИНА

© 2022 г. А. А. Острик^{1,} *, А. С. Григоров², И. В. Бочарова³, А. С. Капрельянц¹, Т. Л. Ажикина², Е. Г. Салина¹

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,

Москва, 117997 Россия

³Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва 107564 Россия

*e-mail: albina.ostrik@gmail.com Поступила в редакцию 31.01.2022 г. После доработки 10.02.2022 г. Принята к публикации 28.02.2022 г.

Изучали роль малых некодирующих PHK Mcr11 и DrrS и их возможную синергию в метаболизме Mycobacterium tuberculosis. При выращивании на стандартных средах заметных различий в динамике роста как штаммов с однократной делецией малых PHK ΔMcr11 и ΔDrrS, так и штамма с двойной делецией $\Delta\Delta$ Mcr11 DrrS по сравнению со штаммом *M. tuberculosis* дикого типа выявлено не было. Однако, после пассирования in vivo этих штаммов в мышах линии В6, мутантные штаммы характеризовались угнетением роста *in vitro* на среде Сотона с высоким содержанием глицерина (6% об.), более выраженным у штамма с двойной делецией. Как известно, торможение роста в присутствии высоких концентраций глицерина у клеток M. tuberculosis вызывала делеция генов Rv3679-3680, которое было обусловлено накоплением токсичного метаболита метилглиоксаля. Согласно биоинформатическим расчетам, мРНК гена Rv3679 содержит два потенциальных участка связывания с малой PHK DrrS в 5'-нетранслируемой области, и, следовательно, является ее потенциальной мишенью. При этом Rv3679 не содержит потенциальных участков связывания с малой PHK Mcr11, однако ее деления также ухудшает рост клеток M. tuberculosis на средах с высоким содержанием глицерина, что указывает на общность регуляторного действия малых PHK DrrS и Mcr11 с возникновением синергического эффекта в развитии "глицериновой токсичности" у штамма ΔΔMcr11_DrrS. Таким образом, малые PHK Mcr11 и DrrS принимают участие в регуляции метаболизма глицерина M. tuberculosis.

Ключевые слова: Муcobacterium tuberculosis, персистенция, вирулентность, малые некодирующие РНК, регуляция трансляции, метаболизм глицерина **DOI:** 10.31857/S0555109922040134

Малые некодирующие РНК, осуществляющие посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов в клетках бактерий, действуют как преобразователи сигналов окружающей среды и контролируют транскрипцию, трансляцию и стабильность целевых мРНК в ответ на изменение внешних условий [1–4]. Особенно интересна роль малых некодирующих РНК у патогенных бактерий, поскольку существует ряд указаний на их участие во взаимодействии с иммунной системой организма-хозяина и сохранении жизнеспособности бактерий в условиях стрессового воздействия [1, 5].

Одной из наиболее распространенных в мире инфекций человека является туберкулез, уносящий ежегодно свыше 8 миллионов человеческих жизней [6]. В настоящее время у *M. tuberculosis* с помощью биоинформатических подходов выявлено несколько сотен потенциальных малых регуляторных РНК, при этом присутствие некоторых из них подтверждено экспериментально [4, 5, 7–9]. Механизм регуляторного действия, однако, установлен лишь для крайне небольшого числа [4, 10].

Особое внимание исследователей привлекают малые некодирующие РНК *M. tuberculosis*, индуцируемые во время инфекции, поскольку изучение их функции может существенно углубить понимание механизмов патогенеза туберкулезной инфекции. Ранее было обнаружено, что малые некодирующие РНК Mcr11 и DrrS интенсивно экспрессируются в моделях хронической инфекции мышей, и сравнимы с уровнем транскрипции

16S рРНК [11, 12], что позволяет предположить, что они участвуют в ответе на стрессовое воздействие, которое микобактерии испытывают после фагоцитоза в организме хозяина. Малые РНК Mcr11 и DrrS присутствуют только у патогенных видов микобактерий туберкулезного комплекса, пособных вызывать туберкулез у человека и животных. Они имеют стабильную вторичную структуру и высоко консервативны [7]. Впервые они были обнаружены в результате полнотраскриптомного анализа M. tuberculosis методом RNA-seq и подтверждены Нозерн-блоттингом [11]. Позднее нами было показано, что гиперэкспрессия этих малых РНК в клетках M. tuberculosis приводит к замедлению роста патогена в стандартных условиях in vitro [13].

Экспрессия малой РНК Mcr11 зависит от фазы роста микобактерий, а также от условий выращивания. Показано, что уровень экспрессии повышается при недостатке питательных веществ и снижается при выращивании в среде с кислым рН [14], что указывает на ее возможную роль в процессах адаптации к стрессовым условиям. Mcr11 функционально связана со смежными генами – Rv1264 и Rv1265. Rv1265 кодирует ДНК-, АТФсвязывающий белок, увеличивающий экспрессию Mcr11 в стационарной фазе роста [15]. Предполагаемыми мишенями Mcr11 являются мРНК генов Rv3282, fadA3, и lipB, вовлеченных в метаболизм липидов [16]. При выращивании M. tuberculosis и M. bovis в среде без источников жирных кислот штаммы с делецией малой РНК Mcr11 показывали отставание в росте.

Малая РНК DrrS является очень стабильным транскриптом, время полужизни которого составляет 6 ч, ее экспрессия функционально связана с регулоном DosR, активирующемся при стрессовом воздействии оксида азота, кислородных радикалов и при гипоксии [17]. Недавно удалось показать, что гиперэкспрессия DrrS в клетках M. tuberculosis приводила к повышению устойчивости бактерий к стрессовым воздействиям [18]. В логарифмической фазе роста такие бактерии сохраняли более высокую метаболическую активность в условиях повышенного окислительного стресса, голодания, продукции оксида азота или при понижении рН среды. Гиперэкспрессия DrrS повышала выживаемость микобактерий при фагоцитировании их макрофагами в экспериментах по инфицированию клеточной линии ТНР-1, тогда как гиперэкспрессия Mcr11 несущественно сказывалась на выживаемости *M. tuberculosis* в этих условиях [18]. Кроме того, показано, что в макрофагах, активированных у-интерфероном, экспрессия DrrS повышается [19], что указывает на ее роль в патогенезе *M. tuberculosis*.

Полученные данные указывают на вероятную роль малых РНК Mcr11 и DrrS в адаптации M. tu-

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

berculosis к персистенции внутри макроорганизма и их участии во взаимодействии "патоген-хозяин".

Шель работы – изучение роли малых некодирующих PHK Mcr11 и DrrS и их возможной синергии в метаболизме *M. tuberculosis*.

МЕТОДИКА

Культивирование бактерий. Бактерии M. tuberculosis штамм H37Rv ("ЦНИИ Туберкулеза", Россия) выращивали в жидкой среде Сотона (г/л листиллированной воды): L-аспарагин – 4.0. КН₂РО₄ – 0.5, MgSO₄ – 1.4, железо лимоннокислое аммиачное – 0.05, натрий лимоннокислый трехзамещенный -2.0, $ZnSO_4 - 0.1$, глицерин -60 мл, pH 7.2; а также в жидкой среде Сотон R со сниженной концентрацией глицерина (г/л дистиллированной воды): L-аспарагин – 2.0, $KH_2PO_4 - 0.25$, $MgSO_4 - 0.7$, железо лимоннокислое аммиачное – 0.025, натрий лимоннокислый трехзамещенный – 1.0, ZnSO₄ – 0.05, глицерин – 6 мл, рН 7.2. Для выращивания также использовали жидкую среду Миддлбрука (7Н9, "HiMedia", Индия) в присутствии ростовой добавки альбумин-декстроза-каталаза (АДК, "Ні-Media", Индия), 0.05% твин-80 при 37°С и перемешивании (200 об./мин). Культивирование на плотных средах проводили в статическом режиме без добавления твин-80.

Пассирование мутантных штаммов in vivo. Мутантные штаммы M.tuberculosis с делецией генов малой РНК МТS0997 и МТS1338 были получены по методике, описанной в статье [20].

Делеция генов была подтверждена полногеномным секвенированием. Данные о мутантных штаммах содержатся в базе данных NCBI (идентификатор проекта: PRJNA701202). Для восстановления вирулентности мутантных штаммов с делецией малой PHK DrrS (Δ DrrS), малой PHK Mcr11 (Δ Mcr11) штамма с двойной делецией малых PHK Mcr11 и DrrS ($\Delta\Delta$ Mcr11 DrrS), полученных *in vitro*, и штамма дикого типа (wt) клетки выращивали в стандартных условиях культивирования на среде Сотона с добавлением АДК и 0.05% твина-80 до $O\Pi = 1$, отмывали от среды и ресуспендировали в физиологическом растворе. Полученную суспензию использовали для заражения мышей линии C57BL/6Ycit (B6), резистентных к туберкулезу, с целью восстановления вирулентных свойств бактерий *M. tuberculosis* (доза 10^5 бактерий/мышь, внутривенный способ инфицирования).

Мыши содержались в обычных условиях в виварии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза (Россия) в соответствии с рекомендациями Минздрава России № 755. Для эксперимента использовали самок мышей в возрасте 2.5–3.0 мес. Экспериментальные процедуры были одобрены Комитетом по биоэтике Цен-

том 58 **№** 4 2022



Рис. 1. Динамика роста штаммов wt, Δ Mcr11, Δ DrrS и Δ AMcr11_DrrS *M. tuberculosis* на средах Сотона (а) и Миддлбрука (б).

трального научно-исследовательского института туберкулеза. Через 21 сут после инфицирования мышей выводили из эксперимента, готовили гомогенаты селезенок и высевали их на плотные питательные среды Сотона и Миддлбрука в присутствии АДК.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью t-теста Стьюдента. За статистически достоверные принимались значения с p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании бактерий в жидкой среде Сотона с добавлением ростовой добавки АДК и твин-80 in vitro было обнаружено, что кривая роста штамма ΔΔMcr11 DrrS была аналогична кривым роста штаммов с однократной делецией малых PHK Δ Mcr11 и Δ DrrS, и кривой роста штамма дикого типа H37Rv, взятого в качестве контроля (рис. 1). Также не наблюдалось различий в динамике роста указанных штаммов в жидкой среде Миддлбрука с добавлением ростовой добавки АДК и твин-80. Таким образом, при росте на стандартных средах заметных различий в динамике роста как штаммов с однократной делецией малых PHK Δ Mcr11 и Δ DrrS, так и штамма с двойной делецией ΔΔMcr11 DrrS по сравнению со штаммом *M. tuberculosis* дикого типа выявлено не было.

При высеве гомогенатов селезенок зараженных мышей линии В6. резистентных к туберкулезу, на плотную питательную среду Сотона с ростовой добавкой АДК и параллельно на среду Миддлбрука с ростовой добавкой АДК, было обнаружено, что, несмотря на идентичный характер роста на среде Миддлбрук + АДК, характер роста штаммов на среде Сотон + АДК был неодинаковым. На плотной среде Сотона у штаммов $\Delta\Delta$ Mcr11 DrrS, Δ Mcr11 и Δ DrrS наблюдали торможение роста, более выраженное у штамма с двойной делецией, у которого рост почти полностью отсутствовал (рис. 2). Колонии, полученные после высева гомогенатов селезенок инфицированных мышей линии В6. были пересеяны на жидкую среду для дальнейшей дифференциации. Оказалось, что штаммы с делецией малой РНК Δ Mcr11 и малой PHK Δ DrrS, а также двух малых РНК ΔΔMcr11 DrrS после пассирования in vivo были не способны расти на стандартной среде Сотон + АДК с твином (рис. 3а), и при этом хорошо росли на среде Миддлбрук + АДК с твином (рис. 3б). Для штамма дикого типа заметной разницы в росте на этих двух средах не наблюдалось.

Основным отличием в составе сред является различная концентрация глицерина, которая в среде Сотона составляла 6 об. %, а в среде Миддлбрука — всего 0.5 об. %. В связи с этим, было выдвинуто предположение о токсичном воздействии глицерина на рост штаммов с делецией малых PHK Δ Mcr11, Δ DrrS и $\Delta\Delta$ Mcr11_DrrS. Действительно,



Рис. 2. Рост штаммов *M. tuberculosis* после высева из гомогенатов селезенок инфицированных мышей линии B6 на плотной среде Сотона (*1*) и Миддлбрука (*2*); а – дикий тип, $6 - \Delta$ Mcr11, $B - \Delta$ DrrS, $\Gamma - \Delta\Delta$ Mcr11_DrrS.

при выращивании штаммов в среде Сотона со сниженной в 10 раз концентрацией глицерина (0.6%, среда Сотон_R) рост штамма $\Delta DrrS$ возобновлялся после незначительно увеличенного лагпериода (рис. 4). При выращивании штаммов $\Delta\Delta Mcr11$ _DrrS и особенно $\Delta Mcr11$ на среде Сотон_R наблюдали значительно увеличенный лагпериод (рис. 4). Однако позднее рост также возобновлялся.

Анализ литературы показал, что подобное торможение роста *М. tuberculosis* на плотных питательных средах в присутствии высоких концентраций глицерина наблюдалось при делеции генов Rv3679-3680, кодирующих белковый комплекс с ATФ-азной функцией [21], и, что особенно интересно, оно тоже проявлялось только после пассирования мутантных клеток *in vivo*. Авторы исследования показали, что при понижении концентрации глицерина в среде рост мутантных штаммов восстанавливался, подобно тому, как это было в наших экспериментах с мутантными штаммами Δ Mcr11, Δ DrrS и $\Delta\Delta$ Mcr11_DrrS.

Малые РНК, как известно, часто осуществляют регуляторную функцию посредством связывания с мРНК гена-мишени, что ингибирует или активирует его трансляцию. Была поставлена задача поиска возможного связывания малых РНК Mcr11 и DrrS с мРНК генов Rv3679 и Rv3680. Согласно биоинформатическим расчетам, мРНК гена Rv3679 в 5'-нетранслируемой области действительно содержит 2 потенциальных участка связы

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ



Рис. 3. Культивирование штаммов *M. tuberculosis* с восстановленной вирулентностью на жидкой среде Сотона (а) и на среде Миддлбрука (б) в присутствии ростовой добавки АДК и 0.05% твина-80 в течение 7 дней культивирования: 1 -дикий тип, $2 - \Delta$ DrrS, $3 - \Delta\Delta$ Mcrl1_DrrS.

том 58 № 4 2022



Рис. 4. Динамика роста штаммов wt, Δ Mcr11, Δ DrrS и $\Delta\Delta$ Mcr11_DrrS *M. tuberculosis* с восстановленной вирулентностью на различных средах с АДК и 0.05% твин-80: а – среда Сотона, 6 – среда Сотона со сниженной концентрацией глицерина (Сотон_R), в – среда Миддлбрука

вания с малой PHK DrrS, но не с малой PHK Mcr11 (Григоров А.С, персональное сообщение на основании алгоритма CopraRNA https://rna.informatik.uni-freiburg.de), что позволило предположить, что Rv3679 может являться мишенью DrrS. а DrrS является регулятором глицеринового метаболизма *M. tuberculosis*. При этом мРНК гена Rv3679 не содержит потенциальных участков связывания с малой РНК Mcr11, однако ее делеция также ухудшает рост клеток *M. tuberculosis* на средах с высоким содержанием глицерина, при этом торможение роста на средах с высоким содержанием глицерина особенно ярко проявляется у штамма с двойной делецией ∆∆Mcr11 DrrS (рис. 26, 4). Полученный результат, по все вероятности, указывает на возникновение синергического эффекта в развитии "глицериновой токсичности" у штамма $\Delta\Delta$ Mcr11 DrrS *M. tuberculosis*. Подобный синергитический эффект был ранее отмечен у другого внутриклеточного бактериального патогена Legionella pneumophila. Примечательно, что делеция двух малых РНК rsmY и rsmZ приводила к резкому снижению вирулентности клеток штамма $\Delta\Delta rsmYZ$ L. pneumophila и их способности к внутриклеточному росту в макрофагах, тогда как делеция малых РНК rsmY и rsmZ по-отдельности не оказывала заметного влияния на вирулентность патогена [22].

Полученные нами результаты открывают перспективы дальнейшего изучения двух малых некодирующих PHK Mcr11 и DrrS *ex vivo* и *in vivo* и их регуляторной роли в метаболизме глицерина *M. tuberculosis* и накоплении токсических метаболитов с целью поиска новых антибиотических веществ, использующих возможности клеточного суицида для уничтожения опасного патогена.

Заявление о работе в соответствии с международными Правилами работы с животными

Исследования на лабораторных мышах линии В6 проводили в строгом соответствии с этически-

ми нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей (European Treaty Series, № 123).

А.А. Острик и Е.Г. Салина благодарят РФФИ (проект № 20-34-90015) за финансовую поддержку работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Holmqvist E., Wagner E.G.H. // Biochem. Soc. Trans. 2017. V. 45. P. 1203–1212.
- Papenfort K., Vogel J. // Cell Host Microbe. 2010. V. 8. P. 116–127.
- Waters L.S., Storz G. // Cell 2009. V. 136. № 4. P. 615– 628.
- Schwenk S., Arnvig K.B. // Pathog. Dis. 2018. V. 76. № 4. P. 1–12.
- Haning K., Cho S.H., Contreras L.M. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2014. V. 4. P. 1–11.
- Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
- DiChiara J.M., Contreras-Martinez L.M., Livny J., Smith D., McDonough K.A., Belfort M. // Nucleic Acids Res. 2010. V. 38. № 12. P. 4067–4078.
- Ignatov D.V., Malakho S., Majorov K.B., Skvortsov T., Apt A.S., Azhikina T.L. // PLoS ONE. 2013. V. 8. № 9. e74209.
- 9. Tsai C.-H., Baranowski C., Livny J., McDonough K.A., Wade J.T., Contreras L.M. // PLoS One. 2013. V. 8. № 11. e79411.
- 10. Острик А.А., Ажикина Т.Л., Салина Е.Г. // Успехи биологической химии 2021. Т. 61. С. 229–252.
- Arnvig K.B., Comas I., Thomson N.R., Houghton J., Boshoff H.I., Croucher N.J., Rose G., Perkins T.T., Parkhill J., Dougan G., Young B.Y. // PLoS Pathog. 2011. V. 7. № 11. P. 1–16.
- Игнатов Д.В., Логунова Н.Н., Ажикина Т.Л. // Биоорг. химия. 2014. Т. 40. С. 253–256.

МАЛЫЕ PHK Mcr11 И DrrS MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

- 13. Ignatov D.V., Salina E.G., Fursov M.V., Skvortsov T.A., Azhikina T.L., Kaprelyants A.S. // BMC Genomics. 2015. V. 16. № 1. P. 1–13.
- 14. Pelly S., Bishai W.R., Lamichhane G. // Gene. 2012. V. 500. № 1. P. 85–92.
- 15. Girardin R.C., Bai G., He J., Sui H., McDonough K.A. // Mol. Microbiol. 2018. V. 110. № 5. P. 811–830.
- 16. Girardin R.C., McDonough K.A. // Mol. Microbiol. 2020. V. 113. № 2. P. 504–520.
- 17. Moores A., Riesco A.B., Schwenk S., Arnvig K.B. // PLoS One. 2017. V. 12. № 3. P. 1–27.
- 18. Острик А.А., Салина Е.Г., Скворцова Ю.В., Григоров А.С., Быченко О.С., Капрельяни А.С., Ажики-

на Т.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. T. 56. № 4. C. 336-341.

- 19. Salina E.G., Grigorov A.S., Skvortsova Y.V., Majorov K.B., Bychenko O.S., Ostrik A.A., Logunova N.N., Ignatov D.V., Kaprelyants A.S., Apt A.S., Azhikina T.L. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2019. V. 9. P. 474304.
- 20. Parish T., Stoker N.G.J. // Bacteriol. 2000. V. 182. № 20. P. 5715-5720.
- 21. Whitaker M., Ruecker N., Hartman T., Klevorn T., Andres J., Kim J., Rhee K., Ehrt S. // Bacteriol. 2020. V. 16. P. e00202-20
- 22. Sahr T., Brüggemann H., Jules M., Lomma M., Albert-Weissenberger C., Cazalet C., Buchrieser C. // Mol. Microbiol. 2009. V. 72. № 3. P. 741-762.

Small RNAS Mcr11 and DrrS of Mycobacterium tuberculosis as Possible Regulators of Glycerol Metabolism

A. A. Ostrik^{a,*}, A. S. Grigorov^b, I. V. Bocharova^c, A. S. Kaprelyants^a, T. L. Azhikina^b, and E. G. Salina^a

^a A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^b Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia ^c Central Institute for Tuberculosis, Moscow, 107564 Russia

*e-mail: albina.ostrik@gmail.com

The role of small non-coding RNAs Mcr11 and DrrS with its possible synergy in the metabolism of *M. tuber*culosis was studied. There were no noticeable differences in the growth dynamics of both strains with a single deletion of small RNAs Δ Mcr11 and Δ DrrS and a strain with a double deletion $\Delta\Delta$ Mcr11 DrrS compared to the wild-type *M. tuberculosis* strain during growth on standard media *in vitro*. However, it was found that after virulence restoration of these strains by *in vivo* passage through B6 mice, they showed a growth defect on Sauton's medium with a high content of glycerol (6 vol. %) in vitro, more pronounced in the strain with a double deletion. As it is known, growth inhibition in the presence of high concentrations of glycerol in *M. tuberculosis* cells was caused by the deletion of the Rv3679-3680 genes, which was due to the accumulation of the toxic metabolite methylglyoxal. According to bioinformatic predictions, the mRNA of the Rv3679 gene in the 5'-untranslated region contains 2 potential binding sites for the DrrS, but not for the Mcr11, suggesting that Rv3679 may be a DrrS target. The obtained result may indicate a common regulatory activity for small RNAs DrrS and Mcr11 of *M. tuberculosis* with the occurrence of a synergistic effect in the development of "glycerol toxicity" in the $\Delta\Delta$ Mcr11 DrrS strain. Thus, small RNAs Mcr11 and DrrS are involved in the regulation of *M. tuberculosis* glycerol metabolism pathways.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, persistence, virulence, small non-coding RNA, regulation of translation, glycerol metabolism

УДК 577.15

НОВЫЙ ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ, СОДЕРЖАЩИЙ ПОЛИСАХАРИДМОНООКСИГЕНАЗУ И β-ГЛЮКОЗИДАЗУ – СИНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ДОБАВКИ К ЦЕЛЛЮЛАЗАМ

© 2022 г. М. В. Семенова^{1,} *, А. В. Гусаков², В. Д. Телицин², В. Ю. Матыс³, Т. В. Бубнова³, В. А. Немашкалов³, А. М. Рожкова¹, А. П. Синицын^{1, 2}

¹Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН, Москва, 119071 Россия ²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия ³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино, 142290 Россия

> *e-mail: margs@mail.ru Поступила в редакцию 11.02.2022 г. После доработки 18.02.2022 г. Принята к публикации 28.02.2022 г.

На основе реципиентного штамма *Penicillium verruculosum* B1-537 (Δ niaD) с использованием промотора гена целлобиогидролазы I создан продуцент гомологичной литической полисахаридмонооксигеназы (**ПМО**) и гетерологичной β-глюкозидазы *Aspergillus niger* (**БГ**) – вспомогательных ферментов для "базового" целлюлазного комплекса, состоящего из эндоглюканаз и целлобиогидролаз. Получен ферментный препарат ПМО-БГ, содержащий 34% ПМО и 43% БГ, который был использован в качестве источника вспомогательных ферментов, увеличивающих на 20–100% эффективность действия базовых целлюлаз *P. verruculosum* при биоконверсии различных видов целлюлозосодержащего сырья: микрокристаллической целлюлозы, предобработанного щелочью тростника и полубеленой сульфатной лиственной целлюлозы АО "Архангельский ЦБК".

Ключевые слова: полисахаридмонооксигеназа, β-глюкозидаза, целлюлазы, синергизм, биоконверсия **DOI:** 10.31857/S0555109922040146

Основную часть органического материала на Земле составляет возобновляемая растительная биомасса, одним из компонентов которой является целлюлоза. Ферментативный гидролиз целлюлозы осуществляется комплексом "базовых" целлюлаз – целлобиогидролаз (ЦБГ) и эндоглюканаз (ЭГ), осуществляющих гидролиз до глюкозы, целлобиозы и целлоолигосахаридов. К вспомогательным ферментам, усиливающим действие целлюлаз, относятся β -глюкозидазы (БГ), гидролизующие целлобиозу и целлоолигосахариды до глюкозы, а также литические полисахаридмонооксигеназы (ПМО), катализирующие окислительную деструкцию основных цепей целлюлозы, способствующую аморфизации ее кристаллических зон.

Целлюлолитические грибы родов *Нуросгеа* (*Trichoderma*) и *Penicillium* наиболее часто используются в качестве источника ферментов для биоконверсии лигноцеллюлозных материалов (**ЛЦМ**) [1–5]. Для ферментных комплексов, продуцируемых этими грибами, характерна несбалансированность по составу между "базовыми" целлюлазами и вспомогательными ферментами. Для решения этой проблемы предложено, например, вводить дополнительно к "базовым" целлюлазам 5–10% ферментного препарата (**ФП**), содер-

жащего БГ и/или ПМО [6, 7]. Другой подход подразумевает встройку в геном грибов генов, кодирующих гомологичные или гетерологичные БГ или ПМО [8–10]. ФП, полученные из продуцентов в результате гетерологичной экспрессии гена БГ Aspergillus niger (bgl1) или гена ПМО Trichoderma reesei (lpmo) в штамме-реципиенте P. verruculosum, продемонстрировали синергетическое увеличение эффективности действия целлюлазного комплекса P. verruculosum при ферментативном гидролизе различных видов ЛЦМ [9, 11–14].

Цель работы – осуществление одновременной экспрессии генов *lpmo* и *bgl1* в реципиентном штамме *P. verruculosum* B1-537 (ΔniaD) для создания продуцента *P. verruculosum* ПМО-БГ, получение на его основе нового ФП с активностями как ПМО, так и БГ и его использование вместе с "базовыми" целлюлазами *P. verruculosum* B1-537 при гидролизе ЛЦМ.

МЕТОДИКА

Штаммы и ферментные препараты. В работе были использованы штаммы: *P. verruculosum* В1-537 (ΔniaD) (реципиентный штамм – проду-

цент "базовых" целлюлаз [15, 16]), *P. verruculosum* ПМО-БГ (продуцент ПМО и БГ), *P. verruculosum* ПМО (продуцент ПМО [17]) и *P. verruculosum* F10 (продуцент БГ [6]).

Для получения комплексного ферментного препарата, содержащего ПМО и БГ, реципиентный штамм *P.verruculosum* 537 (AniaD) был трансформирован плазмидами pCBHI-BGL [6] и рСВНІ-РМО [17], полученными ранее. Трансформированные протопласты высевали на селекционную среду с 10 мМ нитрата натрия. В качестве котрансформационной плазмилы. обеспечивающей прототрофность рекомбинантных штаммов после трансформации, была взята плазмида pSTA10, несущая ген niaD, кодирующий нитратредуктазу A. niger. Для трансформации использовался протокол трансформации для *P. canescens* с модификациями для штамма *P. verruculosum* [18]. Соотношение плазмид pCBHI-BGL, pCBHI-PMO и pSTA10 было 3:3:1 (мкг/мкл). Частота событий одновременной трансформации реципиентного штамма двумя плазмидами составляла 15 трансформантов на 1 мкг смеси экзогенных ДНК. Наличие интегративной вставки гетерологичного гена bgl1 A. niger в рекомбинантах доказывалось методом ПЦР с использованием Phire-полимеразы ("ThermoFisher Scientific", США). Размер гена bgl1 составлял ~2950 п.о. Наличие одновременной сверхэкспрессии гомологичной ПМО и гетерологичной БГ доказывалось электрофоретически по увеличению интенсивности полос белка в районе 35 и 120 кДа соответственно, с последующим масс-спектрометрическим анализом трипсиновых гидролизатов белков на приборе Ultrafle-Xtreme II ("Bruker Daltonics", Германия). Пептидные фрагменты анализировали с использованием MASCOT (http://www.matrixscience.com), а также сервисов PeptideMass и FindPept (http://expasy. org/tools/).

Штаммы *P. verruculosum* выращивали в качалочных колбах Эрленмейера емкостью 750 мл в 100 мл ферментационной среды следующего состава (%): $KH_2PO_4 - 1.5$, $(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O - 0.5$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O - 0.03$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O - 0.03$, глюкоза – 1.0, дрожжевой экстракт – 1.0, пшеничные отруби – 1.0, микрокристаллическая целлюлоза (**МКЦ**) – 40.0. После культивирования в течение 144 ч на качалке при 220 об./мин и 30°C культуральную жидкость (**КЖ**) отделяли от мицелия центрифугированием в течение 10 мин при 10700 g.

Ферментные препараты В1-537, ПМО-БГ, ПМО и БГ были получены путем лиофильного высушивания КЖ штаммов *P. verruculosum* B1-537 (ΔniaD), *P. verruculosum* ПМО-БГ, *P. verruculosum* ПМО и *P. verruculosum* F10 на лиофильной сушке Benchtop 6K ES ("SP Scientific/Virtis", США).

Реагенты. Для создания буферных смесей использовали реактивы фирм "Bio-Rad" (США), "Panreac" (Германия), "Helicon" и "Реахим" (Россия).

При ферментативном гидролизе ЛЦМ в качестве субстратов использовали: МКЦ (ТУ 20.16.59-001-40693384-209, "Кристацелл", Россия); тростник обыкновенный из Астраханской обл., дезинтегрированный, обработанный 1.5%-ным NaOH при 120°С в течение 1 ч с последующей нейтрализацией и многократной отмывкой дистиллированной водой; полубеленую сульфатную лиственную целлюлозу ("Архангельский ЦБК", Россия).

Для определения активностей $\Phi\Pi$ в качестве субстратов использовали МКЦ, ксилан из бука, Na-соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), *n*-нитрофенил- β -глюкозид (*n*Н $\Phi\Gamma$) (все производства "Sigma", США), 2,6-диметоксифенол (2,6-ДМ Φ , "Thermo Fisher Scientific Inc.", США), пероксид водорода 3%-ный ("Тульская фармацевтическая фабрика", Россия).

Определение активностей ФП. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта за 1 мин.

Активности по отношению к полисахаридным субстратам (концентрация 5 г/л в реакционной смеси) определяли по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (**BC**) при рН 5.0 и 50°С методом Шомоди–Нельсона [19].

Активности по отношению к $nH\Phi\Gamma$ (0.9 мМ в реакционной смеси) определяли по скорости образования *n*-нитрофенола при pH 5.0 и 50°C [19].

Активность ПМО с использованием 2,6-ДМФ в качестве модельного субстрата и H_2O_2 в качестве косубстрата определяли при pH 7.5 и 30°С согласно методике, описанной в работе [20]. Концентрацию хромогенного продукта рассчитывали, используя коэффициент экстинкции 53200 M⁻¹ см⁻¹.

Содержание белка в ФП определяли методом Лоури, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Электрофорез в 12%-ном ПААГ с Na-ДДС (ЭФ-ПААГ) проводили на приборе MiniProtein ("Bio-Rad", США) согласно руководству к прибору. Содержание отдельных белков в ФП оценивалось методом денситометрии.

Анализ состава ФП. Анализ компонентного состава ФП проводили в соответствии с методикой, приведенной в работе [21]. На первой стадии проводили хроматографическое фракционирование ФП с использованием анионообменного носителя Source 15Q. Для каждой фракции проводили ЭФ-ПААГ, а также определяли активности по отношению к разным субстратам и содержание белка. Ферментный состав каждой фракции идентифицировали на основе измерения активностей и масс-спектрометрического анализа трипсиновых гидролизатов соответствующих белковых полос,

ФП	Субстрат					
	пΗΦΓ	2,6-ДМФ	МКЦ	КМЦ	ксилан	
ПМО-БГ	31800 ± 700	41 ± 3	310 ± 20	2950 ± 250	2790 ± 200	
БГ	61100 ± 900	0	400 ± 30	3390 ± 300	3310 ± 280	
ПМО	500 ± 10	73 ± 6	450 ± 40	3370 ± 290	8700 ± 710	
B1-537	1800 ± 80	0	860 ± 70	13000 ± 900	19800 ± 950	

Таблица 1. Активности ферментов в используемых ФП (ед./г белка)

полученных с помощью ЭФ-ПААГ [22]. Для определения содержания индивидуальных ферментов в составе ФП использовали метод денситометрии, оценивая долю фермента во фракции на основе интенсивности его полосы в электрофоретическом геле. Затем, зная содержание белка в этой фракции и долю фермента, рассчитывали его содержание в исходном препарате.

Биоконверсия ЛЦМ. Биоконверсию ЛЦМ проводили при концентрации "базового" целлюлазного ФП, полученного с помощью штамма *P. verruculosum* B1-537, 1 г/л (по белку), что соответствовало дозировке 10 мг белка/г субстрата. В реакционную смесь вносили дополнительно 0, 10 или 20% ФП ПМО-БГ, или ПМО, или БГ из расчета 0, 1 или 2 мг белка/г субстрата.

Гидролиз проводили в пластиковых пробирках объемом 2 мл (объем реакционной смеси 1.5 мл) в термостатируемом шейкере Biosan TS-100 ("Biosan", Латвия) в присутствии 0.1 г/л антибиотика ампиокса при рН 5.0 и 40°С. Концентрация субстрата составляла 100 г/л в пересчете на сухое вещество.

В ходе процесса отбирали аликвоты, в которых определяли концентрацию ВС методом Шомоди-Нельсона и глюкозы, используя набор "Фотоглюкоза" и инструкцию к нему ("Импакт", Россия). Качественный и количественный состав низкомолекулярных сахаров определяли с помощью ВЭЖХ-системы Agilent 1100 ("Agilent", США) на колонке Диасфер-110-Амин (5 мкм, 4.0 × 250 мм). В качестве элюента использовали смесь ацетонитрил-вода 75 : 25 при скорости элюции 1 мл/мин, объем анализируемого образца 10–100 мкл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Активность и состав используемых ФП. Для используемых в работе ФП были измерены активности по отношению к ряду субстратов (табл. 1). ФП ПМО-БГ и БГ обладали высокой β -глюкозидазной активностью (по отношению к nНФГ) – 31 800 и 61 100 ед./г белка, β -глюкозидазная активность ФП В1-537 и ПМО была низкой.

Активность полисахаридмонооксигеназы у ФП ПМО-БГ и ПМО по отношению к 2,6-ДМФ составила 41 и 73 ед./г белка, у ФП, полученного с помощью штаммов B1-537 и БГ, отсутствовала. Относительно низкое значение активности ФП ПМО-БГ и ПМО по 2,6-ДМФ объяснялась невысокими каталитическими константами по отношению к этому субстрату, характерными для всех ПМО. Так, активность очищенной ПМО из *Neurospora crassa*, определенная по этой же методике, составляла 32 ед./г [20].

КМЦазная (эндоглюканазная) активность препаратов ПМО-БГ, БГ и ПМО была приблизительно одинаковой (около 3000 ед./г белка), у ФП В1-537 активность по КМЦ была выше и составляла 13000 ед./г белка.

Активность по МКЦ (целлобиогидролазная активность), возрастала от 310 до 850 ед./г в ряду ФП ПМО-БГ, БГ, ПМО и В1-537.

Активность ксиланазы ФП ПМО-БГ и БГ составляла около 3000 ед./г белка, у ФП ПМО и В1-537 ксиланаза была выше — 8700 и 19 800 ед./г белка соответственно.

На рис. 1 представлен данные ЭФ-ПААГ для ФП ПМО-БГ, а также для ФП реципиентного штамма В1-537. На электрофореграмме ПМО-БГ присутствуют две мажорные полосы около 120 и 33 кДа, соответствующие БГ и ПМО. Для ФП В1-537 характерен белковый кластер ЦБГІ и ЦБГІІ в диапазоне 50–65 кДа (общее содержание всех ЦБГ составляло около 60%) и несколько белковых полос в диапазоне 35–50 кДа, соответствующих ЭГІ и ЭГІІ (общее содержание всех ЭГ около 15%). Эти белки или отсутствуют в ФП ПМО-БГ, или их содержание снижено в несколько раз (табл. 2).

Содержание ферментов в ФП ПМО-БГ, определенное с помощью хроматографического фракционирования, составило 34% (ПМО) и 43% (БГ) от общего количества белка, препарат также содержал небольшое количество ЦБГ (15%) и ЭГ (5%). Согласно литературным данным [23, 24], для проявления синергетического эффекта между целлюлазами и вспомогательными ферментами, достаточно небольших количеств последних (около 10% каждого), поэтому с точки зрения состава вспомогательных ферментов новый ФП перспективен в качестве добавки к "базовому" целлюлазному комплексу.

НОВЫЙ ФЕРМЕНТНЫЙ ПРЕПАРАТ



Рис. 1. Электрофорез в ПААГ с Na-ДДС. ФП: *1* – B1-537, *2* – ПМО-БГ, *3* – ПМО, *4* – БГ. *М*-маркеры, указаны молекулярные массы стандартных белков.

Используемые в работе ФП БГ содержал около 80% β-глюкозидазы [6], ФП ПМО имел в своем составе около 70% ПМО [16] (табл. 2).

Биоконверсия ЛЦМ. Для биоконверсии были использованы следующие материалы: МКЦ, тростник обыкновенный и полубеленая сульфатная лиственная целлюлоза. Для увеличения реакционной способности тростник был подвергнут щелочной предобработке по методике [25, 26]. МКЦ и полубеленая целлюлоза какой-либо дополнительной обработке не подвергались, так как обладали достаточно высокой реакционной способностью [27].

В качестве источника "базовых" целлюлаз (ЦБГ и ЭГ) для гидролиза ЛЦМ использовали ФП В1-537, в качестве источника одновременно БГ и ПМО – ФП ПМО-БГ, в качестве источника только БГ – ФП БГ, только ПМО – ФП ПМО (форезы последних двух ФП также представлены на рис. 1).

После 48 ч гидролиза МКЦ (рис. 2а) под действием базового ФП В1-537, внесенного из расчета 10 мг белка/г субстрата, концентрация глюкозы и ВС в реакционной смеси составила 14 и 19 г/л соответственно (исходная концентрация МКЦ была 100 г/л). Полученные результаты свидетельствовали об относительно низкой степени конверсии субстрата под действием "базового" целлюлазного комплекса, а также об образовании в качестве продуктов гидролиза целлоолигосахаридов помимо глюкозы, что было подтверждено данными ВЭЖХ-анализа (данные не приведены).

При внесении в реакционную смесь дополнительно к препарату В1-537 10% ФП ПМО-БГ (1 мг белка/г субстрата) концентрация глюкозы и ВС через 48 ч гидролиза увеличилась до 26 и 27 г/л соответственно. Вклад ФП ПМО-БГ составил 2 г/л глюкозы и 3 г/л ВС при использовании этого ФП в дозировке 1 мг белка/г субстрата. Таким образом, внесение в реакционную смесь относительно небольшого количества вспомогательного ФП ПМО-БГ привело к увеличению эффективности действия базового ФП В1-537 на 60% по выходу глюкозы и 30% по выходу ВС.

Увеличение концентрации ФП ПМО-БГ до 20% в реакционной смеси (до 2 мг белка/г субстрата) не привело к существенному увеличению выхода продуктов.

При использовании в качестве вспомогательного только ФП БГ (10%, 1 мг белка/г субстрата) привело к увеличению выхода глюкозы и ВС после 48 ч гидролиза до 24 и 25 г/л, т.е. эффективность действия ФП В1-537 увеличилась на 59% по выходу глюкозы и 20% по выходу ВС. Увеличение концентрации ФП БГ до 20% (2 мг белка/г субстрата) не приводило к существенному увеличению выхода продуктов. Вклад ФП БГ составил 1.6 или 2.9 г/л глюкозы и 1.9 или 4.6 г/л ВС при внесении 1 или 2 мг белка/г субстрата соответственно.

Таблица 2. Содержание основных ферментов (%) в используемых ФП

ΦП	Фермент, %					
	БГ*	ПМО	ЦБГ	ЭГ	ксиланаза	
ПМО-БГ	43	34	15	5	2	
БΓ	80	0	10	5	2	
ПМО	2	70	25	7	2	
B1-537	3	0	60	15	3	

* Указано содержание собственной и/или клонированной БГ.



Рис. 2. Концентрация глюкозы (1) и ВС (2) после 48 ч гидролиза МКЦ (а), предобработанного тростника (б) и полубеленой сульфатной лиственной целлюлозы (в) в присутствии базового ФП В1-537 (10 мг белка/г субстрата или 1 г белка/л в реакционной смеси), а также при добавлении к нему 10 или 20% ФП БГ, ПМО или ПМО-БГ.

В случае использования в качестве вспомогательного только ФП ПМО было отмечено преимущество смеси ФП В1-537 с 20% ПМО, которая обеспечивала выход глюкозы и ВС до 23 и 27 г/л, эффективность действия ФП В1-537 увеличивалась на 42% по выходу глюкозы и на 18% по выходу ВС. Вклад ФП ПМО составил 2.2 или 3.0 г/л глюкозы и 2.8 или 4.6 г/л ВС при внесении в реакционную смесь 1 или 2 мг белка/г субстрата соответственно.

Таким образом, при гидролизе МКЦ предпочтительным источником вспомогательных ферментов оказался ФП ПМО-БГ: 10%-ной добавки ФП ПМО-БГ оказалось достаточно для максимально возможного в условиях эксперимента увеличения эффективности базового ФП В1-537 до 60% по выходу глюкозы и до 30% по выходу ВС.

После 48 ч гидролиза предобработанного тростника (рис. 26) базовым ФП В1-537 (10 мг белка/г субстрата) концентрация глюкозы и ВС в реакционной смеси составляла 23 и 42 г/л соответственно. Полученные результаты свидетельствовали об образовании помимо глюкозы в качестве продуктов гидролиза целлоолигосахаридов, а также продуктов гидролиза гемицеллюлоз. ВЭЖХ-анализ гидролизата показал присутствие ксилозы (3 г/л), арабинозы (1 г/л) и целлоолигосахаров (преимущественно целлобиозы) суммарно около 5 г/л.

При внесении в реакционную смесь 10% вспомогательного ФП ПМО-БГ концентрации глюкозы и ВС после 48 ч гидролиза составили 43 и 64 г/л соответственно, а при внесении 20% ПМО-БГ – 50 и 68 г/л. Увеличение эффективности действия базового ФП В1-537 составило 80 и 100% для выхода глюкозы (при дополнительных 10 и 20% ФП ПМО-БГ) и 40% – для выхода ВС. Вклад ФП ПМО-БГ составил 1.0 или 1.6 г/л глюкозы и 3.5 или 7.0 г/л ВС при внесении 1 или 2 мг белка/г субстрата соответственно.

Использование в качестве вспомогательного только ФП БГ привело к увеличению концентрации глюкозы и ВС после 48 ч гидролиза до 42 и 60-62 г/л (при внесении 10 и 20% ФП БГ соответственно), т.е. эффективность действия ФП В1-537 увеличивалась на 78 и 70% по выходу глюкозы и на 27 и 22% по выходу ВС. Вклад ФП БГ составил 1.6 или 3.3 г/л глюкозы и 6.7 или 10.3 г/л ВС при внесении 1 или 2 мг белка/г субстрата соответственно.

Использование только ФП ПМО в качестве вспомогательного при гидролизе тростника было мало эффективным и не давало значимого увеличения выхода глюкозы относительно действия только одного ФП В1-537.

Таким образом, при гидролизе предобработанного тростника эффективность ФП ПМО-БГ как источника вспомогательных ферментов относительно ФП БГ и ФП ПМО была очевидной. Использование ФП ПМО-БГ приводило к увеличению до 100% по выходу глюкозы и до 40% по выходу ВС.

После 48 ч гидролиза полубеленой сульфатной лиственной целлюлозы (рис. 2в) под действием индивидуального базового ФП В1-537 (10 мг бел-ка/г субстрата) концентрация глюкозы и ВС в реакционной смеси составила 34 и 40 г/л соответственно. По данным ВЭЖХ помимо глюкозы в качестве продуктов образуются ксилоза (4 г/л) и целлоолигосахариды (преимущественно целлобиоза, около 2 г/л).

При внесении в реакционную смесь 10% вспомогательного ПМО-БГ концентрация глюкозы и ВС после 48 ч гидролиза составили 64 и 68 г/л соответственно, а при внесении 20% ПМО-БГ – 69 и 77 г/л. Увеличение эффективности действия базового ФП В1-537 составило 80% по выходу глюкозы и 50 и 70% по выходу ВС при внесении дополнительных 10 и 20% ФП ПМО-БГ соответственно. Вклад ФП ПМО-БГ составил 2.2 или 4.0 г/л глюкозы и 3.4 или 6.1 г/л ВС при концентрации 1 или 2 мг белка/г субстрата.

Использование в качестве вспомогательного только ФП БГ привело к увеличению концентрации глюкозы и ВС после 48 ч гидролиза до 55–57 и 58—63 г/л соответственно (при внесении 10 или 20% ФП БГ), то есть эффективность действия ФП В1-537 увеличилась на 81-90 или 34-37% по выходу глюкозы и ВС соответственно. Вклад ФП БГ составил 3.0 или 4.9 г/л глюкозы и 4.5 или 7.6 г/л ВС при концентрации 1 или 2 мг белка/г субстрата.

Использование 10-20% вспомогательного ФП ПМО при гидролизе полубеленой целлюлозы было мало эффективным и давало лишь небольшое увеличение выхода глюкозы относительно базового ФП В1-537.

Таким образом, так же как и в случае предобработанного тростника, при конверсии полубеленой сульфатной лиственной целлюлозы эффективность ФП ПМО-БГ как источника вспомогательных ферментов относительно ФП БГ и ФП ПМО очевидна. Использование ФП ПМО-БГ приводило к увеличение выхода глюкозы до 50% и выхода ВС до 30%.

* * *

Результаты биоконверсии ЛЦМ зависят от сбалансированности состава гидролитического комплекса, состоящего из экзо- и эндодеполимераз (ЦБГ и ЭГ), а также присутствия в реакционной смеси вспомогательных ферментов (БГ и ПМО). Принято считать, что доля вспомогательных ферментов должна составлять около 10% каждого от общего пула ферментов "базового" целлюлазного комплекса [6, 7, 23, 24]. В настоящей работе показано, что уже добавление 10% (по белку) ФП ПМО-БГ, содержащего одновременно БГ и ПМО примерно в равных соотношениях, существенно увеличивало эффективность гидролиза МКЦ, предобработанного тростника и полубеленой целлюлозы под действием базового целлюлазного комплекса *P. verruculosum*, причем ФП ПМО-БГ превосходил по эффективности ФП, содержащие только БГ или ПМО.

В работе [7] замена 10% целлюлаз на эквивалентное количество ПМО из T. reesei, Myceliophthora thermophila или Thielavia terrestris приводила к увеличению выхода ВС на 17-18% при гидролизе МКЦ. Смесь "базового" целлюлазного комплекса P. verruculosum с гомогенными ПМО T. reesei и БГ А. niger давала увеличение выхода глюкозы на 100% при гидролизе МКЦ, при этом основной синергетический эффект наблюдался при добавлении к целлюлазам БГ, а вклад ПМО составлял лишь 5% [28]. В работах [6, 11] добавление ФП, содержащего преимущественно БГ, к "базовому" целлюлазному комплексу P. verruculosum увеличивало выход продуктов гидролиза измельченной осиновой древесины и пергамента на 80 и 43% соответственно. В настоящей работе добавление ФП ПМО-БГ к "базовому" целлюлазному комплексу P. verruculosum было наиболее эффективно при гидролизе предобработанного тростника и полубеленой сульфатной лиственной целлюлозы и это обеспечивало увеличение выхода глюкозы на 80–100%.

Полученные результаты позволяют рекомендовать новый ФП ПМО-БГ как источник дополнительных ферментов для интенсификации процесса биоконверсии ЛЦМ.

Работа была выполнена в рамках ГЗ НИР МГУ АААА-А21-121011290089-4.

Авторы благодарят сотрудников ЦКП "Промышленные биотехнологии" ФИЦ Биотехнологии РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nieves R.A., Ehrman C.I., Adney W.S. et al. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 14. P. 301–304. https://doi.org/10.1023/A:1008871205580
- Gusakov A.V. // Trends Biotechnol. 2011. V. 29. № 9. P. 419–425.
 - https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.004
- 3. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Синицын А.П. // Катализ в промышленности. 2012. Т. 6. С. 68–76.
- Kubicek C.P., Mikus M., Schuster A. et al. // Biotechnol. Biofuels. 2009. V. 2. P. 19–33. https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-19
- Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. // Microbiol. Molec. Biol. Rev. 2002. V. 66. № 3. P. 506– 577.
 - https://doi.org/10.1128/mmbr.66.3.506-577.2002
- Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Korotkova O.G., Sinitsyn A.P. // Process Biochem. 2015. V. 50. P. 1258–1263.
- Булахов А.Г., Гусаков А.В., Чекушина А.В., Сатратдинов А.Д., Кошелев А.В., Матыс В.Ю., Синицын А.П. // Биохимия. 2016. Т. 81. № 5. С. 701–709.
- 8. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Кондратьева Е.Г., Синицын А.П. // Биотехнология. 2013. Т. 3. С. 58–68.
- Синицын А.П., Короткова О.Г., Синицвна О.А., Рожкова А.М., Доценко Г.С., Проскурина О.В., Осипов Д.О., Кондратьева Е.Г., Чекушина А.В. // Биокатализ. 2015. Т. 15. № 6. С. 78–83. https://doi.org/10.18412/1816-0387-2015-6-78–83
- Bulakhov A.G., Volkov P.V., Rozhkova A.M., Gusakov A.V., Nemashkalov V.A., Sinitsyn A.P. // PLoS ONE. 2017. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170404
- Синицын А.П., Скомаровский А.А., Чекушина А.В., Синицына О.А., Немашкалов В.А., Кондратьева Е.Г., Рожкова А.М., Кошелев А.В. // Биокатализ. 2015. Т. 15. № 5. С. 74–77.
 - https://doi.org/10.18412/1816-0387-2015-5-74-74-77
- Синицын А.П., Синицына О.А., Зоров И.Н., Рожкова А.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 65. С. 551–560. https://doi.org/10.31857/S0555109920060161
- 13. Семенова М.В., Гусаков А.В., Телицын В.Д., Синицын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология.

2021. T. 57. № 5. C. 477–484. https://doi.org/10.31857/S0555109921050147

- Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В., Зоров И.Н., Соколова Л.М., Бубнова Т.М., Окунев О.Н., Синицын А.П. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 5. С. 699–709.
- 15. *Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M. et al.* // Biotechnol. J. 2010. V. 5. № 8. P. 871–880. https://doi.org/10.1002/biot.201000050
- 16. Синицын А.П., Синицына О.А., Рожкова А.М. // Биотехнол. 2021. Т. 36. №6. С. 24–41. https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-6-24-41
- Semenova M.V., Gusakov A.V., Volkov P.V., Matys V.Y., Nemashkalov V.A., Telitsin V.D., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. // Mol. Biol. Rep. 2019. V. 46. P. 2363–2370. https://doi.org/10.1007/s11033-019-04693-y
- 18. Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J. // Current Genetics. 1995. V. 28. P. 474–478.
- 19. Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. // Итоги науки и техники. М.: ВИНИТИ, Биотехнология. 1990. № 25. С. 148.
- Breslmayr E., Hanzek M., Hanrahan A., Leitner C., Kittl R., Santek B., Oostenbrink C., Ludwig R. // Biotechnol. Biofuels. 2018. V. 11. P. 79. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1063-6
- Markov A.V., Gusakov A.V., Kondratyeva E.G., Okunev O.N., Bekkarevich A.O., Sinitsyn A.P. // Biochem. 2005. V. 70. P. 657–663. https://doi.org/10.1007/s10541-005-0166-4
- 22. *Gusakov A.V., Semenova M.V., Sinitsyn A.P.* // J. Anal. Chem. 2010. V. 65. P. 1446–1461. https://doi.org/10.1134/S1061934810140030
- Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Horn S.J., Liu Z., Zhai H., Sørlie M., Eijsink V.G. // Science. 2010. V. 330. № 6001. P. 219–222. https://doi.org/10.1126/science1192231
- Гусаков А.В., Синицын А.П. // Вкн.: Химия биомассы: биотоплива и биопластики [Ред. С.Д. Варфоломеев]. М.: Научный мир, 2017. С. 65–99.
- Доценко Г.С., Чекушина А.В., Кондратьева Е.Г., Правильников А.Г., Андрианов Р.М., Осипов Д.О. и др. // Лесной Вестник. 2012. Т. 8. С. 129–135.
- 26. Karp S.G., Osipov D.O., Semenova M.V., Rozhkova A.M., Zorov I.N., Sinitsyna O.A., Soccol C.R., Sinitsyn A.P. // Agronomy. 2020. V. 10. № 9. https://doi.org/10.3390/agronomy10091348
- 27. Новожилов Е.В., Синельников И.Г., Аксенов А.С., Чухчин Д.Г., Тышкунова И.В., Рожкова А.М., Осипов Д.О., Зоров И.Н., Синицын А.П. // Катализ в промышленности. 2015. Т. 15. № 5. С. 78-83. https://doi.org/10.18412/1816-0387-2015-5-78-83
- Проскурина О.В., Короткова О.Г., Рожкова А.М., Кондратьева Е.Г., Матыс В.Ю., Зоров И. Н., Кошелев А. В., Окунев О. Н., Немашкалов В. А., Бубнова Т. В., Синицын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 6. С. 592–599. https://doi.org/10.7868/S0555109915060124

A New Enzyme Preparation Containing Polysaccharide Monooxygenase and β-Glucosidase – Synergistic Additives to Cellulases

M. V. Semenova^{*a*, *}, A. V. Gusakov^{*b*}, V. D. Telitsin^{*b*}, V. Y. Matys^{*c*}, T. V. Bubnova^{*c*}, V. A. Nemashkalov^{*c*}, A. M. Rozhkova^{*a*}, and A. P. Sinitsyn^{*a*, *b*}

^a Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia ^b Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, 119991 Russia

^c G.K. Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: margs@mail.ru

Based on the recipient strain of *Penicillium verruculosum* B1-537 (Δ niaD) using the promoter of cellobiohydrolase I gene, a producer of homologous lytic polysaccharide monooxygenase (**PMO**) and heterologous β -glucosidase *Aspergillus niger* (**BG**) – auxiliary enzymes for the "basic" cellulase complex consisting of endoglucanases and cellobiohydrolase – was obtained. The enzyme preparation PMO-BG was obtained, containing 34% PMO and 43% BG, which was used as a source of auxiliary enzymes that increase the effective-ness of basic cellulases *P. verruculosum* by 20–100% in the bioconversion of various types of cellulose-containing raw materials: microcrystalline cellulose, pretreated with alkali cane and semi-green sulfate deciduous cellulose of Arkhangelsk Pulp and Paper Mill JSC.

Keywords: polysaccharide monooxygenase, β-glucosidase, cellulases, synergism, bioconversion

УДК 577.19

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЕКРЕТИРУЕМОГО СОЕДИНЕНИЯ *PANTOEA BRENNERI* AS3, ОБЛАДАЮЩЕГО ФУНГИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2022 г. Д. Л. Иткина^{1, *}, А. Д. Сулейманова¹, М. Р. Шарипова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия *e-mail: laia9301@mail.ru Поступила в редакцию 12.10.2021 г. После доработки 15.12.2021 г.

Принята к публикации 28.02.2022 г.

Штамм *Pantoea brenneri* AS3 стимулирует рост растений и активен против патогенов, выделяя в культуральную среду вторичные метаболиты, подавляющие рост грибов. Выделен и идентифицирован активный вторичный метаболит, продуцируемый штаммом *P. brenneri* AS3, биосурфактант – n(2-гидроксигексадецил) диэтаноламиновая кислота, ингибирующий рост фитопатогена *Fusarium solani*. В дальнейшем он может быть использован при разработке биоудобрений и биопестицидов.

Ключевые слова: биоудобрения, бактерии, растения, биофунгицид, биосурфактант, *Pantoea, Fusarium* **DOI:** 10.31857/S0555109922040079

Поражение сельскохозяйственных культур патогенными микромицетами может иметь катастрофические последствия для агропроизводства, несмотря на все профилактические меры, принятые для контроля их распространения. Широкое использование химических веществ для борьбы с болезнями растений нарушает баланс сообществ микроорганизмов в почве, что приводит не только к развитию устойчивых штаммов-патогенов, но и загрязнению грунтовых вод и очевидным рискам для здоровья людей [1]. Разработка альтернативы химическим пестицидам для борьбы с болезнями сельскохозяйственных культур — одна из актуальных проблем, с которыми сталкиваются микробиологи и фитопатологи [2].

Более 80% всех известных болезней растений вызваны грибами – самой распространенной группой возбудителей [3]. В настоящее время эффективным методом контроля этих болезней растений является широкое применение химических фунгицидов. Однако активное использование химикатов наносит значимый ущерб окружающей среде, что вынуждает искать новые подходы, позволяющие свести к минимуму их использование. Применение микроорганизмов, обладающих биоконтрольными свойствами считается одним из них [4].

Способность ризобактерий контролировать рост патогенной микрофлоры растений осуществляется, с одной стороны, за счет стимулирующего воздействия на рост растения и улучшения его жизненного статуса: увеличение поступления минеральных элементов, фосфора, азота, расщепление сложных белков и др., с другой – за счет выделения соединений, обладаюших фунгицилными свойствами и способных подавлять развитие фитопатогенных бактерий и грибов в ризосфере [5]. Одной из стратегий преодоления ограничений в использовании бактериальных удобрений является использование автохтонных микроорганизмов, приспособленным к климатическим условиям каждого региона [6]. Таким образом, актуальным становится поиск эффективных адаптированных микроорганизмов, способных действовать как против патогенов растений, так и одновременно способствовать росту растений и повышать урожайность, при этом, не нарушая агроценоза и качества почвы.

Ранее из почв Республики Татарстан были выделены гидролизующие фитаты штаммы, идентифицированные молекулярно-генетическими методами как *Pantoea brenneri* [7]. В предыдущих исследованиях уже были показаны их PGP-свойства: установлена способность к секреции комплекса гидролитических ферментов (фитазы, протеазы, целлюлазы), деструкции цианидов (HCN), способность штаммов синтезировать фитогормоны и сидерофоры. Установлено, что штамм *P. brenneri* подавлял (>87%) рост микромицетов рода *Fusarium* [7, 8, 10].

Цель работы – очистка и идентификация секретируемого *P. brenneri* AS3 вещества, обладающего фунгицидной активностью по отношению к микромицетам рода *Fusarium*.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служил выделенный из почвы Республики Татарстан (Россия) бактериальный штамм *P. brenneri* AS3, способный к синтезу фитазы на дифференциальной среде PSM. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером BKM B-12911 [11].

Выделение соединений *Р. brenneri* AS3 с фунгицидной активностью. Штамм P. brenneri AS3 культивировали на среде NBRIP, следующего состава (г/л): глюкоза – 10.0; Ca₃(PO₄)₂ – 5.0; MgCl₂ · $\cdot 6H_2O - 5.0; MgSO_4 \cdot 7 H_2O - 0.25; KCl - 2.0;$ (NH₄)₂SO₄ – 0.1; агар-агар – 20, pH 6.8–7.0. Культивирование проводили в течение 24 ч при 37°С на качалке при 200 об./мин до достижение плотности клеток 10⁸ КОЕ/мл. Полученную культуральную жидкость фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм ("Millipore", Германия). Фильтрат центрифугировали с использованием центрифужного концентратора Amicon Ultra-15ml Ultracel 3K ("Millipore", Германия) при 3500 g (rcf). Полученную фракцию, содержащую низкомолекулярные вещества массой менее 3000 Да, концентрировали пропуская через картридж Discovery DSC C-18 SPE ("Superlco", США) для твердофазной экстракции. Сконцентрированные органические вещества промывали от остатков солей 1.5 мл 0.1%-ного раствора трифторуксусной кислоты (ТФУ) и 1 мл воды. Затем органические вещества эллюировали 500 мкл 80%-ного раствора ацетонитрила ("Biosolve", Франция). Растворитель упаривали в центрифужном испарителе Concentrator Plus ("Eppendorf", Германия) при 45°С под вакуумом. Полученный сухой остаток разводили в 5%-ном растворе ацетонитрила.

Фракционирование методом ВЭЖХ (HPLC). Полученные образцы фракционировали на жидкостном хроматографе UltiMate 3000 ("Thermo Scientific", США) на колонке Acclaim Polar Advantage II ("Dionex", США), C18 5 мкм, 120A, 4.6 × \times 250 мм.

Объем пробы, нанесенной на колонку – 50 мкл. Разделение проводили в условиях градиента: 2 мин 5%-ный ацетонитрил (АЦН), градиент 5– 70% АЦН 10 мин, 70%-ный АЦН 4 мин, от 70– 95% АЦН 5 мин, 95%-ный АЦН 5 мин со скоростью 1 мл/мин при температуре 25°С. Собранные фракции высушивали на центрифужном испарителе, а затем разводили в 20 мкл воды.

Повторная хроматорграфия на колонке Zorbax C-18. Для последующего выделения активной фракции с фунгицидной активностью проводили рехроматографию на колонке Zorbax C-18, 2.1 × × 150 мм, 5 мкм ("Agilent", США). На колонку наносили 80 мкл пробы, вещества разделяли в условиях градиента: 2 мин 40%-ный АЦН, от 40–90% АЦН 10 мин, 90%-ный АЦН 5 мин, градиент от 90–40% АЦН 5 мин со скоростью 0.5 мл/мин при температуре 25°С. Собранные фракции высушивали на центрифужном испарителе, разводили в 20 мкл воды и проверяли на фунгицидную активность.

Определение фунгицидной активности штамма *P. brenneri* AS3 и полученных при разделении фракций метаболитов. Оценку фунгицидной активности фракций после хроматографии проводили на среде Чапека (Γ/π): сахароза – 30; NaNO₃ – 3.0; KH₂PO₄ – 1.0; MgSO₄ · 7H₂O – 0.5; KCl – 0.5; Fe-SO₄ · 7H₂O – 0.01; агар-агар – 20. Контролем служил посев гриба *Fusarium solani* без добавления ингибирующего метаболита. В центр чашки Петри на агаризованную среду высевали штамм микромицета, на одинаковом расстоянии от посева раскладывали диски фильтровальной бумаги, пропитанные каждой фракцией [9].

Идентификация веществ. Идентификацию активного вещества проводили на масс-спектрометре QTrap 6500 ("AB Sciex", Канада). Фракцию разводили в 600 мкл воды и делили на 2 части. В одну часть добавляли 20 мкл 100 мМ раствора формиата аммония для получения спектра в режиме отрицательной ионизации; во вторую – добавляли муравьиную кислоту до конечной концентрации 0.1% для получения спектра в режиме положительной ионизации. Пробу вводили шприцом со скоростью 7 мкл/мин. Параметры сканирования, следующие: IS voltage – напряжение на источнике 5500 В, 250°С, режим сканирования MS Q1. Выбранные ионы далее отправлялись на фрагментацию в режиме MS Q2.

Программное обеспечение. Анализ масс-спектрометрических данных проводили с использованием программного обеспечения PeakView®2.1 (Sciex) и MasterView®1.1 (Sciex), которые осуществляют поиск по библиотечным базам данных, представленным на серверах http://www.massbank.jp; http://www.chemspider.com.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективный метод разделения сложных смесей методом ВЭЖХ был использован для выделения, очистки и идентификации, секретируемых штаммом *P. brenneri* AS3 веществ, обладающих фунгицидными свойствами. На первом этапе проводили фракционирование высушенного фильтрата культуральной жидкости штамма. Были получены низкомолекулярные вещества с массой менее 3000 Да, которые подвергали разделению на колонке Acclaim Polar Advantage II по степени гидрофобности. Результаты хроматографического анализа

том 58 № 4 2022



Рис. 1. Фракционирование культуральной жидкости *P. brenneri* AS3 методом ВЭЖХ на колонке Acclaim Polar Advantage II: I – 260 нм, II – 220 нм, 1–5 фракции с наибольшей ОП при 220–260 нм.



Рис. 2. Подавление роста мицелия *F. solani* фракциями 1–5, полученными при после разделения методом ВЭЖХ: К₁ – контроль, посев гриба без дисков с фракциями; *1–5* – фракции (см. рис. 1), нанесенные на диски, в двух повторностях; К₂ – исходный образец до разделения.

представлены на рис. 1. Было отобрано 5 фракций объемом 10 мкл с наибольшей оптической плотностью при 220—260 нм, которые далее исследовали на фунгицидную активность.

Ранее было установлено, что максимальная ингибирующая способность P. brennery AS3 проявлялась по отношению к микромицету F. solani, возбудителю корневой гнили и трахеомикозного увядания, предоставленному музеем кафедры микробиологии ИФМиБ К(П)ФУ. F. solani выделен из пораженных клубней картофеля в отделе сельскохозяйственной биотехнологии ГНУ Татарский НИИ сельского хозяйства Россельхозакадемии и идентифицирован нами ранее с помощью анализа последовательностей 5.8 S pPHK со стандартными праймерами ITS1 и ITS4. Рост микромицета ингибировался на 87% под действием бактериального штамма *P. brennery* AS3. [8]. Активность отобранных в процессе хроматографии фракций проверяли, используя тест-штамм F. solani как наиболее чувствительный к фунгицидному соединению, продуцируемому штаммом *P. brenneri* AS3. Определение фунгицидной активности штамма *P. brenneri* AS3 и фракций метаболитов после разделения проводили по методу, описанному в статье [9] (рис. 2). Максимальное фунгицидныое действие проявляла фракция № 5, активность которой соответствовала активности исходного не очищенного образца до разделения на хроматографе.

Выше описаны стадии разделения исходной фракции, полученной после разделения на фильтре на 2 части культуральной жидкости *P. brennery*: с молекулярной массой ниже и выше 3000 Да. Анализ второй половины фильтрата с молекулярной массой выше 3000 Да показал отсутствие фунгицидной активности.

На следующем этапе проводили рехроматографию активной фракции № 5 на колонке Zorbax C-18 (рис. 3).

После разделения собрали 8 фракций, которые тестировали на присутствие метаболитов, ингибирующих рост фитопатогена *F. solani* с использованием дисков, пропитанных каждой из них



Рис. 3. Разделение активной фракции № 5 на колонке Zorbax C-18: I – 260, II – 220, III – 330 нм (1-8 – активные фракции).



Рис. 4. Определение фунгицидной активности фракций после рехроматографии методом ВЭЖХ на колонке Zorbax C-18: К – посев без нанесения фракций; *1–8* – диски с нанесенными активными фракциями.

(рис. 4). Фунгицидной активностью обладали фракции 1, 2, 3 и 4, которые были использованы для дальнейшего анализа и идентификации.

Идентификация фунгицидного соединения. Анализировали фракцию № 3, соответствующую максимальному пику на хроматограмме (рис. 3). Идентификацию активного вещества проводили с помощью масс-спектрометра QTrap 6500. Добавление муравьиной кислоты позволило положительно ионизировать пробу, что изменило характер спектра первичных ионов, появились интенсивные сигналы с *m/z* 274.3; 282.3; 290.4; 318.4; 563.7, которые далее фрагментировали в режиме MS Q2 с использованием ионной ловушки для идентификации химического соединения (рис. 5).

Установлено, что ион с *m/z* 318 принадлежал нестабильному соединению, которое распадалось при низких энергиях СЕ (Colission energy). Поскольку данное вещество было нестабильно, вещества в пробе, подкисленной муравьиной кислотой, идентифицировали на масс-спектрометре TripleTOF 5600. Был обнаружен интенсивный сигнал с m/z 362, при фрагментации которого образовывались ионы с m/z 318 и 274, а также с m/z 150. На рис. 6 представлены спектры фрагментации ионов с m/z 362, 318.

377

Выброс нейтральной частицы с массой 62 (разница *m/z* 318–256, 212–150, 256–194) характерен при фрагментации для метоксиметильных простых эфиров, этиленгликолей, этиленкеталей. Выброс нейтральной частицы с массой 26 (разница между дочерними ионами m/z 256–230) могут давать при фрагментации ароматические соединения (потеря C₂H₂) или нитрилы (потеря CN). В случае родительского иона с *m/z* 362 наблюдали потерю нейтральной частицы с массой 44 (является разницей между родительским ионом и дочерним ионом m/z 318, а также между дочерними ионами 318-274, 176-132, 158-114), которая характерна для спектров фрагментации пропилалканов, диметиламинов, этиламинов, циклоалканов, циклических простых эфиров и этиленкеталей. Нейтральный фрагмент с массой 18 (является разницей между парами ионов с *m/z* 318-300, 362-344, 274-

том 58 № 4 2022



Рис. 5. Масс-спектр водного раствора фракции № 5 с добавлением муравьиной кислоты.



Рис. 6. Масс-спектры фрагментации ионов с *m/z* 362 (а); 318 (б).

256, 230-212, 150-132, 132-114, 194-176) принадлежит воде.

По предполагаемым нейтральным осколкам соединение, продуцируемое *P. brenneri* AS3, содержит кислород в составе спиртовых или эфирных групп, но не в составе карбоксильных групп, поскольку нет характерных нейтральных выбросов 17 (18) и последующего выброса 28, свидетельствующих о декарбоксилировании [13].

Первичную обработку полученных в результате QTRAPMS/MS-анализа масс-спектрометрических данных проводили с использованием



Рис. 7. Предполагаемое соединение, биосурфактант – n(2-гидроксигексадецил) диэтаноламиновая кислота.

программного обеспечения PeakView®2.1 (Sciex). Программа позволяла вычислить точную массу и интерпретировать одновременно структуру вещества по массе, фрагментам и изотопному распределению [14]. Дальнейшую обработку результатов проводили с помощью подпрограммы MasterView®1.1 (Sciex), которая осуществляла поиск по библиотечным базам данных (Chem Spider) http://www.massbank.jp; http://www.chemspider.com.

Установлено (табл. 1), что первое соединение $(C_{19}H_{44}N_3OP)$ не может быть искомым веществом, поскольку не встречается в природе. Наиболее вероятное соединение – $C_{20}H_{43}NO_4$ (структура представлена на рис. 7). Для него выявлены нейтральные осколки, соответствующие спектру исследуемого вещества, а также потеря трех молекул воды при фрагментации, свидетельствующая о наличии трех гидроксильных групп. На MS-спектре фрагментов родительского иона с m/z 362; 318 есть характерные для аминосоединений m/z: 114.132. Данные из базы Massbank позволяют утверждать, что в образце присутствуют аминосоединения с карбоксильной группой, поскольку имеются фрагменты ионов с более тяжелыми массами.

Результаты поиска по базе данных позволили предположить, что исследуемое вещество по наличию функциональных групп (неполярный алкановый фрагмент и полярные гидроксильные группы, аминогруппа) является биосурфактантом, то есть может нарушать целостность клеточной мембраны [12]. Исходя из анализа фрагментов и нейтральных выбросов, исследуемое вещество содержало остаток гидроксимиристиновой кислоты, связанной с многоатомным спиртом или углеводным остатком через остаток азота, что соответсвует структуре, представленной на рис. 7.

Биосурфактанты – поверхностно-активные вещества бактериального происхождения с выраженными мультифункциональными свойствами. Они привлекают внимание как альтернатива химически синтезированным аналогам, ввиду их способности подвергаться деструкции, не вызывая загрязнение окружающей среды [15]. Биосурфактанты представляют собой химически гетерогенную группу, которая включает гликолипиды, липопептиды, фосфолипиды, жирные кислоты, нейтральные липиды, полимерные соединения [16]. Бактерии и другие микроорганизмы легко разлагают биосурфактанты, поэтому они не токсичны для окружающей среды [12]. Микробные сурфактанты могут изменять физико-химические свойства среды обитания и оказывать влияние на структуру развивающегося микробного сообщества, предотвращая бактериальные и грибковые заболевания, являясь фактором биоконтроля среды [17]. В настоящее время биосурфактанты рассматриваются в качестве средства для биологической борьбы с фитопатогенами [18]. Фунгицидная активность по отношению к фитопатогенным микромицетам была продемонстрирована у таких соединений, как гликолипиды, целлобиозные липиды [19], рамнолипиды [20] и циклических липопептидов [21] включая сурфактин, итурин и фенгицин [22].

Формула	Оценка сходства	<i>m/z</i> , Да	Ошибка, ррт	Количество совпадений
C ₁₉ H ₄₄ N ₃ OP	78.7	362.32948	2.1	0
C ₂₀ H4 ₃ NO ₄	34.6	362.32649	6.1	13
$\mathrm{C_{16}H_{40}BN_5O_3}$	52.3	362.3297	3.6	0
$\mathrm{C}_{21}\mathrm{H}_{42}\mathrm{B}_{2}\mathrm{NP}$	4.1	362.331198	9.5	0
$C_{21}H_{39}N_5$	58.6	362.32782	2.4	2
$C_{19}H_{43}N_3O_3$	0	362.33772	24.9	1
$C_{15}H_{39}N_9O$	0	362.33503	17.5	0
$C_{16}H_{39}N_7O_2$	0	362.3238	13.5	0
				•

Таблица 1. Результаты анализа иона с m/z 362 с помощью программы Master View ($C_{20}H_{43}NO_4$ предполагаемое соединение)

Было показано, что бактерии рода Pantoea секретируют множество противомикробных соединений. Примером может служить вторичный метаболит, полученный из Pantoea ananatis 4G-9, обладающий противомикробной активностью в отношении Mycosphaerella musicola, представляющий собой по структуре производное индола [23]. Установлено, что бактерии рода Pantoea способны к синтезу бацилломицина и итурина, подавляющих возбудителей коричневой гнили плодов – Monilinia fructigena и М. laxa. [24]. При исследовании антимикробной активности P. aggolomerans против Penicillium citrinum выделены следующие соединения: аэругинальдегид и пуликатин С (C₁₁H₁₁NO₂S) [25]. Новый гликолипидный биосурфактант P. ananatis BRT 175 оказывал цитотоксично действие на амебы Dictyostelium discoideum, нарушая целостность клеток [26]. Штамм Pantoea sp. продемонстрировал способность к синтезу биосурфактантов, таких как гликолипил ананатозил А [27] и рамнолидов, обладающих выдающимся поверхностно-активными свойствами, а также полной биоразлагаемостью низкой токсичностью и хорошей стабильностью [28].

Полученные в работе результаты позволяют предположить, что *P. brenneri* AS3 может быть использован при получении препаратов биоудобрений и биопестицидов, поскольку обладал множественными биоконтрольными свойствами и синтезировал биосурфактант, ингибирующий рост фитопатогенного микромицета *F. solani*, вызывающего фузариозное увядание, сухую гниль клубней картофеля, плодов томатов, семян и зерновок хлебных злаков. [8].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-38-90208.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Aktar W., Sengupta D., Chowdhury A. // Interdiscip. Toxicol. 2009. V. 2. P. 1–12. https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7
- Bozkurt T. //American Journal of Plant Biology. 2017.
 V. 2. № 3. P. 28-31.
- https://doi.org/10.11648/j.ajpb.s.2017020301.1
- 3. *Титова Ю.А., Краснобаева И.Л.* //АгроЭкоИнженерия. 2019. № 2. С. 164–183.
- 4. *Etesami H., Beattie G.A.* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 1–20.
- https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00148
- 5. *Kosmidis C.D., Denning W. //* Infectious Diseases (Fourth Edition). 2017. V. 2. P. 1681–1709.
- Zahid M., Abbasi M.K., Hameed S.N. // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 1–15.
- Сулейманова А.Д., Иткина Д.Л., Пудова Д.С., Шарипова М.Р. // Микробиология. 2021. Т. 90. № 1. С. 100–109.
- Иткина Д.Л., Сулейманова А.Д., Шарипова М.Р. // Микробиология. 2021. Т. 90. № 2. С. 204–214.

- Grady E.N., MacDonald J., Ho M.T., Weselowski B., McDowell T., Solomon O., Renaud J., Yuan Z. // BMC Microbiology. 2019. V. 19. № 5. https://doi.org/10.1186/s12866-018-1380-8
- Itkina D., Suleimanova A. // E3S Web of Conferences DAIC. 2020. V. 222. № 02055. https://doi.org/10.1051/e3sconf/202022202055
- Suleimanova A.D., Beinhauer A., Valeeva L.R., Chastukhina I.B., Balaban N.P., Shakirov E.V., Greiner R., Sharipova M.R. // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. № 19. P. 6790–6799.
- 12. Duong D.A., Stevens A.M. // Peer J. 2017. V.6. № 5. P. 41-45.

https://doi.org/10.7717/peerj.4145

- 13. *Преч Э., Бюльманн Ф., Аффольтер К. //* Определение строения органических соединений. Таблицы спектральных данных. М.: Мир, 2006. 438 с.
- 14. Ильиных Е.С., Ким Д.Г. // Масс-спектрометрия в органической химии: учебное пособие. / Ред. Ильиных Е.С., Ким Д.Г., Челябинск: Издательский центр ЮУрГУ, 2016. 63 с.
- 15. Nawrath M.M., Ottenheim C., Chuan Wu J., Zimmermann W. // Microbiologyopen. 2020. V. 9. № 5. P. 1–14.
- 16. *Tacconelli E. Magrini N., Kahlmeter G., Singh N. //* J. Med. Soc. 2017. V. 32. № 1. P. 76–77.
- 17. *Farrar K., Bryant D., Cope-Selby N.* // Plant Biotechnol. J. 2014. V. 12. № 9. P. 1193–1206.
- Chopra A., Bobate S., Rahi P., Banpurkar A., Mazumder P.B., Satpute S. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. V. 8. № 861. P. 1–14.
- 19. Sato S., Fukuoka T., Saika A., Koshiyama T., Morita T. // J. Oleo Sci. 2019. V. 68. № 12. P. 1287–1294.
- Yan F, Hu H, Lu L, Zheng X. // Pest Manag. Sci. 2016. V. 72. № 8. P. 1500–1507. https://doi.org/10.1002/ps.4177
- Favaro G., Bogialli S., Gangi I.M. Di, Nigris S., Baldan E., Squartini A., Pastore P., Baldan B. // Rapid Commun Mass Spectrom. 2016. V. 30. № 20. P. 2237–2252.
- Zhang F., Huo K., Song X., Quan Y., Wang S., Zhang Z., Gao W., Yang C. // Microb. Cell Fact. 2020. V. 19. № 1. P. 223–242. https://doi.org/10.1186/s12934-020-01485-z
- Aman M., Rai R. // Biocont. Sci. Technol. 2015. V. 26. № 4. P. 1–35. https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1126223
- Lahlali R., Aksissou W., Lyousfi N., Ezrari S., Blenzar A., Tahiri A., Amiri S. // Microbial Pathogenesis. 2019. V. 139. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103914
- 25. Thissera B., Alhadrami H.A., Hassan M.H.A., Hassan H.M.,
- Behery F.A., Bawazeer M., Yaseen I.M., Belbahri L., Rateb M.E. // Biomolecules. 2020. V. 10. № 2. P. 268. https://doi.org/10.3390/biom10020268
- 26. Smith D.D.N., Nickzad A., Deziel E., Stavrinides J. // ASM Journals, mSphere. 2016. V. 1. № 1. https://doi.org/10.1128/mSphere.00075-15
- Almeida F.C.G., Lins C.I.M., Vieira A.M., Vilar C.J., Mota Lins C., Campos-Takaki G.M., Tambourgi E.B. // Microbes in App. Res. 2012. P. 348–352. https://doi.org/10.1142/9789814405041_0070
- Tan Y.N., Li Q. // Microb. Cell Fact. 2018. V. 17. № 1. P. 89–92. https://doi.org/10.1186/s12934-018-0938-3

Isolation, Purification and Identification of the Secrete Compound *Pantoea brenneri* AS3 with Fungicidal Activity

D. L. Itkina^{a, *}, A. D. Suleimanova^a, and M. R. Sharipova^a

^a Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia *e-mail: laia9301@mail.ru

The *Pantoea brenneri* AS3 strain stimulates plant growth and is active against pathogens, releasing secondary metabolites into the culture medium that inhibit the growth of fungi. An active secondary metabolite produced by the *P. brenneri* AS3 strain, a biosurfactant, n(2-hydroxyhexadecyl)diethanolamic acid, inhibiting the growth of the phytopathogen *Fusarium solani*, was isolated and identified using available methods. This suggests that it can be used in the production of biofertilizers and biopesticides.

Keywords: biofertilizers, bacteria, plants, biofungicide, biosurfactant, Pantoea, Fusarium

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ МЕДНО-НИКЕЛЕВЫХ КОНЦЕНТРАТОВ И МЕТАЛЛУРГИЧЕСКОГО ШЛАКА БИОГЕННЫМ РАСТВОРОМ ТРЕХВАЛЕНТНОГО ЖЕЛЕЗА

© 2022 г. Н. В. Фомченко¹, А. Е. Панюшкина¹, В. С. Меламуд¹, М. И. Муравьёв^{1, *}

¹Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: maxmuravyov@inmi.ru Поступила в редакцию 02.02.2022 г. После доработки 26.02.2022 г. Принята к публикации 28.02.2022 г.

Исследовано выщелачивание цветных металлов из медно-никелевых сульфидных концентратов и медно-никелевого шлака раствором сульфата трехвалентного железа, полученного микробным окислением сульфата двухвалентного железа. Процесс проводили при 80°C, pH 1.15 и концентрации Fe³⁺ 9.8 г/л. Показано, что основная часть никеля из шлаков выщелачивалась в течение 1.5 ч. При выщелачивании медно-никелевых концентратов в течение 7 ч не была достигнута максимально возможная концентрация цветных металлов. Скорости выщелачивания меди и никеля из шлаков были близкими и достигали 177 и 141 мг/(л · ч) соответственно. Скорости выщелачивания цветных металлов из медно-никелевых концентратов были значительно ниже и составляли от 25 до 39 мг/(л · ч) для никеля и от 14 до 23 мг/(л · ч) для меди. Эффективность выщелачивания медно-никелевых концентратов было примерно в 4 раза выше извлечения меди. При этом во всех осадках выщелачивания содержание меди повысилось по сравнению с исходными концентратами. Выщелачивание шлаков характеризовалось относительно небольшой продолжительностью, высоким извлечением цветных металлов в жидкую фазу (99%) и низким их содержанием в осадке выщелачивания (0.11–0.14%).

Ключевые слова: сульфидный концентрат, медно-никелевый шлак, биогидрометаллургия, химическое выщелачивание

DOI: 10.31857/S0555109922040043

Переработка многих сульфидных полиметаллических руд связана с технологическими трудностями их обогащения флотационными способами, которые не позволяют экономически эффективно получать селективные концентраты цветных металлов [1, 2]. Однако получение коллективных сульфидных концентратов, например, таких как медноцинковые и медно-никелевые, осуществляется относительно просто и дешево. Непригодные для пирометаллургической переработки, они могут представлять интерес для биогидрометаллургии, основанной на выщелачивании металлов с использованием микроорганизмов [3, 4].

Перспективным направлением является интенсивная биогидрометаллургическая технология переработки коллективных сульфидных концентратов цветных металлов с использованием биораствора трехвалентного железа, полученного с помощью хемолитотрофных микроорганизмов [5, 6]. При этом представляет интерес направление по селективному растворению минералов с низким электродным потенциалом (например, сфалерита) и концентрирование минералов с высоким электродным потенциалом (например, халькопирита) в твердой фазе с получением медного концентрата [7]. Ранее было показано, что из различных медно-цинковых концентратов наиболее эффективно выщелачивался цинк, а медь преимущественно оставалась в осадке, причем, чем выше было содержание халькопирита в концентрате и ниже содержание сфалерита, тем эффективнее цинк переходил в жидкую фазу из сфалерита, а халькопирит концентрировался в осадке выщелачивания [8].

Для развития направления по селективному выщелачиванию и концентрированию цветных металлов представляет интерес сравнение эффективности выщелачивания никеля из пентландита ((Ni,Fe)₉S₈) и виоларита (FeNi₂S₄) по сравнению с медью из халькопирита (CuFeS₂) в зависимости от соотношения содержания меди и никеля в концентратах.

Кроме того, сырьем для получения цветных металлов, в том числе меди и никеля, с помощью химического выщелачивания биораствором сульфата трехвалентного железа могут являться металлургические шлаки, полученные при переработке сульфидного сырья [9]. В шлаках цветные металлы могут содержаться в свободном виде, а также в виде сульфидов, оксидов и силикатов. Химизм выщелачивания металлургических шлаков с использованием раствора сульфата трехвалентного железа в сернокислой среде может быть описан упрощенными реакциями:

$$Cu^{0} + Fe_{2}(SO_{4})_{3} \rightarrow CuSO_{4} + 2FeSO_{4}, \qquad (1)$$

$$\operatorname{MeS} + \operatorname{Fe}_2(\operatorname{SO}_4)_3 \to \operatorname{MeSO}_4 + 2\operatorname{FeSO}_4 + \operatorname{S}^0, \quad (2)$$

$$Me_2SiO_4 + 2H_2SO_4 \rightarrow 2MeSO_4 + H_4SiO_4 , \quad (3)$$

где Me – Fe, Ni, Cu.

В растворе серной кислоты могут растворяться оксиды меди и никеля:

$$CuO \cdot Fe_2O_3 + 4H_2SO_4 \rightarrow$$

$$\rightarrow CuSO_4 + Fe_2(SO_4)_3 + 4H_2O,$$
(4)

$$\operatorname{NiO} \cdot \operatorname{Fe}_2 \operatorname{O}_3 + 4\operatorname{H}_2 \operatorname{SO}_4 \rightarrow$$

$$\to \operatorname{NiSO}_4 + \operatorname{Fe}_2 (\operatorname{SO}_4)_3 + 4\operatorname{H}_2 \operatorname{O}.$$
 (5)

С целью возможной комбинированной переработки сульфидных концентратов и металлургических шлаков важно провести сравнение скорости выщелачивания цветных металлов из них.

Цель работы — исследование химического выщелачивания медно-никелевых сульфидных концентратов с различным содержанием меди и никеля, а также медно-никелевого шлака и сравнение скорости выщелачивания цветных металлов из них.

МЕТОДИКА

Выщелачиваемый материал. В работе были использованы три пробы медно-никелевых концентратов, полученных при флотационном обогащении сульфидной руды Шанучского рудного поля (Камчатский край, Россия). Медно-никелевый шлак, полученный при металлургической переработке сульфидных руд, также был объектом исследований.

Выщелачивающий раствор. Для приготовления выщелачивающих растворов для высокотемпературного выщелачивания было использовано сообщество ацидофильных хемолитотрофных железоокислителей, включающее бактерии Acidithiobacillus ferrooxidans и Leptospirillum sp. Сообщество было выделено при 30°С из лежалых пиритных отходов обогащения сульфидных руд Гайского горно-обогатительного комбината (Россия). Выщелачивающий раствор был приготовлен путем биоокисления коммерческого реагента соли FeSO₄·7H₂O при 30°С в среде Сильвермана и Лундгрена 9 K [10]. Исход-

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

ное число клеток составляло 2 × 10⁷/мл. Культивирование проводили в бутылях на 5 л в течение 48 ч в условиях интенсивной аэрации со скоростью подачи воздуха 4 л/ч. Величину рН на уровне 1.4 в процессе биоокисления поддерживали добавлением 98.5%-ной серной кислоты. Полученный раствор содержал 9.8 г/л Fe³⁺. Численность микроорганизмов сообщества достигала 5 × 10⁸ кл./мл. Этот раствор разбавляли дистиллированной водой до необходимой концентрации Fe³⁺ и после добавления 98.5%-ной серной кислоты до рН 1.15 использовали для окислительного высокотемпературного выщелачивания исследуемых продуктов.

Выщелачивание. Опыты проводили в реакторе объемом 500 мл, содержавшем 200 мл суспензии, при перемешивании верхнеприводной четырехлопастной мешалкой (с наклоненными под углом 45° лопастями) с скоростью 500 об./мин. Реактор был погружен в водяную баню для термостатирования при 80°С. Выщелачиваемый материал загружали в таком количестве, чтобы содержание твердой фазы в суспензии составляло 1%. Продолжительность выщелачивания составляла 7 ч для медно-никелевых концентратов и 3 ч для медно-никелевого шлака.

Аналитические методы. Значения pH измеряли с помощью pH-метра pH-150MИ ("Измерительная техника", Россия). Концентрации Fe³⁺ и Fe²⁺ в жидкой фазе определяли титриметрическим методом с трилоном Б [11]. Концентрацию ионов меди и никеля определяли на атомно-абсорбционном спектрометре с пламенной атомизацией 3100 ("Perkin Elmer", США).

Выход твердой фазы (%) определяли по формуле:

$$\gamma = \frac{m_{\rm oc}}{m_{\rm \mu cx}} \times 100,\tag{6}$$

где $m_{\rm oc}$ — масса осадка (г) после биовыщелачивания, $m_{\rm исx}$ — масса исходного концентрата (г) в суспензии.

Извлечение цветных металлов (%) в раствор определяли по формуле:

$$\varphi = \frac{10CV}{m_{\mu cx}\beta_{\mu cx}},\tag{7}$$

где C – концентрация металла в растворе (мг/л), V – объем реакционной смеси (л), $\beta_{\text{исх}}$ – содержание металла в исходном сырье (%).

Среднюю скорость выщелачивания меди и никеля (мг/(л · ч)) определяли по формуле:

$$\vartheta = \frac{C}{\tau},\tag{8}$$

где т – время (ч).

том 58 № 4 2022

Провуда	Содержание, %					<i>L</i> *	
продукт	Cu	Ni	Fe	S	Si	r	
Шлак	2.1	2.7	16.7	1.9	17.1	0.8	
Концентрат Sh0	10.8	7.2	21.8	26.5	7.95	1.5	
Концентрат Sh1	15.7	7.5	21.3	29.0	5.97	2.2	
Концентрат Sh2	19.1	4.6	21.6	30.3	5.74	4.1	

Таблица 1. Содержание основных элементов в концентратах и шлаке

* *k* – отношение содержания меди к никелю.

Удельную скорость выщелачивания цветных металлов (мг/(г·ч)) определяли по формуле:

$$\omega = \frac{\varphi}{\tau} \times 10. \tag{9}$$

Статистический анализ. Все эксперименты и измерения проводили в двух повторностях. Статистическую обработку выполняли с помощью программы Microsoft Excel 2013. Достоверность результатов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости $p \le 0.1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование химического и минерального состава сульфидных концентратов показало, что они содержали халькопирит (CuFeS₂), пентландит ((Ni,Fe)₉S₈), виоларит (FeNi₂S₄), пирротин (Fe_{1-x}S), пирит (FeS₂), а также нерудные минералы – ярозит, плагиоклаз, хлорит, кварц. Основная кристаллическая часть металлургического шлака была представлена фаялитом (Fe₂SiO₄). Медь присутствовала как в свободном виде (Cu⁰), так и в составе дигенита (Cu₉S₅), борнита (Cu₅FeS₄) и халькопирита (CuFeS₂). Никель в шлаке находился в со-



Рис. 1. Концентрация Fe^{2+} при выщелачивании медно-никелевых концентратов Sh0 (*1*), Sh1 (*2*), Sh2 (*3*) и медно-никелевого шлака (*4*).

ставе серпентина ((Mg,Fe,Ni) $_3$ Si $_2O_5$ (OH) $_4$). Содержание основных элементов в концентратах и шлаке дано в табл. 1.

В процессе выщелачивания проводили контроль концентрации ионов железа и цветных металлов. Показано, что трехвалентное железо восстанавливалось до двухвалентного, при этом цветные металлы переходили из твердой фазы в жидкую. На рис. 1 представлена динамика изменения концентрации Fe²⁺ в процессе выщелачивания концентратов и шлака. Из данных следует, что химическое выщелачивание шлака протекало значительно быстрее, чем медно-никелевых концентратов. Так, за 2 ч была достигнута максимальная концентрация ионов Fe²⁺ и процесс выщелачивания практически завершился. При выщелачивании медно-никелевых концентратов накопление ионов двухвалентного железа продолжалось на протяжении всего процесса (7 ч).

Изменение концентрации цветных металлов в зависимости от времени выщелачивания представлено на рис. 2. Данные свидетельствуют о значительно более высокой скорости изменения концентраций меди и никеля при выщелачивании шлаков. При этом процесс выщелачивания шлаков почти прекращался по прошествии 1.5 ч от начала, так как при этом была зафиксирована максимальная концентрация цветных металлов в жидкой фазе. В случае медно-никелевых концентратов даже за 7 ч не была достигнута максимально возможная концентрация цветных металлов, а концентрация никеля превышала концентрацию меди для всех трех концентратов.

Результаты расчетов скорости выщелачивания цветных металлов представлены на рис. 3. Для шлаков скорости выщелачивания металлов были близкими, достигая 177 и 141 мг/(л · ч) для никеля и меди соответственно. Скорости выщелачивания цветных металлов из медно-никелевых концентратов были значительно ниже. Так, скорость выщелачивания никеля из концентратов Sh0 и Sh1 были близкими – 39 и 37 мг/(л · ч), так как содержание никеля в них было близким. При этом увеличение содержания меди в концентрате Sh1 почти на 5% по сравнению с концентратом Sh0 на скорость выщелачивания никеля влияния не оказывало. Самая низкая скорость выщелачивания никеля наблюдалась для концентрата Sh2 (25 мг/(л · ч)) и была связана с наименьшим содержанием этого металла в концентрате. Скорость выщелачивания меди была значительно ниже, чем скорость выщелачивания никеля – от 14 до 23 мг/(л · ч).

Для сравнения эффективности выщелачивания всех исследованных продуктов были рассчитаны удельные скорости выщелачивания из них цветных металлов (рис. 4). Данные свидетельствуют о том, что удельная скорость выщелачива-


Рис. 2. Концентрация никеля (1-4) и меди (1-4) при выщелачивании концентратов Sh0 (1, 1), Sh1 (2, 2), Sh2 (3, 3) и шлака (4, 4).

ния никеля из трех концентратов была схожей – 49.3–54.7 мг/(г · ч). При этом скорость выщелачивания меди также различалась незначительно, но была существенно ниже – 14.1–23.5 мг/(г · ч).

Сравнение процессов выщелачивания меди и никеля из медно-никелевых концентратов и медно-никелевого шлака выявило значительную разницу в удельной скорости выщелачивания цветных металлов. Скорость выщелачивания как никеля, так и меди из шлака достигала 665 мг/(г · ч). Такое высокое значение, очевидно, связано с тем, что основное количество металлов в шлаке присутствовало в свободном виде, а также в составе оксидов, которые относительно быстро растворялись в кислом растворе сульфата трехвалентного железа. Таким образом, удельная скорость выщелачивания никеля из шлака превышала таковую для сульфидных концентратов приблизительно в 13 раз.

На основании рис. 1 расчет средней скорости накопления двухвалентного железа в жидкой фазе в течение 2 ч, которое образовывалось при восстановлении железа в окислительно-восстанови-



Рис. 3. Средняя скорость выщелачивания меди и никеля из концентратов Sh0 (1), Sh1 (2), Sh2 (3) и шлака (4).

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ



Рис. 4. Средняя удельная скорость выщелачивания меди и никеля из концентратов Sh0 (1), Sh1 (2), Sh2 (3) и шлака (4).

том 58 № 4 2022

Пролукт	BUYOT OCATER %	Извлеч	ение, %	Содержание, %		
продукт	Былод осадка, 70	Ni	Cu	Ni	Cu	
Концентрат Sh0	76.5	39.3	10.5	5.7	11.5	
Концентрат Sh1	75.5	39.7	9.7	6.0	18.8	
Концентрат Sh2	76.5	38.6	9.3	3.7	22.7	
Шлак	77.1	99.6	99.4	0.11	0.14	

Таблица 2. Основные результаты исследований высокотемпературного выщелачивания медно-никелевых концентратов и шлака при 80°C, pH 1.15

тельных реакциях, показал, что максимальное ее значение наблюдалось при выщелачивании шлаков и составило 1000 мг/(л · ч). При выщелачивании концентратов Sh0, Sh1 и Sh2 эта скорость была ниже и составила около 790 мг/(л · ч).

Расчет расхода Fe³⁺, приходящегося на 1 мг выщелоченных суммарно меди и никеля из исследуемых продуктов, показал, что наименьшее значение было получено для шлака – 2.5 мг/мг. Расход Fe³⁺ при выщелачивании трех проб концентратов был близким по отношению друг к другу и составил около 7.2 мг/мг. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в концентратах преобладали сульфидные минералы с высокой энергией кристаллической решетки, окисление которых требовало большего времени окисления и большего расхода окислителя. В шлаках, очевидно, преобладали легкоокислямые компоненты, например, свободные металлы и оксиды. Такие соединения легко окисляются или растворяются в растворах сернокислого трехвалентного железа [12].

По результатам проведенных исследований были рассчитаны основные технологические показатели высокотемпературного химического выщелачивания всех исследованных медно-никелевых продуктов. Результаты исследований представлены в табл. 2. Данные свидетельствуют о том, что выщелачивание шлаков характеризовалось высоким извлечением цветных металлов в жидкую фазу (99%) и получением осадка с очень низким их содержанием (0.11-0.14%). Эффективность выщелачивания медно-никелевых концентратов не зависела от их химического состава, однако извлечение никеля в жидкую фазу было примерно в 4 раза выше извлечения меди. При этом во всех осадках выщелачивания содержание меди повышалось по сравнению с исходными концентратами.

Таким образом, показано, что основные закономерности, полученные при выщелачивании медноцинковых коллективных концентратов, сохранялись и при выщелачивании медно-никелевых концентратов. Медь, находившаяся в них в виде упорного (трудноокисляемого) халькопирита, концентрировалась в твердой фазе. Никель, как и цинк, переходил в жидкую фазу, но из-за более высоких электродных потенциалов никелевых минералов эффективность их выщелачивания была ниже, чем эффективность выщелачивания цинка из сфалерита.

Высокотемпературное выщелачивание медноникелевого шлака позволило перевести в жидкую фазу медь наравне с никелем, так как оба эти металла находились в этом сырье в более легкоокисляемой и легкорастворимой форме по сравнению с медно-никелевыми концентратами.

Осадок выщелачивания характеризовался низким содержанием цветных металлов и мог считаться отходом. Хранение полученных после выщелачивания отходов, очевидно, не будет оказывать отрицательного влияния на окружающую среду, в то время, как хранение самих шлаков загрязняет почву и воду тяжелыми металлами в местах их складирования.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Российского научного фонда № 21-14-00077 (в части выщелачивания концентратов) и Российского фонда фундаментальных исследований № 18-29-24103 (в части выщелачивания шлака).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Черноусенко Е.В., Алексеева С.А., Рухленко Е.Д., Митрофанова Г.В. // Горный журн. 2020. № 3. С. 45–50.
- 2. Лесникова Л.С, Дациев М.С., Сисина А.Н., Чикильдин Д.Е. // Цветные металлы. 2020. № 6. С. 28–32.

- Ahmadi M., Hosseini M.R., Ahmadi A., Foroutan A. // Miner. Eng. 2020. V. 156. № 106529. https://doi.org/10.1016/j.mineng.2020.106529
- Abdollahi H., Shafaei S.Z., Noaparast M., Manafi Z., Niemelä S.I., Tuovinen O.H. // Int. J. Miner. Proc. 2014. V. 128. P. 25–32.
- Муравьев М.И., Панюшкина А.Е., Меламуд В.С., Булаев А.Г., Фомченко Н.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 4. С. 380–387.
- 6. *Carranza F., Palencia I., Romero R.* // Hydrometallurgy. 1997. V. 44. № 1–2. P. 29–42.
- 7. *Фомченко Н.В., Муравьев М.И.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 1. С. 82–87.

- Fomchenko N.V., Muravyov M.I. // Hydrometallurgy. 2019. V. 185. P. 82–87.
- Fomchenko N., Muravyov M. // Minerals. 2020. V. 10. № 12. P. 1097. https://doi.org/10.3390/min10121097
- 10. Silverman M.P., Lundgren D.C. // J. Bacteriol. 1959. V. 77. № 5. P. 642–647.
- Davis D.G., Jacobsen W.R. // Anal. Chem. 1960. V. 32. № 2. P. 215–217.
- Sun J., Zhou W., Zhang L., Cheng H., Wang Y., Tang R., Zhou H. // J. Environ. Manag. 2021. V. 284. № 112133. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112133

Comparison of Leaching of Copper-Nickel Concentrates and Metallurgical Slag with Biogenic Ferric Iron

N. V. Fomchenko^a, A. E. Panyushkina^a, V. S. Melamud^a, and M. I. Muravyov^a, *

^a Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: maxmuravyov@inmi.ru

The leaching of nonferrous metals from copper-nickel sulfide concentrates and copper-nickel slags with ferric sulfate solution obtained by microbial oxidation of ferrous sulfate was studied. The process was carried out at 80° C, pH 1.15, and 9.8 g/L Fe³⁺. Most of nickel was shown to be leached from the slags within 1.5 h. When copper-nickel concentrates were leached for 7 h, the maximum possible concentration of nonferrous metals was not reached. The leaching rates of copper and nickel from slags were close: up to 177 and 141 mg/(L h), respectively. The leaching rates of nonferrous metals from copper-nickel concentrates were significantly lower and ranged from 25 to 39 mg/(L h) for nickel and from 14 to 23 mg/(L h) for copper. The efficiency of leaching of the copper-nickel concentrates was independent of their chemical composition. However, the nickel recovery into the liquid phase was approximately four times higher than the extraction of copper. At the same time, the copper content increased in all leach residues, in comparison with the original concentrates. Slag leaching was characterized by a relatively short duration, high recovery of nonferrous metals into the liquid phase (99%), and their low content in the solids (0.11–0.14%).

Keywords: sulfide concentrate, copper-nickel slag, biohydrometallurgy, ferric leaching

УДК 543.55

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЦЕЛЛЮЛОЗА КАК МАТРИЦА ДЛЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

© 2022 г. С. Е. Тарасов¹, Ю. В. Плеханова¹, А. Е. Китова¹, А. Г. Быков¹, А. В. Мачулин¹, В. В. Колесов², Н. А. Кленова³, В. В. Ревин⁴, О. Н. Понаморева⁵, А. Н. Решетилов^{1, 5, *}

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФГБУН "ФИЦ ПНЦБИ РАН", Московская обл., Пущино, 142290 Россия

²Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Москва, 125009 Россия

³Самарский национальный исследовательский университет им. С.П. Королева, Самара, 443086 Россия

⁴Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарева,

Саранск, 430005 Россия

⁵Тульский государственный университет, Тула, 300012 Россия

*e-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru Поступила в редакцию 09.02.2022 г. После доработки 18.02.2022 г. Принята к публикации 28.02.2022 г.

Для создания амперометрического биосенсора была использована бактериальная целлюлоза (БЦ), продуцируемая бактериями *Komagateibacter sucrofermentas* ВКПМ В-11267, в качестве носителя для иммобилизации уксуснокислых бактерий *Gluconobacter oxydans*. Биосенсор формировали на поверхности печатного графитового электрода, модифицированного наноматериалом – терморасширенным графитом (**ТРГ**), или на поверхности пористого трехмерного материала – никелевой пены (**НП**). Структурные особенности этих материалов способствовали созданию плотного контакта между материалом электрода и поверхностью БЦ, на которой были иммобилизованы бактериальные клетки. Методом сканирующей электронной микроскопии (**СЭМ**) показано, что бактерии не только сорбировались на поверхности БЦ, но и проникали во внутренний объем пленки. С помощью импедансометрии изучена проводимость двух типов биосенсоров и показано уменьшение сопротивления графитового электрода на 3 порядка при модификации его поверхности **ТРГ**. Биоэлектроды, содержащие БЦ, применили в конструкции амперометрического биосенсора для определения содержания глюкозы. Значение коэффициента чувствительности биосенсора для определения содержания глюкозы. Значение коэффициента трехование быть использована для создания трехмерных электродов биоэлектрокаталитических устройств.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, биоэлектроды, уксуснокислые бактерии, *Gluconobacter oxydans*, терморасширенный графит, никелевая пена, биосенсоры, микробные топливные элементы **DOI:** 10.31857/S0555109922040158

Одним из важнейших этапов создания биосенсоров и биотопливных элементов является иммобилизация на носителе или получение биокатализатора [1]. Иммобилизация должна обеспечивать надежную фиксацию биологического компонента на поверхности электрода или в его объеме (в случае использования электродов, имеющих трехмерную структуру активной части) и сохранение каталитической активности объекта в течение длительного времени [2]. Кроме того, иммобилизующие агенты не должны препятствовать переносу субстратов к активным центрам ферментов, а также переносу электронов в системе [3]. Одним из распространенных методов иммобилизации бактерий и ферментов является их включение в полимерные гели. Полимеры, используемые для иммобилизации биокатализаторов, можно разделить на две группы — природные и синтетические. Синтетические матрицы для иммобилизации включают поливиниловый спирт [4], полиакриламид [5], полиэтиленгликоль [6], полианилин [7] и другие. Природные полимеры, такие как, белковые гидрогели [8], альгинаты [9], каррагинаны [10], хитин и хитозан [11], желатин [12], агар [13], а также бактериальная целлюлоза (**БЦ**) [14] обладают биосовместимостью [15], их применение не оказывает отрицательного воздействия на человека и на окружающую среду, уменьшая ее загрязнение веществами синтетического происхождения.

Одним из продуктов современной биотехнологии является бактериальная целлюлоза, которую способны продуцировать как грамположительные [16], так и грамотрицательные [17] бактерии. Биологическая роль БЦ связана с защитой клеток микроорганизмов от высыхания и других неблагоприятных факторов внешней среды. БЦ обладает повышенной влагоудерживающей способностью, гидрофильностью, ультрадисперсной сетчатой архитектурой и прочностью [18]. Для эффективной иммобилизации микроорганизмов на БЦ зачастую проводится их культивирование в присутствии полисахарида. Такой подход позволяет получить биокомпозиты, в которых клетки равномерно распределены в гидрогеле целлюлозы и прочно связаны с полимером, однако он является длительным и достаточно сложным методически [14]. При этом следует отметить, что БЦ обладает достаточно низкой электрической проводимостью [19], в связи с чем ее используют в сочетании с наночастицами металлов [20, 21] или углеродными наноматериалами, призванными снизить сопротивление БЦ [22, 23].

Бактериальная целлюлоза является перспективным материалом для получения широкого спектра продуктов и наноматериалов, в том числе для медицины [24], диетологии [25], промышленной электронике [26]. Тем не менее, многие аспекты ее полезного применения в различных областях промышленности находятся в стадии изучения, например, взаимодействие БЦ со многими металлическими и углеродными матрицами. Интерес представляет изучение свойств комплексов БЦ с таким материалом, как никелевая пена (НП). Этот материал обладает высокой электрической проводимостью и позволяет легко формировать электроды различной формы и площади [27], чтопредставляется особенно важным качеством при создании биотопливных элементов (БТЭ).

Не изучено взаимодействие БЦ с таким углеродным материалом, как терморасширенный графит (**ТРГ**). ТРГ характеризуется значительной электропроводностью, что обусловлено большой удельной площадью его поверхности и высокой биосовместимостью, а также позволяет формировать дополнительные связи между биологическим компонентом и поверхностью электрода для эффективной передачи заряда [28].

В качестве объекта в работе выбраны уксуснокислые бактерии *Komagateibacter sucrofermentas* как продуцент БЦ, и *Gluconobacter oxydans* как биокатализатор в составе биосенсоров. *К. sucrofermentas* является одним из наиболее часто используемых для получения БЦ микроорганизмов [17], а *G. oxydans* содержат во внешней мембране пирролохинолинхинон-зависимые дегидрогеназы [11], обеспечивающие эффективный перенос электронов при участии редокс-соединений (медиаторов электронного транспорта) на проводящую поверхность электрода. В качестве модельного субстрата для проверки работоспособности разработанных композиций в составе биосенсоров использовали глюкозу, т. к. определение глюкозы — один из наиболее востребованных анализов как в промышленности, так и в медицине.

Цель работы — оценка возможности использования бактериальной целлюлозы как полимерной матрицы для иммобилизации уксуснокислых бактерий *G. oxydans* в биосенсорах амперометрического типа, основанных на трехмерных проводящих материалах: графитовых печатных электродах, модифицированных терморасширенным графитом, либо на никелевой пене.

МЕТОДИКА

Реагенты. В работе использовали калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный, натрия гидроксид, натрий хлористый, уксусную кислоту, соляную кислоту, гидрофосфат натрия, этиловый спирт, лимонную кислоту ("Мосреактив", Россия); натриевую соль 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ), хитозан низкомолекулярный, оксид осмия (VIII), трет-бутиловый спирт, трис(гидроксиметил)аминометан ("Merck", Германия); сорбит, глюкозу, дрожжевой экстракт, глутаровый альдегид, трис(гидроксиметил)аминометан ("Merck", Германия); сорбит, глюкозу, дрожжевой экстракт, агар-агар бактериологический, пептон ("Диа-М", Россия). В качестве рабочих использовали фрагменты никелевой пены ("Xiamen Tob New Energy Technology Co.", Китай), и 3-контактные электроды, полученные методом матричной печати (ЭМП) ("КолорЭлектроникс", Россия). В качестве модифицирующего материала использовали терморасширенный графит, полученный по методике, описанной в работе [28].

Культивирование клеток микроорганизмов. В работе использовали штамм Gluconobacter oxydans sbsp. industrius BKM B-1280 (Всероссийская коллекция микроорганизмов, Россия). Культивирование проводили по методике, описанной в работе [29] в течение 18-20 ч до достижения стационарной фазы роста, при которой количество жизнеспособных клеток близко к максимальному. Выращивание проводили в колбах Эрленмейера объемом 750 мл при перемешивании (200 об/мин, 28°С) в 50 мл среды, содержащей (%): сорбит – 10. дрожжевой экстракт – 0.2 (вода дистиллированная). Клетки отделяли центрифугированием при 10000 д в течение 5 мин. Осадок отмывали дважды 25 мМ К-фосфатным буферным раствором, рН 6.5. Культуру поддерживали на скошенной агаризованной среде, содержащей (г/л): сорбит – 100.0, дрожжевой экстракт — 5.0 и агар-агар 15.0.

Получение бактериальной целлюлозы. Культивирование Komagateibacter sucrofermentas осуществляли при температуре 28°C в течение 3 сут на скошенной агаризованной среде следующего состава, г/л: глюкоза — 10.0; дрожжевой экстракт — 10.0; пептон — 7.0; агар-агар — 15.0; лимонная кислота — 0.2; уксусная кислота – 0.1; этанол – 10.0, pH 5.0–6.0. Peжим стерилизации: 121°С в течение 15 мин без этанола в автоклаве MLS-3781L ("Sanyo", Япония). Для получения инокулята использовали среду Хестрин-Шрамма, содержащую (г/л): глюкоза – 20.0; пептон – 5.0; дрожжевой экстракт – 5.0; гидрофосфат натрия – 2.7; лимонная кислота – 1.15, Выращивали в колбах объемом 250 мл, содержащих 100 мл среды на шейкере-инкубаторе ES – 20/60 ("Biosan", Латвия) при 250 об./мин в течение 24 ч при температуре $28 \pm 1^{\circ}$ С. Полученным инокулятом (10% от объема среды) засевали опытные колбы, содержащие по 100 мл среды. Культивирование проводили в шейкере-инкубаторе при 250 об./мин и температуре $28 \pm 1^{\circ}$ С в течение 3-6 сут [30], а затем стационарно 5 сут с добавлением свежей среды в соотношении 1:1.

Полученные пленки промывали проточной водой, затем освобождали от остатков клеток обработкой 0.1 н NaOH при 80°C в течение 30 мин. Затем отмывали дистиллированной водой до pH 7.0 и выдерживали 30 мин в 1.5%-ной соляной кислоте, затем снова отмывали дистиллированной водой до нейтральной реакции. Полученные пленки подсушивали на фильтровальной бумаге и хранили в 70%-ном этиловом спирте.

Для удаления остатков этилового спирта из образцов БЦ их переносили из среды хранения в раствор фосфатного буфера на 24 ч и высушивали до постоянного веса в течение 3 ч. Для оценки содержания влаги в БЦ полученные образцы взвешивались в нативном (Вг) и высушенном до постоянного веса (Вс) состояниях.

Оценка дыхательной активности бактерий. Измерение дыхательной активности бактериальных клеток проводили с помощью кислородного электрода Кларка. На носитель наносили 15 мкл бактериальной суспензии G. oxydans (0.5 мг/мл). В качестве носителей использовали хроматографическую бумагу Whatman GF/A ("Sigma", США) размером 3 × 3 мм², фрагменты никелевой пены размером 3×3 мм² и толщиной 1 мм, фрагмент пленки БЦ толщиной 30 мкм размером 3 × 3 мм². Измерения проводили в кювете объемом 2 мл, содержащей 25 мМ калий-фосфатный буфер, pH 6.5, при постоянном перемешивании и температуре 27°С. Регистрируемым параметром была максимальная скорость изменения выходного сигнала электрода dI/dT (нA/c), связанная пропорциональной зависимостью со скоростью изменения концентрации кислорода, потребленного иммобилизованными клетками биорецептора, в ответ на внесение субстрата в измерительную ячейку.

Формирование биосенсоров на основе электродов матричной печати. ЭМП представлял собой композицию вспомогательного и рабочего электродов, выполненных из графитовой пасты Electrodag 6017SS ("Henkel", Германия), и электрода сравнения (Ag/AgCl). Диаметр рабочего электрода составлял 3 мм. При формировании печатных электродов, модифицированных терморасширенным графитом (**ТРГ**), на рабочем электроде закрепляли слой **ТРГ** толщиной 0.1 мм прессованием под давлением в 150 бар. Схема формирования рабочего электрода представлена на рис. 1.

На рабочий электрод биосенсора наносили 10 мг БЦ, предварительно промытой в дистиллированной воде. Затем электрод с нанесенной БЦ высушивали при комнатной температуре в течение 3 ч и наносили 5 мкл суспензии бактерий с концентрацией 0.5 мг/мкл (рассчет на сырые клетки) и оставляли на 12 ч при температуре 4°С. В качестве контрольного электрода использовали биосенсор с клетками *G. охуdans*, иммобилизованными в геле хитозана [31]. Содержание клеток бактерий на электроде составляло 0.12 мг/мм².

Формирование биосенсоров на основе электродов из никелевой пены. В качестве основы для трехмерных электродов использовали никелевую пену, применяемую для создания батарей и суперконденсаторов. Чистота образца составляла 99.8%, толщина НП составляла 0.5 мм, пористость 97%, плотность 350 г/м², размер пор варьировал в пределах 0.1-0.3 мм. Для формирования электродов использовали фрагменты НП размером 3×3 мм². На фрагмент НП наносили 10 мг БЦ, предварительно промытой в дистиллированной воде. Электрод с нанесенной БЦ высушивали при температуре 25°С в течение 24 ч. Затем на поверхность электрода наносили 10 мкл суспензии бактерий и оставляли на 1 ч при комнатной температуре. Содержание клеток бактерий на электроде составляло 0.12 мг/мм². Схема формирования рабочего никелевого электрода представлена на рис. 1. Полученный электрод использовали в качестве рабочего, вспомогательным электродом служила платиновая пластина площадью 10×5 мм², а электродом сравнения служил Ag/AgCl электрод.

Схема измерений. Электрохимические измерения проводили в кювете объемом 5 мл при температуре 25°С и постоянном перемешивании (500 об./мин). В качестве фонового раствора использовали 25 мМ К-фосфатный буфер, рН 6.5, содержащий 10 мМ хлорид натрия. Для регистрации сигналов электрода использовали гальванопотенциостат IPCmicro ("Кронас", Россия) или гальванопотенциостат-импедансметр VersaSTAT 4 ("Ametek Inc.", США). Хроноамперометрические



Рис. 1. Схема формирования трехмерных электродов.

зависимости регистрировали при приложенном потенциале +200 мВ (vs Ag/AgCl) (для измерений ЭМП), либо +400 мВ (vs Ag/AgCl) (для измерений НП) в присутствии медиатора электронного транспорта ДХФИФ (0.14 мМ). Циклические вольтамперограммы (ЦВА) регистрировали при скорости сканирования 40 мВ/с в диапазоне от -500 до +500 мВ. Значения параметров биосенсоров приведены как средние из 5 измерений.

Импедансные характеристики измеряли при приложенном потенциале +200 мВ (vs Ag/AgCl) либо +400 мВ (vs Ag/AgCl) в диапазоне частот от 40 кГц до 0.2 Гц при амплитуде модуляции напряжения 10 мВ в присутствии 0.14 мМ ДХФИФ. Подходящую эквивалентную электрическую схему для каждой системы подбирали с помощью программы ZSimpWin ("EChem Electrochemystry Software", USA). Схема считалась подходящей, если погрешность определения параметров была ниже 10%.

Сканирующая электронная микроскопия. Образцы для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) перед измерениями предварительно высушивали в течение 4 ч при температуре 25°С в соответствии с рекомендациями фирмыпроизводителя. СЭМ-анализ образцов БЦ, содержащих клетки микроорганизмов, выполняли с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM6510 LV ("JEOL", Япония) в режиме высокого вакуума при регистрации вторичных электронов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические параметры БЦ. Известно, что пористая нитевидная структура БЦ образована микрофибриллами диаметром около 100 нм, что обеспечивает высокую влагоудерживающую способность (**ByC**) за счет капиллярных взаимодействий и формировании гидрофильной оболочки на поверхности фибрилл [32]. ВУС бактериальной целлюлозы составляла 98 \pm 1%, при этом кинетика процессов набухания была типичной для гидрогелей. Полученные данные согласовывались с результатами исследований бактериальной целлюлозы, синтезируемой другими уксуснокислыми бактериями [33, 34].

При адсорбции бактериальных клеток для формирования биоэлектрохимических устройств основная масса биологического материала располагается на поверхности рабочего электрода. Использование бактериальной целлюлозы предполагает возможность распределения клеток не только на ее поверхности, но и в объеме иммобилизующей матрицы. На рис. 2 представлены полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии изображения поверхности электрода с иммобилизованными в гидрогели целлюлозы микроорганизмами G. oxydans. На микрофотографиях видно, что основная масса бактерий адсорбируется на поверхности БЦ (рис. 2а), однако часть клеток встраивается между волокнами БЦ (рис. 2б), что обеспечивает формирование трехмерного биорецептора.

БЦ на графитовых печатных электродах, модифицированных ТРГ. При функционировании биосенсора важную роль играет проводимость измери-



Рис. 2. Пленки на поверхности БЦ в СЭМ с иммобилизованными на поверхности клетками *G. oxydans* (а) и клетки, проникшие диффузионно в объем БЦ (б).

тельного электрода, которая позволяет заряду в процессе биотрансформации субстрата переходить от активных центров фермента микроорганизмов на электрод. Каждый компонент биосенсора вносит свой вклад в этот процесс. В описываемом варианте биосенсора такими компонентами являются терморасширенный графит, модифицирующий поверхность электрода, бактериальные клетки и БЦ, удерживающая их на поверхности электрода. Для оценки влияния каждого из компонентов на общую проводимость системы использовали метод электрохимической импедансной спектроскопии (ЭИС). Каждый из компонентов иммобилизовали на поверхности графитового электрода отдельно и в различных сочетаниях с другими компонентами, и изучали импедансные спектры полученных композиций. Для интерпретации полученных импедансных спектров была применена эквивалентная электрическая схема, представленная на рис. 3, где $R_{\rm S}$ обозначает омическое сопротивление электролита, а пары C (емкость) и R_{CT} (сопротивление переноса заряда) соответствуют стадиям электронного переноса между отдельными компонентами системы. Значения электрохимических параметров для каждого варианта композиции представлены в табл. 1.

БЦ увеличивает значение сопротивления переноса заряда электрода (52 МОм для ЭМП + БЦ против 6 МОм для ЭМП). При этом применение терморасширенного графита в качестве модификатора электрода приводит к значительному (~ на 3 порядка) снижению сопротивлений переноса заряда как при использовании БЦ, так и в ее отсутствии. Таким образом, добавление проводящего углеродного наноматериала позволяет улучшить общую проводимость системы, несмотря на высокое сопротивление отдельных ее компонентов (БЦ и бактериальные клетки). Использование ТРГ приводит к увеличению емкости электрода биосенсора, что не оказывает негативного влияния на его работу.

Для изучения медиаторного электронного переноса в системе "ЭМП/ТРГ/БЦ/*G. oxydans*" использовали метод циклической вольтамперомет-

Композиция	Параметр						
Композиция	<i>R</i> _S , Ом	C_1 , мк Φ	<i>R</i> _{СТ1} , Ом	C_2 , мк Φ	<i>R</i> _{СТ2} , Ом		
ЭМП	920 ± 20	0.029 ± 0.001	823333 ± 155026	0.223 ± 0.001	6100000 ± 953939		
$\Im M\Pi + G.oxydans$	863 ± 9	0.046 ± 0.001	463333 ± 28867	0.160 ± 0.002	2633333 ± 321455		
ЭМП + БЦ	1062 ± 6	0.058 ± 0.008	930000 ± 62449	0.054 ± 0.003	52000000 ± 7211102		
ЭМП + БЦ + G. oxydans	1033 ± 13	0.053 ± 0.004	693333 ± 87369	0.079 ± 0.002	7333333 ± 1625833		
$\Im M\Pi + TP\Gamma$	300 ± 6	9.5 ± 0.8	1630 ± 330	22.3 ± 1.2	55333 ± 14012		
ЭМП + ТРГ + БЦ	339 ± 8	3.7 ± 0.2	1939 ± 440	6.2 ± 0.5	523333 ± 15725		
$\Im M\Pi + TP\Gamma + G.$ oxydans	402 ± 6	7.7 ± 0.8	1335 ± 48	46 ± 2	46000 ± 1000		
ЭМП + ТРГ + БЦ + + G.oxydans	383 ± 6	4.3 ± 0.2	2163 ± 174	11.3 ± 0.6	183333 ± 20817		

Таблица 1. Значения параметров, полученных в результате обработки импедансных спектров биосенсоров



Рис. 3. Эквивалентная электрическая схема, использованная для обработки импедансных спектров. R_S – омическое сопротивление электролита, C – емкость и R_{CT} – сопротивление переноса заряда.



Рис. 4. ЦВА биосенсора на основе клеток, иммобилизованных на БЦ (а) и включенных в хитозан (б), в буферном растворе (1) и при введении ДХФИФ (0.05 мМ) и глюкозы (5 мМ) (2).

рии. На рис. 4а приведены ЦВА биоэлектрода на основе клеток G. oxvdans. иммобилизованных на БЦ. Измерения проводили в диапазоне от -0.5 до 0.5 В. Максимальное значение анодного тока в присутствии глюкозы составляло 1.9 мкА.

Полученные циклические вольтамперограммы сравнивали с ЦВА биоэлектрода с клетками G. oxydans, включенными в гель хитозана (рис. 4б). Иммобилизация в гель хитозана является одним из наиболее часто используемых методов иммобилизации бактериальных клеток в биоэлектрохимических устройствах [31, 35]. На ЦВА (рис. 4б) можно видеть, что максимальное значение анодного тока при добавлении глюкозы составляло 3.5 мкА, что примерно в 2 раза превышало значение анодного тока биоэлектрода на основе БЦ. Тем не менее, для обоих типов биоэлектродов наблюдалось значительное расхождение токов окисления в области приложенных потенциалов от -50 до 500 мВ в присутствии и отсутствии максимальной концентрации (5 мМ) глюкозы. Это свидетельствовало о наличии эффективного медиаторного электронного переноса в данных системах и позволило использовать его как основу для амперометрического глюкозного биосенсора.

На рис. 5а представлен типичный вид сигналов биосенсоров при введении в измерительную кювету глюкозы и медиатора, а также полученные калибровочные зависимости для глюкозного биосенсора (рис. 5б). Для сравнения приведены параметры биосенсора, в котором бактериальные клетки иммобилизованы в гель хитозана. Амплитуда сигнала биосенсора на основе клеток, включенных в хитозан, в 1.6 раза превышала амплитуду сигнала биосенсора на основе клеток, иммобилизованных на БЦ.

Способ иммобилизации бактериальных клеток на поверхности электрода (иммобилизация на БЦ, либо включение в гель хитозана) не влиял на диапазон детекции, линейный диапазон и нижний предел обнаружения глюкозы. Нижний предел детекции глюкозы составил 62.5 мкМ, диапазон детекции – 62.5 мкМ – 5 мМ. Линейный диапазон определения составлял 62.5-1500 мкМ. Калибровочные зависимости для обоих биосенсоров аппроксимировали трехпараметрическим уравне-



Рис. 5. Вид сигнала биосенсоров на основе клеток *G. oxydans*, иммобилизованных на БЦ (*1*) и включенных в гель хитозана (*2*) на введение глюкозы (1.5 мМ, а) и их калибровочные зависимости (б): б – на оси X концентрация глюкозы в измерительной ячейке.



Рис. 6. Долговременная стабильность биосенсора на основе клеток, иммобилизованных на БЦ (1, мкА) и в хитозане (2, мкА). Между измерениями электроды хранили при температуре 4°C. Концентрация глюкозы в кювете – 1.5 мМ

нием Хилла ($r^2 = 0.988$). Кинетические константы уравнения для биосенсора на основе БЦ составили: $K_m = 0.89 \pm 0.16$ мМ и $V_{max} = 0.42 \pm 0.02$; для биосенсора на основе хитозана – $K_m = 1.05 \pm 0.12$ мМ и $V_{max} = 0.75 \pm 0.03$ мкА. Коэффициент чувствительности биосенсора определяли как значение производной от калибровочной характеристики биосенсора в области линейного диапазона. Для биосенсора на основе клеток *G. охуdans*, иммобилизованных на БЦ, его значение составило 3 мкА/мМ × см². Для биосенсора на основе клеток *G. охуdans*, данный параметр был равен 5 мкА/мМ × см². Та-

ким образом, можно отметить, что несмотря на незначительную потерю в чувствительности электрода на основе БЦ, ее можно использовать как носитель для бактериальных клеток в составе микробного биосенсора или анода микробного топливного элемента.

Изучение стабильности сигналов биосенсоров на основе клеток, иммобилизованных на БЦ и в геле хитозана (рис. 6) показало, что в течение первых 10 сут хранения амплитуда отклика биосенсора на основе БЦ снижалась на 40%, в то время как сигнал биосенсора на основе геля хитозана оставался на прежнем уровне. На 34 сут хранения отклик биосенсора на основе БЦ уменьшался в 5 раз



Рис. 7. Сигнал кислородного электрода (скорость изменения сигнала, нА/с) с бактериями *G. oxydans*, иммобилизованными на разных носителях: *1* – НП, *2* – хроматографическая бумага GF/A, *3* – БЦ, в присутствии 1.25 мМ глюкозы. Ось х – номер измерения.

по сравнению с начальным уровнем сигнала. На 48 сут хранения отклик биосенсора на основе хитозана снижался в 3 раза по сравнению с начальным уровнем сигнала. Возможно, это связано с различием в строении полимеров: в составе хитозана присутствуют реакционноспособные аминогруппы, которые способствуют более эффективному закреплению микроорганизмов внутри полимерной матрицы за счет образования связей с отрицательно заряженными карбоксильными и фосфатными группами на поверхности мембран бактериальных клеток [36], и которые отсутствуют в БЦ.

Таким образом, показана возможность использования БЦ для иммобилизации уксуснокислых бактерий *G. oxydans* на поверхности графитовых ЭМП в составе биосенсоров. Следует отметить, что использование БЦ возможно лишь в случае предварительной модификации поверхности графитового электрода наноматериалами, например, ТРГ. Последний выполняет двойную функцию, позволяя снизить общее сопротивление полученного электрода и обеспечивая надежное закрепление матрицы БЦ с иммобилизованными клетками на поверхности электрода.

БЦ на поверхности объемных электродов из никелевой пены. Для оценки возможности использования БЦ в качестве иммобилизующего агента в составе трехмерного электрода необходимо оценить степень удерживания БЦ на поверхности электрода (в данном случае НП). Была проверена способность БЦ удерживаться на поверхности НП при двух различных состояниях: а) предварительно высушенная пленка БЦ, повторно гидратированная и иммобилизованная на поверхности НП; б) агрегат БЦ, хранившийся в 70% растворе этилового спирта.

Поведение гидратированных фрагментов БЦ на НП были различны для образцов пленок и агрегатов. Гидратированная пленка отслаивалась после высыхания и погружения в измерительный раствор, а агрегаты БЦ прочно закреплялись на носителе в процессе высушивания. Таким образом, стандартная процедура предварительного засева БЦ бактериями в данном случае не подходит. В дальнейшей работе микроорганизмы иммобилизовали на агрегаты БЦ после высыхания непосредственно на электроде.

Влияние НП на дыхательную активность бактерий, иммобилизованных в пленках БЦ. Известно, что НП может использоваться для очистки бытовых сточных вод от некоторых видов бактерий [37], поэтому необходимо оценить ее влияние на каталитическую активность микроорганизмов, используемых в работе. Для этого регистрировали дыхательную активность бактерий G. oxydans, иммобилизованных на разных типах подложек (хроматографическая бумага, НП, БЦ) с помощью кислородного электрода типа Кларка. На рис. 7 показаны уровни дыхательной активности бактерий, измеренные в 9 последовательных измерениях. Из полученных данных видно, что скорость ферментативной реакции окисления глюкозы незначительно понижалась в случае использования НП как подложки. Тем не менее, это могло быть связано не с токсическим действием никеля на бактериальные клетки, а с диффузионными огра-



Рис. 8. Диаграммы Найквиста для трехмерных электродов из НП (1) в присутствии БЦ (2) и иммобилизованных бактериальных клеток *G. oxydans* (3). На оси X (Z_{re}) – величину активного сопротивления, оси Y (Z_{im}) – мнимого.

ничениями при использовании 3D-материала в качестве подложки.

На всех носителях активность бактерий сохранялась до 7 сут. При этом уровень сигнала для бактериальных клеток на поверхности НП через 7 сут составлял ~30% от начальной величины.

Электрохимические измерения. Для изучения импедансных характеристик биоэлектродов из НП были построены диаграммы Найквиста (рис. 8). Как видно из представленных диаграмм, наиболее низкое общее сопротивление электрода характерно для образца из немодифицированной НП (26.4 кОм). Иммобилизация БЦ на поверхности НП приводила к заметному увеличению емкостной составляющей импеданса и общего сопротивления электрода. Добавление бактерий G. oxydans незначительно уменьшало общее сопротивление электрода (55.3 кОм) по сравнению с композитом НП + БЦ (179.5 кОм) за счет снижения сопротивления переноса заряда, что свидетельствовало о потенциальной возможности применения данного композита в составе биоэлектродов, входящих в биосенсор, и БТЭ, так как в системе наблюдался перенос заряда от биокатализатора на поверхность рабочего электрода.

Для оценки возможности использования композиции "НП + БЦ + бактериальные клетки" в составе биоэлектрохимических устройств оценивали ЦВА и хроноамперометрические зависимости биоэлектрода до и после введения в измерительную ячейку максимальной (для данного типа композиции) концентрации субстрата (глюкоза, 3 мМ) в присутствии ДХФИФ в качестве медиатора электронного транспорта. Результаты представлены на рис. 9. При добавлении в систему глюкозы наблюдался рост анодных пиков в диапазоне от 200 до 500 мВ (рис. 9а), что свидетельствовало о наличии медиаторного электронного переноса в системе в присутствии субстрата и подтверждало данные, полученные методом ЭИС. Для получения амперометрических сигналов биоэлектрода выбран рабочий потенциал, равный +400 мВ (относительно стандартного хлорсеребряного электрода), так как при этом потенциале на ЦВА-зависимостях наблюдали максимальное расхождение анодных пиков при добавлении в систему субстрата. На рис. 96 представлен вид типичной хроноамперометрической зависимости, показывающей изменение тока при введении субстрата в систему "НП + БЦ + иммобилизованные бактерии".

Таким образом, иммобилизованная на НП БЦ способна эффективно удерживать бактериальные клетки. С помощью электрохимических методов исследования показано, что, используя простую иммобилизацию БЦ на поверхности НП возможно создание комплексов "НП + БЦ + бактерии", которые представляют основу для трехмерных электродов биоэлектрохимических устройств.

В работе показана возможность использования бактериальной целлюлозы в сочетании с высокопроводящими объемными материалами, такими как ТРГ и НП, для иммобилизации уксуснокислых бактерий в составе биосенсоров амперометрического типа. Несмотря на то, что биосовместимость БЦ была детально изучена ранее [38] и показана возможность использования ее в качестве основы электродов биоэлектрохимических устройств [39], вопрос об эффективности применения БЦ как компонента иммобилизующей матрицы оставался не до конца изученным. Основная масса работ посвящена применению БЦ как самостоятельного рабочего электрода, модифицируемого



100

Рис. 9. Циклические вольт-амперные характеристики (а) и хроноамперометрическая зависимость (б) для биоэлектрода НП + БЦ + иммобилизованные клетки *G. oxydans*, в отсутствии (*I*) и после добавления 3 мМ глюкозы в ячейку (2). а – по оси X (мВ) –приложенный потенциал, на оси Y (мкА) – уровень тока; б – на оси X (с) – время, на оси Y (мкА) – уровень тока.

400 мВ

34

32

0

наноматериалами [40], либо как основы для нанесения проводящих чернил, которые формируют электроды на поверхности БЦ [41]. В данной работе БШ использована как полимерная матрица для иммобилизации бактериальных клеток на поверхности графитового или никелевого электрода. При этом показано, что модификация поверхности графитовых электродов БЦ для иммобилизации бактерий не приводила к получению стабильно функционирующего биосенсора. Только добавление дополнительного наноматериала – ТРГ – позволяло эффективно иммобилизовать БЦ на регистрирующем электроде. Кроме того, использование ТРГ позволяло на ~3 порядка снизить сопротивление переноса заряда графитового электрода, что положительно сказывалось на эффективности его работы. Показана возможность применения двух высокопроводящих материалов ТРГ и НП для обеспечения высокоэффективного медиаторного переноса электронов от клеток микроорганизмов, иммобилизованных в БЦ. В случае использования данных композиций не требуется дополнительной химической привязки клеток к поверхности электрода. С помощью метода СЭМ показано, что основная масса бактерий оседает на поверхности БЦ, а часть клеток встраивается между ее волокнами, позволяя получить объемный биоэлектрод, сохраняющий свою активность в течение 34 сут. Полученные результаты представляют собой основу для дальнейшей разработки биоэлектрохимических устройств на основе БЦ, в том числе амперометрических биосенсоров для определения глюкозы. Таким образом, БЦ в сочетании с НП и ТРГ может быть материалом, который можно использовать для формирования объемных электродов биосенсоров и биотопливных элементов, основанных на бактериальных клетках Gluconobacter.

-200

-400

0

200

мкА

100

80

60

40

20

0 -20

-40

-60

Исследование выполнено в рамках Государственного задания Министерства образования и науки РФ № FEWG-2020-0008 и Государственного задания ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН FFWZ-2022-0002.

200

300

400 c

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lobsiger N., Stark W.J. // Anal Sci. 2019. V. 35. № 8. P. 839–847. https://doi.org/10.2116/analsci.19R004
- Andriukonis E., Celiesiute–Germaniene R., Ramanavicius S., Viter R., Ramanavicius A. // Sensors. 2021. V. 21. № 7. 2442. https://doi.org/10.3390/s21072442
- 3. *Lakard B.* // Appl. Sci. 2020. V. 10. 6614. https://doi.org/10.3390/app10186614
- 4. *Liu C., Xu Y., Han X., Chang X.* // Environ. Toxicol. Chem. 2017. V. 37. № 2. P. 329–335. https://doi.org/10.1002/etc.3959
- Chen J.Y., Xie P., Zhang Z.P. // Chem. Eng. J. 2019.
 V. 361. P. 615–624. https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.116
- Piao M., Zou D., Yang Y., Ren X., Qin C., Piao Y. // Materials. 2019. V. 12. 704. https://doi.org/10.3390/ma12050704
- Truong D.H., Dam M.S., Bujna E., Rezessy-Szabo J., Farkas C., Vi V. N. H., Csernus O., Nguyen V.D., Gathergood N., Friedrich L., Hafidi M., Gupta V.K., Nguyen Q.D. // Fuel. 2021. V. 285. 119259. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119259
- Meyer J., Meyer L.-E., Kara S. // Eng. Life. Sci. 2021. P. 1–13. https://doi.org/10.1002/elsc.202100087
- 9. Gao H., Khera E., Lee J.K., Wen F. // J. Vis. Exp. 2016. V. 110. 53944. https://doi.org/10.3791/53944

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

- Chakraborty S. // J. Carbohydr. Chem. 2017. V. 36. № 1. P. 1–19. https://doi.org/10.1080/07328303.2017.1347668
- Plekhanova Y., Tarasov S., Bykov A., Prisyazhnaya N., Kolesov V., Sigaev V., Signore M.A., Reshetilov A. // Biosensors. 2019. V. 9. 137. https://doi.org/10.3390/bios9040137
- Kalita T., Sangma S., Bez G., Ambasht P. // J. Sci. Res. 2020. V. 64. P. 192–200. https://doi.org/10.37398/JSR.2020.640227
- Sattar H., Aman A., Qader S.A.U. // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 111. P. 917–922. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.105
- Żywicka A., Wenelska K., Junka A., Chodaczek G., Szymczyk P., Fijałkowski K. // World. J. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 35. № 1. P. 11. https://doi.org/10.1007/s11274-018-2584-7
- 15. Bezerra C.S., de Farias Lemos C.M.G., de Sousa M., Gonçalves L.R.B. J. Appl. Polym. Sci. 2015. V. 132. № 26. https://doi.org/10.1002/app.42125
- Moniri M., Boroumand Moghaddam A., Azizi S., Abdul Rahim R., Bin Ariff A., Zuhainis Saad W., Navaderi M., Mohamad R. // Nanomaterials. 2017. V. 7. № 9. 257. https://doi.org/10.3390/nano7090257
- Revin V., Liyaskina E., Nazarkina M., Bogatyreva A., Shchankin M. // Braz. J. Microbiol. 2018. V. 49. P. 151–159. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.12.012
- Mohite B.V., Patil S.V. // Biotechnol. Appl. Biochem. 2014. V. 61. № 2. P. 101–110. https://doi.org/10.1002/bab.1148
- Kiesewetter D.V., Zhuravleva N.M., Reznik A.S., Khripunov A.K., Migunova A.V. // 2020 IEEE 3rd International Conference on Dielectrics (ICD). 2020. P. 245– 248. https://doi.org/10.1109/ICD46958.2020.9341885
- Wang W., Zhang T.-J., Zhang D.-W., Li H.-Y., Ma Y.-R. Qi, L.-M., Zhou Y.-L., Zhang X.-X. // Talanta. 2011. V. 84. № 1. P. 71–77. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.12.015
- Li G., Sun K., Li D., Lv P., Wang Q., Huang F., Wei Q. // Colloids Surf. A Physicochem. 2016. V. 509. P. 408– 414. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.09.028
- Jasim A., Ullah M.W., Shi Z., Lin X., Yang G. // Carbohydr. Polym. 2017. V. 163. P. 62–69. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.056
- Divya Mahapatra S., Srivastava V.R., Chandra P. // Biosensors. 2021. V. 11. № 6. 168. https://doi.org/10.3390/bios11060168
- Swingler S., Gupta A., Gibson H., Kowalczuk M., Heaselgrave W., Radeck, I. // Polymers. 2021. V. 13. № 3. P. 412.
 - https://doi.org/10.3390/polym13030412
- Dourado F., Gama M., Rodrigues A.C. // Toxicol. Rep. 2017. V. 4. P. 543–553. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.09.005

- Poddar M.K., Dikshit P.K. // Nano Select. 2021. V. 2. № 9. P. 1605–1628. https://doi.org/10.1002/nano.202100044
- 27. *Hui Y., Ma X., Qu F., Chen F., Chen Y. //* J. Electrochem. Soc. 2017. V. 164. № 13. P. 112–120. https://doi.org/10.1149/2.0761713jes
- Plekhanova Y., Tarasov S., Kitova A., Kolesov V., Kashin V., Sundramoorthy A.K., Reshetilov A. // 3 Biotech. 2022. V. 12. P. 42. https://doi.org/10.1007/s13205-021-03107-w
- Reshetilov A.N., Plekhanova Y.V., Tarasov S.E., Arlyapov V.A., Kolesov V.V., Gutorov M.A., Gotovtsev P.M., Vasilov R.G. // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. № 1. P. 123–129. https://doi.org/10.1134/s0003683817010161
- Ревин В.В., Кленова Н.А., Редькин Н.А., Белоусова З.П., Тукмаков К.Н., Маркова Ю.А., Сосова Э.Ю. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2017. Т. 7. № 1. С. 102–110. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2017-7-1-102-110
- Плеханова Ю.В, Тарасов С.Е., Быков А.Г., Присяжная Н.В., Тенчурин Т.Х., Чвалун С.Н., Орехов А.С., Шепелев А.Д., Готовцев П.М., Решетилов А.Н. // Российские нанотехнологии. 2018. Т. 13. № 9–10. С. 77–84. https://doi.org/10.1134/S1992722318050114
- 32. Погорелова Н.А., Чернигова С.В., Рогачев Е.А. // Вестник Омского государственного аграрного университета. 2019. Т. 4. № 36. С. 131–141.
- Zhang H.Y., Yan X.J., Jiang Y., Cong J. // AMR 2010. V. 152–153. P. 978–987. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.152-153.978
- Rebelo A.R., Archer A.J., Chen X., Liu C., Yang G., Liu Y. // Sci. Technol. Adv. Mater. 2018. V. 19. № 1. P. 203–211. https://doi.org/10.1080/14686996.2018.1430981
- Nangia S., Warkar S., Katyal D. // J. Macromol. Sci. A. 2019. P. 1–17. https://doi.org/10.1080/10601325.2018.1526041
- Kubota M., Matsui M., Chiku H., Kasashima N., Shimijoh M., Sakaguchi K. // Appl Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 12. P. 8805–8902 https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8895–8902.2005
- Zhao J., Yan P., Snow B., Santos R.M., Chiang Y.W. // Process. Saf. Environ. Prot. 2020. V. 142. P. 191–202. https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.06.013
- Torres F, Commeaux S., Troncoso Heros O. // J. Funct. Biomater. 2012. V. 3. P. 864–878. https://doi.org/10.3390/jfb3040864
- Li X., Lv P., Yao Y., Feng Q., Mensah A., Li D., Wei Q. // Chem. Eng. J. 2019. 122316. https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122316
- 40. *Mashkour M., Rahimnejad M., Mashkour M., Soavi F. //* J. Power Sources. 2020. V. 478 P. 228822. https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2020.228822
- Eynaki H., Ali Kiani M., Golmohammadi H. // Nanoscale. 2020. V. 12. P. 18409–18417. https://doi.org/10.1039/D0NR03505J

Bacterial Cellulose as a Matrix for Microorganisms in Bioelectrocatalytic Systems

S. E. Tarasov^a, Yu. V. Plekhanova^a, A. E. Kitova^a, A. G. Bykov^a, A. V. Machulin^a, V. V. Kolesov^b, N. A. Klenova^c, V. V. Revin^c, O. N. Ponamoreva^e, and A. N. Reshetilov^{a, e, *}

^a G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center, Pushchino Biological Research Center Russian Academy of Sciences, Moscow oblast, Pushchino, 142290 Russia

^b FSBIS V.A. Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 125009 Russia

^c S.P. Korolev Samara National- Research University, Samara, 443086 Russia

^d National Research Mordovia State University, Saransk, 430005 Russia

^e Tula State University, Tula, 300012 Russia

*e-mail: anatol@ibpm.pushchino.ru

Bacterial cellulose (BC) produced by the *Komagateibacter sucrofermentas* VKPM B-11267 bacteria was used as a carrier for immobilization of acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* in amperometric biosensors. The bioreceptor was formed on the surface of a screen-printed graphite electrode modified with the thermally expanded graphite (**TEG**) or on the surface of a porous three-dimensional material – nickel foam (**NF**). Stuctural features of these materials contributed to the creation of a firm contact between the electrode material and the surface of the BC on which the bacterial cells were immobilized. Scanning electron microscopy showed that bacteria not only sorb on the surface of BC, but are also able to penetrate the inner volume of the film. Conductivity of both types of biosensors was studied using impedance spectroscopy and the resistance of the graphite electrode was shown to decrease by three orders of magnitude after its surface is modified with TEG. Bioelectrodes containing BC were used in the construction of an amperometric biosensor for glucose determination. The sensitivity of the biosensor was 3 μ A/mM × cm². Thus, BC in combination with TEG and NF can be used to create three-dimensional electrodes of bioelectrocatalytical devices.

Keywords: bacterial cellulose, bioelectrodes, acetic acid bacteria, *Gluconobacter oxydans*, thermally expanded graphite, nickel foam, biosensors, microbial fuel cell

УДК 577.112

ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОТЕОМЕ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ПТИЦЫ ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В РАЦИОН РАЗЛИЧНЫХ БЕЛКОВЫХ ДОБАВОК

© 2022 г. Д. Ю. Исмаилова¹, О. С. Савинова², Т. В. Фёдорова^{2, *}, Д. В. Васина², В. Г. Волик¹, В. С. Лукашенко³, И. П. Салеева³

¹Всероссийский научно-исследовательский институт птицеперерабатывающей промышленности — филиал ФНЦ "ВНИТИП" РАН (ВНИИПП), п. Ржавки, Московская обл., Солнечногорский район, 141552 Россия

²Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

³Федеральный научный центр "Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства" Российской академии наук (ФНЦ "ВНИТИП" РАН), Сергиев Посад, Московская обл., 141311 Россия *e-mail: fedorova tv@mail.ru

Поступила в редакцию 03.09.2021 г. После доработки 01.11.2021 г. Принята к публикации 15.11.2021 г.

Показано, что при введении в рацион кормления цыплят бройлеров ферментированной белковой кормовой добавки (**ФКД**), в протеомах грудных (*pectoralis*) и ножных (*femoralis*) мышц птицы отмечалось появление дополнительных фрагментов белков, являющихся биомаркерами нежности (актин, тропонин, тяжелые и легкие цепи миозина) и влагоудерживающей способности мяса (креатин-киназа М типа). Также присутствовали дополнительные изоформы белков, относящихся к различным комплексам электрон-транспортной цепи (комплекс цитохромов bc1, или комплекс III дыхательной цепи переноса электронов), характеризующих эффективность данного рациона кормления. Введение в рацион кормления птицы ФКД приводило также к повышению антиоксидантной емкости тканей грудных и ножных мышц бройлеров и снижению содержания жира в тканях ножных мышц.

Ключевые слова: бройлеры, белковая кормовая добавка, грудные мышцы (*pectoralis muscle*), ножные мышцы (*femoralis muscle*), протеом, антиоксидантная емкость, белковые маркеры качества мяса **DOI:** 10.31857/S0555109922040067

Качество и безопасность продукции птицеводства во многом зависят как от технологии выращивания и содержания птицы, так и от рационов кормления. Сбалансированное кормление цыплят-бройлеров (цыплята определенных кроссов с высокой продуктивностью набора мышечной массы за короткий промежуток времени) предполагает использование рационов, содержащих безвредные и полноценные корма и добавки, которые позволяют наиболее полно реализовать генетический потенциал птицы и получить высокопитательную и безопасную пищевую продукцию.

В последнее время все более популярным становится замещение традиционных источников белка в рационе птицы гидролизатами вторичных продуктов животноводства [1, 2], в том числе птицеводства [3–5]. Внимание к таким подходам обусловлено тем, что содержащиеся в гидролизатах пептиды могут проявлять функциональную (регуляторную) и биологическую (противомикробную, антиоксидантную, антигипертензивную и иммуномодулирующую) активности.

Поскольку сочность, нежность, запах и вкус мяса цыплят зависят от разных факторов (генетических особенностей, условий кормления и содержания птицы, обработки и хранения тушек) [6], знание динамики роста, морфологии и биохимического состава мышечной ткани с учетом вида, породы, пола, условий содержания и кормления птицы представляет большой научный и практический интерес. Однако традиционные методы оценки качества мяса, такие как анализ текстуры, цветовых различий, влагоудерживающей способности (ВУС) и вкуса, не могут полностью достичь цели контроля и прогнозирования качества мяса [7–9]. Поэтому, в последние годы все большее внимание уделяется поиску и изучению биомаркеров, обуславливающих качественные характеристики мяса, с помощью протеомных технологий [10-18]. Протеомика становится важным и перспективным инструментом в области науки о мясе и позволяет исследователям получить более глубокие знания об основных молекулярных механизмах, влияющих на качество мяса.

Хотя протеомные исследования были успешно применены для поиска биомаркеров и изучения молекулярных механизмов, связанных с качеством мяса домашних животных, таких как свиньи [19], коровы [20] и овцы [21], тем не менее, сообщения о подобных исследованиях на птице весьма ограничены. Так, были проведены протеомные исследования для выяснения влияния рациона питания на рост и качество мяса птицы [10, 11]. Исследователи обнаружили влияние дефицита аминокислот в рационе питания на протеом мышц и объяснили изменения в протеомах во время роста кур-несушек [11]. В результате изучения протеома индеек были обнаружены различия в быстром и нормально протекающем гликолизе в тканях грудных мышц и установлена их связь с качеством мяса [12]. Был проведен протеомный анализ мышц нативных и коммерческих цыплят-бройлеров [13] с целью определения взаимосвязи между белковым составом и нежностью мяса. Результаты показали, что гликолитические ферменты, такие как пируваткиназа, фосфоглицерат мутаза и триозофосфатизомераза, связаны с качеством мяса. Протеомная характеристика саркоплазматических белков в грудных мышцах была проведена для двух различных генотипов цыплят, включая коммерческих бройлеров Ross 708 и цыплят-леггорнов Hyline W-36 [15]. Результаты показали, что гликогенфосфорилаза, енолаза, креатинкиназа, фруктозо-бисфосфатальдолаза и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа различались у этих двух штаммов в период роста грудных мышц. В работе [16] авторы изучили протеомный состав и дифференциальную экспрессию белков, экстрагированных из мышц молодняка кур с различной скоростью роста и отличающихся ВУС. Белки отличия, идентифицированные у разных групп цыплят с помощью двумерного электрофореза и масс-спектрометрии, включали такие метаболические ферменты как креатинкиназа и пируваткиназа. Эти исследования обозначили потенциал протеомных методов для выяснения биохимических основ изменения окраски, ВУС и текстуры мяса цыплятбройлеров.

Цель работы — сравнительное исследование протеомов белого и красного мяса цыплят-бройлеров при выращивании на разных рационах кормления и анализ белковых биомаркеров качества мяса птицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кормовые добавки. В качестве кормовых добавок животного происхождения при кормлении бройлеров использовали побочные продукты птицепереработки, такие как кровь, кишечник, перо, которые подвергали кратковременному гидротермическому гидролизу (гидролизованная кормовая добавка – ГКД) [22] с последующим ферментативным гидролизом протеазами (ферментированная кормовая добавка – ФКД) [23], и рыбную муку – РМ (Марка МК – 0378, производитель "Капитан Назин", Россия).

ГКД получали гидролизом побочных продуктов переработки птицы (перо, кишечник) в аппарате высокотемпературной обработки при 140-190°С в течение 60-90 с [22]. ФКД получали ферментацией побочных продуктов переработки птицы после гидротермической обработки [23]. Для гидролиза перьевого сырья использовали ферментные препараты Протозим С ("Биопрепарат", Россия) и Novo-Pro D ("Novozymes", Дания) из расчета 5–15 ед. протеолитической активности (МЕ) на г белка при гидромодуле 1:4, температуре 55-58°С, в течение 4 ч. Для ферментации кишечного сырья использовали ферментные препараты нейтраза и алкалаза ("Novozymes", Дания) в дозе 5-10 МЕ/г белка при гидромодуле 1 : 1, температуре 50-52°С, продолжительности гидролиза 2-4 ч.

Исследования *in vivo*. Опыт по включению различных кормовых добавок в рацион цыплят бройлеров кросса "Смена" проводили в условиях вивария селекционно-генетического центра "Загорское Экспериментальное Племенное Хозяйство" ФНЦ ВНИТИП РАН (Россия). Для опыта были отобраны цыплята-бройлеры кросса "Смена 9" средней живой массой 43 ± 0.8 г. Из них было сформировано случайным образом 4 группы по 35 голов в каждой.

Контрольная группа № 1 получала основной рацион без добавления кормовых добавок животного происхождения (табл. 1), а контрольная группа № 4 – основной рацион с добавлением рыбной муки. Опытные группы №№ 2 и 3 дополнительно к основному рациону до конца периода выращивания получали экспериментальные кормовые добавки (табл. 2). В опытной группе № 2 в качестве кормовой добавки использовали гидролизат побочных продуктов переработки птицы, полученный методом кратковременной высокотемпературной обработки (ГКД, гидролизованная кормовая добавка). В опытной группе № 3 — ферментированный гидролизат побочных продуктов переработки птицы (ФКД). Масса потребленного протеина в составе белковых добавок – 1.6 кг на 1 кг живой массы птицы.

В возрасте 38 дней были отобраны по 3 средних по живой массе бройлера из каждой группы. С целью оценки мясных качеств тушки цыплят после обескровливания подвергали анатомической разделке согласно методике [24]. После анатомической разделки были отобраны образцы мышечной ткани бедра и грудки цыплят бройлеров, проанализированы их физико-химические

Nº 4

том 58

2022

ИСМАИЛОВА и др.

4	0	2
	v	~

Таблица 1. Рацион без добавления кормовых добавок животного происхождения

	Период выращивания, сут.					
Компонент	0—5 (престарт)	6—14 (старт)	15—22 (рост)	23–38 (финиш)		
Пшеница 11.5%	32.70	33.90	34.80	37.00		
Кукуруза 8.5%	20.00	19.34	20.55	20.00		
Соевый шрот 44%	25.14	22.80	2.70	0		
Соя полуобеж 40%	15.00	16.00	25.60	24.14		
Жмых подсолн. 34%	0	0	9.80	11.60		
Масло соевое	2.80	3.50	2.50	3.50		
Известняк Са 36%	1.10	1.12	1.05	0.96		
Монокальцийфосфат	1.60	1.60	1.35	1.26		
Лизин монохлоргидрат	0.23	0.27	0.31	0.29		
Метионин	0.34	0.35	0.26	0.17		
Соль	0.26	0.27	0.27	0.28		
Треонин	0.12	0.14	0.10	0.10		
Сульфат натрия	0.11	0.11	0.11	0.10		
Холин хлорид	0.10	0.10	0.10	0.10		
Премикс "Агрофид" 0.5%	0.50	0.50	0.50	0.50		
Итого:	100	100	100	100		
В	100 г комбикорма	содержится, %				
Обменной энергии, ккал	305.0	310.0	310.0	320.0		
Сырого протеина	23.03	22.54	21.0.3	20.01		
Сырой клетчатки	3.79	3.69	4.46	4.57		
Кальция	0.96	0.96	0.87	0.82		
Фосфора общего	0.79	0.78	0.77	0.75		
Фосфора усвояемого	0.48	0.48	0.43	0.41		
Натрия	0.16	0.16	0.16	0.16		
Хлориды	0.23	0.24	0.26	0.26		
Лизина	1.37	1.23	1.22	1.12		
Лизина усвояемого	1.23	0.66	1.09	1.00		
Метионина + Цистина	1.03	1.03	0.95	0.84		
Мет + Цистина усвояемого	0.93	0.96	0.84	0.73		
Треонина	0.94	0.94	0.86	0.78		
Треонина усвояемого	0.81	0.81	0.71	0.68		

ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОТЕОМЕ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ПТИЦЫ

Показатель, %	ГКД	ФКД	РМ
Массовая доля жира	6.6	11.7	13.0
Массовая доля протеина	26.0	76.1	74.3
Массовая доля золы	3.3	4.9	9.1
Массовая доля влаги	4.9	7.3	3.6
Пищевые волокна	59.2	—	_
Переваримость протеина	66.9	95.4	90.2
Антиоксидантная емкость (ORAC), мкмоль ТЭ/г	401.5 ± 50	1980 ± 100	152.8 ± 10
Массовая доля белковой фракции с Mr >10 кДа	32.8	4.9	7.9
Массовая доля белковой фракции с Mr 3—10 кДа	13.6	16.6	8.5
Массовая доля белковой фракции с <3 кДа	53.6	78.5	83.6

Таблица 2. Физико-химический, фракционный состав и антиоксидантная емкость кормовых добавок

свойства (рН, содержание белка, жира, влаги и золы, ВУС), белковый состав и антиоксидантная емкость.

Содержание белка определяли согласно ISO 5983-1:2005; жира по ISO 6492:1999; влаги – по ISO 6496:1999; золы по ISO 5985:2002 и рН по ISO 2917:1974. ВУС определяли методом Грау-Хамма в модификации Журавской [25].

Протеомный анализ экстрактов мышечной ткани бройлеров. Анализ проводили методом двумерного электрофореза с масс-спектрометрической идентификацией отдельных белковых пятен. Использовали образцы мышечных тканей грудки и бедра бройлеров 4-х экспериментальных групп (табл. 3).

Для получения белковых экстрактов мышечные ткани бедра и грудки бройлеров измельчали в блендере ("Selecline", Китай) в течение 5 минут до гомогенного состояния. Затем навеску измельченной мышечной ткани (100 мг) гомогенизировали с использованием гомогенизатора Поттера в 400 мкл лизис-буфера следующего состава (%): дитиотреитол (DTT, "Merck", Германия) – 1; 3-(3-холамидопропил) диметиламмоний-3-пропансульфонат (CHAPS, "VWR Chemicals", США) – 4; амфолины 3/10 ("Serva Electrophoresis", Германия) – 5; 7 М мочевина и 2 М тиомочевина ("GE Healthcare", США). Полученный экстракт центрифугировали в течение 10 мин при 800 g, отбирали надосадочную жидкость и хранили при температуре –73°С до проведения анализа.

Двумерный электрофорез (2-DE). 2-DE электрофорез проводили по О'Фарреллу с изоэлектрофокусированием в амфолиновом градиенте pH 3–10 ("Serva Electrophoresis", Германия), как было описано ранее в [26], на системе PROTEAN II xi 2-D Cell ("Bio-Rad", США). Количество образца составляло 70 мкг белка на трубку. Электрофорез полученных после изоэлектрофокусирования образцов проводили в градиентном акриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-Na, 7.5–25%) при напряжении 300 В. Перед нанесением на второе направление образцы инкубировали 20 мин в растворе, содержащем дитиотреитол (мочевина – 6 М, ДДС-Na – 2%, DTT – 10 мМ, трис-HCl – 0.5 М, рН 6.8) для предотвращения окисления сульфгидрильных групп в белках. Для визуального анализа распределения белковых компонентов и масс-спектрометрического анализа гели окрашивали раствором AgNO₃ или Brilliant Blue R Staining Solution ("Sigma", США).

Для получения белковых карт, использовали систему гельдокументирования Infinity1000/26MX ("Vilber Lourmat", Франция). Анализ белковых карт проводили при помощи программного обеспечения ImageMaster 2D Platinum, v.7 ("GE Healthcare", США).

Масс-спектрометрический анализ белков. Для масс-спектрометрического анализа вырезали кусочки геля размером 3-4 мм³, соответствующие белковым пятнам, и дважды промывали для удаления красителя в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0.1 М NH₄HCO₃ в течение 20 мин при 37°С. После удаления раствора, добавляли 100 мкл ацетонитрила для дегидратации геля. После удаления ацетонитрила и высушивания геля, добавляли раствор модифицированного трипсина ("Promega", США) в 0.05 М NH₄HCO₃ с концентрацией 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 8 ч при 37°С, затем к раствору добавляли 0.5%-ную трифторуксусную кислоту (ТФУ) в 10%-ном водном растворе ацетонитрила. Раствор, содержащий гидролизат белка, использовали для масс-спектрометрического анализа. В качестве матрицы использовали раствор 2,5-дигидрокси-

	Группа №							
Пока-	1 кон	троль	2 Г	КД	3Ф	КД	4 PM	
затель	грудные мышцы	ножные мышцы	грудные мышцы	ножные мышцы	грудные мышцы	ножные мышцы	грудные мышцы	ножные мышцы
pН	5.79 ± 0.00	6.07 ± 0.00	5.80 ± 0.00	6.01 ± 0.00	5.99 ± 0.00	6.00 ± 0.00	5.82 ± 0.00	5.90 ± 0.00
Влага, %	73.2 ± 7.3	73.2 ± 7.3	72.8 ± 7.2	71.1 ± 7.1	72.8 ± 7.2	73.5 ± 7.3	73.1 ± 7.3	69.7 ± 6.9
Жир, %	1.8 ± 0.3	7.0 ± 1.0	1.3 ± 0.2	8.8 ± 1.3	1.3 ± 0.2	5.9 ± 0.9	1.3 ± 0.2	10.2 ± 1.5
Белок, %	23.7 ± 1.9	18.6 ± 2.8	24.5 ± 2.00	18.9 ± 2.8	24.5 ± 2.00	19.4 ± 2.9	24.1 ± 1.9	18.9 ± 2.8
Зола, %	1.22 ± 0.17	1.02 ± 0.15	1.30 ± 0.18	1.03 ± 0.15	1.30 ± 0.18	1.09 ± 0.16	1.35 ± 0.19	1.05 ± 0.15
ВУС, %	58.5	61.5	60.4	61.5	63.4	64.4	58.9	62.7

Таблица 3. Физико-химический состав грудных мышц (pectoralis muscle) и ножных мышц (femoralis muscle)

бензойной кислоты ("Aldrich", США) 10 мг/мл в 20%-ном водном ацетонитриле и 0.5%-ной ТФУ.

Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II ("Bruker", Германия), оснащенном УФ-лазером в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность измеренных масс моноизотопов после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.005% (50 ppm). Спектры получали в диапазоне масс 700–4500 m/z, выбирая мощность лазера оптимальную для достижения наилучшего разрешения. Для получения спектров фрагментации использовали тандемную масс-спектрометрию MALDI TOF/TOF-MS, точность измерения фрагментных ионов была не ниже 1 Да.

Обработку масс-спектров осуществляли с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 ("Bruker Daltonics", Германия). Идентификацию белков проводили при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Для этого, используя опцию "пептидный фингерпринт", проводили поиск в базе данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) среди белков всех организмов с указанной выше точностью, с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом геля. Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности score >76 в базе данных NCBI считали определенными надежно (p < 0.05), белки, имеющие параметр достоверности score >50, считали вероятными. С использованием программного обеспечения Biotools 3.2 ("Bruker Daltonics", Германия) проведен поиск по объединенным результатам.

Определение *in vitro* антиоксидантной емкости (AOE) в гомогенатах мышечной ткани бедра и грудки цыплят бройлеров. Для определения AOE гидрофильных компонентов тканевых экстрактов, 200 мг ткани грудной мышцы или бедра птицы помещали в пластиковую пробирку, добавляли 8 мл 11.5%-ного раствора хлорида калия. Гомогенизацию проводили в течение 5 мин при температуре 4°С в гомогенизаторе Silent Crusher S, снабженным насадкой 7F ("Heildolph", Германия) при скорости 75 000 об./мин. Гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 30000 g и температуре 4°С. Надосадочную жидкость отделяли и разводили в 50 мМ фосфатно-солевом буфере, pH 7.4, в 15–25 раз.

Анализ антиоксидантной емкости гомогенизированных образцов мяса грудной мышцы и бедра птицы измеряли по отношению к пероксильному радикалу. Пероксильный радикал генерировался непосредственно в реакционной среде при термическом распаде азосоединения 2,2'-азобис(2-метилпропионамидина) дигидрохлорида (ААРН, "Sigma", США), которое инициировалось инкубацией при 37°С в течение 10 мин [27]. АОЕ гидрофильных компонентов экстрактов мышечной ткани птицы по отношению к пероксильному радикалу выражали в мкмоль эквивалентов тролокса (ТЭ) в расчете на г ткани. Кинетику уменьшения флуоресценции регистрировали в течение 1 ч с интервалом измерений 60 сек на фотометре-флуориметре BioTek Synergy 2 ("BioTek", США), в режиме регистрации интенсивности флуоресценции (длина волны возбуждения – 485 нм, длина волны испускания – 528 нм).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Физико-химические свойства грудных и ножных мышц птицы. Результаты оценки влияния скармливания белковых кормовых добавок на физикохимический состав грудных и ножных мышц цыплят-бройлеров представлен в табл. 3. По показателям pH грудных и ножных мышечных тканей после забоя и анатомической разделки тушек не обнаружено принципиальных различий в группах. Между тем в группах 2–4 цыплят-бройлеров наблюдалась общая закономерность снижения количества общей влаги по сравнению с контрольной группой 1, при этом в грудных мышцах содержание влаги было меньше контроля в группах 2 и 3, а в ножных мышцах — в группах 2 и 4. Содержание жира в грудных мышцах опытных птиц в группах 2–4 было достоверно ниже (примерно на 28%) относительно контрольной группы 1. Также содержание жира в ножных мышцах опытной группы 3 было ниже контрольной на 16%. В то же время в группах 2 и 4 содержание жира в ножных мышцах было выше на 26 и 46% соответственно по сравнению с контрольной группой 1.

Показано повышение содержания сырого протеина в грудных мышцах цыплят-бройлеров трех групп (группы 2, 3 и 4) примерно на 3.4%, в сравнении с контролем (группа 1). В то же время суммарное содержание белка в ножных мышцах цыплят из опытной группы 3 было выше на 4.3% по сравнению с остальными группами, что, повидимому, является следствием увеличения усвоения белка у цыплят этой группы, получавших белковую кормовую добавку ФКД (табл. 3).

ВУС грудных и ножных мышечных тканей в опытной группе 3 была самой высокой среди всех групп и превосходила аналогичный показатель групп 1 и 4 на 8.4% для грудных мышц и на 4.7% для ножных мышц. Значение ВУС грудных мышц птицы, получавшей рацион с ГКД (группа 2), также было выше показателей групп 1 и 4 на 3.2%. Однако значение ВУС ножных мышц птицы из группы 2 имело близкие с контрольной группой 1 значения и несколько уступало значениям в группе 4.

Мясо птицы является наиболее полноценным и диетическим продуктом по сравнению с мясом других сельскохозяйственных животных, так как в нем содержится больше полноценных и меньше трудно усваиваемых белков (коллагена и эластина), что обусловливает его высокую питательную ценность. Увеличение содержания белка в мышечных тканях цыплят-бройлеров группы 3 повышало питательную ценность мяса птиц этой опытной группы. При этом показатели ВУС грудных и ножных мышечных тканей у данной опытной группы самые высокие, что свидетельствовало также о повышении качества мяса птиц, получавших рацион с кормовой добавкой ФКД.

Таким образом, показано, что включение в рацион цыплят-бройлеров кросса "Смена 9" экспериментальной кормовой белковой добавки ФКД наиболее существенно влияло на физико-химический состав мышечной ткани, по сравнению с ГКД и РМ, что в свою очередь положительно сказывается на питательной ценности и качестве мяса. В настоящее время для исследования качества мяса и поиска биомаркеров, характеризующих его вкусовые качества, такие как нежность и влагоудерживающую способность, активно применяют протеомные методы [28, 29]. Кроме того, протеомика позволяет определять модификацию белков мышечных тканей, а именно фосфорилирование, окисление, деградацию и денатурацию [30]. В связи с этим в работе был изучен белковый состав образцов мышечных тканей птицы из разных групп и проведен их сравнительный анализ.

Фракционный состав белковых экстрактов грудных и ножных мышц птицы. В ходе исследования были получены протеомные карты образцов тканей грудных (pectoralis muscle) и ножных (femoralis muscle) мышц бройлеров (белое и красное мясо птицы соответственно) при различных рационах кормления (рис. 1 и 2).

Белковые фракции характеризовались различными изоточками pI и различными молекулярными массами. Фракционирование образцов методом двумерного электрофореза позволило идентифицировать до 150 белковых фракций (основные представлены в табл. 4). Большинство триптических спектров белков соответствовали последовательностям, существующим в базах данных для цыпленка (Gallus gallus), однако для некоторых гомологи были найдены у других видов. Среди идентифицированных белков более половины (61%) составляли белки структурной функции, в том числе фибриллярные белки: актин, миозин, тропомиозин и тропонин, также были идентифицированы виментин и парвальбумин. Изменения спектра структурных белков в образцах в основном обусловлены аминокислотными заменами или модификациями этих форм относительно белковых последовательностей, существующих в базах данных. Это вероятно связано с генетическими особенностями птиц, использованных в исслеловании.

Кроме того, были идентифицированы ферменты, участвующие в гликолизе: енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH), фосфоглицератмутаза (PGM), лактатдегидрогеназа (LDH), триозофосфатизомераза и другие ферменты: АТФ-синтаза, малатдегидрогеназа, креатинкиназа (CK), а также различные белки семейства молекулярных шаперонов (HSP70 и HSP71).

Проведенный протеомный анализ позволил выявить зоны локализации важных структурных мышечных белков: актинов, миозинов, тропомиозинов и тропонинов (рис. 1a и 2a). Как видно на рисунках, протеомные профили в группах 1–4 близки для образцов грудных мышц (рис. 1) и ножных мышц (рис. 2) птицы. Так, в каждой группе белков присутствуют "стабильные" формы, продукция которых неизменна от образца к



Рис. 1. Протеомный профиль образцов грудных мышц бройлеров групп 1(а), 3 (б), 2 (в) 4 (г). Черным обозначены белки, характерные для всех образцов, зеленым – присутствующие не во всех образцах, красным – уникальные; М – маркер молекулярной массы.

образцу. Тем не менее, были идентифицированы также индивидуальные белковые компоненты, изменяющиеся как количественно, так и качественно в зависимости от образца (рис. 1 и 2).

Показаны значительные изменения в профилях продукции трех групп белков мышечного сокращения (актины, миозины и тропонины) в зависимости от рациона питания. Обнаружены дополнительные фракции актина в протеоме грудных мышц птицы из группы 2: кардиальный альфа-актин 1 (ACTA1, KFW81934.1) и скелетномышечный альфа-актин (NP_001026234.1) (рис. 16). На протеомных картах ножных мышц птицы из группы 3 присутствовали дополнительные изоформы актина: скелетномышечный альфа-актин (NP_001026234.1) и кардиальный альфа-актин (NP_001026234.1) и кардиальный альфа-актин 2 (ААХ85445.1) (рис. 2в). В протеоме ножных мышц птицы из группы 4 также идентифицированы дополнительные изоформы скелетномышечного альфа-актина (NP_001026234.1, рис. 2г).

На протеомных картах различался также состав фракций миозинов: в грудных мышцах птицы из группы 2 обнаружено увеличенное содержание фракции тяжелых цепей миозинов (ААВ20215.1), по сравнению с образцами из других групп. В тоже время в грудных мышцах птицы из группы 4 идентифицированы дополнительные изоформы легких цепей миозина (ХР_015144626.1). Что касается изоферментного состава тропонинов в различных образцах, то в грудной мышце опытной группы 4 были обнаружены дополнительные изоформы тропонина С (NP 990781.1 и NP_990464.1, рис. 1г). В протеомах ножных мышц птицы из групп 3 и 4 идентифицированы фракции тропонинов I (NP 990748.1) и Т (XP 015142062.1, NP 990253.1) (рис. 2 в, г).



Рис. 2. Протеомный профиль образцов ножных мышц бройлеров групп 1(a), 3 (б), 2 (в) 4 (г). Черным обозначены белки, характерные для всех образцов, зеленым – присутствующие не во всех образцах, красным – уникальные; М – маркер молекулярной массы.

В процессе созревания мяса происходят существенные биохимические изменения в мышцах, влияющие на конечные характеристики качества мяса. Хорошо известно, что под действием протеолитических ферментов в мышцах *postmorthem* происходят автолитические изменения, в результате чего образуются фрагменты миофибриллярных белков актина, миозина и тропонина, которые можно рассматривать как молекулярные маркеры нежной структуры мяса [31]. Во многих исследованиях показано, что увеличение в протеомах мышц интенсивности белковых пятен легких и тяжелых цепей миозина, актина ACTA1, тропонина T связано с нежностью мяса [32, 33].

Таким образом, в протеомах грудных и ножных мышц птицы, содержащейся на рационах с добавлением белковых кормовых добавок, отмечено наличие дополнительных фрагментов структурных

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

желые и легкие цепи), по сравнению с первой контрольной группой бройлеров.

белков, таких как актин, тропонин и миозин (тя-

Стоит также отметить, что в образце грудных мышц бройлеров из группы 2 помимо увеличения содержания тяжелых цепей миозина, идентифицирован дополнительный белок виментин (VIM, vimentin, NP_001041541.2), отсутствующий в других образцах. Белки виментин и десмин играют важную роль в поддержании цитоархитектуры мышц и считаются надежными маркерами регенеративных процессов, протекающих в мышцах. Недавно проведенные исследования показали увеличение экспрессии гена VIM, а также увеличение содержания кодируемого им белка виментина в грудной мышце (Pectoralis major) быстрорастущих бройлеров с различными миопатиями, приводящими к развитию таких пороков мяса как появление идущих параллельно мышечным волок-

том 58 № 4 2022

ИСМАИЛОВА и др.

Идентифицированный белок	Обозна- чение на (рис. 1 и 2)	NCBI ID	Мм, кДа	p <i>I</i>	Индекс совпаде- ния (Score)	E-value	Организм
		Структурные	белки				
		Актины					
Кардиальный альфа-актин 1		KFW81934.1	30	4.99	54	12	Manacus vitellinus
Актин альфа скелетно- мышечный*	Act	NP_001026234.1	42	5.23	329	1.3e-030	Gallus gallus
Кардиальный альфа-актин 2		AAX85445.1	42.5	5.23	75	0.11	Rana catesbeiana
		Миозины	ı				
Легкая цепь миозина, изо- форма скелетно-мышечная X1*	Myo L	XP_015144626.1	19	4.96	244	1.3e-18	G. gallus
Легкая цепь миозина 1, кар- диальная изоформа X1		XP_015136535.1	22	5.13	96	2.3e-007	G. gallus
Тяжелая цепь миозина 1E, скелетно-мышечная	Myo H	NP_001013415.1	224	5.63	234	1.3e-17	G.gallus
Тяжелая цепь миозина*		AAB20215.1	222	5.61	412	2.1e-35	G. gallus
		Тропонин	51				
Тропонин С скелетно- мышечный	Trop C	NP_990781.1	18	4.05	163	1.7e-10	G. gallus
Тропонина С сердечная/мед- ленная скелетная изоформа		NP_990464.1	19	4.05	139	4.2e-08	G. gallus
Тропонин I скелетно-мышеч- ный, быстрый тип*	Trop I	NP_990748.1	21	9.19	201	2.6e-14	G. gallus
Тропонин Т скелетно- мышечный, быстрый тип, изоформа X42	Trop T	XP_015142062.1	30	9.19	112	2.1e-05	G. gallus
Тропонин T скелетно- мышечный, быстрый тип		NP_990253.1	34	6.60	88	0.0058	G. gallus
	Тропомиозины						
Тропомиозин альфа 1-цепь, изоформа X1*		AAA49113.1	31	4.64	423	1.2e-36	G. gallus
Тропомиозин альфа 1-цепь, изоформа X1*	TRMyo	XP_015134260.1	32	4.7	472	1.5e-41	G. gallus
Тропомиозин β-цепь, изо- форма В		OPJ75462.1	30	4.63	329	3.1e-27	Patagioenas fasci- ata monilis

Таблица 4. Список белков в тканях грудных (*pectoralis*) и ножных (*femoralis*) мышц бройлеров кросса "Смена 9", идентифицированных с помощью MALDI TOF/TOF-масс-спектрометрии

ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОТЕОМЕ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ПТИЦЫ

Таблица 4. Окончание

Идентифицированный белок	Обозна- чение на (рис. 1 и 2)	NCBI ID	Мм, кДа	p <i>I</i>	Индекс совпаде- ния (Score)	E-value	Организм
Другие							
Парвальбумин мышечный	Parv	KFV44965.1	10	5.07	118	3.9e-06	Tyto alba
Виментин	Vim	NP_001041541.2	53	5.13	139	4.2e-08	G. gallus
		Фермент	ы				
Креатинкиназа М-тип*	СК	NP_990838.1	44	6.50	365	1.00e-30	G. gallus
Цитоплазматическая малат- дегидрогеназа	MDH1	NP_001006395.1	37	6.92	160	3.3e-10	G. gallus
Субьединица β митохондри- ального комплекса АТФ син- тазы	βΑΤΡ	NP_001026562.2	57	5.44	419	4.2e-36	G. gallus
Фосфоглюкомутаза-1*	PGM-I	NP_001033782.2	53	6.52	324	9.7e-27	G. gallus
Гликолиз							
α-Енолаза, изоформа Х3	α-Eno	XP_015152319.2	48	6.09	118	5.2e-06	G. gallus
β-Енолаза	β-Eno	NP_990450.1	48	7.28	223	1.7e-16	G. gallus
Глицеральдегид-3-фосфатде- гидрогеназа 1	GAPDH-I	AZN23181.1	39	6.27	126	8.3e-07	G. gallus
Триозофосфатизомераза*	TPI	NP_990782.1	27	6.71	393	1.7e-33	G. gallus
Лактатдегидрогеназа А*	LDHA	NP_990615.1	29	7.75	301	1.9e-24	G. gallus
Фосфоглицератмутаза-1*	PGAM	NP_001026727.1	22	7.03	217	4.9e-16	G. gallus
		Другие бел	ки				
Аполипопротеин А1	Apo A-I	AAA48597.1	31	5.58	615	1.00e-55	G. gallus
Цитохром-bc1-комплекс митохондриальный, субъеди- ница 1	Cyt bc1	XP_414356.3	54	6.58	114	1.3e-05	G. gallus
Фосфатидилэтаноламин-свя- зывающий белок 1	PEBP-I	NP_001185571.1	21	6.96	159	4.2e-10	G. gallus
Карбоангидраза II	CA II	CAA29417.1	30	6.56	127	6.6e-07	G. gallus
Сывороточный альбумин, прекурсор	SA	NP_990592.2	72	5.51	376	8.3e-32	G. gallus
Белок теплового шока 71	HSP71	XP_010147574.1	60	5.23	318	3.9e-26	Eurypyga helias
Белок теплового шока 70	HSP70	AAP37959.1	60	5.66	291	1.9e-23	G. gallus

* Представлены наибольшие значения Score и E-value, если было идентифицировано несколько изоформ белка в одном образце.

нам белых полос (white stripes – WS) и синдром "деревянной груди" (wooden breast – WB) [34]. Таким образом, виментин может являться маркером аномального развития мышечных волокон Pectoralis *major* на ранних стадиях. Интересно, что в группах 2 и 4, получавших ферментированные белковые корма с более высоким содержанием аминокислот, низкомолекулярных пептидов и высокой переваримостью (табл. 2), виментин в грудных мышцах обнаружен не был. Известно, что мышечная дистрофия наблюдается при скармливании цыплятам рационов с недостаточным содержанием витамина Е, селена и серосодержащих аминокислот [34]. Включение же в рацион метионина, цистеина или увеличение содержания витамина Е способствует профилактике мышечной листрофии у цыплят, причем комбинация антиоксидантов и омега-3 жирных кислот более действенна в борьбе с этим пороком мяса. Анализ антиоксидантной емкости кормовых добавок (табл. 2), используемых в данной работе, показал, что содержание антиоксидантов значительно выше в белковой добавке ФКД (1980 мкМоль ТЭ/г), по сравнению с ГКД (около 400 мкМоль ТЭ/г) и РМ (около 150 мкМоль ТЭ/г).

Вторую широко представленную группу в образцах протеомов мыши составляли ферменты (табл. 4). Основными растворимыми белковыми компонентами протеома являлись α- и β-енолазы, лактатдегидрогеназа А, фосфоглицератмутаза, фосфоглюкомутаза, креатинкиназа, а кроме того триозофосфатизомераза. В грудной мышце птиц гликолиз является одним из основных путей получения энергии для сокращения мышц и для удовлетворения энергетических потребностей при росте. Чтобы поддерживать мышечную массу, а также удовлетворять потребности сократительной мускулатуры птицы нуждаются в значительном количестве энергии. Поэтому не удивительно, что во фракции растворимых белков преобладали преимущественно ферменты гликолиза. Для всех образцов в этой категории так же существует "минимальный" консервативный набор белков, не изменяющих свою продукцию. Основные отличия между образцами были зафиксированы в протеоме ножных мышц птицы из группы 3, где обнаружены дополнительные изоформы α-енолазы (ХР 015152319.2), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (AZN23181.1), малатдегидрогеназы (NP 001006395.1) и креатинкиназы (NP 990838.1) (рис. 2в). Интересно отметить, что именно в этой опытной группе бройлеров отмечался наиболее интенсивный прирост мышечной массы, по сравнению с другими группами.

В ножных мышцах птицы из группы 3 обнаружен повышенный уровень белка креатинкиназы М-типа (NP_990838.1), одного из четырех форм СК (рис. 2в). Известно, что СК является потенциальным биомаркером ВУС мяса [8], действительно значение ВУС ножных мышц птицы из группы 3 самое высокое (табл. 3). Ранее было показано [35], что продукция креатинкиназы М-типа и сывороточного альбумина была ниже в образцах с низкой ВУС [8].

Кроме того, в образцах мышечных тканей всех групп птиц были идентифицированы такие белки как фосфатидилэтаноламин-связывающий белок 1, карбоангидраза II и сывороточный альбумин (кроме группы 4) (табл. 4).

Известно, что обнаруженный фермент карбоангидраза II катализирует обратимую реакцию гидратации диоксида углерода и дегидратации угольной кислоты, участвует в поддержании pH-баланса в мышечных тканях. Фосфатидилэтаноламин-связывающий белок 1, который вместе с виментином является протеомным маркером ревматических заболеваний хрящевой ткани [36] и гомолог которого у людей способен взаимодействовать с Маркиназами [37].

Для образца № 3 (рацион ФКД) показано присутствие аполипопротеина A1 (АроА-I) в тканях ножных мышц бройлеров (табл. 4, рис. 2). АроА-І участвует в метаболизме липидов, и, являясь основным компонентом липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), играет важную роль в регуляции содержания холестерина в периферических тканях посредством его обратного транспорта в печень. Дефицит АроА-І связан с избыточным накоплением внутриклеточного холестерина у людей и птицы. Показано, что уровень экспрессии АроА-І снижается при геморрагическом синдроме жирной печени у кур [38], также показано снижение уровня экспрессии АроА-І в тканях бройлеров с высоким содержанием абдоминального жира [39]. Действительно, наличие фракции АроА-І в тканях ножных мышц бройлеров из группы 3 коррелировало с самым низким содержанием жира в мышечных тканях femoralis muscle среди всех групп — 5.9 ± 0.9% (табл. 3).

В литературе предпринимались попытки ассоциировать экспрессию (и активность) митохондриальных белков с эффективностью рационов кормления (ЭРК) птиц [40]. Было показано, что активность комплексов I и II электронтранспортной цепи выше в митохондриях образцов белого и красного мяса, полученных при высокой ЭРК. Экспрессию митохондриальных белков при низкой ЭРК связывают с низкой способностью передачи электронов в электронтранспортной цепи при окислительном фосфорилировании.

Появление в образцах группы 3 дополнительных изоформ различных комплексов электронтранспортной цепи свидетельствует об изменениях, происходящих в метаболизме.

Стоит отметить отсутствие различий в продукции шаперонового комплекса в протеоме птиц

2022

№ 4

Таблица 5. Антиоксидантная емкость (AOE) тканей грудных (*pectoralis*) и ножных (*femoralis*) мышц бройлеров кросса "Смена 9", выращенных на различных рационах кормления

	АОЕ, мкМоль ТЕ/г ткани				
i pyima, j v <u>e</u>	грудная мышца	ножная мышца			
1	27.39 ± 1.9	24.85 ± 1.7			
2	31.11 ± 1.6	23.18 ± 1.5			
3	36.97 ± 2.0	31.29 ± 1.3			
4	31.41 ± 1.8	25.53 ± 1.6			

различных групп: для фракции белков HSP70 и HSP71 не было выявлено изменений в составе изоформ. Предполагается, что данные белки участвуют в регуляции процессов сборки и поддержания структуры мышечной ткани, в защите структурных белков, в том числе десмина, актина и титина при стрессе [41], а также в регуляции гликолиза [42]. При этом снижение их продукции ассоциируют с развитием PSE-синдрома, характерными признаками которого являются экссудативное бледное, мягкое, водянистое мясо с мягкой рыхлой консистенцией и выделением мясного сока вследствие пониженной BУС [42, 43].

Антиоксидантная емкость грудной и мышечной ткани птицы. Из литературы известно, что АОЕ мышечной ткани влияет на качество мяса. Исследования показали, что окисление мышечных белков, вызванное окислительным стрессом, приводит к потере незаменимых аминокислот (например, триптофана) и влияет на ВУС белков мяса, цвет и текстуру получаемых мясных продуктов, а также на усвояемость мяса и приводит к снижению его пищевой ценности [44, 45]. Окисление миофибриллярных белков свиней также снижает их способность к гелеобразованию, что важно для текстурных и структурных характеристик мясных продуктов [46]. Как видно из представленных в табл. 5 результатов, самые высокие значения АОЕ мышечной ткани грудных и ножных мышц были получены для бройлеров из группы 3, получавших дополнительно к основному рациону ФКД.

Таким образом, при введение в рацион кормления цыплят бройлеров кросса "Смена 9" ферментированной белковой кормовой добавки, в протеомах грудных и ножных мышц птицы отмечены фрагменты белков, являющихся биомаркерами нежности (актин, тропонин, тяжелые и легкие цепи миозина) и ВУС мяса (креатин киназа М типа), а также появление дополнительных изоформ различных комплексов электрон-транспортной цепи (комплекс цитохромов bcl, или комплекс III дыхательной цепи переноса электронов), характеризующих эффективность данного рациона кормления. Введение в рацион кормления птицы ФКД приводило также к увеличению антиоксидантной емкости тканей грудных и ножных мышц бройлеров, и снижению содержания жира в тканях ножных мышц, что коррелировало с наличием в протеомах данных тканей аполипопротеина A1 (ApoA-I).

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (проект № 17-16-01028).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Еремеев Н.Л., Николаев И.В., Керученько И.Д., Степанова Е.В., Сатрутдинов А.Д., Зиновьев С.В. и др. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 6. С. 717–724.

https://doi.org/10.1134/S0555109909060130

- Mamelona J., Saint-Louis R., Pelletier E., Mamelona J. // Int. J. Food Sci. Technol. 2010. V. 45. P. 147–154. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02114.x
- Khiari Z., Ndagijimana M., Betti M. // Poult. Sci. 2014. V. 93. P. 2347–2362. https://doi.org/10.3382/ps.2014-03953
- 4. Фисинин В.И., Исмаилова Д.Ю., Волик В.Г., Лукашенко В.С., Салеева И.П. // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 6. С. 1105–1115. https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.6.1105rus
- 5. Фисинин В.И., Лукашенко В.С., Салеева И.П., Овсейчик Е.А., Журавчук Е.В., Волик В.Г., Исмаилова Д.Ю. // Птицеводство. 2018. Т. 11. № 12. С. 20-22.
- 6. *Силкина В.А.* // Генетика и разведение животных. 2015. № 1. С. 26–29.
- Piras C., Roncada P., Rodrigues P.M., Bonizzi L., Soggiu A. // Proteomics. 2016. V. 16. P. 799–815. https://doi.org/10.1002/pmic.v16.5
- Vlachos A., Arvanitoyannis I.S., Tserkezou P. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2013. V. 56. P. 1061–1096. https://doi.org/10.1080/10408398.2012.691573
- 9. Wu W, Fu Y, Therkildsen M., Li X.M., Dai R.T. // Food Rev. Int. 2015. V. 31. P. 13–28. https://doi.org/10.1080/ 87559129.2014.961073
- Paredi G., Raboni S., Bendixen E., de Almeida A.M., Mozzarelli A. // J. Proteomics. 2012. V. 75. № 14. P. 4275–4289. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.011
- Corzo A., Kidd M.T., Dozier W.A., Shack L.A., Burgess S.C. // The British Journal of Nutrition. 2006. V. 95. № 4. P. 703–708. https://doi.org/10.1079/bjn20051716
- Molette C., Remignon H., Babile R. // Poultry Science. 2005. V. 84. № 1. P. 119–127. https://doi.org/10.1093/ps/84.1.119
- Mekchay S., Teltathum T., Nakasathien S., Pongpaichan P. // The J. Poultry Science. 2010. V. 47. № 1. P. 8–12.

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

том 58 № 4 2022

- 14. Surowiec I., Koistinen K.M., Fraser P.D., Bramley P.M. // Meat Science. 2011. V. 89. № 2. P. 233–237.
- 15. Zapata I., Reddish J.M., Miller M.A., Lilburn M.S., Wick M. // Poultry Science. 2012. V. 91. № 7. P. 1654– 1659.

https://doi.org/10.3382/ps.2011-02029

- Phongpa-Ngan P., Grider A., Mulligan J.H., Aggrey S.E., Wicker, L. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. V. 59. № 24. P. 13181–13187.
- Laville E., Sayd T., Terlouw C., Blinet S., Pinguet J., Fillaut M., Glannison J., Chérel P. // J. Agric. Food Chem. 2009. V. 57. № 11. P. 4913–4923. https://doi.org/10.1021/jf900286x
- Marcos B., Mullen A.M. // Meat Science. 2014. V. 97. № 1. P. 11–20. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.12.008
- Sayd T., Morzel M., Chambon C., Franck M., Figwer P., Larzul C. et al. //J. Agric Food Chem. 2006. V. 54. P. 2732–2737. https://doi.org/10.1021/jf052569v
- Bouley J., Meunier B., Chambon C., De S.S., Hocquette J.F., Picard B. // Proteomics. 2005. V. 5. P. 490– 500. https://doi.org/10.1002/()1615-9861
- Hamelin M., Sayd T., Chambon C., Bouix J., Laville E., Milenkovic D. et al. // J. Anim. Sci. 2007. V. 84. P. 3266–3276.

https://doi.org/10.2527/jas.2006-162

- Волик В.Г., Исмаилова Д.Ю., Зиновьев С.В., Ерохина О.Н. // Птица и птицепродукты. 2017. № 2. С. 40-42.
- Волик В.Г., Исмаилова Д.Ю., Лукашенко В.С., Салеева И.П., Фёдорова Т.В., Овсейчик Е.А., Журавчук Е.В., Зиновьев С.В. // Ученые записки Казанского университета, серия естественные науки. 2019. Т. 161. № 3. С. 422–439. https://doi.org/10.26907/2542-064X.2019.3.422-439
- 24. Лукашенко В.С., Лысенко М.А., Столяр Т.А. Методика проведения анатомической разделки тушек, органолептической оценки качества мяса и яиц сельскохозяйственной птицы и морфологии яиц. / Ред. В.С. Лукашенко. Сергиев Посад: ВНИТИП, 2013. 36 с.
- Журавская Н.К., Алехина Л.Т. Отряшенкова Л.М. Исследование и контроль качества мяса и мясопродуктов. / Агропромиздат. Москва. 1985. 295 с.
- Vasina D.V., Pavlov A.R., Koroleva O.V. // BMC Microbiology. 2016. V. 16. Article 106 (2016). https://doi.org/10.1186/s12866-016-0729-0
- Nikolaev I.V., Sforza S., Lambertini F., Ismailova D.Yu., Khotchenkov V.P., Volik V.G. et al. // Food Chemistry. 2016. V. 197. Part A. P. 611–621.
- Picard B., Lebret B., Cassar-Malek I., Liaubet L., Berri C., Le Bihan-Duval E., Renand G. // Meat Science. 2015. V. 109. P. 18–26. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.05.003
- 29. *Huang H., Lametsch R.* in Proteomics in Foods: Principles and Applications. / Ed. F. Toldrá, L.M.L. Nollet

New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer, 2013. P. 103–109.

- D'Alessandro A., Marrocco C., Rinalducci S., Mirasole C., Failla S., Zolla L. // J. Proteom. 2012. V. 75. № 14. P. 4381–4398.
- Luccia A. D., Picariello G., Cacace G., Scaloni A., Faccia M., Liuzzi V., Alviti G., Musso S. S. // Meat Science. 2005. V. 69. P. 479–491. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.10.004
- Beldarrain L.R., Aldai N., Picard B., Sentandreu E., Navarro J.L., Sentandreu M.A. // J. Proteomics. 2018.
 V. 183. P. 25–33. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.05.005
- Gagaoua M., Monteils V., Picard B. // J. Agric. Food Chem. 2018. V. 66. № 51. P. 13552–13563. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05744
- Soglia F., Mazzoni M., Zappaterra M., Di Nunzio M., Babini E., Bordini M. et al. // Front. Physiol. 2020. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01581
- Bottje W., Iqbal M., Tang Z.X., Cawthon D., Okimoto R., Wing T., Cooper M. // Poult. Sci. 2002. V. 81. № 4. P. 546–555.
- Yeung K., Janosch P., McFerran B., Rose D.W., Mischak H., Sedivy J.M., Kolch W. // Mol. Cell. Biol. 2000.
 V. 20. № 9. P. 3079–3085. https://doi.org/10.1128/mcb.20.9.3079-3085.2000
- 37. *Ghosh J.G., Houck S.A., Clark J.I.* // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2007. V. 39. № 10. P. 1804–1815.
- Song Y., Ruan J., Luo J., Wang T., Yang F., Cao H., Huang J., Hu G. // Poult. Sci. 2017. V. 96. № 10. P. 3559–3563. https://doi.org/10.3382/ps/pex163
- 39. Wang D., Wang N., Li N., Li H. // Poult. Sci. 2009. V. 88. № 11. P. 2285–2292. https://doi.org/10.3382/ps.2009-00190
- 40. *Iqbal M., Pumford N.R., Tang Z.X., Lassiter K., Wing T., Cooper M.* // Poult. Sci. 2004. V. 83. № 3. P. 474–484. https://doi.org/10.1093/ps/83.3.474
- Laville E., Sayd T., Santé-Lhoutellier V., Morzel M., Labas R., Franck M., Chambon C., Monin G. // Meat Sci. 2005. V. 70. P. 167–172.
- 42. Xing T., Wang P., Zhao L., Liu R., Zhao X., Xu X., Zhou G. // Poultry Science. 2016. V. 95. № 10. P. 2391–2396. https://doi.org/10.3382/ps/pew181
- 43. *Xing T., Zhao X., Zhou G., Xu X.* // J. Agric. Food Chem. 2017. V. 65. № 13. P. 2913–2922. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05835
- 44. Lund M.N., Heinonen M., Baron C.P., Estévez M. // Mol. Nutr. Food Res. 2011. V. 55. P. 83–95.
- 45. *Zhou F., Zhao M., Zhao H., Sun W., Cui C.* // Meat Sci. 2014. V. 96. № 4. P. 1432–1439.
- 46. Carvalho M.E., Gasparin G., Poleti M.D., Rosa A.F., Balieiro J.C., Labate C.A., Coutinho L.L. // Meat Science. 2014. V. 96. № 3. P. 1318–1324.

Changes in the Bird Muscle Tissue Proteome When Including Various Protein Supplements in the Diet

D. Yu. Ismailova^{*a*}, O. S. Savinova^{*b*}, T. V. Fedorova^{*b*}, *, D. V. Vasina^{*b*}, V. G. Volik^{*a*}, V. S. Lukashenko^{*c*}, and I. P. Saleeva^{*c*}

^a All-Russian Research Institute of the Poultry Processing Industry, Moscow region, Solnechnogorsk district, village Rzhavki, 141552 Russia

^b Bach Institute of Biochemistry Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^c Federal Scientific Center "All-Russian Research and Technological Poultry Institute" of Russian Academy of Sciences,

Moscow region, Sergiev Posad, 141311 Russia

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

It has been shown that when a fermented protein feed additive (**FFA**) is added to the diet of broiler chickens, the presence of additional protein fragments is noted in the proteomes of the pectoral (*pectoralis*) and leg (*femoralis*) muscles of the bird. These proteins (actin, troponin, myosin heavy and light chains) are biomarkers of tenderness and water-holding capacity of meat (type M creatine kinase). The presence of additional isoforms of various complexes of the electron transport chain (complex of cytochrome bc1, or complex III of the electron transport chain), characterizing the effectiveness of this diet, is also noted. In addition, the introduction of FFA into the poultry diet leads to an increase in the antioxidant capacity of the tissues of the pectoral and leg muscles of broilers and a decrease in the fat content in the tissues of the leg muscles.

Keywords: broilers, protein feed additive, pectoralis muscle, femoralis muscle, proteome, antioxidant capacity, protein markers of meat quality

УДК 57.055

ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА В СОСТАВЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ПОДКОРМКИ "БиХит" НА ХОЗЯЙСТВЕННО ПОЛЕЗНЫЕ ПРИЗНАКИ ПЧЕЛ

© 2022 г. А. И. Албулов¹, М. А. Фролова¹, В. П. Варламов¹, Э. И. Ковалева^{1, *}, А. К. Елисеев¹

¹ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности", Московская обл., Щелковский район, пос. Биокомбината, 141142 Россия

> **e-mail: vnitibp@mail.ru* Поступила в редакцию 13.01.2022 г. После доработки 25.02.2022 г. Принята к публикации 01.03.2022 г.

Разработан состав и проведены испытания биологически активной подкормки для пчел "БиХит", содержащей различные модификации хитозана, на базе частных пасек Московской области и республики Крым, которые показали ее положительное влияние на хозяйственно полезные признаки пчел.

Ключевые слова: биологически активная подкормка "БиХит", хитозан, хозяйственно полезные признаки пчел

DOI: 10.31857/S055510992204002X

В настоящее время в медицине и ветеринарии все больше внимания привлекают перспективы использования биостимуляторов на основе хитозана и его производных, которые способны сорбировать различного рода токсины и быть одновременно безопасными для пчелосемей, при этом являясь естественным компонентом скелета пчел. Известно, что хитин и его дезацетилированное производное хитозан входят в состав тканей экзоскелета и пищеварительного тракта пчел, участвуя в выполнении важных регуляторных функций в организме пчелы. Хитозан и его модификации обладают множеством свойств, которые позволяют применять их в пчеловодстве: природное происхождение и отсутствие токсичности, иммуномодулирующие свойства, антимикробная активность, способность повышать устойчивость и выводить из организма пчел тяжелые металлы и токсины [1-3].

По данным ряда отечественных ученых хитозан оказывает положительное влияние на яйценоскость, медопродуктивность, зимовку, восстановление ослабленных пчелосемей в весенний период и сопротивляемость организма пчел к варроатозу и нозематозу. В научной литературе встречаются публикации, доказывающие иммуномодулирующее действие хитозана на медоносную пчелу [4–6].

Важным периодом в жизнедеятельности пчелиных семей является благополучная зимовка. От ее исхода в значительной мере зависит дальнейшая продуктивность и развитие пчелиных семей. Успешная зимовка позволяет эффективно использовать пчел в весенне-летний период на медосборе и опылении сельскохозяйственных культур. Массовая гибель пчелосемей зимой — один из пусковых механизмов, приводящих к их коллапсу. Пчела играет важнейшую роль в экосистеме Земли, являясь, помимо источника меда, важнейшим опылителем сельскохозяйственных культур, жизненно необходимых человеку.

Принос нектара и пыльцы в улей стимулирует жизнедеятельность, повышает яйцекладку маток. С уменьшением или прекращением медосбора кладка яиц уменьшается или вовсе прекращается — рост семей замедляется. Полноценное развитие пчелиных семей зависит от репродуктивных свойств пчелиных маток, поэтому необходимо стимулировать процесс яйцекладки при помощи подкормок на основе биологически активных веществ, позволяющих покрывать недостаток жизненно необходимых аминокислот, витаминов и микроэлементов [7, 8].

Цель работы — изучение влияния хитозана в составе биологически активной подкормки "Би-Хит" на хозяйственно полезные признаки пчел.

МЕТОДИКА

Опыты проводили на базе частных пасек Московской области и республики Крым. Были сформированы по две группы пчел (контрольная

Группа	Сила семей (количествово улочек)	Расплод (количествово ячеек)	Мед, кг			
Начало опыта, май						
Контрольная	4.5 ± 0.4	17771 ± 67.0	—			
Опытная	5.0 ± 0.4	14607 ± 71.0	_			
Конец опыта, июнь						
Контрольная	7.7 ± 0.3	26795 ± 82.0	5.4 ± 0.1			
Опытная	10.3 ± 0.4	32885 ± 71.0	8.1 ± 0.2			

Таблица 1. Влияние биологически активной подкормки "БиХит" на хозяйственно полезные признаки пчелиных семей в условиях частной пасеки (Московская обл.) (*n* = 3)

Таблица 2. Влияние биологически активной подкормки "БиХит" на хозяйственно полезные признаки пчелиных семей в условиях частной пасеки (республика Крым) (*n* = 13)

Группа	Сила семей	Расплод				
Tpyma	(количествово улочек)	(количествово ячеек)				
Начало опыта (начало апреля)						
Контрольная	2.9 ± 0.3	2820 ± 26.0				
Опытная	2.9 ± 0.3	2641 ± 41.0				
	Середина опыта (середина апреля)					
Контрольная	3.0 ± 0.2	6339 ± 33.0				
Опытная	3.2 ± 0.3	7112 ± 41.0				
	Конец опыта (конец апреля)					
Контрольная	6.5 ± 0.3	16723 ± 56.0				
Опытная	7.1 ± 0.4	18199 ± 38.0				

и опытная) по 3 пчелосемьи на частной пасеке в Московской области и по 13 пчелосемей на частной пасеке в республике Крым. Контрольные группы получали 60%-ный сахарный сироп, опытные — 60%-ный сахарный сироп с добавлением 4 г подкормки "БиХит" на 1 л сахарного сиропа из расчета 1 л сахарного сиропа на 10000 пчел один раз в неделю в течение месяца. Учет силы, яйценоскости маток и медопродуктивности пчелосемей проводили в начале, середине и конце опыта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены результаты, полученные на базе частной пасеки в Московской области. Из данных, приведенных в табл. 1, видно, что контрольная группа по силе пчелосемей и количеству расплода увеличилась на 71.1 и 50.8%, а опытная на 106 и 125.1% соответственно, по сравнению с началом опыта. Скармливание биологически активной подкормки "БиХит" опытной группе оказало положительное влияние на медопродуктивность пчелосемей, наблюдали ее увеличение в 1.5 раза по сравнению с контрольной группой.

Результаты опыта на базе частной пасеки в республике Крым представлены в табл. 2.

Из данных, представленных в табл. 2 видно, что уже к середине опыта сила семей и расплод увеличивались в контрольной группе на 3.4, 124.8%

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

и опытной группе на 10.3, 169.3% соответственно. К концу опыта показатели силы семьи и расплод пчелосемей в контрольной группе увеличилась на 24.1 и 493.0%, а в опытной — на 44.8 и 589.1% соответственно.

Таким образом, показана эффективность биологически активной подкормки "БиХит", содержащей хитозан, в отношении хозяйственно полезных признаков пчел.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Еськов Е.К. Ярошевич Г.С. // Аграрная Россия. 2004. № 5. С. 34–35.
- 2. Назмиев Б.К., Салтыкова Е.С., Николенко А.Г. // Пчеловодство. 2013. № 1. С. 34-35.
- Салтыкова Е.С., Гайфуллина Л.Р., Ильясов Р.А., Николенко А.Г. Николенко А.Г. // Современные перспективы в использовании хитина и хитозана. Материалы X Международной. конф. Российского хитинового общества. Н. Новгород. 2010. С. 302–305.
- 4. Хамадиева А.Р., Кутлин Н.Г., Шареева З.В., Назмиев Б.К. // Пчеловодство. 2012. № 3. С. 18–19.
- Ишмурастова Н.М., Ишмурастов Г.Ю., Циколенко А.С. // Матер. II Международный форум "Медовый мир". "Пути развития пчеловодства в России через успешный опыт регионов России, стран СНГ и Дальнего Зарубежья" Ярославль: Узорочье, 2011. С. 45–48.

том 58 № 4 2022

- 6. Салтыкова Е.С., Гайфулина Л.Р., Гатауллин А.Р., Каримова А.А., Николенко А.Т. // Известия Уфимского научного центра РАН. 2016. № 1. С. 157–159.
- 7. Пшеничная Е.А. // Пчеловодство. 2016. № 2. С. 14, 15.
- 8. Маннапов А.Г., Мишуковская Г.С., Циколенко С.П., Мамаев В.П. // Пчеловодство. 2004. № 7. С. 16–18.

Effect of Chitosan as Part of Biologically Active Feeding "BiHit" on Economically Useful Features of Bees

A. I. Albulov^{a, *}, M. A. Frolova^a, V. P. Varlamov^a, E. I. Kovaleva^a, and A. K. Eliseev^a

^a All-Russian Scientific Research and Technological Institute of Biological Industry, Moscow Region, Shchelkovsky District, settlement Biokombinat, 141142 Russia *e-mail: vnitibp@mail.ru

Currently, biostimulants based on chitosan and its derivatives are increasingly used in veterinary medicine. Chitosan and its modifications have many properties that allow them to be used in beekeeping: natural origin and lack of toxicity, immunomodulatory properties, antimicrobial activity, the ability to increase resistance and remove heavy metals and toxins from the bees. Chitosan is a chitin derivative that is a natural component of the skeleton of bees. [The composition was developed and tested for biologically active feeding for bees "BiHit," containing various modifications of chitosan, on the basis of private apiaries of the Moscow region and the Republic of Crimea, which showed its positive effect on economically useful signs of bees.

Keywords: biologically active feeding "BiHit," chitosan, economically useful signs of bees