

СОДЕРЖАНИЕ

Том 56, номер 5, 2020

Перспективы создания препаратов против гриппа на основе лекарственных грибов (обзор) <i>Т. В. Теплякова, Т. Н. Ильичева, Н. А. Маркович</i>	409
Вакцины против туберкулеза: проблемы и перспективы (обзор) <i>Н. И. Надолинская, Д. С. Карпов, А. В. Гончаренко</i>	419
Полимерные гидрогели для контролируемого выделения инсулина <i>И. Л. Валуев, Л. В. Ванчугова, Л. И. Валуев</i>	428
Влияние комплексов железа с оксидом азота на реакционную способность цистеинов гемоглобина <i>О. В. Космачевская, Э. И. Насыбуллина, К. Б. Шумаев, Н. Н. Новикова, А. Ф. Топунов</i>	436
Микроорганизмы в обессеривании углей (обзор) <i>В. И. Котельников, Ч. А. Сарыглар, Р. Б. Чысыма</i>	446
Альтернативный синтез цефазолина с использованием синтетазы цефалоспоринов-кислот <i>А. В. Скляренко, И. А. Грошкова, А. И. Сидоренко, С. В. Яроцкий</i>	452
Конструирование метанотрофа I типа с пониженной способностью аккумулировать гликоген и сахарозу <i>С. Ю. Бут, С. Н. Дедыш, В. О. Попов, Н. В. Пименов, В. Н. Хмеленина</i>	465
Оценка пробиотического потенциала и функциональных свойств <i>Lactobacillus reuteri</i> LR1 <i>in vitro</i> <i>А. В. Бегунова, О. С. Савинова, И. В. Рожкова, Ю. И. Крысанова, Т. В. Фёдорова</i>	472
Анализ и выделение вторичных метаболитов гриба <i>Bipolaris sorokiniana</i> различными методами хроматографии и спектр их биологической активности <i>А. О. Берестецкий, А. А. Далинова, В. Р. Дубовик, Е. Н. Григорьева, Д. М. Кочура, И. В. Сендерский, С. Н. Смирнов, Е. А. Степанычева, С. М. Тураева</i>	483
Синтез и антибактериальная активность наночастиц серебра, стабилизированных сукцинамидом хитозана <i>В. А. Александрова, А. М. Футорянская, В. С. Садыкова</i>	497
Разработка бессывороточных сред на основе оптимальной комбинации рекомбинантных белков-добавок и гидролизатов неживотного происхождения для получения иммуноглобулинов <i>Д. С. Балабашин, Е. Н. Калиберда, И. В. Смирнов, Ю. А. Мокрушина, Т. В. Бобик, Т. К. Алиев, Д. А. Долгих, М. П. Кирпичников</i>	503
Акустическая сенсорная система для определения бактерий в водной среде <i>О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, О. А. Караваева, А. К. М. Алсовэиди, О. С. Ларионова, И. А. Бородина</i>	514

CONTENTS

Vol. 56, No. 5, 2020

Future Developing Medicines Against Influenza on the Basis of Medicinal Mushrooms (Review) <i>T. V. Teplyakova, T. N. Ilyicheva, and N. A. Markovich</i>	409
Vaccines Against Tuberculosis: Problems and Prospects (Review) <i>N. I. Nadolinskaia, D. S. Karpov, and A. V. Goncharenko</i>	419
Polymeric Hydrogels for Controlled Insulin Releasing <i>I. L. Valuev, L. V. Vanchugova, and L. I. Valuev</i>	428
Influence of Iron Complexes with Nitric Oxide on the Reactivity of Hemoglobin Cysteines <i>O. V. Kosmachevskaya, E. I. Nasybullina, K. B. Shumaev, N. N. Novikova, and A. F. Topunov</i>	436
Microorganisms in the Desulphurization of Coal (Review) <i>V. I. Kotelnikov, Ch. A. Saryglar, and R. B. Chysyma</i>	446
Alternative Synthesis of Cefazolin Using Cephalosporin-Acid Synthetase <i>A. V. Sklyarenko, I. A. Groshkova, A. I. Sidorenko, and S. V. Yarotsky</i>	452
Construction of a Type I Metanotroph with a Reduced Ability to Accumulate Glycogen and Sucrose <i>S. Yu. But, S. N. Dedysh, V. O. Popov, N. V. Pimenov, and V. N. Khmelenina</i>	465
<i>In vitro</i> Evaluation of Probiotic Potential and Functional Properties of <i>Lactobacillus reuteri</i> LR1 <i>A. V. Begunova, O. S. Savinova, I. V. Rojkova, U. I. Krisanova, and T. V. Fedorova</i>	472
Analysis and Isolation of Secondary Metabolites of <i>Bipolaris sorokiniana</i> by Different Chromatography Techniques and the Spectrum of Their Biological Activity <i>A. O. Berestetskiy, A. A. Dalinova, V. R. Dubovik, E. N. Grigoryeva, D. M. Kochura, I. V. Senderskiy, S. N. Smirnov, E. A. Stepanycheva, and S. M. Turaeva</i>	483
Silver Nanoparticles Stabilized with Chitosan Succinamide: Synthesis and Antibacterial Activity <i>V. A. Alexandrova, A. M. Futoryanskaya, and V. S. Sadykova</i>	497
Development of Serum Free Media Based on the Optimum Combination of Recombinant Proteins and Non-Animal Derived Hydrolysates to Produce Immunoglobulins <i>D. S. Balabashin, E. N. Kaliberda, I. V. Smirnov, Y. A. Mokrushina, T. V. Bobik, T. K. Aliev, D. A. Dolgikh, and M. P. Kirpichnikov</i>	503
Acoustic Sensor System for Determining Bacteria in Aquatic Environment <i>O. I. Guliy, B. D. Zaitsev, O. A. Karavaeva, A. K. M. Alsowaidi, O. S. Larionova, and I. A. Borodina</i>	514

УДК 615.281.8:582.28+578.832.1

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ ГРИППА НА ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБОВ (ОБЗОР)

© 2020 г. Т. В. Теплякова^{1, *}, Т. Н. Ильичева^{1, 2}, Н. А. Маркович^{1, **}

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Кольцово Новосибирской области, 630559 Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: teplyakova@vector.nsc.ru

**e-mail: namark@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.12.2019 г.

После доработки 15.04.2020 г.

Принята к публикации 22.04.2020 г.

Рассмотрены российские и международные публикации, посвященные противовирусной активности лекарственных грибов в отношении гриппа, исследуемых на культуре клеток, моделях животных, наличию ингибиторов сиалидазы (нейраминидазы) и РНК-полимеразы вируса гриппа. Описана активность против гриппа как водных экстрактов высших грибов, так и присутствующих в них полисахаридов, пептидогликанов, белков, меланина, полифенолов и терпеноидов. Отмечена необходимость дальнейших исследований механизмов противовирусного действия этих компонентов лекарственных грибов, как растущих в природных условиях, так и культивируемых твердофазным или глубинным способами в лабораторных и заводских условиях, для создания лекарственных препаратов на их основе.

Ключевые слова: лекарственные грибы, *Basidiomycota*, вирус гриппа, нейраминидаза, сиалидаза, РНК-полимераза, ингибирование, полисахариды, меланин, терпеноиды, полифенолы, культивирование

DOI: 10.31857/S0555109920050141

Наиболее эффективными подходами к профилактике и борьбе с гриппом являются вакцинация и противовирусная терапия. В настоящее время грипп можно эффективно лечить с помощью противовирусных препаратов, действие которых направлено против белков вируса гриппа (ВГ) или на повышение защитных сил организма [1].

В течение сезона гриппа 2018–2019 гг. в США были рекомендованы к применению против ВГ типов А и В три ингибитора вирусной нейраминидазы (NA): пероральный осельтамивир фосфат (Tamiflu®), аэрозольный препарат занамивир (Relenza®) и внутривенный перамивир (Rapivab®). Четвертый препарат, пероральный балоксавир (Xofluza®) – ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы, который препятствует транскрипции вирусной РНК и блокирует репликацию вируса (<https://www.cdc.gov/flu/professionals/antivirals/summary-clinicians.htm>). В России в дополнение к ингибиторам NA широкое распространение получил арбидол.

Поскольку устойчивость к существующим противовирусным препаратам растет, необходи-

мым становится поиск новых ингибиторов, действующих на другие белки и ферменты, присутствующие в ВГ. В связи с этим рассматриваются новые противовирусные стратегии, которые направлены на гемагглютинин [2], РНК-полимеразу [3–5], NA [6, 7], нуклеопротеин [8] и неструктурный белок 1 [9, 10]. Перспективны также средства против гриппа, которые регулируют клеточный метаболизм, а также сигнальные пути и противовирусный ответ хозяина [11]. Однако не рекомендуется применение ингибиторов ионного канала M2, амантадина и римантадина, поскольку ВГ типа А обладает к ним лекарственной устойчивостью, а на ВГ типа В они не действуют [12].

Разработка противовирусных препаратов значительно отстает от срока разработки антибиотиков. Основная причина заключается в том, что вирусы используют большинство метаболических процессов и клеточных структур инфицированной клетки-хозяина для репликации, следовательно, затруднено нацеливание на вирус без вреда организму-хозяину (Drugs.com, Medicinenet.com).

К перспективным источникам получения лекарственных препаратов относятся высшие грибы. Класс высших грибов включает свыше 15 тыс. видов, из которых более 200 видов используют в традиционной медицине Китая, Кореи, Японии и других юго-восточных стран [13].

Лекарственные грибы в основном относят к отделу Basidiomycota, классу Agaricomycetes, порядку Agaricales (Агариковые), Hymenochaetales (Гименохетовые), Phallales (Веселковые) и Polyporales (Полипоровые). В настоящем обзоре будет рассмотрена активность против ВГ 39 видов лекарственных грибов, как растущих в природных условиях, так и культивируемых твердофазным или глубинным способами. Ниже приведены род и вид согласно цитируемым в списке литературы работам: *Agrocybe aegerita* = *Agrocybe cylindracea* (DC.) Gillet (агроцибе (полевка) цилиндрическая); *Auriporia aurea* (Peck) Ryvarden (пория кокосовидная); *Cordyceps militaris* (Linn) Link (кордицепс военный); *Cryptoporus volvatus* (Peck) Shear; *Daedaleopsis confragosa* (Bolton) J. Schröt (дедалеопсис шершавый); *Datronia mollis* (Sommerf.) Donk (датрония мягкая); *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer (зимний опенок); *Fomes fomentarius* (L.) Fr. (трутовик настоящий); *Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bondartsev and Singer (трутовик листовнический); *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst. (трутовик окаймленный); *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (трутовик плоский); *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr) P. Karst. (трутовик лакированный (рейши)); *Ganoderma pfeifferi* Bres. (ганодерма Пфейффера); *Glaziella splendens*; *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray (грифола курчавая); *Inonotus hispidus* (Bull.) P. Karst. (трутовик щетинистоволосый); *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilát (трутовик скошенный, чага); *Ischnoderma benzoinum* (Wahlenb.) P. Karst. (трутовик смолистый); *Kuehneromyces mutabilis* (Schaeff.) Singer and A.H.Sm. (опенок летний); *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill (трутовик серно-желтый); *Laricifomes officinalis* (Batsch) Kotl. and Pouzar (трутовик лекарственный (лиственничная губка)); *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (шиитаке); *Lenzites betulina* (L.) Fr. (ленцитес березовый); *Lyophyllum shimeji* (Kawam.) Hongo (лиофиллум симедзи); *Phallus impudicus* L. (веселка обыкновенная); *Phellinus baumii* Pilát; *Phellinus igniarius* (L.) Qué. (трутовик ложный); *Phellinus linteus* (Berkeley and M. A. Curtis) Teng (PL) (феллинус льняной); *Phellinus robustus* (P. Karst.) Bourdot and Galzin (трутовик ложный дубовый); *Pleurotus eryngii* (DC.) Gillet (вешенка королевская); *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (вешенка устричная (обыкновенная)); *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. (вешенка легочная); *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries (трутовик зонтичный); *Poria cocos* (Schw.) Wolf (пория кокосовидная); *Rozites caperata*

(Pers.: Fr.) P. Karst. (колпак кольчатый); *Schizophyllum commune* Fr. (щелелистник обыкновенный); *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. (траметес горбатый); *Trametes pubescens* (Schumach.) Pilát (траметес опушенный) и *Trametes versicolor* (L.) Lloyd. (траметес разноцветный).

Прямая противовирусная активность экстрактов высших грибов. Был проведен скрининг экстрактов из мицелия высших грибов на подавление ВГ на культуре клеток почки собаки Madin-Darby (MDCK) и лабораторных животных. Водные экстракты из культивируемого мицелия *A. aurea*, *F. velutipes*, *F. fomentarius*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *L. shimeji*, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *S. commune* и *T. versicolor* ингибировали вирус А/Н1N1 в клетках MDCK с различной эффективностью [14].

В ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора (Россия) изучали на клетках MDCK противовирусную активность водных экстрактов культивируемого мицелия 13 видов грибов и обнаружили, что *D. confragosa*, *D. mollis*, *F. officinalis*, *I. benzoinum*, *L. officinalis*, *L. betulina*, *T. gibbosa* и *T. versicolor* оказались перспективными для создания препаратов против ВГ субтипов А/Н5N1 и А/Н3N2 [15–18].

Более детальное изучение действия веселки обыкновенной *Ph. impudicus* по отношению к ВГ субтипа А/Н5N1 показало, что водные экстракты из плодовых тел и культивированного мицелия подавляли репликацию вируса в клетках MDCK на 5.20 ± 1.50 и 4.45 ± 1.60 lg соответственно [19].

Наиболее активными в отношении ВГ птиц были образцы водных экстрактов из плодовых тел трутовика плоского *G. applanatum*, индекс нейтрализации (IN) в отношении субтипа Н5N1 составил 5.00 ± 0.15 lg; трутовика серно-желтого *L. sulphureus* – А/Н5N1 – 5.00 ± 1.67 lg и А/Н3N2 – 6.16 ± 0.14 lg; склероция чаги *I. obliquus* – IN для субтипа Н5N1 составил 4.7 ± 1.2 lg; вешенки легкой *P. pulmonarius* по отношению к Н5N1 – 6.06 ± 0.18 lg и Н3N2 – 5.73 ± 0.14 lg [20–22].

Водные экстракты из высших базидиомицетов *G. applanatum*, *I. obliquus* и *L. sulphureus* оказались малотоксичны для культуры клеток MDCK и лабораторных животных и подавляли размножение пандемического ВГ А/Moscow/226/2009(Н1N1)pdm09 в культуре клеток MDCK сравнимо с эффектом референс-препарата Тамифлю® (2.6 – 3.2 и 2.9 lg соответственно). Через 4 сут после инфицирования мышей ВГ его концентрация в гомогенатах легких у животных, получавших экстракты высших базидиомицетов *I. obliquus* и *L. sulphureus*, была достоверно ниже контроля на 1.83 и 2.00 lg соответственно (суточная доза экстрактов составляла 273.0 и 129.0 мкг/г массы мышцы соответственно). Для мышей, получавших Тамифлю®, снижение содержания вируса по сравнению с контролем

составило 2.16 lg [23]. Экстракт *C. volvatus* подавлял репликацию ВГ типа А субтипов А/Н1N1 и А/Н3N2 *in vivo* и *in vitro* [24]. Противовирусную активность по отношению к ВГ типов А и В проявляли также экстракты плодовых тел и мицелия *I. hispidus* [25–27].

Водный экстракт *Ph. igniarius* был эффективен против ВГ типов А и В, включая пандемический А/Н1N1 2009 года и А/Н3N2 человека, А/Н9N2 птиц, а также вирусы А/Н1N1, устойчивые к осельтамивиру. Вирусологические анализы показали, что этот экстракт может влиять на одно или несколько ранних событий в цикле репликации ВГ, включая прикрепление вируса к клетке-мишени [28].

Введенный перорально водный экстракт культивируемого твердофазным способом мицелия *L. edodes* ингибирует такие этапы входа вируса, как прикрепление и раздевание до репликации и транскрипции вирусного генома у мышей [29].

Ингибиторы нейраминидазы вируса гриппа из лекарственных грибов. Одним из подходов, препятствующих распространению ВГ, является ингибирование вирусной нейраминидазы (NA, сиалидазы, КФ 3.2.1.18). Этот фермент расщепляет α -2 \rightarrow 3-, α -2 \rightarrow 6-, α -2 \rightarrow 8-кетозидные связи концевой сиаловой кислоты с галактозой в олигосахаридах, гликопротеинах, гликолипидах. В результате вновь образованные вирусные частицы не прикрепляются к зараженной ранее клетке, а распространяются по межклеточному пространству к здоровым клеткам. Поэтому вирусные NA являются привлекательными терапевтическими мишенями для предотвращения дальнейшего распространения инфекции гриппа. По сравнению с блокаторами ионных каналов, которые были первыми одобренными противогриппозными препаратами, ингибиторы NA хорошо переносятся и активны как по отношению к ВГ типа А, так и ВГ типа В. Аминокислотные остатки, которые формируют активный центр фермента, высококонсервативны для всех известных субтипов NA [7].

Активность ингибиторов NA обнаружена также у ряда высших грибов. В работе [30] исследовали *in vitro* ингибирующую активность 31 тритерпеноида *G. lucidum* по отношению к NA и показали, что ганодеровые кислоты TR и T-Q эффективно подавляли активность NA у А/Н1N1 и А/Н5N1, взаимодействуя с аминокислотными остатками Arg292 или/и Glu119. Степень и характер ингибирования соединений, выделенных из *G. lingzhi*, *G. splendens*, *Ph. baumii* и *Ph. igniarius*, оценивали в отношении трех NA из следующих субтипов ВГ: рекомбинантного А/Н1N1rv, А/Н3N2 и А/Н5N1 [30–33]. Соединения *G. splendens*, *Ph. baumii* и *Ph. igniarius* неконкурентно ингибировали NA ВГ типа А со

значениями IC₅₀ в диапазоне 0.7–~50.9 мкМ, тогда как ганодеровая кислота T-Q *G. lingzhi* ингибировала NA по смешанному типу, а препарат сравнения занамивир ингибировал NA конкурентно (табл. 1).

Из этанольного экстракта плодовых тел *Ph. baumii* выделены пять полифенолов: гиспидин, гифоломин В, иноскавин А, даваллиалактон (davallialactone) и феллигридин D. Эти соединения неконкурентно ингибировали активность NA А/Н1N1, А/Н5N1 и А/Н3N2, а также снижали уровень индуцированного вирусом цитопатического действия в клетках MDCK [31] (табл. 1).

В работе [33] показано, что плодовые тела *G. splendens* содержат производные азафилона, обладающие ингибирующей NA активностью (табл. 1). Одно из соединений оказалось новым производным азафилона, остальные четыре идентифицированы как энтоннамин А, комазафилон D, рубигинозин А и энтоннамин В. Соединения показали значительную ингибирующую активность в отношении NA трех субтипов ВГ со значениями IC₅₀ 30.9, 41.8 и 35.7 мкМ для комазафилона D и 46.5, 50.4 и 29.9 мкМ для рубигинозина А соответственно. [33]. Сесквитерпеноид из *Ph. igniarius* также ингибировал активность NA ВГ (табл. 1) [34].

Эффективными считают ингибирующие NA ВГ соединения лекарственных грибов с IC₅₀ ниже 100 мкМ (табл. 1).

Ингибирование РНК-полимеразы ВГ. Известно, что РНК-полимераза ВГ является гетеротримером, состоящим из субъединиц: PA, PB1 и PB2, и отвечает за репликацию и транскрипцию восьми сегментов вирусного РНК-генома в ядре инфицированной клетки. Чтобы синтезировать вирусные мРНК, она связывается с кэпом хозяйской мРНК и отщепляет его вместе с 5'-участком, причем эндонуклеазный сайт находится в PA-субъединице. PA-эндонуклеазу рассматривают как перспективную мишень для противогриппозных препаратов [3–5].

В эпидемическом сезоне 2018–2019 гг. в США применяли пероральный препарат балоксавир (Xofluza®), ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы, который препятствует транскрипции вирусной РНК и блокирует репликацию ВГ типов А и В (<https://www.cdc.gov/flu/professionals/antivirals/summary-clinicians.htm>). Действие балоксавира направлено на эндонуклеазную активность субъединицы PA РНК-полимеразы ВГ. Этот препарат был недавно лицензирован в Японии и США для лечения ВГ типов А и В [5]. В настоящее время проводятся исследования еще ряда препаратов, ингибирующих РНК-полимеразу ВГ [3–5].

Таблица 1. Ингибирующее действие соединений из плодовых тел базидиомицетов *G. lingzhi*, *G. splendens*, *Ph. baumii* и *Ph. igniarius* на нейраминидазы трех субтипов вируса гриппа А [30–33]

Соединения	IC ₅₀ (мкМ)*			Тип ингибирования, вирус гриппа (K _j , мкМ)	Ссылки
	H1N1	H3N2	H5N1		
Комазафилон D <i>G. splendens</i>	41.8 ± 0.6	30.9 ± 0.1	35.7 ± 0.2	Неконкурентный, H3N2 (35.3)	[33]
Рубигинозин А <i>G. splendens</i>	50.4 ± 1.1	46.5 ± 2.5	29.9 ± 0.6	Неконкурентный, H3N2 (42.0)	[33]
Феллигридин Е <i>Ph. igniarius</i>	8.1 ± 0.1	6.6 ± 0.4	1.0 ± 0.3	Неконкурентный, H1N1 (7.1)	[32]
Феллигридин G <i>Ph. igniarius</i>	8.0 ± 1.0	5.2 ± 0.6	0.7 ± 0.1	Неконкурентный, H1N1 (6.9)	[32]
Гиспидин <i>Ph. baumii</i>	50.9	45.2	16.9	Неконкурентный, H1N1 (43.0)	[31]
Гифоломин В <i>Ph. baumii</i>	22.9	14.6	12.3	Неконкурентный, H1N1 (20.9)	[31]
Иноскавин А <i>Ph. baumii</i>	20.0	18.5	18.5	Неконкурентный, H1N1 (24.5)	[31]
Даваллиалактон <i>Ph. baumii</i>	14.2	21.1	21.8	Неконкурентный, H1N1 (27.6)	[31]
Феллигридин D <i>Ph. baumii</i>	8.8	10.3	10.9	Неконкурентный, H1N1 (15.9)	[31]
Ганодеровая кислота Т-Q <i>G. lingzhi</i>	5.6 ± 1.9	Н.д.	1.2 ± 1.0	Смешанный, H5N1	[30]
Ганодеровая кислота TR <i>G. lingzhi</i>	4.6 ± 1.7	Н.д.	10.9 ± 6.4	Н.д.	[30]
Занамивир (препарат сравнения, Relenza®, нМ)	9.2 ± 0.1	12.2 ± 0.2	2.9 ± 0.1	Конкурентный, H3N2	[33]

* Результаты трех экспериментов; Н.д. – нет данных, IC₅₀ – концентрация, ингибирующая на 50%.

Таблица 2. Действие криптопоровой кислоты Е против различных штаммов вируса гриппа А [35]

Штамм вируса	IC ₅₀ , мкМ*	Индекс селективности (SI)**
A/WSN/33(H1N1)	8.40	26.0
A/PR8/34 (H1N1)	1.99	109.8
A/Beijing/CAS0001/2007(H3N2)	2.74	79.7
A/H1N1/pdm09	3.27	66.8

* IC₅₀ – 50%-ная ингибирующая концентрация.

** Индекс селективности (SI = CC₅₀/IC₅₀), где CC₅₀ – 50%-ная цитотоксическая концентрация.

Ранее было показано, что экстракт *C. volvatus* может эффективно ингибировать репликацию ВГ *in vitro* и *in vivo* [24]. Идентифицирован основной эффективный компонент *C. volvatus* против ВГ – криптопоровая кислота Е. Она обладает широким спектром противогриппозной активности против пандемического штамма 2009 г. А/Beijing/07/2009 (H1N1/09pdm), сезонного штамма А/Beijing/CAS0001/2007 (H3N2), а также адаптированных к мышам штаммов А/WSN/33 (H1N1) и А/PR8/34 (H1N1) (табл. 2). Анализ показал, что криптопоровая кислота Е действует в основном на средней стадии жизненного цикла ВГ, подавляя активность РНК-полимеразы ВГ и блокируя репликацию и транскрипцию вирусной РНК в клетках MDCK. Криптопоровая кислота Е также

нарушала инфекционность ВГ, напрямую воздействуя на частицы вируса. Эти данные свидетельствуют о том, что криптопоровая кислота *E. volvatus* [35].

Биологически активные соединения лекарственных грибов, ингибирующие вирус гриппа. Известны и другие соединения лекарственных грибов, оказывающие прямое ингибирующее действие на ВГ. Из водного экстракта гриба *R. caperata* было выделено вещество белковой природы с молекулярной массой 28 кДа, препятствующее процессу репликации ВГ типа А [36].

Изопреноидные вещества, хиспидин и хисполон, найденные в этанольном экстракте гриба *I. hispidus*, проявляли противовирусную активность по отношению к ВГ типов А и В [27]. Было показано, что несколько соединений, таких как аппланоксидовая кислота G, ганодермадиол, люциальдегид В, люцидадиол и эргоста-7, 22-диен-3 β -ол из *G. pfeifferi* обладают противовирусной активностью в отношении ВГ [37–40].

Самый широкий спектр противовирусной активности по отношению не только к ВГ, но и другим патогенным вирусам проявляли образцы из чаги *I. obliquus* (водные экстракты, меланин). Они подавляли в клеточных культурах все исследуемые в работе вирусы: вирус Западного Нила, вирус иммунодефицита человека 1 типа, вирус простого герпеса 2 типа, вирус натуральной оспы, вирус осповакцины [41–44]. Это можно объяснить сложным составом гриба, основным компонентом которого является хромоген-полифенолоксикарбонный комплекс. Окраску полифенолам придают меланины, отнесенные к алломеланинам [45, 46]. Возможно, активность против ВГ также связана с обнаруженными в склероции и мицелии *I. obliquus* терпеноидами, стеролами и новым сесквитерпеном [47–49].

В настоящее время проводятся активные исследования меланинов грибов, в том числе высших базидиомицетов. В качестве продуцентов меланинов в работах описываются такие трутовики, как *F. pinicola*, *F. fomentarius*, *G. applanatum*, *I. hispidus*, *I. obliquus*, *Ph. igniarius*, *Ph. robustus* [50, 51].

Применение щадящих условий выделения позволило получить водорастворимые меланины, которые являются мощными природными антиоксидантами, способными нейтрализовать различные свободные радикалы и снижать уровень повреждений ДНК, возникающих под действием химических и радиационных факторов [51]. Водный раствор меланина, полученного из склероция чаги *I. obliquus*, в концентрациях от 0.02 до 0.25 мг/мл обладал противовирусной активностью по отношению к ВГ типа А [44].

Оптимизация получения меланина на основе эффективного штамма чаги *I. obliquus* F-1244 позволила разработать лабораторный регламент производства субстанции, названной “меланин чаги”, которая при низкой токсичности проявляет противовирусный эффект по отношению к ВГ типа А (штамм А/California/07/09 (H1N1pdm09), IC₅₀ = 9.8 мкг/мл, IS = 32). Как показали дальнейшие исследования в ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, подбор штаммов и условий их культивирования позволяет повысить эффективность меланинов, выделенных из культуральной жидкости и биомассы *I. obliquus*, по отношению к штамму гриппа А/California/07/09(H1N1 pdm09) до IS = 160.

В табл. 3 приведены соединения из высших грибов, которые также обладают прямой противовирусной активностью по отношению к ВГ.

Стимуляция иммунитета против гриппа препаратами высших базидиомицетов. Выявлена стимуляция врожденного иммунитета против ВГ полисахаридами, полисахаропептидами и тритерпеноидами высших базидиомицетов. Так, полисахариды *F. velutipes* [53] и *G. lucidum* [54] индуцируют синтез интерферонов в культуре лейкоцитов крови человека. Пептидоманнан *L. edodes* KS-2, введенный внутривенно и перорально, повышал уровень интерферона у мышей и также ингибировал ВГ субтипа А/Н2N2 [55].

Добавление активного соединения, связанного с гексозой (α -гликанов из *L. edodes*, active hexose correlated compound, АНСС), повышало врожденный иммунный ответ на инфекцию ВГ типа А (А/PR/8/34 H1N1) у мышей C57BL/6, увеличивало активность клеток НК (естественных киллеров), улучшало выживаемость и снижало тяжесть протекания инфекции гриппа у молодых мышей [56].

Ганодеровая кислота Me, выделенная из мицелия *G. lucidum*, при введении мышам достоверно увеличивала активность клеток НК и повышала экспрессию интерлейкина-2 и интерферона- γ [57].

При пероральном введении мышам экстракта мицелия *L. edodes* (LEM), культивируемого твердофазным способом, быстро активировалась экспрессия гена IFN- β [29], что указывало на способность препарата защищать мышей от заражения ВГ не только прямым воздействием на вирусную инфекцию, но также с помощью стимуляции врожденного иммунного ответа.

Кислый полисахарид из *C. militaryaris*, состоящий из D-галактозы, L-арабинозы, D-ксилозы, L-рамнозы и D-галактуроновой кислоты, при интраназальном введении снижал титры вируса в жидкости бронхоальвеолярного лаважа и легких мышей, инфицированных ВГ типа А, и увеличи-

Таблица 3. Соединения высших базидиомицетов с прямой противовирусной активностью по отношению к вирусу гриппа

Вид высших базидиомицетов	Соединения	Вирус гриппа	IC ₅₀ или мишень противовирусной активности*	Ссылки
<i>G. pfeifferi</i>	Аппланоксидовая кислота G	Типа А (клетки MDCK)	100.3 мкг/мл	[38, 39]
<i>G. pfeifferi</i>	Люциальдегид В	Типа А (клетки MDCK)	3.0 мкг/мл	[38]
<i>G. pfeifferi</i>	Люцидадиол	Типа А (клетки MDCK)	100.3 мкг/мл	[38, 39]
<i>G. pfeifferi</i>	Эргоста-7, 22-диен-3β-ол	Типа А (клетки MDCK)	0.78 мкг/мл	[38]
<i>I. hispidus</i>	Гисполон	Типов А и В	20 мкг/мл	[26]
<i>I. hispidus</i>	Гиспидин	Типов А и В	40 мкг/мл	[26]
<i>I. obliquus</i>	Водный раствор меланина	Типа А птиц (клетки MDCK)	0.02 мг/мл – 0.25 мг/мл	[44]
<i>I. obliquus</i>	Полисахариды	Кошачьих H3N2 и H5N6	Связывание вируса/ абсорбция	[66]
<i>Ph. igniarius</i>	Сесквитерпеноид	ВГ	NA, 0.14 ± 0.04 мкМ	[34]
<i>R. caperata</i>	Белок RC-28	Типа А	Репликация	[36]
Препарат сравнения	Амантадина сульфат	Типа А (клетки MDCK)	15.0 мкг/мл	[38]

* IC₅₀ – концентрация, ингибирующая ВГ на 50%.

вал выживаемость. Кроме того, он модулировал иммунную функцию макрофагов, повышая уровень TNF-альфа и IFN-гамма, IL-1-бета, IL-6, IL-10 у мышей по сравнению с таковыми у необработанных мышей [58].

В качестве адъювантов для вакцины против А/Н5N1 использовали экстракт *Ph. linteus* [59] и полисахарид *P. cocos* (PCP-II) [60]. Лектин *A. aege-rita*, использованный в качестве адъюванта для вакцинации против гриппа А/Н9N2, повышал уровень IgG по сравнению с вакциной без адъюванта [61].

Рандомизированное контролируемое исследование 30 здоровых взрослых показало, что добавление АНСС из *L. edodes* после иммунизации достоверно улучшало титры защитных антител против гриппа В [62]. Кроме того, оно улучшало ответ на инфекцию ВГ типа А (H1N1, PR8) у мышей C57BL/6 [61] и улучшало выживание птиц и инфицированных ВГ (А/Н5N1) мышей BALB/c [63, 64].

Иммуномодулирующие эффекты β-глюканов также оказались полезны для профилактики гриппа. Двухнедельное кормление мышей, инфицированных ВГ, смесью глюканов из плодовых тел *G. frondosa* и мицелия из *L. edodes*, *A. brasiliensis* и

I. obliquus значительно уменьшило симптомы инфекции [65].

Возможные механизмы противовирусного действия соединений из грибов. Предполагают, что механизм противовирусной активности полисахаридов и других соединений грибов может быть связан с предотвращением адсорбции вируса на клетках, блокированием вирусных ферментов, повышением клеточного иммунитета [66, 67], а также стимуляцией врожденного иммунитета. Стимуляция клеточного иммунитета полисахаридами грибов может быть связана также с их действием в качестве пребиотиков на молочнокислые бактерии кишечника и последующим иммуномодулирующим действием молочнокислых бактерий микрофлоры [68, 69]. Стимуляцию иммунитета против гриппа экстрактами базидиомицетов связывают также с высоким содержанием в них микроэлементов [70].

В отчете Военной академии (Point Institute, USA, 2013) приводятся данные о проявлении прямого действия некоторых активных компонентов грибов на патогенные вирусы. Тритерпены гриба трутовика лакированного *G. lucidum* действуют в качестве противовирусных агентов против ВГ типа А. Экстракт из мицелия *K. mutabilis* [71] и фе-

нольные соединения из *I. hispidus* продемонстрировали противовирусную активность в отношении ВГ типов А и В.

Показано, что среди биологически активных соединений ряда лекарственных грибов присутствуют ингибиторы ферментов ВГ, нейраминидазы (сиалидазы) и РНК-полимеразы (табл. 1, 2).

Препараты из грибов. Многие высшие грибы содержат в своих плодовых телах, культивируемом мицелии и культуральной жидкости биологически активные вещества, которые могут проявлять противовирусные и иммуномодулирующие свойства [13, 72]. Различные соединения, извлеченные из высших грибов, включают лектины [73], полисахариды [74], полисахаропептиды [75], терпены, ферменты и молекулы других соединений [25, 49], которые обладают широкой иммуномодулирующей и противовирусной активностью, однако их действие против ВГ исследовано лишь частично [76].

Полисахариды были первыми лекарственными препаратами, полученными из грибов. Наиболее известны из них лентинан из шиитаке *L. edodes* [77, 78], полисахаридпептид и крестин из трюфеля разноцветного *T. versicolor*, ганодеран из трутовика лакированного (рейши) *G. lucidum*, плевран из вешенки устричной (обыкновенной) *P. ostreatus* и грифолан из грифолы курчавой *G. frondosa* [79, 80]. При этом часть из них обладает иммуномодулирующими свойствами [13], полезными при лечении опухолей и некоторых вирусных болезней.

Администрацией по контролю пищевых продуктов и медикаментов Китая (the China Food and Drug Administration (CFDA)) были одобрены препараты полисахаридов высших грибов в виде инъекций, а также капсул полисахарида из трутовика зонтичного *P. umbellatus*, перорального раствора полисахарида *P. cocos*, таблеток полисахарида *Ganoderma*, капсул полисахарида *Coriolus versicolor* (= *T. versicolor*) и инъекций лентинана, которые применяют для лечения хронического гепатита и в качестве адъювантных лекарств, средств регуляции иммунной системы для повышения эффективности и уменьшения побочного действия химиотерапевтических препаратов [67].

Важно оценить активность этих высокомолекулярных препаратов, а также биополимеров новых культивируемых штаммов лекарственных грибов на наличие противовирусных компонентов и повышение иммунитета против ВГ. Низкомолекулярные биологически активные вещества часто преобладают в экстрактах, полученных с помощью органических растворителей, как например терпе-

ны *I. obliquus*, химический состав которых приведен в обзоре Никитиной с соавт. [49].

Среди зарегистрированных в России, Белоруссии и Украине препаратов в отношении ряда вирусных болезней исследованы “Иммуномакс” (ООО “Иммафарма”, Россия), “Микотон” (ООО “Микотон-Агликон”, Украина). Однако не изучена их активность против гриппа, которой обладают таблетки из порошка ганодермы, вешенки, чаги, майтаке, листовичной губки, шиитаке, хитозана полифракционного “Чагален” [81–83].

Анализ результатов научных исследований показал, что высшие грибы содержат в плодовых телах и мицелии такие биологически активные вещества, как полисахариды, гликопротеины, терпены, стеролы, пигменты и др., которые могут проявлять, наряду с антибактериальными, противоопухолевыми и противопаразитарными, противовирусными и иммуномодулирующими свойствами.

На основании литературных данных и результатов собственных исследований установлено, что при низкой токсичности водные экстракты из биомассы штаммов высших базидиальных грибов, содержащие полисахариды, белки, меланины и низкомолекулярные биологически активные вещества, оказывают противовирусное действие, в том числе и по отношению к ВГ разных типов/субтипов.

Однако противовирусная активность лекарственных грибов и выделенных из них биологически активных веществ по отношению к вирусу гриппа изучена недостаточно. Наряду с перспективными биологически активными биополимерами, обладающими противовирусной активностью (меланины, белки, полисахариды и пептидогликаны), заслуживают внимания также низкомолекулярные биологически активные вещества из лекарственных грибов. Кроме того, важно привлечь внимание исследователей к поиску ингибиторов нейраминидазы и РНК-полимеразы вирусов гриппа в более широком круге лекарственных грибов.

Необходимы дальнейшие исследования механизмов противовирусного действия компонентов лекарственных грибов, как растущих в природных условиях, так и культивируемых твердофазным и глубинным способами в лабораторных и заводских условиях, что позволит в дальнейшем создать эффективные лекарственные препараты на их основе.

Исследование было выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *De Clercq E., Li G.* // Clin. Microbiol. Rev. 2016. V. 29. № 3. P. 695–747.
2. *Zhu L., Li Y., Li S., Li H., Qiu Z., Lee C., Lu H., Lin X., Zhao R., Chen L., Wu J.Z., Tang G., Yang W.* // PloS One. 2011. V. 6. № 12: e29120.
3. *Stevaert A., Naesens L.* // Med. Res. Rev. 2016. V. 36. № 6. P. 1127–1173.
4. *Furuta Y., Gowen B.B., Takahashi K., Shiraki K., Smee D.F., Barnard D.L.* // Antiviral Res. 2013. V. 100. № 2. P. 446–454.
5. *Mifsud E.J., Hayden F.G., Hurt A.C.* // Antiviral Res. 2019. V. 169. Article № 104545. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104545>
6. *Haque M.S.K., Elzagheid M.* // Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 2019. V. 11. № 5. P. 1–10.
7. *Glanz V.Y., Myasodova V.A., Grechko A.V., Orekhov A.N.* // Drug Des. Devel. Ther. 2018. V. 12. № 12. P. 3431–3437. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S176220>
8. *Lejal N., Tarus B., Bouguyon E., Chenavas S., Bertho N., Delmas B., Ruigrok R.W., Di Primo C., Slama-Schwok A.* // Antimicrob. Agents Chemother. 2013. V. 57. № 5. P. 2231–2242.
9. *Basu D., Walkiewicz M.P., Frieman M., Baric R.S., Auble D.T., Engel D.A.* // J. Virol. 2009. V. 83. № 4. P. 1881–1891.
10. *Amarelle L., Lecuona E., Sznajder J.I.* // Arch. Bronco-neumol. 2017. V. 53. № 1. P. 19–26.
11. *Loregian A., Mercorelli B., Nannetti G., Compagnin C., Palù G.* // Cell Mol. Life Sci. 2014. V. 71. № 19. P. 3659–3683.
12. *Pielak R.M., Schnell J.R., Chou J.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 18. P. 7379–7384.
13. *Wasser S.P.* // Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications, First Ed. / Eds. D.C. Zied, A. Pardo-Gimenez. West Sussex: The Atrium, 2017. P. 503–540.
14. *Krupodorova T., Rybalko S., Barshteyn V.* // Virol. Sin. 2014. V. 29. № 5. P. 284–290.
15. *Teplyakova T.V., Psurtseva N.V., Kosogova T.A., Mазуркова N.A., Khanin V.A., Vlasenko V.A.* // Int. J. Med. Mushrooms. 2012. V. 14. № 1. P. 37–45.
16. *Теплякова Т.В., Косогова Т.А., Ананько Г.Г., Бардашева А.В., Ильичева Т.Н.* // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. Материалы IX Межд. научно-практич. конф. Барнаул: РПИК Артика, 2010. С. 245–246.
17. Патент РФ. 2018. № 2475531.
18. Патент РФ. 2018. № 2663111.
19. Патент РФ. 2012. № 2475529.
20. *Кабанов А.С., Шишкина Л.Н., Теплякова Т.В., Пучкова Л.И., Косогова Т.А., Мазуркова Н.А., Скарнович М.О., Сергеев А.Н.* // Иммунопатол., аллергол., инфектол. 2009. № 2. С. 185–186.
21. *Кабанов А.С., Косогова Т.А., Шишкина Л.Н., Теплякова Т.В., Скарнович М.О., Мазуркова Н.А., Пучкова Л.И., Малкова Е.М., Ставский Е.А., Дроздов И.Г.* // Журн. микробиол. 2011. № 1. С. 40–43.
22. *Теплякова Т.В., Косогова Т.А., Ананько Г.Г., Ильичева Т.Н.* // Современная микология в России. / Ред. Ю.Т. Дьяков, Ю.В. Сергеев. Материалы IV Съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии, 2017. Т. 7. С. 425–427.
23. *Филиппова Е.И., Кабанов А.С., Скарнович М.О., Мазурков О.Ю., Теплякова Т.В., Трошкова Г.П. и др.* // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 5. <http://www.science-education.ru/111-10250>
24. *Gao L., Sun Y., Si J., Liu J., Sun G., Sun X., Cao L.* // PloS One. 2014. V. 9. № 12. Article № e113604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113604>
25. *Lindequist U., Niedermeyer T.H.J., Julich W.D.* // Evid. Based Complement Alternat. Med. 2005. V. 2. № 3. P. 285–299.
26. *Awadh Ali N.A., Mothana R.A.A., Lesnau A., Pilgrim H., Lindequist U.* // Fitoterapia. 2003. V. 74. № 5. P. 483–485.
27. *Ali N.A.A., Jansen R., Pilgrim H., Liberra K., Lindequist U.* // Phytochemistry. 1996. V. 41. № 3. P. 927–929.
28. *Lee S., Kim J.L., Heo J., Lee I., Park S., Hwang M.W., Bae J.Y.* // J. Microbiol. 2013. V. 51. № 5. P. 676–681.
29. *Kuroki T., Lee S.J., Hirohama M., Taku T., Kumakura M., Haruyama T., Nagata K., Kawaguchi A.* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. № 5. Article № 1164. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01164>
30. *Zhu Q., Bang T. H., Ohnuki K., Sawai T., Sawai K., Shimizu K.* // Sci. Rep. 2015. V. 5. № 8. Article № 13194. <https://doi.org/10.1038/srep13194>
31. *Hwang B.S., Lee I.K., Choi H.J., Yun B.S.* // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2015. V. 25. № 16. P. 3256–3260.
32. *Kim J.Y., Kim D.W., Hwang B.S., Woo E.E., Lee Y.J., Jeong K.W., Lee I.K., Yun B.S.* // Mycobiology. 2016. V. 44. № 2. P. 117–120.
33. *Kim J.-Y., Woo E.-E., Ha L.S., Ki D.-W., Lee I.-K., Yun B.-S.* // Mycobiology. 2019. V. 47. № 2. P. 256–260.
34. *Song A.R., Le S.X., Kong C., Zhao C., Qin D., Huang F., Yang S.* // Arch. Virol. 2014. V. 159. № 4. P. 753–760.
35. *Gao L., Han J., Si J., Wang J., Wang H., Sun Y., Bi Y., Liu J., Cao L.* // Antiviral Res. 2017. V. 143. № 7. P. 106–112.
36. *Pirano F.F.* // Int. J. Med. Mushrooms. 2005. V. 7. № 3. P. 354–355.
37. *Zjawiony J.K.* // J. Nat. Prod. 2004. V. 67. № 2. P. 300–310.
38. *Lindequist U., Julich W.D., Witt S.* // Phytochemistry. 2015. V. 114. № 6. P. 102–108.
39. *Mothana R.A.A., Awadh Ali N.A., Jansen R., Wegner U., Mentel R., Lindequist U.* // Fitoterapia. 2003. V. 74. № 1–2. P. 177–180.
40. *Niedermeyer T.H., Lindequist U., Mentel R., Gördes D., Schmidt E., Thurow K., Lalk M.* // J. Nat. Prod. 2005. V. 68. № 12. P. 1728–1731.
41. *Теплякова Т.В., Косогова Т.А.* Высшие грибы Западной Сибири – перспективные объекты для биотех-

- нологии лекарственных препаратов. Новосибирск: СибНСХБ Россельхозакадемии, 2014. 298 с.
42. *Теплякова Т.В., Косогова Т.А., Андреева И.С., Соловьянова Н.А.* // Успехи медицинской микологии. 2019. Т. 20. С. 535–540.
 43. *Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А., Ибрагимова Ж.Б., Юрганова И.А., Кабанов А.С., Пучкова Л.И., Бормотов Н.И., Бардашева А.В.* // Проблемы особо опасных инфекций. 2012. № 3(113). С. 99–101.
 44. Патент РФ. 2013. № 2480227.
 45. *Шиврина А.Н.* Продукты биосинтеза высших грибов и их использование. М.–Л.: Наука, Ленинградское отделение, 1966. С. 49–56.
 46. *Рыжова Г.Л., Кравцова С.С., Матасова С.А., Грибель Н.В., Пашинский В.Г., Дычко К.А.* // Хим.-фарм. журн. 1997. № 10. С. 44–47.
 47. *Кукулянская Т.А., Курченко Н.В., Курченко В.П., Бабицкая В.Г.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 1. С. 68–72.
 48. *Шашкина Н.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В.* // Хим.-фарм. журн. 2006. Т. 40. № 10. С. 37–44.
 49. *Никитина С.А., Хабибрахманова В.Р., Сыроева М.А.* // Биомедицинская химия. 2016. Т. 62. № 4. С. 369–375.
 50. *Сушинская Н.В., Курченко В.П., Горовой Л.Ф., Сеньюк О.Ф.* // Успехи медицинской микологии. 2005. Т. 6. С. 255–259.
 51. *Hou R., Liu X., Xiang K., Chen L., Wu X., Lin W., Zheng M., Fu J.* // Food Chem. 2019. V. 277. P. 533–542.
 52. *Кукулянская Т.А., Курченко В.П., Гавриленко Н.В., Курченко Н.В., Новиков Д.А., Сеньюк О.Ф., Горовой Л.Ф.* // Успехи медицинской микологии. 2004. Т. 3. С. 153–155.
 53. Патент РФ. 2012. № 2522880.
 54. *Краснопольская Л.М., Автономова А.В., Щегловитова О.Н., Гушин П.А.* // Башкирский хим. журн. 2012. Т. 19. № 4. С. 83–88.
 55. *Suzuki F., Suzuki C., Shimotura E., Maeda H., Fujii T., Ishida N.* // J. Antibiot. 1979. V. 32. № 12. P. 1336–1345.
 56. *Ritz B.W., Nogusa S., Ackerman E.A., Gardner E.M.* // J. Nutr. 2006. V. 136. № 11. P. 2868–2873.
 57. *Wang G., Zhao J., Liu J., Huang Y., Zhong J.J., Tang W.* // Int. immunopharmacol. 2007. V. 7. № 6. P. 864–870.
 58. *Ohta Y., Lee J.B., Hayashi K., Fujita A., Park D.K., Hayashi T.* // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. № 25. P. 10194–10199.
 59. *Ichinohe T., Aina A., Nakamura T., Akiyama Y., Maeyama J., Odagiri T., Tashiro M., Takahashi H., Sawa H., Tamura S., Chiba J., Kurata T., Sata T., Hasegawa H.* // J. Med. Virol. 2010. V. 82. № 1. P. 128–137.
 60. *Wu Y., Li S., Li H., Zhao C., Ma H., Zhao X., Wu J., Liu K., Shan J., Wang Y.* // Int. J. Biol. Macromol. 2016. V. 91. P. 248–257.
 61. *Ma L.-B., Xu B.-Y., Huang M., Sun L.H., Yang Q., Chen Y.J., Yin Y.L., He Q.G., Sun H.* // J. Zhejiang Univ. Sci. B. 2017. V. 18. № 8. P. 653–661.
 62. *Roman B.E., Beli E., Duriancik D.M., Gardner E.M.* // Nutr. Res. 2013. V. 33. № 1. P. 12–17.
 63. *Nogusa S., Gerbino J., Ritz B.W.* // Nutr. Res. 2009. V. 29. № 2. P. 139–143.
 64. *Shin M.S., Park H.J., Maeda T., Nishioka H., Fujii H., Kang I.* // J. Immunol. Res. 2019. V. 2019. Article № 3758576. <https://doi.org/10.1155/2019/3758576>
 65. *Vetvicka V., Vetvickova J.* // Ann. Transl. Med. 2015. V. 3. Article № 2. 7 p. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25738142>
 66. *Tian J., Hu X., Liu D., Wu H., Qu L.* // Int. J. Biol. Macromol. 2017. V. 95. № 2. P. 160–167.
 67. *He X., Fang J., Guo Q., Wang M., Li Y., Meng Y., Huang L.* // Carbohydr. Polym. 2020. V. 229. Article № 115548. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115548>
 68. *Nowak R., Nowacka-Jechalke N., Juda M., Malm A.* // Eur. J. Nutr. 2018. V. 57. № 4. P. 1511–1521.
 69. *Bajpai V.K., Majumder R., Rather I.A. Nam G.-J., Park Y.-H.* // Natl. Acad. Sci. Lett. 2018. V. 41. № 5. P. 301–305.
 70. *Wang L., Hou Y.* // Biol. Trace Elem. Res. 2011. V. 143. № 3. P. 1799–1807.
 71. *Mentel R., Meinsen D., Pilgrim H., Herrmann B., Lindquist U.* // Pharmazie. 1994. V. 49. № 11. P. 859–860.
 72. *Vaccер С.П.* // Биосфера. 2015. Т. 7. № 2. С. 238–248.
 73. *Hassan M.A.A., Rouf R., Tiralongo E., May T.W., Tiralongo J.* // Int. J. Mol. Sci. 2015. V. 16. № 4. P. 7802–7838.
 74. *Friedman M.* // Foods. 2016. V. 5. № 4. Article № E80. <https://doi.org/10.3390/foods5040080>
 75. *Ng T.B.* // Gen. Pharmacol. 1998. V. 12. № 1. P. 473–476.
 76. *Pradeep P., Manju V., Feraz Ahsan M.* // Medicinal Mushrooms / Eds. D. C. Agrawal, M. Dhanasekaran. Singapore: Shpringer, 2019. P. 275–298.
 77. *Bisen P.S., Baghel R.K., Sanodiya B.S., Thakur G.S., Prasad G.B.* // Curr. Med. Chem. 2010. V. 17. № 22. P. 2419–2430.
 78. *Rincão V.P., Yamamoto K.A., Ricardo N.M., Soares S.A., Meirelles L.D., Nozawa C., Carvalho Linhares R.E.* // Virol. J. 2012. V. 15. Article № 9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-37>
 79. *Wasser S.P.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 60. № 3. P. 258–274.
 80. *Автономова А.В., Ярина М.С., Краснопольская Л.М.* // Вестник РАЕН. 2014. Т. 14. № 6. С. 102–108.
 81. *Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В.* Чага, Чаговит, Чагалюкс в лечебной и профилактической практике. М.: Эдас, 2009. 64 с.
 82. *Корсун В.Ф., Корсун Е.В., Бореко Е.И., Краснопольская Л.М., Савинова О.В.* // Успехи медицинской микологии. 2016. Т. 16. С. 267–271.
 83. *Кузнецова О.Ю.* // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1(14). С. 128–141.

Future Developing Medicines Against Influenza on the Basis of Medicinal Mushrooms (Review)

T. V. Teplyakova^{a, *}, T. N. Plyicheva^{a, b}, and N. A. Markovich^{a, **}

^a*Federal Budgetary Research Institution "State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia*

^b*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: teplyakova@vector.nsc.ru*

***e-mail: namark@yandex.ru*

We have reviewed Russian and international publications over the past years on the antiviral activity of mushrooms in cell culture, on the course of influenza in animals, the sialidase and RNA polymerase inhibition of influenza viruses. In particular, we have considered activity of extracts of higher fungi, polysaccharides, glycoproteins, proteins, melanin, polyphenols and triterpenoids against influenza. We have noted the need for further research into the mechanisms of action of components of mushrooms, both growing in natural conditions and cultivated by solid-phase or submerged methods in laboratory and factory conditions for the subsequent creation of drugs based on them.

Keywords: medicinal mushrooms, *Basidiomycota*, influenza viruses, neuraminidase, sialidase, RNA polymerase, inhibition, polysaccharides, melanin, terpenoids, polyphenols, cultivation

УДК 579.61,604.6:615.371

ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЕЗА: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ (ОБЗОР)

© 2020 г. Н. И. Надолинская¹ *, Д. С. Карпов², А. В. Гончаренко¹

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

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия
*e-mail: nioriss@gmail.com

Поступила в редакцию 16.03.2020 г.

После доработки 13.04.2020 г.

Принята к публикации 22.04.2020 г.

Несмотря на усилия мирового медицинского и научного сообщества, туберкулез остается основной причиной смерти от инфекционных заболеваний. Ожидания положительного эффекта от применения разработанных новых противотуберкулезных препаратов не оправдались, и внимание исследователей в значительной степени обращено на создание новых микобактериальных штаммов для вакцинопрофилактики туберкулеза. Предлагаемый обзор содержит современную информацию о существующих вакцинных штаммах и разработке новых генно-инженерных штаммов для профилактики туберкулеза, а также для профилактики и лечения других заболеваний. В обзор включена актуальная информация о корреляции между вакцинацией БЦЖ и частотой и тяжестью протекания COVID-19.

Ключевые слова: туберкулез, БЦЖ, вакцина, рекомбинантная вакцина

DOI: 10.31857/S0555109920050128

Туберкулез – инфекционное заболевание, вызываемое *Mycobacterium tuberculosis* (МТБ), остается основной причиной смерти от инфекционных заболеваний во многих странах [1]. На сегодняшний день лечение туберкулеза представляет собой комбинированную антибиотикотерапию в течение 6–9 мес., вызывающую значительные побочные эффекты. В настоящее время стратегия Всемирной организации здравоохранения по борьбе с туберкулезом направлена на усиление профилактики заболевания [2] и по всему миру ведется активная работа по разработке улучшенных противотуберкулезных вакцин, некоторые из которых вступили в стадию клинических исследований.

Бацилла Кальмета–Герена (БЦЖ), *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) на сегодняшний день остается единственной вакциной против туберкулеза, успешно защищает от туберкулеза (ТБ) детей, но обеспечивает только частичную защиту от респираторных форм ТБ подростков и взрослых. Альберт Кальмет и Камиль Герен получили БЦЖ от возбудителя туберкулеза крупного рогатого скота *Mycobacterium bovis* путем непрерывного пассирования в течение нескольких лет, что привело к ослаблению штамма. БЦЖ применяется для вакцинации с 1921 г. и приводит также к уменьшению общей детской смертности за счет неспеци-

фического иммуномодулирующего действия микобактериальной вакцинации. Хотя БЦЖ внесла значительный вклад в профилактику ТБ [3], потеря нескольких доминирующих антигенов и ключевых молекулярных признаков патогенных микобактерий может объяснить ее ограничение в профилактике туберкулеза взрослого населения. Предлагаемый обзор содержит современные данные о существующих штаммах БЦЖ, о разработке генетически модифицированных вакцинных штаммов, возможно, способных заменить БЦЖ, оптимальном пути доставки вакцины в организм, а также в нем обсуждаются возможности использования БЦЖ для борьбы с другими заболеваниями.

Штаммы БЦЖ и их генеалогия. Основное отличие БЦЖ от исходного штамма *M. bovis* – отсутствие нескольких сегментов генома, в частности, так называемого региона различия (region of difference 1, RD1) [4]. Он кодирует иммунодоминантные антигены, такие как ESAT6, CFP10 и уникальную микобактериальную систему секреции ESX-1 типа II (T7SS) [5, 6]. Потеря ESX-1 привела к утрате способности БЦЖ проникать из фагосомы в цитозоль, что явилось мощным фактором аттенуации штамма.

В настоящее время выделяется довольно большое количество штаммов БЦЖ, что обусловлено особенностями условий поддержания линий в

разных странах [7]. Интересно отметить, что первый дочерний штамм БЦЖ, полученный от исходной культуры, был зарегистрирован в России в 1940 г. [8].

Бер с соавт. [9] исследовали генеалогию распространения БЦЖ и объединили штаммы в группы на основе информации о количестве копий гена IS6110 (инсерционный элемент, характерный только для группы микобактерий, вызывающих туберкулез) и наличию или отсутствию гена *mp164* (консервативный антиген МТБ, используемый для диагностики). Исследование обнаружило синонимичные штаммы под разными названиями и было проведено их объединение для упрощения типирования [10].

Говоря о генетических особенностях штаммов БЦЖ, интересно рассмотреть один из них более подробно. При изучении штамма VCG-Prague была обнаружена мутация гена *phoP* в виде однонуклеотидной вставки, которая приводила к разрушению С-концевого ДНК-связывающего домена [11, 12]. Эта мутация специфична для VCG-Prague и не обнаруживается в других штаммах БЦЖ [13]. PhoP является регулятором ответа двухкомпонентной системы PhoP-PhoR, которая позитивно регулирует более 40 генов в МТБ, включая два важных протективных антигена (Ag85A, RPE18), которые используются для конструирования субъединичных вакцин [14, 15]. Таким образом, возникло предположение, что низкая иммуногенность VCG-Prague может быть результатом мутации *phoP*. Показано, что комплементация мутации аллелем *M. bovis phoP* действительно восстанавливает иммуногенность VCG-Prague. Также сверхэкспрессия аллеля *M. bovis phoP-phoR* в VCG-Japan с полноценной копией *phoP-phoR* еще более повышает иммуногенность и защитную эффективность этого вакцинного штамма. Вакцинация мышей C57BL/6 рекомбинантным штаммом rVCG-Japan/PhoPR индуцировала более высокие уровни продукции интерферона- γ (IFN- γ) CD4⁺ Т-клетками, чем при использовании VCG-Japan. Морские свинки, вакцинированные rVCG-Japan/PhoPR, были лучше защищены от заражения МТБ, чем те, которые иммунизированы VCG-Japan, демонстрируя значительно более длительное время выживания, сниженные бактериальные нагрузки и менее тяжелую патологию. В результате этих исследований идентифицировали генетическую модификацию, которая может применяться для создания новых рекомбинантных вакцин БЦЖ.

Способы защиты микобактерий от иммунной системы инфицированного хозяина. После проникновения в организм клетки МТБ сталкиваются с первым эшелом защиты в виде фагоцитирующих клеток. Фагоцитированная бактерия подвергается кислотному стрессу, воздействию активных

форм кислорода и азота (ROS и RNS), гидролитических ферментов и катионных антимикробных пептидов. Низкий pH внутри созревающей фагосомы активирует ферменты, которые разлагают бактериальные липиды и белки [16, 17]. Однако микобактерии выработали различные пути адаптации к бактерицидной среде созревающей фагосомы. В частности, они уходят от действия бактерицидных механизмов, блокируя протонный “насос”, подкисляющий содержимое фагосом, и ингибируют слияние фагосом и лизосом [18, 19]. С понижением pH МТБ может изменить свой метаболизм и использовать вместо цикла Кребса глиоксилатный путь, что уменьшает синтез НАДН и высвобождение CO₂. Таким образом, дополнительный углерод затем может быть использован для синтеза липидов или других метаболитов для дальнейшего снижения преодоления стресса [20]. Так, согласно исследованиям, синтез гиперфосфорилированных гуаниновых нуклеотидов (p)ppGpp необходим для выживания микобактерий в неблагоприятных условиях, включая и окислительно-восстановительный стресс [21]. Другой механизм ответа на закисление среды – выработка аммиака для повышения pH. МТБ используют для этого оперон *ompATb* (необходим для функционирования при пониженном pH), источником аммиака служит аспарагин [22]. Уреазный оперон также вносит вклад в защелачивание среды [23]. Следует добавить, что микобактериальная уреаза участвует в предотвращении нормальной экспрессии молекул МНС класса II, которые участвуют в связывании антигенов и презентации их Т-клеткам на клеточной поверхности [24]. Кроме того, в ответе на окислительный стресс МТБ также задействует эрготионеиновые, тиоловые и тиоредоксиновые системы, и описанную выше систему PhoP-PhoR [25].

Блокировав образование фаголизосомы, микобактерия разрушает мембрану фагосомы с помощью системы секреции ESX-1, что позволяет туберкулезным антигенам и самим бактериям выходить в цитозоль [19, 26]. Напротив, БЦЖ не имеет ESX-1 и остается внутри фагосомы хозяина, поэтому антигены и бактериальная ДНК не попадают в цитозоль [5, 6, 27]. Исследования показали, что иммунный ответ инфицированных микобактериями макрофагов характеризуется сниженной экспрессией генов МНС класса II и других генов, индуцируемых IFN- γ . Одним из механизмов подавления экспрессии МНС II является специфическое ингибирование путем деацетилирования гистонов, что приводит к снижению ответов CD4⁺ Т-клеток [28, 29]. CD4⁺ Т-клетки дифференцируются в Т-клетки центральной памяти (T_{CM}), которые, в свою очередь, дифференцируются в клетки эффекторной памяти T_{EM}, эффекторные клетки Th1 или Th17, далее они мигрируют и осу-

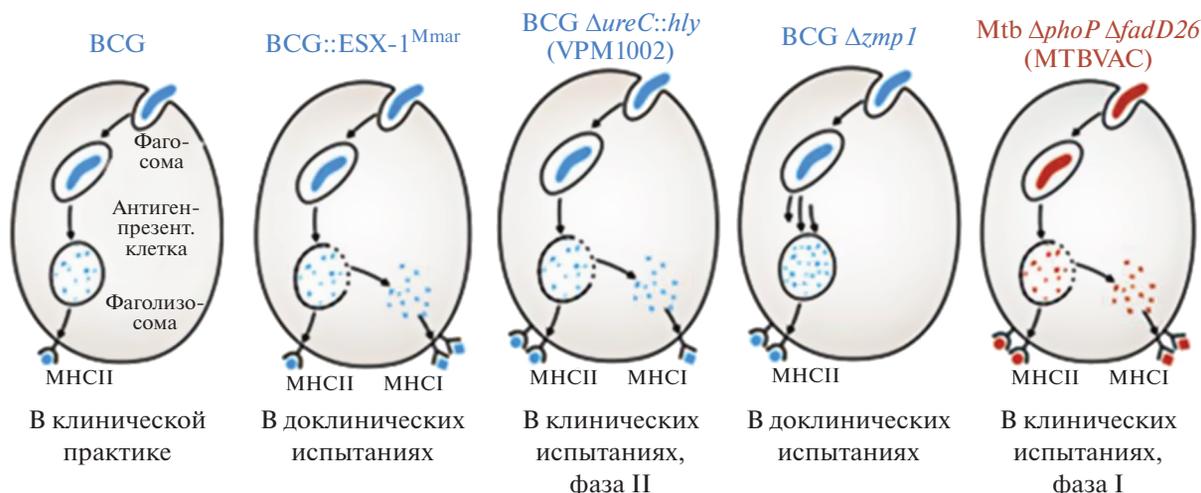


Рис. 1. Кандидатные вакцинные штаммы с проницаемой фагосомой [37].

шествляют свои эффекторные функции в инфицированных тканях. Когда CD4⁺ Т-клетки прибывают в место инфекции, они сталкиваются с агрегатами МТБ-содержащих макрофагов и других иммунных клеток и вместе образуют плотную клеточную структуру, называемую гранулемой. CD4⁺ Т-клетки секретируют цитокины, которые активируют инфицированные макрофаги для контроля роста бактерий и привлечения большего количества иммунных клеток к грануле [30]. Присутствие микобактериальной ДНК в цитозоле приводит к активации инфламмосом NLRP3 и AIM-2, высвобождению интерферонов и увеличению аутофагии и апоптоза [20, 31, 32], что в конечном итоге может привести к лучшей индукции ответов Т-клеток [33].

Во время развития заболевания увеличивается количество МТБ-специфичных CD8⁺ Т-клеток, но их роль в защитном иммунитете не ясна. Было показано, что истощение CD8⁺ клеток приводит к снижению протективности вакцинации БЦЖ [34]. В то же время даже высокий уровень индуцированных вакцинацией CD8⁺-клеток не влияет на пролиферацию МТБ и не приводит к распознаванию МТБ-инфицированных макрофагов [35].

Роль гуморального иммунитета при инфекции МТБ остается спорной, однако показано, что индивидуумы с латентной туберкулезной инфекцией и активным заболеванием имеют различные МТБ-специфические гуморальные ответы и обладают различными паттернами гликозилирования антител [36].

Пути повышения протективности БЦЖ. BCG::ESX-1. Несколько кандидатов в рекомбинантные вакцины БЦЖ были сконструированы так, чтобы обеспечить разрушение мембраны фагосомы клетками вакцинного штамма (рис. 1) [37].

Как обсуждалось выше, у штамма БЦЖ утеряны гены, необходимые для секреции типа VII (T7S) ESX-1, предназначенные для секреции белков, играющих ключевую роль во взаимодействиях хозяина с патогеном [38, 39].

Основная система ESX-1 состоит из АТФаз ЕссВ-D, которые образуют трансмембранную структуру в виде канала. Цитозольные компоненты системы ESX-1 представлены АТФазой ЕссА, шаперонами EspD-H и секретируемыми субстратными белками EsxA-B, PE35-PPE68, EspA-C и EspE. Другие важные эффекторы, которые секретируются этой системой – антигенная мишень раннего секретирования 6 кДа (early secreted antigenic target of 6 kDa, **ESAT-6**) и белок культурального фильтрата 10 кДа (culture filtrate protein of 10 kDa, **CFP-10**). Белки секретируются в виде гетеродимера, связываясь с ядерными компонентами системы ESX-1 [40], что вызывает каскад неспецифических иммунных реакций [41–43]: активацию AIM-2 и NLRP3, повышение секреции интерлейкина-1b (IL-1b) и/или IL-18 [30, 31, 44] и активацию циклической синтазы GMP-AMP (сGas), стимулятора генов интерферона (STING) и TANK-связывающей киназы 1 (TBK1). Последний сигнальный каскад приводит к образованию интерферонов типа I (IFN) [17]. Помимо неспецифической иммунной активации, секретируемые эффекторы ESX-1 также индуцируют специфические реакции Th1-клеток с сильным защитным потенциалом [45].

Посредством гетерологичной экспрессии области *esx-1* *Mycobacterium marinum* в БЦЖ была создана рекомбинантная БЦЖ, обладающая ESX-1-активностью (BCG::ESX-1^{Mmar}), которая индуцирует цепочку сGas/STING/TBK1/IRF-3/интерферон I и усиливает воспалительную активность AIM2 и NLRP3, что стимулирует образование эффектор-

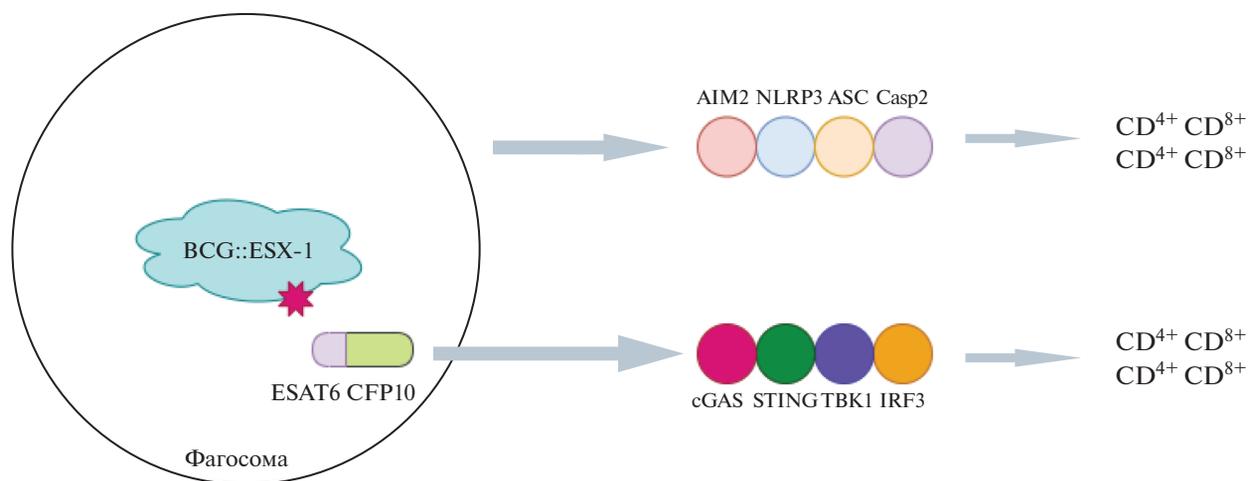


Рис. 2. Схематичный механизм повышенной защиты BCG::ESX-1^{Mmar} [46].

ных CD8⁺ и CD4⁺ Th1-клеток (рис. 2) [46]. Важно отметить, что штамм BCG::ESX-1^{Mmar} характеризовался низкой вирулентностью и обеспечивал более эффективную защиту по сравнению с исходным штаммом БЦЖ при заражении высоковирулентным МТБ.

BCG *ΔureC::hly* (VPM1002) и производные. VPM1002 представляет собой рекомбинантный штамм гBCG *ΔureC::hly*, в котором ген уреазы С был заменен геном *hly*, кодирующим листериолизин О (LLO), из *Listeria monocytogenes* [47]. Уреаза С препятствует закислению фагосом, содержащих микобактерии, путем образования аммиака, и тем самым ингибирует созревание фаголизосом и способствует выживанию микобактерий внутри макрофагов [48, 49]. Уменьшение продукции уреазы С приводит к подкислению фагосом, что способствует образованию фаголизосом [50]. LLO представляет собой холестеринзависимый цитолизин, который образует трансмембранные поры в фаголизосоме, позволяя *L. monocytogenes* выйти в цитозоль [50, 51]. Его экспрессия в VPM1002 приводила к высвобождению антигенов и бактериальной ДНК в цитозоль, вызывая аутофагию, активацию воспаления и апоптоз. VPM1002 продемонстрировал существенное повышение иммуногенности, эффективности и безопасности по сравнению с БЦЖ в доклинических исследованиях, успешно прошел клинические испытания I и II фаз. Продолжаются клинические испытания II/III фазы в Индии. Вакцина прошла I фазу клинических испытаний в Германии и Южной Африке, продемонстрировав ее безопасность и иммуногенность у молодых людей. Она также была успешно опробована в фазе IIa рандомизированного клинического исследования на здоровых новорожденных в Южной Африке и в настоящее время проходит фазу IIb исследования на ВИЧ-инфицированных новорожденных [52].

Производные второго поколения гBCG *ΔureC::hly* секретируют цитокины для усиления иммуногенности [53] и ауксотрофны по витамину B₆ [54]. Кроме того, получен штамм гBCG *ΔureC::hly ΔnuoG*, deletированный по гену антиапоптотической вирулентности *nuoG*, предотвращающего апоптоз инфицированных клеток [55]. Для мышей вакцинация гBCG *ΔureC::hly ΔnuoG* оказалась более безопасной, чем вакцинация немодифицированной БЦЖ, и более протективной по сравнению с гBCG *ΔureC::hly*, значительно снижала МТБ-нагрузку в легких мышей, уменьшала патологические проявления в легких и усиливала иммунные реакции. Транскриптомный анализ дренирующих лимфатических узлов после вакцинации либо гBCG *ΔureC::hly*, либо гBCG *ΔureC::hly ΔnuoG* продемонстрировал более раннюю и более сильную индукцию иммунных ответов, чем при использовании немодифицированной БЦЖ. Таким образом, гBCG *ΔureC::hly ΔnuoG* является многообещающим кандидатом на вакцину с улучшенной эффективностью и безопасностью [55].

БЦЖ, экспрессирующая перфринголизин О. Недостатком гBCG *ΔureC::hly* является активность LLO в узком диапазоне pH. Был создан штамм БЦЖ, экспрессирующий перфринголизин О (Pfo) – цитолизин *Clostridium perfringens* [56]. Чтобы уменьшить его цитотоксический эффект, использовали мутантную форму этого белка, содержащую замену G137Q (PfoA_{G137Q}). Мутация значительно уменьшила период полураспада белка, что привело к устранению его цитотоксичности. Для полученного штамма гBCG, обозначенного AERAS-401 (BCG₁₃₃₁ *ΔureC::ΩpfoA_{G137Q}*), было подтверждено отсутствие активности уреазы. Секретция биологически активного гемолизина была показана с помощью лизиса эритроцитов овцы в присутствии супернатанта рекомбинантного штамма. Кроме

того, было показано, что AERAS-401 оказался менее вирулентным для мышей с иммунодефицитом по сравнению с родительским штаммом БЦЖ.

BCGΔzmp1. Было установлено, что удаление гена металлопротеазы цинка *zmp1* ослабляет МТБ и способствует усилению неспецифического иммунитета, воспалительных и IL-1-зависимых иммунных механизмов при инфицировании мутантным штаммом. Аналогичная делеция была получена у БЦЖ, и эксперименты по иммунизации *in vitro* и *in vivo* на мышах и морских свинках показали, что делеционный мутант BCG Δ*zmp1* является более иммуногенным, и также усиливает презентацию антигенов в составе МНСII [57]. Кроме того, один из ингибиторов *Zmp1* был способен снижать выживаемость МТБ в первичных макрофагах человека [58]. Таким образом, BCG Δ*zmp1* ожидает дальнейшей оценки и клинических испытаний.

rBCG-SOCS1DN. Среди разнообразных механизмов ухода МТБ от иммунной системы хозяина – индукция экспрессии супрессора цитокинов SOCS1 клетками хозяина, что приводит к подавлению передачи сигналов цитокинов и нарушению передачи сигналов JAK/STAT, участвующих в врожденном иммунитете и последующем адаптивном иммунитете. Реализация этого механизма вакцинным штаммом БЦЖ может быть причиной недостаточной протективности вакцины. Был получен штамм БЦЖ (rBCG-SOCS1DN), секретирующий доминантно-негативный мутантный вариант SOCS1. Показано, что иммунизация rBCG-SOCS1DN усиливала активацию дендритных клеток костного мозга и активацию Т-клеток по сравнению с клетками контрольного штамма БЦЖ, повышала уровень продукции цитокинов IFN-γ, TNF-α и IL-6. Кроме того, у мышей, иммунизированных rBCG-SOCS1DN, было отмечено значительное снижение количества КОЕ МТБ в легких и селезенке по сравнению с таковыми у контрольных мышей, иммунизированных БЦЖ, после инфицирования высокопатогенным штаммом МТБ. Из полученных данных вытекает новая концепция рекомбинантной вакцины БЦЖ как инструмента для иммуномодулирования цитокинов в клетках-хозяевах [59].

Вакцины на основе МТБ. Осуществляются попытки получить вакцинный штамм из МТБ путем его аттенуации с помощью удаления RD1 локуса в результате нарушения синтеза кофактора (*panCD*) и биосинтеза аминокислот (*leuD*, *lysA*) [60]. Исследованные штаммы с различными комбинациями этих мутаций показали протективность и иммуногенность в моделях с мышами, морскими свинками и приматами.

Наиболее успешным оказался вакцинный штамм МТВVAC – МТВ Δ*phoP* Δ*fadD26*, производное штамма МТБ МТ103. Он был сконструирован пу-

тем создания двух независимых стабильных генетических делеций в генах *phoP* и *fadD26*, кодирующих два основных фактора вирулентности [61]. Уже упоминавшийся ген *phoP*, который кодирует фактор транскрипции двухкомпонентной системы вирулентности PhoPR, и ген *fadD26*, участвующий в биосинтезе и экспорте димикоцерозатов фтиоцерола (PDIM), – основные связанные с вирулентностью липидов клеточной стенки МТБ [62, 63]. В доклинических оценках МТВ Δ*phoP* Δ*fadD26* имел сравнимую безопасность с БЦЖ, но лучшую иммуногенность и защитную эффективность [61, 64].

На настоящий момент МТВVAC является единственной живой аттенуированной вакциной на основе человеческого патогена, которая после почти 20 лет исследований успешно прошла клинические испытания в качестве профилактической вакцины у новорожденных (вместо БЦЖ) и в качестве профилактической вакцины у подростков и взрослых (получивших прививку БЦЖ при рождении). МТВVAC сохраняет большинство Т-клеточных эпитопов, описанных для ТБ, включая основные иммунодоминантные антигены ESAT-6 и CFP-10 RD1. Исследования показали, что МТВVAC-индуцированный иммунитет к ESAT-6 и CFP-10 коррелирует с лучшей протективностью по сравнению с БЦЖ [65].

Сравнение БЦЖ и МТВVAC показало, что ассоциированный с МТВVAC иммунитет длится дольше, чем иммунитет БЦЖ, когда вводится в виде однократной дозы [66].

Пути доставки БЦЖ в организм. В настоящее время вакцинация БЦЖ производится подкожно, однако существуют и другие способы [67]: через слизистые оболочки (перорально, интраназально, аэрозольно) или внутривенно. Ниже будет рассмотрено возможное влияние выбора пути вакцинации на ее эффективность.

Последние исследования показывают возрождение интереса к пероральному введению БЦЖ, в свое время от него отказались в пользу подкожного в связи с загрязнением вакцины туберкулезом в Любеке. Однако, некоторые данные демонстрируют повышение эффективности защиты, если вместе с традиционной подкожной вакцинацией использовать пероральную [68, 69].

Другой метод доставки БЦЖ – интраназальный. Данный вариант введения БЦЖ в организм продемонстрировал достаточную эффективность в исследовании на мышах [70, 71]. Однако, по сравнению с другими путями, тоже использующими слизистую оболочку, интраназальный обладает определенными недостатками. Так, по некоторым данным, он сопряжен с опасностью развития паралича лицевого нерва (паралича Белла) [72].

Существует, кроме того, аэрозольное введение БЦЖ. Так, у макак и морских свинок было показано преимущества защитных свойств такого пути

перед подкожным [73, 74]. Было проведено исследование, демонстрирующее повышение иммунного ответа именно при аэрозольном введении вакцины [75, 76]. У людей также проводилась аэрозольная вакцинация БЦЖ, данный вариант может быть перспективным [77].

Дарра с соавт. изучили влияние внутривенного способа введения БЦЖ на приматах [78]. В этом исследовании они показали способность БЦЖ давать очень высокую степень защиты при таком варианте доставки: у шести из десяти макаков инфекция не была детектирована; девять из десяти показывали высокую защищенность. Внутривенная иммунизация индуцировала значительно более сильные Т-клеточные ответы в крови, селезенке, бронхоальвеолярном лаваже и лимфатических узлах легких, чем другие способы вакцинации.

Обобщая данные о различных способах доставки БЦЖ в организм, можно отметить, что при доставке через слизистые оболочки наблюдается повышение защиты от микобактерий в сравнении с принятым сейчас подкожным способом вакцинирования; в то же время, внутривенная вакцинация, по-видимому, обладает еще более сильным эффектом, но потенциально более опасна.

Использование БЦЖ для борьбы с другими заболеваниями. Известно, что вакцинация БЦЖ приблизительно вдвое снижает смертность в первые 6–12 мес. жизни [79], скорее всего, из-за стимуляции неспецифического иммунитета, приводящего к повышению устойчивости к респираторным заболеваниям и сепсису у новорожденных [80, 81]. Было показано, что вакцинация БЦЖ дает положительные неспецифические иммунные эффекты, приводящие к улучшению реакции на другие немикобактериальные патогенные микроорганизмы. В частности, вакцинация БЦЖ значительно увеличивает секрецию IL-1 β , который играет важную роль в противовирусном иммунитете [82]. Вакцинированные БЦЖ мыши были устойчивее к вирусу коровьей оспы, и у них был зарегистрирован повышенный уровень продукции гамма-интерферона CD4⁺ клетками [83]. Феномен иммунного эффекта после гетерологичной вакцинации, получивший название “тренированный иммунитет”, предположительно вызван метаболическими и эпигенетическими изменениями, приводящими к стимулированию активности генетических областей, кодирующих провоспалительные цитокины [84].

Благодаря своим иммуностимулирующим свойствам БЦЖ является стандартной терапией для предотвращения рецидивов после операции в случае немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря [85]. Инстилляция БЦЖ в мочевой пузырь способствует противоопухолевой активности, вероятно, за счет стимулирования рекрутирования CD4⁺ Т-клеток, нейтрофилов и лимфоцитов, а

также активации иммунных клеток для устранения раковых клеток уротелия, инфицированных БЦЖ [85–87]. Канно с соавт. [88] получили штаммы rBCG, экспрессирующие *Bordetella pertussis* токсин (S1PT), для дальнейшего использования в качестве альтернативной иммунотерапии для модели рака мочевого пузыря у мышей и показали их большую эффективность в иммунотерапии [88].

Текущие исследования направлены на выявление клинических параметров и биомаркеров, которые могут предсказать индивидуальный ответ на терапию БЦЖ [89, 90]. Поскольку побочные эффекты приводят к прекращению терапии БЦЖ у некоторых пациентов, BCG *DureC::hly* в настоящее время тестируется в качестве замены в фазе II клинических испытаний.

Осуществляются попытки лечения меланомы с использованием рекомбинантных штаммов БЦЖ [91]. Наиболее успешными оказались варианты БЦЖ, экспрессирующие интерлейкин-2 (rBCG-IL-2) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (rBCG-GM-CSF).

Другим возможным приложением БЦЖ может стать создание новых инструментов для борьбы с ВИЧ. На основе описанного выше вакцинного штамма MТВVAC, был создан рекомбинантный штамм MТВVAC.H1VA2а_hu, в качестве двойной вакцины против туберкулеза и ВИЧ [92]. Эта вакцина против туберкулеза и ВИЧ обладает сходной протективностью с родительским штаммом MТВVAC при заражении МТБ у мышей и оказалась более безопасной, чем БЦЖ и MТВVAC для мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом. Вакцина MТВVAC.H1VA2а_hu, усиленная модифицированным вирусом коровьей оспы Ankara (MVA).H1VA, индуцировала специфические для ВИЧ-1 и МТБ Т-клеточные ответы и ВИЧ-1-специфические CD8⁺ Т-клетки.

Был проведен анализ текущих эпидемиологических данных инфекции COVID-19, который выявил корреляцию между вакцинацией БЦЖ и снижением заболеваемости и смертностью от COVID-19 во всем мире [93]. Было обнаружено, что страны, не практикующие вакцинацию БЦЖ (Италия, Нидерланды, США) пострадали от пандемии сильнее, чем страны с всеобщей и давней политикой вакцинации БЦЖ. Страны с поздним началом всеобщей вакцинации БЦЖ (Иран, 1984) имеют более высокую смертность, что согласуется с идеей о том, что БЦЖ защищает привитое пожилое население. Поскольку показано, что вакцинация БЦЖ обеспечивает широкую защиту от вирусных инфекций и сепсиса [94], вероятно, защитный эффект БЦЖ может быть не связан напрямую с защитой от COVID-19. Тем не менее, обнаружено, что вакцинация БЦЖ коррелировала с уменьшением числа зарегистрированных случаев COVID-19. Это позволяет предположить, что

БЦЖ может предоставить некоторую защиту и непосредственно от COVID-19. Широкое использование вакцины БЦЖ в популяции может снизить количество носителей, и в сочетании с другими мерами может замедлить или остановить распространение COVID-19.

Масштабное исследование III клинической фазы покажет, эффективен ли рекомбинантный вариант БЦЖ VPM1002 против COVID-19. Исследование будет проведено на группах пожилых людей и работников здравоохранения, наиболее подверженных риску заболевания [95].

Таким образом, многочисленные исследования показывают, что БЦЖ остается многообещающей основой для генетических модификаций, способных повысить эффективность вакцины. Кроме того, адьювантные свойства БЦЖ, достаточная емкость ее генома и внутриклеточная локализация патогена позволяет рассматривать перспективы использования БЦЖ в качестве аттенуированного вектора для различных, в том числе вирусных антигенов. Неспецифические иммунотерапевтические эффекты БЦЖ делают вакцинацию ей потенциально новым инструментом в борьбе с COVID-19 и, вероятно, с другими инфекционными заболеваниями.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант № 1901500149А).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Global Tuberculosis Report. World Health Organization, 2017. Geneva. 147 p.
- Uplekar M., Weil D., Lonnoth K., Jaramillo E., Lienhardt C., Dias H. et al. // *Lancet*. 2015. V. 385. № 9979. P. 1799–1801.
- De Gijzel D., von Reyn C.F. // *Int. J. Infect. Dis*. 2019. V. 80. P. S6–S8.
- Lewis K., Reiling L., Guinn K., Hickey M., Smith S., Behr M., Sherman D. // *Bone*. 2011. V. 23. № 1. P. 1–7.
- Demangel C., Hinds J., Neyrolles O., Butcher P., Leclerc C., Cole S., Brosch R. // *Infect. Immun*. 2006. V. 74. № 1. P. 88–98.
- Simeone R., Bottai D., Brosch R. // *Curr. Opin. Microbiol*. 2009. V. 12. № 1. P. 4–10.
- Левин Д.Т., Обухов Ю.И., Александрова Н.В., Волкова Р.А., Эльберт Е.В., Альварес Фигероа М.В., Проккопенко А.В., Луданный Р.И. // Биопрепараты. Профилактика, диагностики, лечение. 2016. V. 16. P. 49–54.
- Corran P., Griffiths E. // World Health Organization. WHO Technical Report Series № 980. Geneva, Switzerland. 2012. 509 p.
- Behr M., Small P. // *Vaccine*. 1999. V. 17. № 7–8. P. 915–922.
- Fomukong N., Dale J., Osborn T., Grange J. // *J. Appl. Bacteriol*. 1992. V. 72. № 2. P. 126–133.
- Ahn S., Tran V., Leung A., Ng M., Li M., Liu J. // *Mol. Ther*. 2018. V. 26. № 12. P. 2863–2874.
- Sun R., Skeiky Y., Izzo A., Dheenadhayalan V., Imam Z., Penn E., et al. // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 33. P. 4412–4423.
- Abdallah A., Hill-Cawthorne G., Otto T., Coll F., Guerra-Assunção J., Gao G., et al. // *Sci. Rep*. 2015. V. 5. № October. P. 1–15.
- Andersen P., Kaufmann S. // *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014. V. 4. № 6. pii: a018523.
- Walters S.B., Dubnau E., Kolesnikova I., Laval F., Daffe M., Smith I. // *Mol. Microbiol*. 2006. V. 60. № 2. P. 312–330.
- Flannagan R., Cosío G., Grinstein S. // *Nat. Rev. Microbiol*. 2009. V. 7. P. 355–366.
- Stanley S., Johndrow J., Manzanillo P., Cox J. S. // *J. Immunol*. 2007. V. 178. № 5. P. 3143–3152.
- Van der Wel N., Hava D., Houben D., Fluittsma D., van Zon M., Pierson J., Brenner M., Peters P. // *Cell*. 2007. V. 129. № 7. P. 1287–1298.
- Kaufmann S. // *Trends Immunol*. 2012. V. 33. № 7. P. 373–379.
- Gengenbacher M., Nieuwenhuizen N.E., Kaufmann S. // *Curr. Opin. Immunol*. 2017. V. 47. P. 8–16.
- Baker J., Dechow S., Abramovitch R. // *Trends Microbiol*. 2019. V. 27. № 11. P. 942–953.
- Prusa J., Zhu D., Stallings C. // *Pathog. Dis*. 2018. V. 76. № 5. P. 1–13.
- Song H., Huff J., Janik K., Walter K., Keller C., Ehlers S. et al. // *Mol. Microbiol*. 2011. V. 80. P. 900–18.
- Mukai T., Maeda Y., Tamura T., Miyamoto Y., Maki-no M. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 2008. V. 53. P. 96–106.
- Sendide K., Deghmane A., Reyraat J., Talal A., Hmama Z. // *Infect Immun*. 2004. V. 72. P. 4200–9.
- Gengenbacher M., Kaufmann S. // *FEMS Microbiol. Rev*. 2012. V. 36. № 3. P. 514–532.
- Saiga H., Nieuwenhuizen N., Gengenbacher M., Koehler A., Schuerer S., Moura-Alves P. et al. // *J. Infect. Dis*. 2015. № 1. P. 1–25.
- Wang Y., Curry H., Zwilling B., Lafuse W. // *J. Immunol*. 2005. V. 174. № 9. P. 5687–5694.
- Andersen P., Scriba T. // *Nat. Rev. Immunol*. 2019. V. 19. № 9. P. 550–562.
- Fulton S., Reba S., Pai R., Pennini M., Torres M., Harding C., Boom W. // *Infect. Immun*. 2004. V. 72. № 4. P. 2101–2110.
- Dorhoi A., Nouailles G., Jörg S., Hagens K., Heinemann E., Pradl L. et al. // *Eur. J. Immunol*. 2012. V. 42. № 2. P. 374–384.
- Kupz C., Er U., Stäber M., Perdomo A., Dorhoi A., Brosch R., Kaufmann S. // *J. Clin. Invest*. 2016. V. 126. № 6. P. 2109–2122.
- Tzelepis F., Verway M., Daoud J., Gillard J., Hassani-Ardakani K., Dunn J. et al. // *J. Clin. Invest*. 2015. V. 125. № 2. P. 752–768.
- Chen C., Huang D., Wang R., Shen L., Zeng G., Yao S. et al. // *PLoS pathogens*. 2009. V. 5. № 4. e1000392.
- Lindenstrom T., Aagaar, C., Christensen D., Agger E., Andersen P. // *Eur. J. Immunol*. 2014. V. 44. P. 1699–1709.
- Lu L., Chung A., Rosebrock T., Ghebremichael M., Yu W., Grace P. et al. // *Cell*. 2016. V. 167. № 2. P. 433–443.

37. Mavi P.S., Singh S., Kumar A. // *Antioxid. Redox Signal.* 2019. P. 1–59.
<https://doi.org/10.1089/ars.2019.7867>
38. Gröschel M., Sayes F., Simeone R., Majlessi L., Brosch R. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2016. V. 14. № 11. P. 677–691.
39. Augenstreich J., Arbues A., Simeone R., Haanappel E., Wegener A., Sayes F. et al. // *Cell. Microbiol.* 2017. V. 19. № 7. P. 1–19.
40. Tiwari S., Casey R., Goulding C., Hingleywilson, S., Jacobs W. // *Microbiol Spectr.* 2019. V. 7.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec>
41. Collins A., Cai H., Li T., Franco L., Li X., Nair R. et al. // *Cell Host Microbe.* 2015. V. 17. № 6. P. 820–828.
42. Wassermann R., Gulen M., Sala C., Perin S., Lou Y., Rybniker J. et al. // *Cell Host Microbe.* 2015. V. 17. № 6. P. 799–810.
43. O. W., Bell S., MacDuff D., Kimmey J., Elie D., Olivias J. et al. // *Cell Host Microbe.* 2015. V. 17. № 1. P. 811–819.
44. Wong K., Jacobs W. // *Cell. Microbiol.* 2011. V. 13. № 9. P. 1371–1384.
45. Brodin P., Majlessi L., Brosch R., Smith D., Bancroft G., Clark S. et al. // *J. Infect. Dis.* 2004. V. 190. № 1. P. 115–122.
46. Gröschel M., Sayes F., Shin S., Frigui W., Pawlik A., Orgeur M. et al. // *Cell Rep.* 2017. V. 18. № 11. P. 2752–2765.
47. Grode L., Ganoza C., Brohm C., Weiner J., Eisele B., Kaufmann S. // *Vaccine.* 2013. V. 31. № 9. P. 1340–1348.
48. Reyrat J., Berthet F., Gicquel B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 19. P. 8768–8772.
49. Gordon M., D'Arcy Hart A., Young P. // *Nature.* 1980. V. 286. № 5768. P. 79–80.
50. Hamon M.A., Ribet D., Stavru F., Cossart P. // *Trends Microbiol.* 2012. V. 20. № 8. P. 360–368.
51. Shaughnessy L., Hoppe A., Christensen K., Swanson J. // *Cell. Microbiol.* 2006. V. 8. № 5. P. 781–792.
52. Nieuwenhuizen N., Kulkarni P., Shaligram U., Cotton M., Rentsch C., Eisele B., Grode L., Kaufmann S. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. № SEP. P. 1–9.
53. Rao M., Vogelzang A., Kaiser P., Schuerer S., Kaufmann S., Gengenbacher M. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 11. P. 1–10.
54. Gengenbacher M., Vogelzang A., Schuerer S., Lazar D., Kaiser P., Kaufmann S. // *MBio.* 2014. V. 5. № 3. P. 1–8.
55. Gengenbacher M., Nieuwenhuizen N., Vogelzang A., Liu H., Kaiser P., Schuerer S. et al. // *MBio.* 2016. V. 7. № 3. P. 1–10.
56. Sun R., Skeiky Y., Izzo A., Dheenadhayalan V., Imam Z., Penn E. et al. // *Vaccine.* 2009. V. 27. № 33. P. 4412–4423.
57. Sander P., Clark S., Petretera A., Vilaplana C., Meuli M., Selchow P. et al. // *Vaccine.* 2015. V. 3. № 11. P. 1353–1359.
58. Paolino M., Brindisi M., Vallone A., Butini S., Campiani G., Nannicini C. et al. // *ChemMedChem.* 2018. V. 13. № 5. P. 422–430.
59. Mizuno S., Soma S., Inada H., Kanuma T., Matsuo K., Yasutomi Y. // *J. Immunol.* 2019. V. 203. № 1. P. 188–197.
60. Sambandamurthy V., Derrick S., Jalapathy K., Chen B., Russell R., Morris S., Jacobs W. // *Infect. Immun.* 2005. V. 73. № 2. P. 1196–1203.
61. Arbues A., Aguilo J., Gonzalo-Asensio J., Marinova D., Uranga S., Puentes E. et al. // *Vaccine.* 2013. V. 31. № 42. P. 4867–4873.
62. Cox J., Chess B., McNeil M., Jacobs W. // *Nature.* 1999. V. 402. № 6757. P. 79–83.
63. Kirksey M., Tischler A., Siméone R., Hisert K., Uplekar S., Guilhot C., McKinney J. // *Infect. Immun.* 2011. V. 79. № 7. P. 2829–2838.
64. Aguilo N., Uranga S., Marinova D., Monzon M., Badiola J., Martin C. // *Tuberculosis.* 2016. V. 96. P. 71–74.
65. Gonzalo-Asensio J., Marinova D., Martin C., Aguilo N. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. № 12. P. 1–8.
66. Clark S., Lanni F., Marinova D., Rayner E., Martin C., Williams A. // *J. Infect. Dis.* 2017. V. 216. № 5. P. 525–533.
67. Tanner R., Villarreal-Ramos B., Vordermeier H., McShane H. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. № @. P. 5–7.
68. Hoft D., Brown R., Belshe R. // *Clin. Infect. Dis.* 2000. V. 30. № 3. P. S217–S222.
69. Monteiro-Maia R., de Pinho R. // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2014. V. 109. № 6. P. 838–845.
70. Falero-Diaz G., Challacombe S., Banerjee D., Douce G., Boyd A., Ivanyi J. // *Vaccine.* 2000. V. 18. № 28. P. 3223–3229.
71. Lyadova I., Vordermeier H., Eruslanov E., Khaidukov S., Apt A., Hewinson R. // *Clin. Exp. Immunol.* 2001. V. 126. № 2. P. 274–279.
72. Mutsch M., Zhou W., Rhodes P., Bopp M., Chen R., Linder T., Spyr C., Steffen R. // *N. Engl. J. Med.* 2004. V. 350. № 9. P. 896–903.
73. Barclay W., Busey W., Dalgard D., Good R., Janicki B., Kasik J. et al. // *Am. Rev. Respir. Dis.* 1973. V. 107. № 3. P. 351–358.
74. Garcia-Contreras L., Wong Y., Muttill P., Padilla D., Sadoff J., De Rouse J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 12. P. 4656–4660.
75. Dijkman K., Sombroek C., Vervenne R., Hofman S., Boot C., Remarque E. et al. // *Nat. Med.* 2019. V. 25. № 2. P. 255–262.
76. Scriba T., Nemes E. // *Nat. Med.* 2019. V. 25. № 2. P. 199–201.
77. Thomas Z., McShane H. // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2014. V. 109. № 3. P. 175–181.
78. Darrah P., Zeppa J., Maiello P., Hackney J., Wadsworth M., Hughes T. et al. // *Nature.* 2020. V. 577. № 7788. P. 95–102.
79. Higgins J., Soares-Weiser K., López-López J., Kakourou A., Chaplin K., Christensen H. et al. // *BMJ.* 2016. V. 355.
80. Aaby P., Whittle H., Benn C. // *BMJ.* 2012. V. 345. № 7864. P. 1–6.
81. Aaby P., Kollmann T., Benn C. // *Nat. Immunol.* 2014. V. 15. № 10. P. 895–899.
82. Kleinnijenhuis J., Quintin J., Preijers F., Benn C., Joosten L., Jacobs C. et al. // *J. Innate Immun.* 2014. V. 6. P. 152–158.

83. Mathurin K., Martens G., Kornfel H., Welsh R. // *J. Virol.* 2009. V. 83. P. 3528–3539.
84. Netea M., Joosten L., Latz E., Mills K., Natoli G., Stunnenberg H., O'Neill L., Xavier R. // *Science*. 2016. V. 352. № 6284. aaf1098.
85. Zheng Y., Naguib Y., Dong Y., Shi Y., Bou S., Cui Z. // *Expert Rev. Vaccines*. 2015. V. 14. № 9. P. 1255–1275.
86. Pichler R., Fritz J., Zavadil C., Schäfer G., Culig Z., Brunner A. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 26. P. 39916–39930.
87. Suttman H., Riemensberger J., Bentien G., Schmaltz D., Stöckle M., Jocham D., Böhle A., Brandau S. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 16. P. 8250–8257.
88. Kanno A., Goulart C., Leite L., Pagliarone A., Nascimento I. // *Biomed Res. Int.* 2019. V. 2019. P. 9630793.
89. Steinberg R., Thomas L., Mott S., O'Donnell M. // *Bl. Cancer*. 2016. V. 2. № 2. P. 215–224.
90. Zhang N., Jiang G., Liu X., Na R., Wang X., Xu J. // *Biomed Res. Int.* 2016. V. 2016. P. 9859021.
91. Benitez M., Bender C., Oliveira T., Schachtschneider K., Collares T., Seixas F. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. № 19. P. 7903–7916.
92. Broset E., Saubi N., Guitart N., Aguilo N., Uranga S., Kilpeläinen A. et al. // *Mol. Ther. – Methods Clin. Dev.* 2019. V. 13. P. 253–264.
93. Miller A., Reandelar M., Fasciglione K., Roumenova V., Li Y., Otazu G. // *medRxiv* (preprint). 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.20042937>
94. Moorlag S., Arts R., van Crevel R., Netea M. // *Clin. Microbiol. Infect.* 2019. V. 25. P. 1473–1478.
95. *Max Planck Society*, 2020. <https://medicalxpress.com/news/2020-03-vaccinebcg-immune-boost-coronavirus.html>

Vaccines Against Tuberculosis: Problems and Prospects (Review)

N. I. Nadolinskaia^{a,*}, D. S. Karpov^b, and A. V. Goncharenko^a

^a*Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences”, Moscow, 119071 Russia*

^b*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: nioriss@gmail.com*

Despite the efforts of the global medical and scientific community, tuberculosis remains the leading cause of death from infectious diseases. The expectation of success associated with the development of new anti-TB drugs was not justified, and the attention of researchers was largely drawn to the creation of new mycobacterial strains for vaccination against tuberculosis. The proposed review contains current information about existing vaccine strains and the development of new genetically engineered strains for the prevention of tuberculosis, as well as for the prevention and treatment of other diseases. The review includes relevant information on the correlation between BCG vaccination and the frequency and severity of COVID-19 infection.

Keywords: tuberculosis, BCG, vaccine, recombinant vaccine

УДК 541.64:547.455.623

ПОЛИМЕРНЫЕ ГИДРОГЕЛИ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ИНСУЛИНА

© 2020 г. И. Л. Валув¹, Л. В. Ванчугова¹, Л. И. Валув¹, *

¹Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: ivaluev@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 14.02.2020 г.

После доработки 12.03.2020 г.

Принята к публикации 22.04.2020 г.

На примере опубликованных и новых экспериментальных данных показано, что инсулинсодержащие гидрогели на основе сополимеров N-(2-D-глюкоз)акриламида с акриламидом, сшитых Конканавалином А, могут моделировать одну из функций поджелудочной железы — выделять инсулин при повышении концентрации глюкозы в окружающей среде, в том числе по двухстадийному механизму с максимальной скоростью на первом этапе.

Ключевые слова: инсулин, гидрогель, панкреатическая железа

DOI: 10.31857/S0555109920050153

Хорошо известно, что секреция любого биологически активного вещества в живом организме происходит при изменении его внутренней среды. При этом организм сам определяет когда, где и в каком количестве это вещество должно появиться. Изучение биохимических реакций, лежащих в основе этого процесса, с целью создания наиболее физиологичных терапевтических систем, способных его моделировать, можно отнести к одной из наиболее интересных и практически важных задач современной прикладной биохимии и фармакологии. Очевидно, что определяющая роль в таких системах должна принадлежать, так называемым, “умным” макромолекулярным носителям, которые способны изменять свои характеристики при изменении температуры окружающей среды, рН или при появлении в ней нового химического соединения, обеспечивая тем самым выделение предварительно введенного в него лекарства.

Одними из первых такие системы были созданы применительно к секреции инсулина — важнейшего гормона поджелудочной железы, определяющего характер протекания таких процессов, как транспорт глюкозы через мембрану клеток и ее утилизация, метаболизм липидов и белков, активация ферментов гликолиза и т.д. Интерес к этой проблеме был обусловлен широким распространением сахарного диабета — заболевания, обусловленного дефицитом инсулина и получившего название “неинфекционная эпидемия XX и XXI вв.”, а также существующими методами его лечения.

По данным ВОЗ сейчас около 300 миллионов человек в мире страдают этим заболеванием, а по прогнозам к 2025 г количество больных диабетом вырастет до 435 миллионов. Лечение сахарного диабета, в основном, сводится к периодическим (несколько раз в сутки) инъекциям инсулина и, хотя инъекционный способ введения гормона позволяет сохранить жизни большинству больных диабетом, он имеет принципиальный недостаток. В физиологических условиях выделяемый поджелудочной железой инсулин попадает в кровоток через печень, которая и осуществляет контроль за его распределением в организме [1]. При инъекционном введении печень теряет такой контроль и физиологическое соотношение между концентрациями инсулина и глюкозы нарушается, что может приводить к ряду серьезных осложнений, часто наблюдаемых у больных сахарным диабетом [2].

Поскольку повышение концентрации глюкозы в крови — главный стимул секреции инсулина поджелудочной железой, то создание систем контролируемого выделения инсулина сводится, главным образом, к синтезу глюкозочувствительных полимеров, изменяющих свою проницаемость при появлении глюкозы и выделяющих при этом предварительно введенный в них гормон.

Впервые принцип создания подобных систем был сформулирован еще в 1979 г., и основан он был на использовании конканавалина-А (Кон А) — белка с молекулярной массой 102000 Да, имеющего четыре участка связывания углеводов [3].

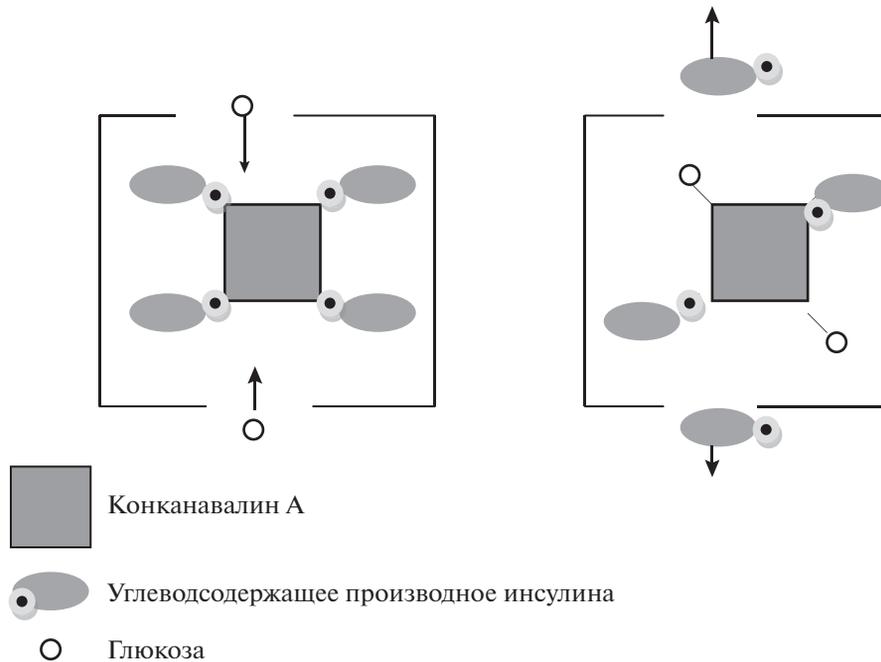


Рис. 1. Схема действия системы контролируемого выделения инсулина.

В полимерную мембрану, проницаемую для глюкозы и инсулина, но не проницаемую для Кон А, помещали комплекс Кон А и специально синтезированного углеводсодержащего производного инсулина. При появлении глюкозы в окружающей среде она проникала через мембрану и вытесняла производное инсулина из его комплекса с Кон А (рис. 1).

Исследования в этом направлении свелись к выбору углеводов, константы взаимодействия которых с Кон А обеспечивали бы необходимые скорость и количество выделяющегося инсулина; синтезу десятков различных углеводсодержащих производных инсулина с минимальным изменением физиологической активности гормона; созданию биосовместимой полимерной мембраны с требуемыми транспортными характеристиками и высокой механической прочностью, гарантирующей от разрушения всей системы, с выбросом большого количества инсулина. Были синтезированы производные инсулина, активность которых находилась на уровне 90% от активности нативного гормона, и созданы системы, показывающие неплохие результаты в опытах *in vitro* и *in vivo*. Однако работы в этом направлении не получили дальнейшего развития, в основном, из-за технологических трудностей конструирования подобных систем, а главное, из-за невозможности строгого контроля зависимости количества выделяющегося инсулина от концентрации глюкозы в растворе. В то время как контролирование такой зависимости является необходимым условием при лечении сахарного диабета [4–6].

Существенно большее распространение получил близкий по смыслу подход, основанный на использовании немодифицированного инсулина и глюкозосодержащих полимерных гидрогелей [7]. Принцип действия таких систем иллюстрирует рис. 2. При обработке раствором глюкозы гидрогеля, полученного сшиванием полимера, содержащего химически связанные с ним конканавалином А остатки глюкозы, эти остатки замещаются молекулами глюкозы. При этом межмакромолекулярное взаимодействие между полимерными цепями нарушается, степень набухания гидрогеля увеличивается и предварительно введенный в гидрогель инсулин выделяется в раствор.

В качестве глюкозосодержащего компонента гидрогелей были использованы полисахариды, например гликоген [8] или декстран с молекулярной массой (ММ) от 10^2 до 10^6 Да [9], а также ненасыщенные производные полисахаридов, например, декстран-метакрилат [10–12], декстран-акрилат [13, 14] или хитозан-гликозилоксиэтилакрилат [15, 16], образующие с Кон А комплексы состава 4 : 1. Испытания этих комплексов показали, что они достаточно биосовместимы (по крайней мере, не обладают цитотоксичностью) и способны к обратной сорбции и десорбции инсулина в отсутствие или присутствии глюкозы. К недостаткам подобных систем следует отнести сложность регулирования количества выделяющегося инсулина. Из некоторых систем инсулин выделялся даже при низкой, физиологически приемлемой, концентрации глюкозы.

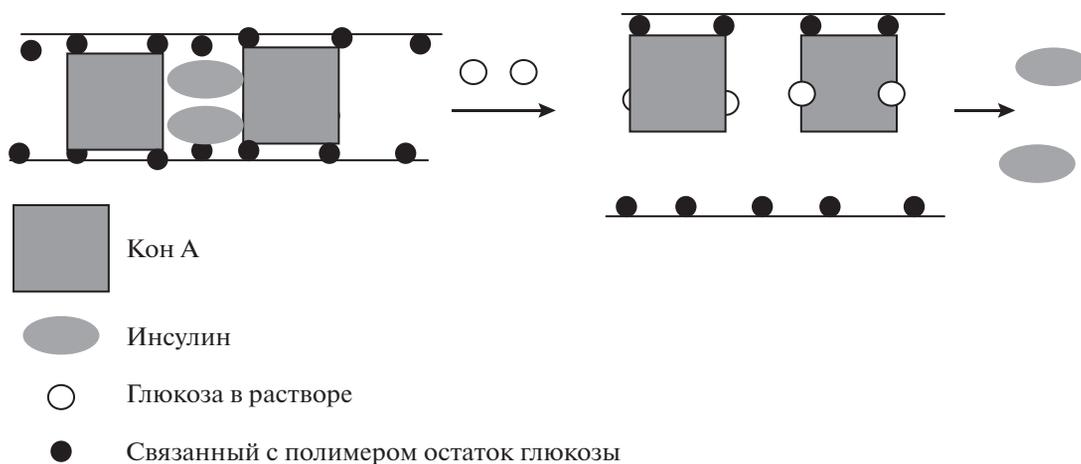


Рис. 2. Схема действия глюкозочувствительных гидрогелей на основе полимеров, сшитых Кон А.

Для решения этой проблемы гораздо более широкие возможности открывает использование полимеров, полученных полимеризацией ненасыщенных производных глюкозы, например, N-(2-D-глюкоз)акриламида (ГАА) [17, 18]. Преимущество использования таких мономеров заключается в том, что, используя известные закономерности реакции полимеризации, можно в широких пределах изменять химический состав и строение глюкозосодержащего полимера, а следовательно параметры взаимодействия полимера с Кон А и кинетику выделения инсулина из комплексов полимер-Кон А.

В настоящем обзоре будут проанализированы возможности использования полимера ГАА для создания макромолекулярных систем, моделирующих одну из функций поджелудочной железы, а именно выделение инсулина.

ГАА синтезировали проводя реакцию глюкозамина с ангидридом акриловой кислоты [19]. Сополимеризацией ГАА с другим водорастворимым мономером, например, акриламидом (константы сополимеризации для акриламида и ГАА равны 1.12 ± 0.11 и 0.024 ± 0.012 соответственно), были получены линейные сополимеры, цепи которых состояли из достаточно длинных полиакриламидных блоков, разделенных отдельными звеньями ГАА. Такое распределение звеньев ГАА в сополимере является наиболее благоприятным для взаимодействия с Кон А, поскольку в этом

случае исключаются стерические препятствия для реакции остатков глюкозы с одним из четырех центров связывания на молекуле Кон А.

При смешивании водных растворов синтезированных сополимеров и раствора Кон А практически мгновенно происходит образование гидрогеля. Степень набухания гидрогелей зависела от исходного соотношения ГАА (в сополимере) : Кон А (табл. 1)

Из таблицы видно, что с увеличением количества Кон А, выполняющего роль четырехфункционального сшивающего агента, степень набухания гидрогелей сначала уменьшалась, а затем при мольном отношении ГАА : Кон А = 4 : 1 прекращала изменяться. Причина этого, вероятно, заключается в том, что при таком соотношении происходило насыщение лектина остатками глюкозы и избыток Кон А не вступал в реакцию с сополимером. При этом плотность сетки гидрогеля при мольных соотношениях ГАА : Кон А $\leq 4 : 1$ не зависела от концентрации Кон А, а определялась только содержанием звеньев ГАА в сополимере. Так, при содержании звеньев ГАА 3.92, 10.14 и 14.5% (мол.) степень набухания составляла 34.9, 15.6 и 11.2 г воды на 1 г полимера при мольном отношении ГАА : Кон А = 4 : 1.

При добавлении глюкозы в водный раствор, окружающий гидрогель, сначала никаких видимых изменений с гидрогелем не происходило (сте-

Таблица 1. Зависимость степени набухания гидрогелей от мольного соотношения ГАА : Кон А (содержание звеньев ГАА в сополимере 10.14%)

Показатель	ГАА/Кон А							
	8 : 1	7 : 1	6 : 1	5 : 1	4 : 1	3 : 1	2 : 1	1 : 1
Степень набухания, г/г вода/полимер	29.7	25.4	22.1	19.3	15.6	15.9	15.2	15.5

пень набухания гидрогеля не изменялась). Однако, при достижении некоторого порогового значения концентрации глюкозы происходил довольно быстрый переход гидрогеля в растворимое состояние, то есть комплекс [Кон А–звено ГАА сополимера] распался с образованием комплекса [Кон А–глюкоза] и водорастворимых макромолекул сополимера ГАА и акриламида.

Как и следовало ожидать, значение пороговой концентрации было функцией количества остатков глюкозы в сополимере: чем выше содержание звеньев ГАА в сополимере, тем выше значение пороговой концентрации. Для сополимеров с содержанием ГАА 3.92, 10.14 и 14.45 мол. % значение пороговой концентрации глюкозы составляла 180, 380 и 565 мг/100 мл раствора.

Следует отметить, что пороговая концентрация глюкозы оказалась даже несколько выше, чем можно было ожидать, исходя из значений констант связывания Кон А с глюкозой и ГАА, равных 3.7×10^3 и $1.1 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ соответственно [18].

Разрушение гидрогеля естественно приводило к выделению в раствор предварительно введенного в гидрогель инсулина. С точки зрения выделения требуемого количества инсулина при достижении определенной концентрации глюкозы представляют интерес смеси сополимеров с различным содержанием звеньев ГАА. Можно привести следующий пример. В сосуд объемом 3 мл, имеющий отверстия диаметром 2 мм, помещали смесь гидрогелей на основе сополимеров различного состава, предварительно насыщенных раствором инсулина. Использованы сополимеры с содержанием ГАА 3.92, 10.14 и 14.45 мол. %. Количество гидрогеля каждого типа составляло 1 м, в каждый из них было введено 1.3 мг инсулина. Затем сосуд помещали в стакан с 10 мл буферного раствора, рН 3.5. Диффузия инсулина из сосуда в отсутствие глюкозы не превышала 15 мкг за 10 ч. При добавлении глюкозы к буферному раствору начиналась ее диффузия в сосуд с гидрогелем, а при концентрации выше пороговой гидрогель каждого типа растворялся с выделением содержащегося в нем инсулина. Динамика выделения инсулина приведена на рис. 3, на котором видно, что, чем выше концентрация глюкозы в окружающей среде, тем большее количество инсулина выделяется из системы.

Для предотвращения побочного выделения в окружающую среду одновременно с инсулином водорастворимых компонентов гидрогеля (Кон А и сополимера) использовали два приема. Первый из них заключался в применении для изоляции гидрогеля от окружающей среды диализной мембраны, проницаемой для глюкозы и инсулина, но непроницаемой для Кон А и сополимера [20], второй – в использовании дополнительно сшивающего агента – N,N'-метилен-бис-акриламида (БИС) [21].

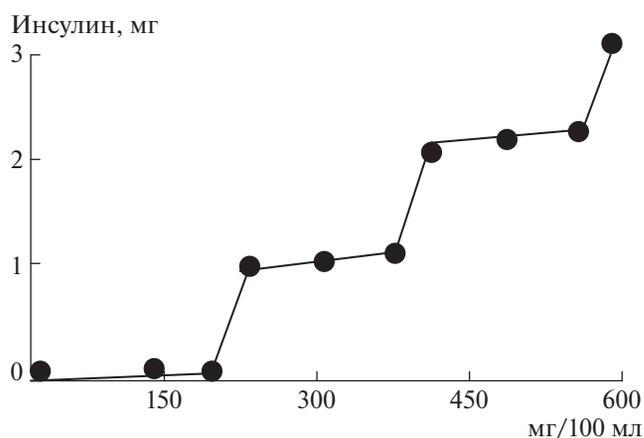


Рис. 3. Зависимость количества выделившегося инсулина (мг) от концентрации глюкозы (мг/100 мл) в окружающей среде.

При сополимеризации ГАА с акриламидом в присутствии Кон А добавление БИС существенно уменьшало степень набухания синтезируемых гидрогелей (табл. 2). При этом часть сшивок в гидрогеле образуется за счет биоспецифического взаимодействия углеводов-лектин, а часть – за счет ковалентного связывания цепей БИС [21].

При изучении взаимодействия синтезированных гидрогелей с растворами глюкозы было установлено, что, как и следовало ожидать, для гидрогелей, полученных в отсутствие ГАА, добавление глюкозы не приводит к изменению их степени набухания. Для гидрогелей, которые наряду с ковалентными содержали еще сшивки, образованные взаимодействием Кон А со звеньями ГАА полимера, добавление глюкозы резко увеличивало степень набухания. При этом разрушение комплекса ГАА–Кон А в каждом конкретном случае происходило по принципу “все или ничего”, то есть только при достижении пороговой концентрации глюкозы, определяемой содержанием ГАА в полимере.

Электронно-микроскопические исследования лиофилизированных образцов гидрогелей показали, что участие макромолекулярного сшивающего агента [(ГАА)₄-Кон А] в процессе синтеза приводило к формированию однородной пористой структуры со средним размером макропор 4.0 мкм при среднеквадратичном отклонении 1.1 мкм.

Такая однородная структура гидрогеля обеспечивала равномерное выделение инсулина при строго определенной “пороговой” концентрации глюкозы. Чем больше содержание звеньев ГАА в сополимере, тем выше была эта концентрация. Однако именно такое равномерное выделение инсулина принципиально отличало эту систему от поджелудочной железы.

Таблица 2. Зависимость степени набухания гидрогелей на основе сополимеров акриламида, ГАА и БИС, полученных в присутствии 0.1%-ного Кон А (по массе) от состава исходной мономерной смеси

Состав мономерной смеси, г/100 г раствора			Степень набухания, г/г вода/полимер		Пороговая концентрация глюкозы, мг/100 мл
Акрил-амид	ГАА	БИС	вода	1%-ный раствор глюкозы	
3.0	0	0.015	31.5	31.4	—
		0.03	27.7	27.3	—
		0.06	20.1	20.5	—
2.85	0.15	0.015	18.6	33.1	97
		0.03	13.7	28.2	92
		0.06	9.2	20.0	95
5.0	0	0.025	15.3	15.0	—
		0.1	6.1	6.4	—
4.75	0.25	0.025	9.6	15.3	96
		0.1	4.0	6.6	91

Таблица 3. Влияние концентрации меркаптоуксусной кислоты на свойства гидрогелей. Приведены минимальные и максимальные значения для пяти гидрогелей

МУК, %	Степень набухания, г/г	Доступность гидрогеля для белков с ММ, %				
		6500	40000	80000	96000	140000
—	12.7–14.5	97–99	87–93	79–84	71–76	66–71
0.029	14.4–16.0	95–97	84–88	75–80	44–50	39–43
0.058	16.5–19.0	96–100	78–83	66–71	44–51	36–42
0.10	20.3–22.2	94–98	79–82	62–67	49–52	38–43

Известно, что для секреции инсулина поджелудочной железой пороговой является концентрация глюкозы в крови порядка 80–100 мг/100 мл, а максимальная скорость достигается при концентрации 300–500 мг/100 мл. К особенностям этого процесса относится его неравномерность. Немедленный ответ или первая фаза реакции начинается в пределах 1 мин после повышения концентрации глюкозы и продолжается первые 8–10 мин. Затем скорость выделения инсулина резко замедляется и наступает вторая, более медленная и продолжительная фаза практически равномерного выделения инсулина в течение 55–60 мин, резко обрывающаяся после удаления глюкозы [2].

Поскольку скорость выделения инсулина из гидрогелей определяется скоростью диффузии глюкозы в объем гидрогеля и доступностью для нее молекул сшивающего агента – Кон А, то очевидно, что реализация физиологического пути секреции инсулина возможна только при условии двухуровневой структурной организации этого но-

сителя. С этой точки зрения интерес представляют гидрогели, синтезированные радикальной сополимеризацией акриламида с БИС в присутствии соединения, ограничивающего рост цепи полимера – меркаптоуксусной кислоты (МУК) [22]. В отличие от обычных гидрогелей эти гидрогели имеют повышенную степень набухания (до 20 г воды на 1 г сухого полимера), а до 70% их микропор имеют относительно небольшие размеры и поэтому недоступны для макромолекул белков с ММ выше 100000 Да. Аналогичные особенности структуры были обнаружены и при дополнительном введении ГАА в исходную мономерную смесь [23].

В этом случае использование соединения, ограничивающего рост полимерных цепей на первой стадии формирования полимерного гидрогеля, приводило к заметному (примерно в полтора раза) увеличению степени набухания гидрогеля, а также изменению характера распределения микропор по размерам (табл. 3).

Таблица 4. Кинетика выделения инсулина из гидрогелей

МУК, %	Скорость выделения инсулина (Ед./мин) в период, мин							
	0–5	5–8	8–10	10–15	15–20	20–30	30–40	40–60
–	2.5	3.0	3.1	2.7	2.9	2.1	1.5	0.6
0.029	4.8	6.0	4.2	1.8	1.6	1.4	1.0	0.6
0.058	5.2	5.6	4.3	1.9	1.7	1.4	1.1	0.7
0.10	5.6	5.8	4.6	1.9	1.8	1.5	1.2	0.5

Таблица 5. Зависимость концентрации глюкозы в крови животных после подкожного введения инсулина (0.2 или 0.6 мг/кг массы кролика или крысы соответственно)*

Животное	Препарат	Глюкоза в крови (мг/100 мл) через время, мин					
		0	15	30	60	90	120
Кролики	Исходный	124	96	65	60	44	42
	Выделившийся	116	102	58	56	40	40
Крысы	Исходный	145	126	84	62	51	56
	Выделившийся	132	112	78	56	50	50

* Приведены средние значения для трех опытов на животных.

Видно, что, если доступность микропор гидрогелей для белков с ММ до 80000 Да мало зависела от присутствия передатчика цепи, то для белков с ММ выше 960000 Да доля недоступных для них микропор при использовании МУК повышалась с 30 до 60%. Следовательно, можно сделать вывод, что в таких гидрогелях существуют два уровня структурной организации микропор: наряду с обычным, характерным для радикальной полимеризации широким распределением микропор по размерам, имеется значительное количество микропор уменьшенного размера. При этом, как показано в работе [20], проведение реакции сополимеризации в присутствии высокомолекулярных белков (в данном случае Кон А) приводило к тому, что большая часть макромолекул белка (до 90%) иммобилизуется на поверхности стенок, разделяющих поры гидрогеля, и доступна для соответствующих субстратов. Естественно, что величина такой поверхности тем больше, чем меньше размеры микропор.

Такой уровень структурной организации и определяет скорость взаимодействия Кон А с глюкозой, а следовательно и скорость выделения предварительно введенного в гидрогель инсулина (табл. 4). Видно, что выделение инсулина из синтезированных гидрогелей в раствор глюкозы происходит неравномерно. Наличие повышенного количе-

ства мелких пор с развитой поверхностью приводит к быстрой диффузии инсулина с поверхности этих пор. Максимальная скорость достигается на 8 мин и составляет 5.6–6.0 Ед./мин, а затем, по мере истощения инсулина в гидрогеле, скорость его выделения равномерно снижается до 1.9–0.7 Ед./мин [23]. В данном случае кинетика выделения инсулина из гидрогеля в ответ на появление глюкозы полностью аналогична секреции этого гормона поджелудочной железой, когда ударная доза инсулина появляется в течение первых 5–10 мин [2] и отличается синтезированные гидрогели от гидрогелей с более гомогенным распределением пор по размерам. Выделение инсулина из гидрогелей, полученных в отсутствие передатчика цепи, на начальном этапе происходит со скоростью 2.5–3.0 Ед./мин, а затем равномерно снижается до 1.5–0.6 Ед./мин.

Практическое использование, таких гидрогелей подразумевает их длительное пребывание в контакте с тканями живого организма и, в первую очередь, с кровью. Гидрогели сами по себе являются достаточно гемосовместимыми, но необходимо выяснить в какой степени введение в состав гидрогеля остатков глюкозы может изменять состояние белков крови. В оценке гемосовместимости важная, если не определяющая, роль принадлежит степени изменения нативной конформации белков крови в результате их контакта с поверх-

ностью полимера. В настоящее время индикатором конформационных изменений белков принято считать систему комплемента [24]. У человека она состоит из 21 белка глобулиновой природы. Компоненты этой системы свободно циркулируют в крови в форме неактивных предшественников, которые активируются, в том числе и в результате взаимодействия с чужеродным материалом, и приобретают свойства ферментов. Ферментативную активность оценивают, измеряя время полулизиса эритроцитов барана плазмой крови. Для гидрогелей с содержанием звеньев ГАА — 0, 0.3, 1.0 и 2.0% мол. значения константы скорости активации системы комплемента составляли 3.3, 2.7, 2.4 и $1.9 \pm 0.29 \times 10^6 \text{ с}^{-1} \text{ см}^{-2}$. То есть введение в состав гидрогеля остатков глюкозы приводит к некоторому уменьшению константы скорости активации системы комплемента, т.е. способствует сохранению белками нативной конформации [25].

Отсутствие драматических конформационных изменений белков крови обеспечивает неизменность биологической активности инсулина, выделяющегося из гидрогеля (табл. 5). Видно, что инъекционное введение раствора исходного и выделенного из гидрогеля инсулина приводит к практически одинаковому снижению уровня глюкозы в крови подопытных животных.

Как и ожидалось, инсулин, прошедший стадии введения в гидрогель и выделение из гидрогеля, не подвергается денатурции и полностью сохраняет биологическую активность [21].

Таким образом, рассмотренные результаты работ однозначно свидетельствуют о том, что синтезированный полимерный гидрогель на основе ГАА можно рассматривать как макромолекулярную систему, имитирующую одну из важнейших функций поджелудочной железы, связанную с выделением определенного количества инсулина в ответ на повышение концентрации глюкозы в окружающей среде. Обнаруженные закономерности, в свою очередь, могут открыть достаточно интересные перспективы для разработки новой стратегии лечения сахарного диабета. Очевидно, что полученные результаты являются иллюстрацией широких возможностей биохимии и химии высокомолекулярных соединений.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИНХС РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Saffran M.* Targeting of Drugs: The Challenge of Peptides and Proteins / Ed. G. Gregoriadis. N.Y.: Plenum Press, 1992. P. 89–95.
2. *Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.* Harper's Biochemistry. Norwalk. Connecticut/San Mateo. California: Appleton & Lange, 385 p.
3. *Brownlee M., Cerami A.* // Science. 1979. V. 206. № 4423. P. 1190–1191.
4. *Kim S.W., Pai C.M., Makino K., Semionoff L.A., Holmberg D.L., Gleeson Y.M., Wilson D.E., Mack E.Y.* // J. Control Release. 1990. V. 11. P. 193–201.
5. *Валуев Л.И., Старосельцева Л.К., Валуев И.Л., Ванчугова Л.В.* // Хим. фарм. журн. 2019. Т. 53. № 4. С. 20–23.
6. *Liu F., Song S.C., Mix D., Baudys M., Kim S.W.* // Bioconjug. Chem. 1997. V. 8. № 5. P. 664–672.
7. *Yin R., Bai M., He J., Nie J., Zhang W.* // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V. 124. P. 724–732.
8. *Sato K., Kodama D., Endo Y., Anzai J.* // J. Nanosci. Nanotechnol. 2009. V. 9. № 1. P. 386–390.
9. *Benzeval I., Bowyer A., Hubble J.* // J. Eur. Pharm. Biopharm. 2012. V. 80. № 1. P. 143–148.
10. *Taylor M.J., Tanna S., Sahota T.S.* // Drug. Dev. Ind. Pharm. 2008. V. 34. № 1. P. 73–82.
11. *Taylor M.J., Tanna S., Sahota T.S.* // Pharm. Dev. Technol. 2010. V. 15. № 1. P. 80–88.
12. *Yin R., Tong Z., Yang D., Nie J.* // Carbohydr. Polym. 2012. V. 89. № 1. P. 117–123.
13. *Tanna S., Taylor M.J., Sahota T.S., Sawicka K.* // Biomaterials. 2006. V. 27. № 8. P. 1586–1597.
14. *Tanna S., Sahota T.S., Sawicka K., Taylor M.J.* // Biomaterials. 2006. V. 27. № 25. P. 4498–4507.
15. *Yin R., Wang K., Du S., Chen L., Nie J., Zhang W.* // Carbohydr. Polym. 2014. V. 103. P. 369–376.
16. *Bai M., He J., Kang L., Nie J., Yin R.* // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 113. P. 889–899.
17. *Валуев И.Л., Валуев Л.И., Ванчугова Л.В., Обыденнова И.В.* // Высокомолекулярные соединения. 2015. Т. 57 Б. № 5. С. 334–337.
18. *Валуев И.Л., Чупов В.В., Валуев Л.И., Сытов Г.А., Платэ Н.А.* // Высокомолекулярные соединения. 1997. Т. 39 Б. № 4. С. 751–754.
19. *Iyakura Y., Imai Y., Vagu Y.* // J. Polym. Sci. A-1. 1968. V. 6. № 6. P. 1625–1632.
20. *Obaidat A.A., Park K.* // Biomaterials. 1997. V. 18. № 11. P. 801–806.
21. *Валуев И.Л., Ванчугова Л.В., Валуев Л.И.* // Высокомолекулярные соединения. 2011. Т. 53 А. № 5. С. 691–695.
22. *Ванчугова Л.И., Валуев Л.И., Валуев И.Л., Талызенков Ю.А.* // Высокомолекулярные соединения. 2013. Т. 55 Б. № 2. С. 225–228.
23. *Валуев И.Л., Валуев Л.И., Ванчугова Л.В., Обыденнова И.В.* // Высокомолекулярные соединения. 2018. Т. 60 А. № 4. С. 308–311
24. *Биосовместимость / Ред. В.И. Севастьянов М.:* ГУП “Информационный центр ВНИИгеосистем”, 1999. 367 с.
25. *Валуев И.Л., Валуев Л.И., Ванчугова Л.В., Валуева Т.А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 3. С. 319–322.

Polymeric Hydrogels for Controlled Insulin Releasing

I. L. Valuev^{a,*}, L. V. Vanchugova^a, and L. I. Valuev^a

^a*A.V. Topchiev Institute of Petrochemical synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

^{*}*e-mail: ivaluev@ips.ac.ru*

The example of published and new experimental data shows that insulin-containing hydrogels based on copolymers N-(2-D-glucose) acrylamide with acrylamide, crosslinked by Concanaline A, can simulate one of the functions of the pancreas – secrete insulin when the concentration of glucose in the environment increases, including on a two-stage mechanism with maximum speed in the first stage.

Keywords: insulin, hydrogel, pancreas

УДК 577.112.386.2:547.963.4

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА С ОКСИДОМ АЗОТА НА РЕАКЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ ЦИСТЕИНОВ ГЕМОГЛОБИНА

© 2020 г. О. В. Космачевская¹ *, Э. И. Насыбуллина¹,
К. Б. Шумаев¹, Н. Н. Новикова², А. Ф. Топунов¹

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

²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

*e-mail: rizobium@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.03.2020 г.

После доработки 17.04.2020 г.

Принята к публикации 22.04.2020 г.

Эритроцитарный гемоглобин (Hb) человека имеет два реакционноспособных остатка цистеина, расположенных на поверхности β -субъединиц. Эти остатки цистеина играют важную роль в настройке функций Hb. Известно, что они участвуют в транспорте внутриклеточного оксида азота (NO), в редокс-сигнализации, а также в регуляции равновесия димерной и тетрамерной форм Hb. В работе показано, что включение Cys-93 β как лигандов в состав комплексов железа с NO является еще одним способом регуляции реакционной способности SH-групп. Такие комплексы стабилизируют SH-группы в виде тиолят-аниона (R-S⁻), реакционная способность которого значительно выше, чем у протонированной формы тиола (Cys-SH). Благодаря этому включенные в комплексы тиолы проявляют повышенную реакционную способность по отношению к электрофильным агентам, таким как ThioGlo1. С другой стороны, в составе комплексов тиолы оказываются защищенными от окисления гидропероксидом *трет*-бутила. Включение SH-групп в состав комплексов железа с NO можно рассматривать как защиту тиолов от необратимого окисления в условиях окислительного стресса.

Ключевые слова: гемоглобин, тиолы, динитрозильные комплексы железа, гидропероксид *трет*-бутила

DOI: 10.31857/S0555109920050098

Значение цистеинов для физиологии клетки огромно, поскольку эти аминокислоты подвержены широкому спектру посттрансляционных модификаций, многие из которых обратимы. Тиоловые группы обладают такими свойствами, как нуклеофильность, способность к обратимому окислению-восстановлению и связыванию металлов, благодаря которым они чрезвычайно чувствительны к кислотно-основному, окислительно-восстановительному и электрофильно-нуклеофильному равновесию [1–5]. Даже незначительное изменение концентрации окислителей или электрофилов отражается на состоянии белковых SH-групп. Именно поэтому цистеины играют ключевую роль в передаче редокс-сигналов в живых системах.

Критическими для функционирования белков являются SH-группы, входящие в активный центр, а также локализованные на поверхности белковой молекулы. Поэтому такие цистеины расположены в эволюционно консервативных доменах молекул [6]. Взаимодействовать с белковыми SH-группами могут различные соединения, обладаю-

щие электрофильными свойствами, к которым относятся активные формы кислорода и азота, активные карбонильные соединения, а также ионы металлов – железа, цинка, меди, кальция и др. [7]. Наиболее распространенные посттрансляционные модификации сульфгидрильных групп: окисление до дисульфидов (R-S-S-R) и цистеинсульфеновой кислоты (R-SOH), нитрозилирование (R-SNO), сульфгидрирование (R-S-SH), образование аддуктов Михаэля и гемитиоацеталей [4, 8–10]. Перечисленные посттрансляционные модификации изменяют физико-химические свойства белков, их реакционную способность и способность к агрегации.

Показано, что сульфгидрильные группы играют важную роль в системе проведения сигнала внутри клетки. Часто именно через модификацию SH-групп ферментов, рецепторов, транскрипционных факторов и других белков-регуляторов происходит интеграция различных информационных потоков для выработки оптимального ответа клетки на внешнее воздействие [4, 9–11]. Упомянутые

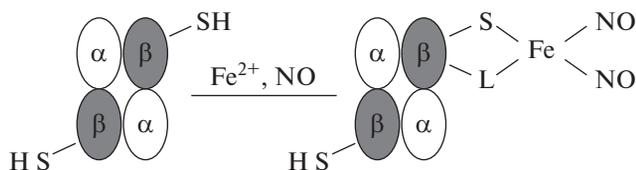


Рис. 1. Схематичное изображение ДНКЖ, связанных с SH-группой β-субъединицы гемоглобина. L – второй лиганд, связывающий железо в ДНКЖ.

посттрансляционные модификации, в отличие от фосфорилирования, как правило являются неферментативными. Еще одной модификацией SH-групп цистеинов является формирование динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) – комплексов, содержащих ион железа (Fe^{2+}) и две молекулы оксида азота (NO). ДНКЖ, связанные с цистеинами белков, являются стабильной формой депонирования NO в организме [12, 13], однако нельзя исключить, что эти комплексы функционируют и в качестве регуляторов активности белковой молекулы.

Гемоглобины (Hb) многих позвоночных имеют реакционноспособные остатки цистеина, локализованные на поверхности белковой молекулы [14]. Hb человека содержит два таких остатка в β-субъединицах тетрамера (Cys-93β). Показано, что с участием этих цистеинов и формируются ДНКЖ [15, 16] (рис. 1). В качестве второго лиганда, связывающего железо в ДНКЖ (обозначен на рис. 1 как L), обычно выступает другая аминокислота в белке. Мы предполагаем, что чаще всего таким лигандом является остаток тирозина.

Ранее была показана способность ДНКЖ, связанных с Cys-93β, защищать Hb от окислительной модификации, вызванной гидроперекисями [15–17], сформулирована гипотеза о сайтспецифическом антиоксидантном действии ДНКЖ по отношению к белкам. В модельных системах с низкомолекулярными ДНКЖ, содержащими тиольные лиганды, было показано, что в основе антиоксидантных свойств комплексов лежат следующие эффекты: связывание ионов железа и NO, перехватывание активных форм кислорода и азота, кооперативное взаимодействие с другими антиоксидантами, способность восстанавливать оксоферильную форму гема [15, 16, 18, 19]. Мы предположили, что ДНКЖ, связанные с Hb, могут быть и модуляторами реакционной активности Cys-93β.

Цель работы – изучение влияния ДНКЖ на реакционную способность SH-групп Hb при действии на него гидропероксида *трет*-бутила. Последний является водорастворимым аналогом гидропероксидов липидов и широко используется для моделирования процессов перекисного окисления в живых системах [19, 20].

МЕТОДИКА

Использованные реактивы. В работе были использованы следующие реактивы: метгемоглобин (окисленный Hb) человека, гидропероксид *трет*-бутила (*t*-BOOH), метилглиоксаль, ПААГ, ДДС-Na, Трис, глицин, NaN_3 , дитиотреитол (ДТТ), диметилсульфоксид (ДМСО), 4-гидрокси-(2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил (**4-гидрокси-ТЕМРО**), кумасси бриллиантовый синий R-250 – “Sigma-Aldrich” (США); 3Н-нафтол[2,1-*b*]пиран-*s*-карбоновая кислота (**ThioGlo1**) – “Calbiochem” (США); остальные реактивы – “Химмед” (Россия).

ДНКЖ синтезировали, как было описано в работах [15–17, 21]. ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (**GS-ДНКЖ**) получали, смешивая растворы FeSO_4 и восстановленный глутатион (GSH) в молярном соотношении 1 : 2 в сосуде Тунберга в атмосфере NO. ДНКЖ с фосфатными лигандами синтезировали аналогичным образом, пропуская в сосуде Тунберга газообразный NO через раствор FeSO_4 в 100 мМ фосфатном буфере, pH 6.8.

Связанные с Hb ДНКЖ получали добавлением фосфатных ДНКЖ (ДНКЖ-PO_4^-) к раствору гемоглобина в 20 мМ К-фосфатном буфере pH 6.8, в молярном соотношении Hb : ДНКЖ = 1 : 3. Концентрацию ДНКЖ рассчитывали по интегральной интенсивности сигнала электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) этих комплексов, используя в качестве внешнего стандарта спиновую метку 4-гидрокси-ТЕМРО. Препараты ДНКЖ хранили при -70°C .

Получение metHb- N_3 и его обработка гидропероксидом *трет*-бутила. Для исключения аллостерических переходов в гемоглобине к 0.15 мМ раствору Hb в 20 мМ К-фосфатном буфере, pH 6.8, добавляли NaN_3 до конечной концентрации 12 мМ, при этом раствор приобретал темно-вишневый цвет, что свидетельствовало об образовании низкоспиновой формы $\text{Hb}^{\text{III}}-\text{N}_3$. В дальнейшем при упоминании гемоглобина имеется в виду именно этот комплекс.

Для приготовления реакционной смеси к раствору $\text{Hb}^{\text{III}}-\text{N}_3$ добавляли *t*-BOOH в молярном соотношении 1 : 10. При изучении зависимости реакционных эффектов от концентрации окислителя *t*-BOOH добавляли до конечных концентраций: 0.6, 1.6, 2.6, 6.8, 11.0 мМ и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, после чего проводили измерения.

Определение свободных SH-групп. Количественную оценку сульфгидрильных групп проводили с помощью тиол-специфичной флуоресцентной метки ThioGlo1. При добавлении к раствору белка ThioGlo1 образуется тиоловый аддукт с максимумом испускания флуоресценции при 500 нм при длине волны возбуждения 379 нм [22].

Образцы для анализа готовили следующим образом: к 5 мкл реакционной смеси, содержащей 0.15 мМ Hb (0.15 мМ), добавляли 5 мкл 2.5 мМ ThioGlo1 в ДМСО и инкубировали 3 мин. Полученный раствор (10 мкл) вносили в кварцевую спектрофлуориметрическую кювету, содержащую 490 мкл 20 мМ К-фосфатного буфера, рН 6.8. Для деоксигенации Hb кювету с реакционной смесью продували аргоном в течение 10 мин.

При измерении содержания SH-групп в образцах глутатиона и глутатионовых ДНКЖ в реакции с *t*-BOOH реакционная смесь содержала 0.08 мМ GS-ДНКЖ (по Fe²⁺) или эквивалентное количество GSH в 10 мМ К-фосфатном буфере, рН 7.4, и 0.2 мМ *t*-BOOH (GSH/GS-ДНКЖ : *t*-BOOH = 1 : 2.5).

Измерение автофлуоресценции триптофана и дитирозина. Состояние остатков триптофана и тирозина в молекуле Hb изучали с помощью флуоресцентной спектроскопии. Образцы белков были приготовлены, как описано выше для получения metHb-N₃. В кювету к 490 мкл 20 мМ К-фосфатного буфера, рН 6.8, добавляли 10 мкл раствора белка. Для селективного возбуждения автофлуоресценции триптофана использовали длину волны 295 нм. Флуоресценцию регистрировали при 330 нм. Ширина щели возбуждающего света составляла 5 нм, испускаемого — 10 нм.

Спектрофотометрическую детекцию образования дитирозинов осуществляли при длине волны возбуждения 325 нм и излучения 400 нм (330–600 нм) [23]. Ширина щели возбуждающего и испускаемого света составляла 5 нм.

Образцы Hb перед измерением разбавляли в 25 раз при измерении флуоресценции триптофана и в 12.5 раз при измерении флуоресценции дитирозинов.

Регистрацию флуоресценции во всех случаях проводили в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1 см на спектрофлуориметре RF-5301 PC (“Shimadzu”, Япония) при высокой чувствительности — “high” и средней скорости сканирования — “medium” (в соответствии с обозначениями на приборе).

ДДС-электрофорез в ПААГ. Электрофорез проводили в блоках 12%-ного ПААГ размером 15 × 15 × 1 мл по методу Лэммли [24], используя прибор для вертикального электрофореза серии VE (“Хеликон”, Россия). К образцам Hb, приготовленным как описано выше, добавляли буфер для образцов в соотношении 1 : 1, прогревали в течение 5 мин при 95°C и затем наносили по 10 мкл на гель. Буфер для образцов был приготовлен на основе 0.1 М Трис-НС1 буфера, рН 6.8, и содержал 4% ДДС-Na, 0.2% бромфенолового синего и 20% глицерина. Для создания восстановительных условий в буфер добавляли раствор 3%-ного ДТТ. В качестве электродного буфера использовали

0.2 М Трис-глициновый буфер, рН 8.3, содержащий 0.1% ДДС-Na.

Электрофорез проводили при 4°C и *I* = 50 мА, *U* = 150 В. Необходимые условия электрофореза обеспечивались источником питания Эльф-4 (“НПО ДНК-Технология”, Россия). После окончания процесса разделения белков гель фиксировали и окрашивали раствором Кумасси бриллиантового синего R-250.

Для каждого образца Hb измерения проводили не менее чем в трех повторностях. Статистическую обработку полученных данных проводили на основе расчета средних арифметических значений и их ошибок. Различия показателей по сравнению с контролем определялись методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как было отмечено выше, в интактном Hb человека имеется только два доступных реакционно-способных цистеина (Cys-93β) [25], расположенных вблизи гистидина (His-92), координирующего ион железа, что делает их чувствительными к конформационным превращениям белка, вызванным присоединением лиганда к гемовому железу [26, 27]. Реакционная способность SH-групп зависит как от природы гемового лиганда, так и от степени насыщения лигандом гемовых групп.

Для оценки реакционной способности сульфгидрильных групп использовали высокоспецифичный флуоресцентный реагент на восстановленные тиолы — ThioGlo1, образующий ковалентные аддукты с восстановленными SH-группами [22]. Поскольку на флуоресцентные характеристики тиоловых аддуктов значительное влияние может оказывать электронное состояние гема, было проведено предварительное исследование взаимосвязи между реакционной способностью SH-групп и конформационным состоянием молекулы белка. Показано, что интенсивность флуоресценции тиолового аддукта с ThioGlo1 меняется в зависимости от степени оксигенации Hb (конформационный R–T-переход) (рис. 2). Этот факт подтвердил наличие аллостерического взаимодействия между гемом и Cys-93β, что позволяло использовать данный методический подход для изучения модификаций SH-групп в Hb. Полученные в эксперименте данные согласуются с результатами, полученными в работе [26], в которой было показано, что добавление CO или O₂ к deoxyHb приводило к 8-кратному увеличению скорости реакции N-этилмалеимида с SH-группами. Чтобы избежать влияния аллостерии на состояние Cys-93β, к раствору metHb добавляли азид натрия (NaN₃) для получения стабильного низкоспинового комплекса Hb^{III}-N₃.

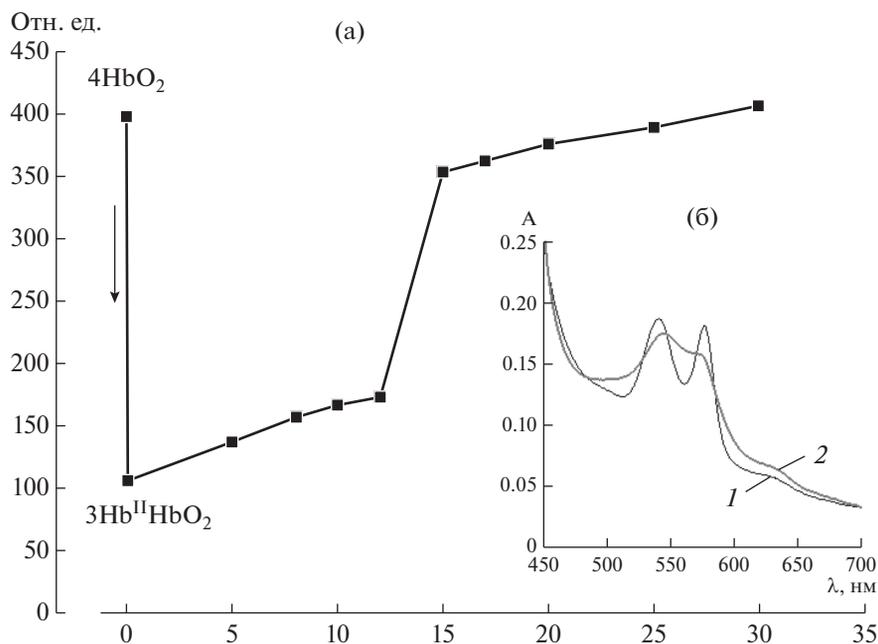


Рис. 2. Влияние степени окисления Hb на реакционную способность SH-групп, измеренную с помощью ThioGlo1: а – снижение интенсивности флуоресценции (отн. ед.) ThioGlo1 при деоксигенации Hb (стрелкой показана продувка реакционной смеси аргоном); б – спектры поглощения Hb с разной степенью окисления: 1 – оксигенированы все четыре субъединицы (4HbO_2); 2 – оксигенирована одна субъединица ($3\text{Hb}^{11}\text{HbO}_2$).

Изменение реакционной способности SH-групп после их включения в состав ДНКЖ изучали в зависимости от концентрации ThioGlo1 (система 1) и от концентрации окислителя – *t*-BOOH (система 2) (рис. 3). В первой системе флуоресценция тиолового аддукта линейно возрастала при увеличении концентрации ThioGlo1 в реакционной смеси (рис. 3а). В экспериментах с гемоглобиновыми ДНКЖ (Hb-ДНКЖ) интенсивность флуоресценции была выше по сравнению с Hb. В системе 2 интенсивность флуоресценции тиолового аддукта Hb-ДНКЖ также превосходила интенсивность флуоресценции Hb (рис. 3б), причем с увеличением концентрации окислителя возрастала и эта разница. Вероятно, включение SH-групп в состав ДНКЖ продлевали время их нахождения в форме тиолят-аниона (R-S^-), характеризующейся выраженными нуклеофильными свойствами, что увеличивало ее реакционную способность в отношении ThioGlo1.

На следующем этапе было изучено изменение во времени флуоресценции тиоловых аддуктов с ThioGlo1 после добавления *t*-BOOH к раствору Hb в молярном соотношении 10 : 1. *t*-BOOH в обоих вариантах – Hb и Hb-ДНКЖ сначала вызывал незначительное (~7%) увеличение интенсивности флуоресценции, а затем снижение, которое свидетельствовало об окислении SH-групп (рис. 4). К 80 мин интенсивность флуоресценции падала в обоих вариантах на ~15%. Наблюдаемый вначале скачок флуоресценции, по-видимому, связан с об-

разованием активированных форм тиола: тиолят-аниона (R-S^-) и сульфеновой кислоты (R-SOH). У этих форм константа связывания ThioGlo1 отличалась от R-SH . Известно, что образование активированных тиолов происходит в условиях мягкого окисления остатков цистеина [4, 9], что соответствует условиям эксперимента. Следует отметить, что в случае Hb-ДНКЖ время нахождения тиолов в активированном состоянии было дольше, чем для Hb.

Чтобы проверить, действительно ли наблюдаемое повышение флуоресценции тиоловых аддуктов связано с включением SH-групп в состав комплексов, было исследовано взаимодействие *t*-BOOH с низкомолекулярным тиолом – восстановленным глутатионом (GSH). Добавление к раствору глутатиона *t*-BOOH в молярном соотношении 1.0 : 2.5 показало, что тиоловые группы GSH окисляются и к концу измерений (20 мин) их количество составляло только половину от исходного уровня (рис. 5, кривая 1).

Следует отметить, что как в случае низкомолекулярных глутатионовых ДНКЖ (GS-ДНКЖ), так и в случае белковых (Hb-S-ДНКЖ) в начале происходило увеличение флуоресценции и только затем ее снижение (рис. 5, кривая 2). При этом к 20 мин окислилось только 30% тиолов. Ранее сходные результаты были нами получены при окислении GSH и GS-ДНКЖ хлорноватистой кислотой [19].

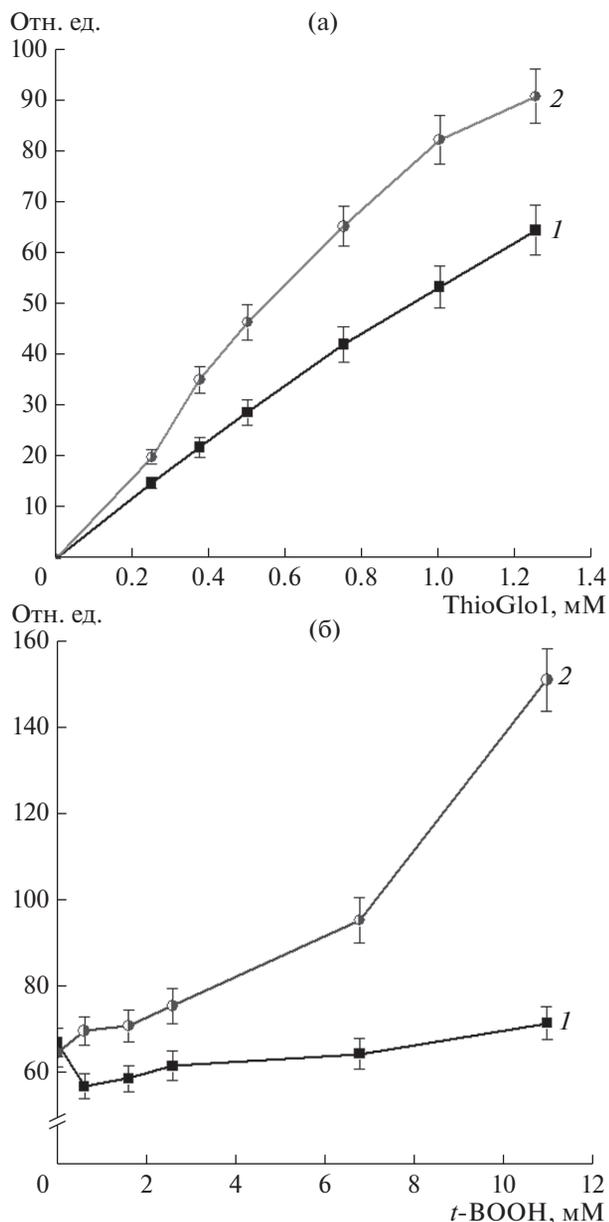


Рис. 3. Флуоресценция (отн. ед.) аддуктов цистеина с ThioGlo1 в зависимости от концентрации ThioGlo1 (а) и *t*-BOOH (б): 1 – Hb, 2 – Hb-ДНКЖ.

Связанные с белком глутатионовые ДНКЖ слабо реагируют с органическими гидропероксидами. Однако разрушение ДНКЖ может быть спровоцировано оксоферрильной формой Hb (Hb-Fe^{IV}=O), образующейся в реакции metHb с *t*-BOOH [16]. Возможный молекулярный механизм антиоксидантного действия ДНКЖ в этом случае связан с восстановлением радикалов Hb-Fe^{IV}=O [17, 28, 29]. Антиоксидантное действие также может быть обусловлено восстановлением оксоферрильной формы гема и нитрозилированием гемовой группы оксидом азота, высвобождающимся при распа-

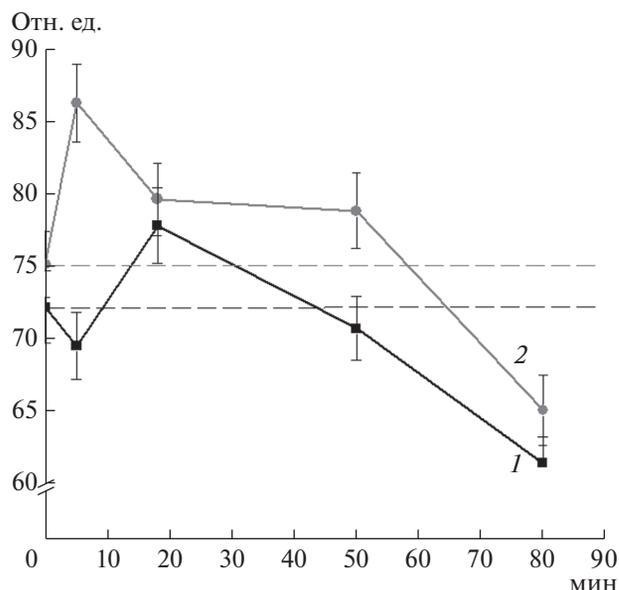


Рис. 4. Изменение во времени флуоресценции (отн. ед.) аддуктов цистеина с ThioGlo1 гемоглобина, обработанного пероксидом *tert*-бутила (Hb : *t*-BOOH = 1 мМ : 10 мМ): 1 – Hb, 2 – Hb-ДНКЖ. Пунктирная линия – исходный уровень флуоресценции образца.

де ДНКЖ [28, 29]. Оксоферрильная форма гема является очень сильным окислителем, модифицирующим белковую цепь гемопroteидов [30, 31]. При этом в результате одноэлектронного окисления остатков тирозина формируются феноксильные радикалы, которые могут окислять остатки цистеина с образованием тиольных радикалов [32].

Известно, что в Hb окислению подвергаются остатки Tyr42 и Tyr24. В связи с этим наряду со спектрофлуориметрическими измерениями состояния тиолов было проведено определение состояния тирозиновых остатков. Их флуоресценция возрастала при образовании дитириновых в результате взаимодействия двух тирозиновых радикалов. В экспериментах с Hb происходило сначала снижение флуоресценции, а затем ее возрастание, которое к концу измерения составляло 15% от исходного уровня (рис. 6). Возрастание флуоресценции тирозинов по времени совпадало со снижением флуоресценции тиоловых аддуктов с ThioGlo1 (рис. 4), что указывало на одновременность окисления тиолов и тирозинов в Hb. Полученные результаты согласуются с результатами работы [32], в которой было показано, что окислению тиолов и образованию тиольного радикала предшествовало появление тирозиновых радикалов. В эксперименте с Hb-ДНКЖ флуоресценция в первые минуты увеличивалась на 6% и далее уже не менялась (рис. 6). Таким образом, наличие ДНКЖ в составе белка защищало остатки тирозина от окисления. Этот факт можно объяснить образованием 3-нитротирозина в реакции NO

(источником которого были ДНКЖ) с тирозиновыми радикалами [33].

Поскольку наблюдаемые различия в свойствах тиолов могут быть вызваны конформационными изменениями белка под действием ДНКЖ, была исследована собственная флуоресценция Hb, обусловленная свечением остатков триптофана. Этот метод широко применяется для оценки конформационного состояния белков. Полученные спектры испускания флуоресценции Hb и Hb-ДНКЖ представлены на рис. 7а. Анализ спектров показал, что формирование Hb-ДНКЖ не приводило к сдвигу максимума спектра флуоресценции триптофана, положение которого зависит от перестройки ближайшего окружения данной аминокислоты. Это говорит об отсутствии влияния ДНКЖ на конформационное состояние молекулы Hb. Поэтому наблюдаемые различия в реакционных свойствах SH-групп в обоих вариантах скорее всего обусловлены не конформационными изменениями белка, а разным состоянием тиолов.

Известно, что в Hb мишенью для атаки гидропероксидами помимо цистеина является триптофан [34, 35], поэтому была изучена зависимость интенсивности испускания флуоресценции триптофана при 327 нм от концентрации *t*-BOOH (рис. 7б). Эта зависимость имела волнообразный характер. На кривых, полученных для Hb, присутствуют два экстремума: при концентрациях окислителя 0.6 и 6.8 мМ, в случае Hb-ДНКЖ – явно выражен только первый экстремум. Для обоих вариантов белка можно отметить концентрации *t*-BOOH, при которых флуоресценция практически не отличается от исходной: без *t*-BOOH – это 2.6 мМ и 11 мМ. Появление экстремумов флуоресценции триптофана можно объяснить локальными конформационными перестройками молекулы Hb, происходящими в результате окислительной модификации. Конформационные перестройки скорее всего носят неденатурационный характер, причем в случае Hb-ДНКЖ они гораздо менее выражены. Интенсивность флуоресценции во всем диапазоне концентраций *t*-BOOH не опускалась ниже исходного уровня, что указывало на отсутствие окисления триптофана.

Агрегация молекул Hb была исследована с помощью ДДС-электрофореза в ПААГ с дитиотреитолом, восстанавливающим дисульфидные связи. Анализ представленных на электрофореграмме данных показывает, что в присутствии *t*-BOOH в обоих вариантах белка образовывались ковалентно-сшитые димеры (рис. 8), но в Hb количество высокомолекулярных форм было больше, чем в Hb-ДНКЖ. Поскольку образцы белка содержали ДТТ, можно заключить, что димеризация Hb была обусловлена не дисульфидными связями. Скорее всего в образовании межбелковых сшивок

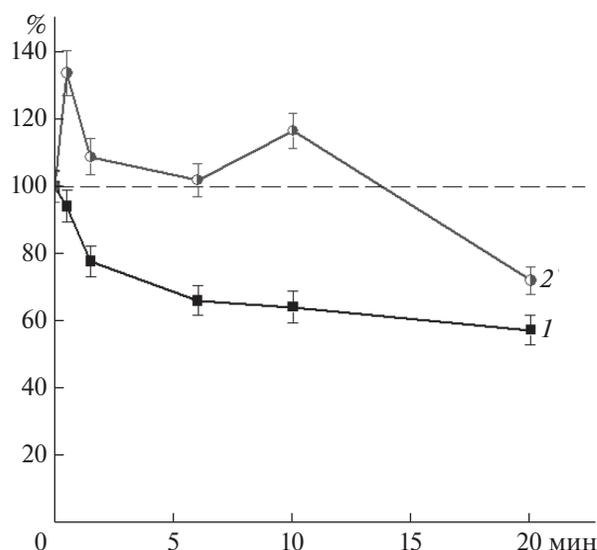


Рис. 5. Изменение во времени флуоресценции (отн. ед.) тиоловых аддуктов глутатиона, обработанного пероксидом *t*-BOOH (GSH/GS-ДНКЖ : *t*-BOOH = 1.0 : 2.5 мМ): 1 – GSH, 2 – GS-ДНКЖ. Пунктирная линия – исходный уровень флуоресценции образца.

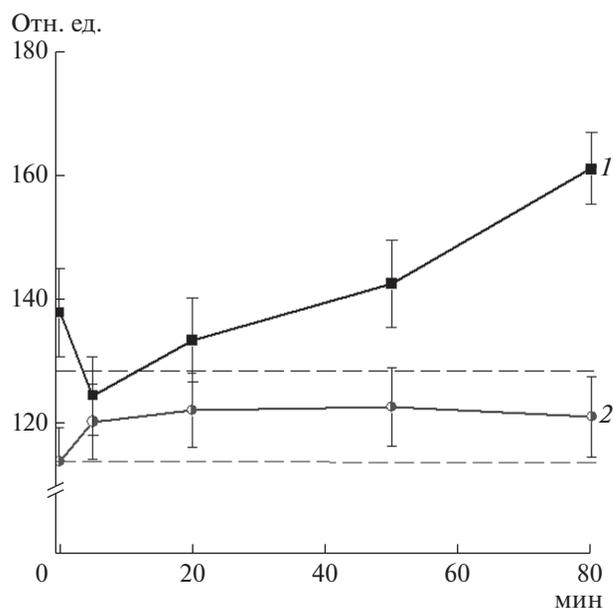


Рис. 6. Изменение во времени автофлуоресценции тирозина гемоглобина, обработанного пероксидом *t*-BOOH (Hb : *t*-BOOH = 1 мМ : 10 мМ): 1 – Hb, 2 – Hb-ДНКЖ. Пунктирная линия показывает исходный уровень флуоресценции образца.

участвовали тирозиновые радикалы. Поскольку в образце Hb-ДНКЖ окисление тирозинов было менее выражено (рис. 6), чем в Hb, то и формирование сшитых белков происходило менее интенсивно. Полученные данные согласуются с ранее полученными результатами, демонстрирующими способность ДНКЖ предотвращать окислительную

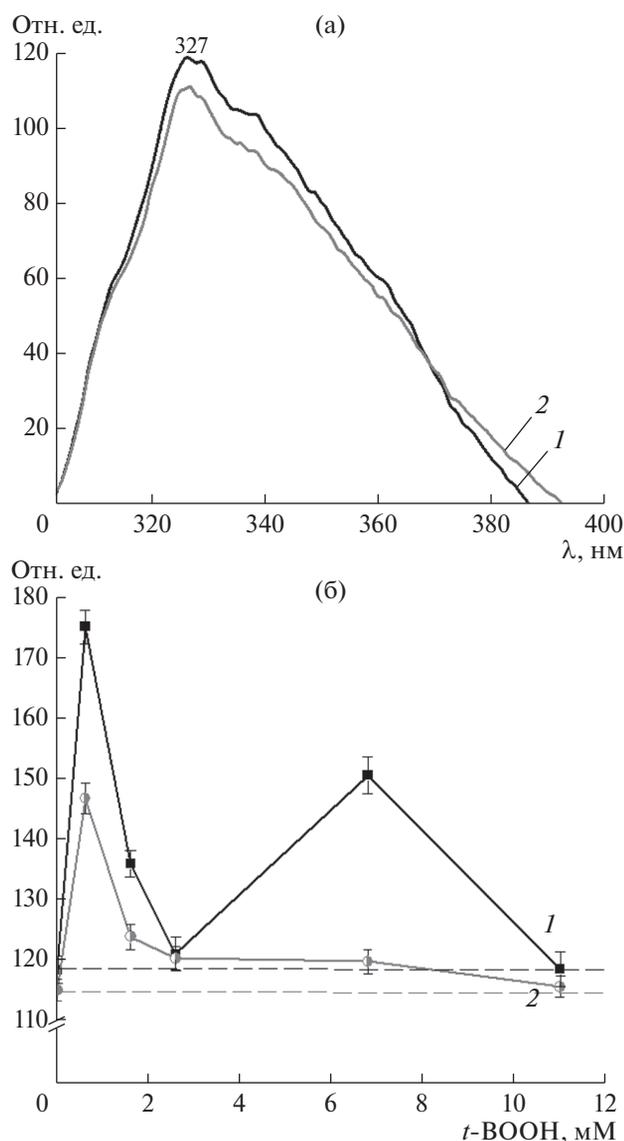


Рис. 7. Автофлуоресценция остатков триптофана в гемоглобине: а – спектр автофлуоресценции раствора Hb, б – зависимость интенсивности флуоресценции триптофана в зоне максимума (327 нм) от концентрации *t*-BOOH: 1 – Hb, 2 – Hb-ДНКЖ. Пунктирная линия показывает исходный уровень флуоресценции образца.

модификацию связанного с ними белка [15–17]. Эта способность ДНКЖ объясняется тем, что они выступают одновременно в роли хелатора и антиоксиданта. Однако в случае Hb-ДНКЖ при концентрациях *t*-BOOH 6.8 и 11 мМ возникали крупные белковые агрегаты, которые не входили в разделяющий гель. Это может быть связано с тем, что при высокой концентрации окислителя динитрозильные комплексы разрушаются, высвобождая ионы Fe^{2+} , реагирующие с пероксидами с образованием свободных радикалов, провоцирующих дальнейшее окисление белка [36]. Двой-

ственная роль ДНКЖ как антиоксиданта при низких концентрациях, окислителя и прооксиданта при высоких неоднократно подчеркивалась в работах [15–18, 21, 37, 38].

Можно дать и дополнительное объяснение наблюдаемым фактам. Расположенные на поверхности белка тиолы являются легкодоступными мишенями для активных форм кислорода (АФК). Вступая в реакцию с окислителем, они принимают на себя удар и тем самым защищают другие аминокислоты от необратимой окислительной модификации. Если тиолы заблокированы и не могут прореагировать с АФК, под удар попадают тирозин и триптофан, что приводит к множественным межмолекулярным сшивкам и накоплению крупных белковых агрегатов. Роль Cys-93β в защите Hb от денатурации и полимеризации в реакции с H_2O_2 была показана в работах [39, 40].

Роль Cys-93β в функционировании Hb и эритроцитов до сих пор до конца не понятна. На важное биологическое значение этих тиолов указывают высокая консервативность поверхностного остатка цистеина у Hb позвоночных [14], аллостерическая регуляция его реакционной способности [26, 27] и высокая внутриклеточная концентрация (~10 мМ, исходя из концентрации Hb в эритроцитах человека при ~40%-ном гематокрите). Активно обсуждается гипотеза об участии Cys-93β в метаболизме NO и в его экспорте [10, 41–45]. Поскольку реакционная способность Cys-93β зависит от степени насыщения Hb кислородом, эти тиолы могут участвовать во внутриклеточной редокс-сигнализации, которая осуществляется через взаимодействие Hb с компонентами мембраны эритроцита [45]. Тиоловые группы могут участвовать в регуляции равновесия димерной и тетрамерной форм Hb, от чего зависит образование O_2^- и соответственно H_2O_2 внутри клетки [46]. Имеются доказательства участия Cys93β в регуляции окисления Hb. Так, этот тиол может реагировать с супероксидом, образующимся в гемовом кармане β-цепи при автоокислении, с образованием тиольного радикала [47]. Показано, что Cys93β замедляет зависимое от H_2O_2 окисление оксигенированного Hb примерно в два раза [48]. Предложена гипотеза, что Cys-93β является аллостерически регулируемым антиоксидантом в эритроцитах [48]. В работе [39] обсуждается роль Cys93β в обеспечении безопасного пути для передачи электронов, генерируемых в гемовом кармане. Образующийся при этом цистеиновый радикал может быть восстановлен глутатионом, содержание которого в эритроцитах велико.

Полученные на Hb результаты показывают, что ДНКЖ могут быть регуляторами реакционной способности белковых SH-групп, при этом стабильность ДНКЖ определяется редокс-условиями внутри клетки. В нормальных условиях

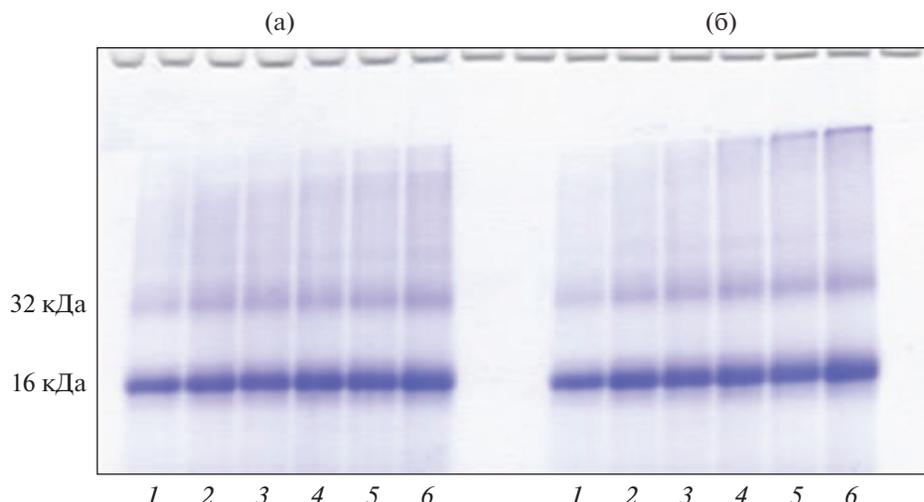


Рис. 8. Электрофорез в 12%-ном ПААГ с ДТТ и ДДС-Na: Hb (а) и Hb-ДНКЖ (б). Концентрация *t*-BOOH (мМ): 1 – 0, 2 – 0.6, 3 – 1.6, 4 – 2.6, 5 – 6.8, 6 – 11.0. (16 кДа – мономер Hb, 32 кДа – димер).

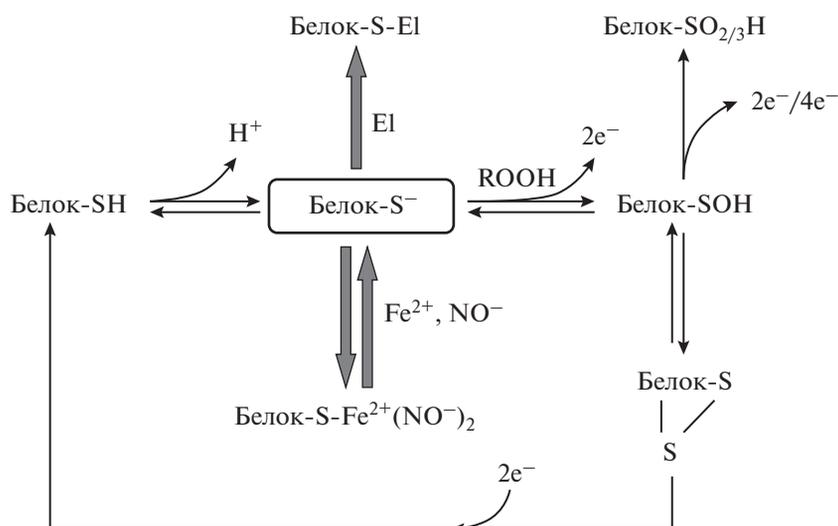


Рис. 9. Предполагаемый механизм регуляции активности тиолов в белках посредством формирования ДНКЖ. EI – электрофильные соединения, ROOH – органический гидропероксид.

включение SH-групп в ДНКЖ является обратной посттрансляционной модификацией, которая снижает реакционную способность тиолов, но при этом не исключает участия в редокс-превращениях. В условиях окислительного стресса комплексы распадаются, высвобождая тиолят-анион, который находится в состоянии повышенной готовности к реакции с АФК и электрофильными соединениями, поскольку не нуждается в предварительном депротонировании.

Образование аддуктов с электрофильными соединениями приводит к формированию стабильной модификации белка. Иными словами, ДНКЖ

являются своеобразной меткой на реакционно-способные цистеины, предрасполагая их к стабильным модификациям, и обеспечивая тем самым селективность этой модификации. Регуляторное действие ДНКЖ связано еще и с тем, что они влияют на равновесие между тиолом и тиолятом в белке, смещая его в сторону тиолята. Стабилизируя тиолят-анионы, эти комплексы повышают энергетический барьер реакции с пероксидами. Таким образом, ДНКЖ настраивают реакционную способность цистеина по отношению к действию пероксидов и электрофилов, что проиллюстрировано схемой (рис. 9).

Настройку реакционной способности цистеинов с помощью ДНКЖ можно отнести к механизмам регуляции структуры и функции белка посредством связывания ионов металлов или их комплексов [1, 7]. Известно, что тиолятная группа является хорошим лигандом для ионов железа, меди и цинка [1, 7, 49, 50]. При этом связывание металлов цистеиновыми лигандами не только изменяет структуру белка, но также оказывает комплексное защитное действие благодаря одновременному снижению реакционной способности тиола и металла. Это позволяет отсрочить образование стабильных модификаций белковых тиолов в условиях незначительного окислительного стресса и, наоборот, ускорить их при высокой степени стресса.

При проведении исследований использовали оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-29-12052) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Giles N.M., Watts A.B., Giles G.I., Fry F.H., Littlechild J.A., Jacob C. // *Chem. Biol.* 2003. V. 10. № 8. P. 677–693.
- Paulsen C.E., Carroll K.S. // *ACS Chem. Biol.* 2010. V. 5. № 1. P. 47–62.
- Paulsen C.E., Carroll K.S. // *Chemical Reviews.* 2013. V. 113. № 7. P. 4633–4679.
- Go Y.M., Chandler J.D., Jones D.P. // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. V. 84. P. 227–245.
- Klomsiri C., Karplus P.A., Poole L.B. // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. V. 14. № 6. P. 1065–1077.
- Gupta V., Carroll K.S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1840. № 2. P. 847–875.
- Novikova N.N., Kovalchuk M.V., Yurieva E.A., Kononov O.V., Stepina N.D., Rogachev A.V., Yalovega G.E., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F., Yakunin S.N. // *J. Phys. Chem. B.* 2019. V. 123. № 40. P. 8370–8377.
- Lo Conte M., Carroll K.S. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 37. P. 26480–26488.
- Wible R.S., Sutter T.R. // *Chem. Res. Toxicol.* 2017. V. 30. № 3. P. 729–762.
- Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F. // *Biochemistry (Moscow).* 2019. V. 84. Suppl. 1. P. S206–S224.
- Foyer C.H., Wilson M.H., Wright M.H. // *Free Radic. Biol. Med.* 2018. V. 122. P. 137–149.
- Vanin A.F. // *Nitric Oxide.* 2016. V. 54. P. 15–29. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.01.006>
- Vanin A.F. Dinitrosyl Iron Complexes as a “Working Form” of Nitric Oxide in Living Organisms. Cambridge, UK: Cambridge Scholars Publishing, 2019. 265 p.
- Reischl E., Dafre A.L., Franco J.L., Wilhelm Filho D. // *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2007. V. 146. № 1–2. P. 22–53.
- Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhenkov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F. // *Nitric Oxide.* 2008. V. 18. № 1. P. 37–46.
- Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. // *Methods Enzymol.* 2008. V. 436. P. 445–461.
- Shumaev K.B., Petrova N.E., Zabbarova I.V., Vanin A.F., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K. // *Biochemistry (Moscow).* 2004. V. 69. № 5. P. 569–574.
- Shumaev K.B., Dudylyina A.L., Ivanova M.V., Pugachenko I.S., Ruuge E.K. // *Biofactors.* 2018. V. 44. № 3. P. 237–244.
- Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V., Grigoryeva D.V., Panasenkov O.M., Vanin A.F., Topunov A.F., Terekhova M.S., Sokolov A.V., Cherenkevich S.N., Ruuge E.K. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. V. 2019. Article ID 2798154. <https://doi.org/10.1155/2019/2798154>
- Domanski A.V., Lapshina E.A., Zavodnik I.B. // *Biochemistry (Moscow).* 2005. V. 70. № 7. P. 761–769.
- Шумаев К.Б., Губкин А.А., Губкина С.А., Гудков Л.Л., Лакомкин В.Л., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. // *Биофизика.* 2007. Т. 52. № 3. С. 534–538.
- Hoff S., Larsen F.H., Andersen M.L., Lund M.N. // *Analyst.* 2013. V. 138. № 7. P. 2096–2103.
- Davies K.J., Delsignore M.E. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 20. P. 9908–9913.
- Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
- Blacken G.R., Wang Y., Lopez J.A., Fu X. // *Blood.* 2009. V. 114. № 22. P. 4040–4040.
- Riggs A. // *J. Biol. Chem.* 1961. V. 236. № 7. P. 1948–1954.
- Benesch R.E., Benesch R. // *Biochemistry.* 1962. V. 1. № 5. P. 735–738.
- Gorbulov N.V., Osipov A.N., Day B.W., Zayas-Rivera B., Kagan V.E., Elsayed N.M. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. № 20. P. 6689–6699.
- Gorbulov N.V., Yalovich J.C., Gaddam A., Thampatty P., Ritov V.B., Kisin E.R., Elsayed N.M., Kagan V.E. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 19. P. 12328–12341.
- Reeder B.J., Grey M., Silaghi-Dumitrescu R.-L., Svishtunenko D.A., Bülow L., Cooper C.E., Wilson M.T. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 45. P. 30780–30787.
- Vlasova I.I. // *Molecules.* 2018. V. 23. № 10. e2561. <https://doi.org/10.3390/molecules23102561>
- Bhattacharjee S., Deterding L.J., Jiang J., Bonini M.G., Tomer K.B., Ramirez D.C., Mason R.P. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. № 44. P. 13493–13501.
- Gunther M.R., Sturgeon B.E., Mason R.P. // *Toxicology.* 2002. V. 177. № 1. P. 1–9.
- Steffek R.P., Thomas M.J. // *Free Radic. Res. Commun.* 1991. V. 12–13. № 2. P. 489–497.
- Jia Y., Buehler P.W., Boykins R.A., Venable R.M., Alayash A.I. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 7. P. 4894–4907.

36. *Laquerre M., Bily A., Roller M., Birtic S.* // *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2017. V. 8. P. 391–411.
37. *Шумаев К.Б., Губкин А.А., Губкина С.А., Гудков Л.Л., Свириева И.В., Тимошин А.А., Топунов А.Ф., Ванин А.Ф., Рууге Э.К.* // *Биофизика.* 2006. Т. 51. № 3. С. 472–477.
38. *Шумаев К.Б., Губкина С.А., Ванин А.Ф., Бурбаев Д.Ш., Мох В.П., Топунов А.Ф., Рууге Э.К.* // *Биофизика.* 2013. Т. 58. № 2. С. 239–245.
39. *Winterbourn C.C., Carrell R.W.* // *Biochem. J.* 1977. V. 165. № 1. P. 141–148.
40. *Pimenova T., Pereira C.P., Gehrig P., Buehler P.W., Schaer D.J., Zenobi R.* // *J. Proteome Res.* 2010. V. 9. № 8. P. 4061–4070.
41. *Stamler J.S., Singel D.J., Piantadosi C.A.* // *Nat. Med.* 2008. V. 14. № 10. P. 1008–1009.
42. *Jensen F.B.* // *J. Exp. Biol.* 2009. V. 212. № 21. P. 3387–3393.
43. *Gaston B., May W.J., Sullivan S., Yemen S., Marozkina N.V., Palmer L.A., Bates J.N., Lewis S.J.* // *J. Appl. Physiol.* 2014. V. 116. № 10. P. 1290–1299.
44. *Zhao Y., Wang X., Noviana M., Hou M.* // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2018. V. 50. № 7. P. 621–634.
45. *Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Blindar V.N., Topunov A.F.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. V. 55. № 2. P. 83–98.
46. *O'Neill J.S., Reddy A.B.* // *Nature.* 2011. V. 469. № 7331. P. 498–503.
47. *Balagopalakrishna C., Abugo O.O., Horsky J., Manoharan P.T., Nagababu E., Rifkind J.M.* // *Biochemistry.* 1998. V. 37. № 38. P. 13194–13202.
48. *Vitturi D.A., Sun C.W., Harper V.M., Thrash-Williams B., Cantu-Medellin N., Chacko B.K., Peng N., Dai Y., Wyss J.M., Townes T., Patel R.P.* // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. V. 55. P. 119–129.
49. *Jakob U., Eser M., Bardwell J.C.A.* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 275. № 49. P. 38302–38310.
50. *Kaim W., Schwederski B.* // *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life* / Ed. G.N.A. Meyer. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1991. P. 330–350.

Influence of Iron Complexes with Nitric Oxide on the Reactivity of Hemoglobin Cysteines

O. V. Kosmachevskaya^{a,*}, E. I. Nasybullina^a, K. B. Shumaev^a, N. N. Novikova^b, and A. F. Topunov^a

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

^b*National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia*

**e-mail: rizobium@yandex.ru*

Human erythrocyte hemoglobin (Hb) has two reactive cysteines located on the surface of β -subunits. These cysteines play an important role in adjustment of Hb functions. It is known that they are involved in the transport of intracellular nitric oxide (NO), in redox signaling, as well as in the regulation of dimeric-tetrameric Hb equilibrium. In this paper we have shown that the inclusion of Cys-93 β as ligands in iron-NO complexes (DNIC) is another way for regulation of SH group reactivity. DNIC stabilize SH group as a thiolate anion (R-S⁻), whose reactivity is significantly higher than of the protonated form of thiol (Cys-SH). Thanks to that, the thiols included in the complexes show increased activity in relation to electrophilic agents, such as ThioGlo1. On the other hand, thiols as part of the complexes, are protected from oxidation by *tert*-butyl hydroperoxide. The incorporation of SH groups to DNIC can be considered as protection of thiols from irreversible oxidation at the oxidative stress conditions.

Keywords: hemoglobin, thiols, dinitrosyl iron complexes, *tert*-butyl hydroperoxide

МИКРООРГАНИЗМЫ В ОБЕССЕРИВАНИИ УГЛЕЙ (ОБЗОР)

© 2020 г. В. И. Котельников¹, Ч. А. Сарыглар¹, Р. Б. Чысыма¹, *

¹Тувинский институт комплексного освоения природных ресурсов СО РАН, Кызыл, 667007 Россия

*e-mail: chysyuma@mail.ru

Поступила в редакцию 27.01.2020 г.

После доработки 03.04.2020 г.

Принята к публикации 22.04.2020 г.

Обобщены сведения по использованию микроорганизмов и смешанных консорциумов в биологическом обессеривании углей. Показаны экологические проблемы при сжигании высокосернистых углей, рассмотрены перспективы экологически безопасных и ресурсосберегающих биотехнологических подходов к обессериванию угля. Анализ литературных источников свидетельствует об огромной роли микроорганизмов различных таксономических групп в удалении неорганической и органической серы из углей. Показана доминирующая роль мезофильных и умеренно термофильных ацидофильных хемолитотрофных бактерий (АХБ) рода *Acidithiobacillus* – *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *A. caldus*, а также некоторых гетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus polymyxa* в удалении неорганической серы. В качестве одного из эффективных инструментов в удалении пиритной серы рассмотрены смешанные культуры и ассоциации мезофильных и термофильных бактерий, выделенные из угольных шахт или с поверхности структуры угля. Рассмотрены возможности биодесульфурации органической серы в составе угля с помощью гетеротрофных микроорганизмов родов *Pseudomonas*, *Sulfolobus*, *Rhodococcus*, грибов *Agrocybe aegerita*, *Alternaria sp* и бактериально-грибных консорциумов *Sulfolobus solfataricus* и *Phanerochaeta chrysosporium* ME446, лакказного фермента базидиомицетов *Trametes versicolor* ATCC 20080.

Ключевые слова: уголь, сера, обессеривание (десульфурация), мезофильные и термофильные АХБ, гетеротрофные микроорганизмы, бактерии, грибы, дибензотиофен

DOI: 10.31857/S0555109920050104

Наиболее важной экологической характеристикой угля, влияющей на его качество, является присутствие в нем серы. Содержание серы в углях различных бассейнов и месторождений варьирует в широких пределах. В России содержание серы в рядовых углях колеблется от 0.4 до 8%, в США – от 0.7 до 5.4% при средних данных этого показателя здесь 1.8–2.2%. Диапазон колебаний содержания общей серы в донецких углях исключительно велик – от 0.46 до 9.28% [1].

При сгорании углей соединения серы превращаются в сернистые газы, которые при попадании в атмосферу приводят к образованию кислотных дождей, оказывающих вредное воздействие на окружающую среду и жизнедеятельность живых организмов. Более того, высокосернистые угли плохо коксуются и поэтому не могут быть использованы в цветной металлургии [2, 3].

Проблема очистки угля от сернистых соединений является важной проблемой для топливно-энергетической промышленности и, несмотря на большое число предложенных и апробированных в производственных условиях механических, термических и физико-химических методов, остается

не до конца решенной [4]. Выделение серы из углей на основе механических методов позволяет снизить содержание в них серы лишь на 15–20%, использование термохимических методов переработки требует высокой температуры и давления, связанных с высокими эксплуатационными расходами, частичной потерей горючих веществ и выделением большого количества углекислого газа [5–7]. Наиболее перспективными и эффективными признаются методы удаления серы из углей, в основе которых лежат биотехнологические процессы, основанные на разложении соединений серы микроорганизмами. Преимуществами этих процессов являются низкие энергозатраты и экологичность при сохранении энергетической ценности угля [8–10].

За последние десятилетия накоплено достаточное число публикаций, свидетельствующих о способности широкого спектра таксономических групп бактерий снижать содержание серы в углях [11–13].

В настоящем обзоре обобщены имеющиеся литературные источники по биодесульфурации углей, способности различных микроорганизмов

эффективно обессеривать уголь, — (поиск источников выполнен в 2019 г., глубина поиска — 2009–2019 гг.).

Соединения серы в угле присутствуют в основном в виде неорганической или пиритной ($S_{\text{пир}}$), органической ($S_{\text{орг}}$) и, сульфатной ($S_{\text{сул}}$) серы [14, 15].

Пиритная сера в угле представлена в форме минерального вещества, она слабо связана со структурой угля, тогда как органическая сера присутствует в качестве неотъемлемой части угольной матрицы, равномерно распределена по всему пласти и ковалентно связана с углеродным скелетом угля [16, 17]. Процесс биотехнологического удаления серы происходит через тиосульфатные и полисульфатные пути, протекает как биохимическая реакция, катализируемая микроорганизмами в жидкой среде, приводящая к окислению серы до сульфитов и сульфатов, которые являются водорастворимыми [18].

Удаление неорганической серы. По данным литературы, способностью снижать содержание неорганической серы обладают широкий спектр микроорганизмов, в котором доминирующая роль принадлежит мезофильным и умеренно термофильным ацидофильным хемолитотрофным бактериям (АХБ) и археям [19–22].

Наиболее распространенными микроорганизмами, используемыми для удаления пиритной серы, являются ацидофильные мезофильные бактерии: *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Acidithiobacillus thiooxidans*. Это неспорообразующие, грамотрицательные палочки, нетребовательные к источникам питания автотрофы. Они требовательны к кислороду: понижение его содержания в окружающем воздухе на 5%, ведет к снижению их активности. Диапазон активности бактерий рН — 1.5–3.5, оптимальная температура — 25–40°C. Мезофильные бактерии в большом количестве обнаружены в природных и рудных водах, а также в угольных шахтах [23].

Эффективность процесса биодесульфурации зависит от многих факторов, прежде всего, это рН-среды, окислительно-восстановительный потенциал (Eh), температура, плотность пульпы, размер угольных частиц, содержание и распределение пирита в угле, вид микроорганизмов, и т.д. В исследованиях [24] показаны результаты изучения влияния размера частиц и плотности пульпы на биообессеривание углей шахты Табас (Иран) с участием *A. ferrooxidans*. Отмечается, что уменьшение размера частиц от 0.5–1.0 мм до 0–0.5 мм повышало уровень десульфурации более чем в два раза, максимальное удаление серы наблюдалось при плотности пульпы 10%.

В работе [25] приведены результаты десульфурации угля с угольной шахты в провинции Гуйчжоу (юго-западная часть Китая) аэробной хемо-

автотрофной бактерией *A. ferrooxidans* YU2, выделенной из кислотного дренажа шахты. При этом, процент удаления общей серы, *A. ferrooxidans* YU2 в секвенирующем периодическом реакторе на 20 сут составил 75%, в том числе пиритной серы 86%.

He H. с соавт. [26] сообщают об биодесульфурации индонезийского угля термофильными штаммами *A. caldus*, выделенными из горячих источников провинции Юнь-Нань на юго-востоке Китая. Для культивирования *A. caldus*, была использована питательная среда, известная как базальная солевая среда Старки с добавлением серного порошка пирита и тиосульфата, культивирование бактерий проводили при температуре 40°C. Результаты исследований показали, что бактерии были способны удалять из угля 47% пиритной и 19% общей серы. Использование термофильных бактерий в биодесульфурации позволяло повысить скорость протекания процесса в биореакторах и, снижало вероятность загрязнения питательной среды [13].

В работе [27] сообщалось об удалении общей серы с турецкого угля чистой культурой *A. ferrivorans*, выделенной из кислого дренажа шахты Баля (Турция). Биодесульфурация протекала при рН — 2.5, количестве инокулята 2%, плотности пульпы 1%, размере угольных частиц — 500–250 мкм. За 14 сут инкубации *A. ferrivorans* удавалось снизить содержание общей серы в угле на 33%.

Одним из эффективных инструментов в биодесульфурации углей является использование смешанных культур, ассоциаций и консорциумов, выделенных из угольных шахт или с поверхностных структур углей. Для десульфурации двух образцов колумбийских углей с Юго-Запада (Колумбия) использовали нативную смесь *A. ferrooxidans* и *A. thiooxidans*, выделенных при кислотном дренировании угольных шахт и адаптированных в течение 6 мес [28]. В течение 30 сут, в образцах углей удалось снизить содержание пиритной серы на 85–95%, общей серы на 31–51%. Микроорганизмы культивировали на плотной питательной среде, процесс десульфурации угля протекал при температуре 30°C, плотность пульпы составляла 10%, размер частиц угля — 74 мкм. Наиболее высокая скорость окисления пирита была характерна для высокосернистого образца угля, что, по-видимому, связано с его сфероидальной формой, облегчающей окисление минералов при значительном увеличении площади взаимодействия с микроорганизмами.

Для удаления пиритной серы из высокосернистого угля Мехр-Азинского разреза (Табас, Иран) была использована смешанная культура мезофильных микроорганизмов *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* и *Leptospirillum ferrooxidans*. При исходном содержании $S_{\text{общ}}$ — 3.87%, $S_{\text{орг}}$ — 1.53%, $S_{\text{пир}}$ — 2.31%, $S_{\text{сул}}$ — 0.03%, удавалось снизить содержание об-

шей серы с 3.87 до 1.92%, с суммарной эффективностью 50.3% [29].

Авторами [30] сообщается о способности обессеривать низкосортный лигнит смешанной культурой *A. ferrooxidans* и *Pseudomonas* sp. NP22. В исследовании был использован образец бурого угля, из месторождения Цзинин (Шаньдун, Китай). В результате десульфурации с использованием *Pseudomonas* sp. NP22 содержание серы снизилось на 46%, *A. ferrooxidans* на 37% соответственно. Процесс обессеривания проходил при кислотности среды pH 3–5, размер угольных частиц составлял – 75–45 мкм, при 5%-ной плотности пульпы, температуре 35°C и времени инкубации 8 ч. Химические исследования позволили также выявить снижение содержания золы и повышение теплотворной способности угля с 6219 кал/г до 6406 и 6315 кал/г, что указывало на положительное влияние биодесульфурации на энергетическую ценность угля.

В работе [31] приведены данные биодесульфурации высокосернистого колумбийского угля (Кордова, Колумбия) с исходным содержанием пиритной и органической серы 1.03 и 0.9% соответственно. В результате исследования в течение 4 сут, удалось снизить содержание пиритной серы на 59.22% без предварительного измельчения угля до мелких фракций. Обессеривание угля осуществлялось с использованием смешанной культуры бактерий *A. ferrooxidans* и *A. thiooxidans* (Национальный университет Колумбии, Sede Medellín). Процесс проводился в двухфазном режиме при комнатной температуре, при кислой реакции среды, размере угольных частиц – 3/4 (<19.05 мм), с продолжительностью 4–8 сут в перемешиваемом реакторе с мешалкой объемом 4000 л.

Исследования [32] по десульфурации индийского угля (Нагаленд Северо-Восточная Индия) показали эффективность штамма *Pseudoxanthomonas* sp. в удалении общей серы. Как показали результаты, в углях этих месторождений отмечено высокое содержание пирита, поэтому для обработки образцов угля использовалось измельчение до размера – 210 мкм. Из исследованных девяти образцов угля для десульфурации были отобраны четыре образца. В результате исследований, было достигнуто максимальное удаление серы на 28.8% у образцов, имеющих в своей структуре значительное число полостей и трещин, что свидетельствовало о зависимости десульфурации от структуры угля.

В работе [33] показана способность гетеротрофных бактерий *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus polymyxa* снижать в угле количество пиритной серы и золы. Бактерии были выделены из воды шахты Эль-Магхара (Египет). В результате обессеривания углей с исходным содержанием общей серы 3.3%, лучший результат по сравнению с *P. polymyxa* от-

мечен с *B. subtilis*. Биофлотационные испытания, основанные на естественной плавучести угля и гидрофильности бактерий, показали хорошие возможности *B. subtilis* удалять из угля более 70% пиритной серы и золы.

Приведенный анализ литературных источников свидетельствует о способности мезофильных и умеренно термофильных ацидофильных хемолитотрофных бактерий (АХБ) и архей значительно снижать содержание неорганической серы в углях. Одним из эффективных инструментов в биодесульфурации углей является использование смешанных культур, ассоциаций и консорциумов бактерий, выделенных из угольных шахт или с поверхностной структуры угля.

Удаление органической серы. Органическая сера ковалентно связана с атомами углеродной матрицы угля в виде серосодержащих соединений, сложных тиофеновых кольцевых систем, дибензотиофена со связью C–S. Сложная молекулярная структура и низкая растворимость в воде ограничивают использование аэробных хемолитотрофных бактерий для удаления органической серы. Расщепление органических серосодержащих соединений, таких как дибензотиофены (ДБТ), требует участия микроорганизмов, способных разрушать C–S связи с высвобождением атомов серы, присутствующих в ароматическом кольце. Чаще всего в качестве модельного соединения для удаления органической серы из ископаемого топлива (нефть, уголь) рассматривается ДБТ, поскольку тиофеновая сера, вероятнее всего составляет основную долю органической серы углей [34].

Сообщается о трех основных путях разрушения ДБТ микроорганизмами [35]. Первый, известный как путь Кодамы, (окисляющий путь), в котором ДБТ частично окисляется до водорастворимых промежуточных продуктов. Второй путь, называемый серо-специфическим, вызывает деградацию соединения, при которой он подвергается десульфурации с расщеплением C–S связи, что приводит к накоплению гидрооксибифенила и третий путь – полностью разрушающий, в котором ДБТ минерализуется до CO₂, сульфита и воды.

Способность расщеплять ароматические кольца органической серы в углях присуща только некоторым штаммам бактерий родов *Pseudomonas*, *Sulfolobus*, *Rhodococcus*, а также бактериально-грибным консорциумам и ферментам. Аэробные представители таких микроорганизмов, как бактерии рода *Rhodococcus*, способны проводить последовательное селективное окисление атома серы в молекуле ДБТ с последующим разрывом связи C–S и образованием сульфита/сульфата и органической составляющей 2-гидроксибифенила (2-ГБФ) [36].

В работе [37] описываются результаты проведенных исследований по биодegradации ДБТ нативным штаммом *Rhodococcus ruber*. Для анализа

были использованы 2 образца углей: NE – уголь высоким содержанием органической серы: лигнит и прокаленный кокс (ПК). Нативные штаммы *R. ruber* в течение 7 сут снижали содержание общей серы в образце угля NE на 36%, из которых 53% приходилось на долю органической серы. Уменьшение содержания серы в индийском лигните и прокаленном коксе составляло соответственно на 15.87 и 14.83% соответственно. При этом энергетическая ценность угля NE увеличилась с 6698 до 6812 к/кал, что свидетельствовало о перспективности его применения в производстве кокса.

Эффективность смешанного консорциума *Sinomonas flava* 1С и *A. ferrooxidans* для удаления органической серы из магалайского угля Индии продемонстрирована в работе [38]. Процесс обессеривания проводился в два этапа, где *S. flava* 1С использовалась для удаления органической серы, а *A. ferrooxidans* – пиритной. Результаты исследований показали, что последовательная обработка угля с размерами частиц 500–300 мкм смешанными культурами бактерий снижала содержание общей серы на 3.09%, в том числе органической на 2.5%, пиритной от 0.1 до 0.8%, с увеличением тепловорной способности угля от 26208 до 29481 Дж/г.

Очень интересна работа была сделана авторами [39] в которой они описали биодесульфурацию с участием консорциума, состоящего из грибов *Phanerochaeta chrysosporium* ME446 и термофильной, ацидофильной бактерии *Sulfolobus solfataricus* ATCC 35091 двух высокосернистых болгарских углей (уголь и лигнит) и одного турецкого лигнита. Перед проведением процесса образцы углей были подвергнуты химической деминерализации и депиритизации, с удалением 25.3–54.2% серы. Более высокая степень обессеривания была достигнута при использовании грибов *P. chrysosporium* ME446, с помощью которых за 6 сут удалось снизить количество общей серы на 24.2 и на 23.8% органической серы. Штамм *S. solfataricus* ATCC 35091 снижал содержание общей серы в углях на 16.9% и органической серы на 18.3%.

Об эффективном использовании бактерий *Pseudoclavibacter* sp. штамм SKC/XLW-1 и продуктов ее метаболизма, для окисления органических соединений угля Тондонгура (Индонезия) путем многоступенчатой биологической обработки сообщается в работе [40]. Многоступенчатая биологическая обработка состояла из биоокисления и последующей биофлотации. При удалении органической серы, по мнению авторов, большое значение имеет биоокисление, на долю которого приходится 52–100% многоступенчатого процесса. В результате обработки было удалено от 27 до 31.6% органической серы угля. Следует также подчеркнуть, что процессы удаления пиритной и общей серы имели такие же закономерности, что и при удале-

нии органической серы. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования *Pseudoclavibacter* sp. штамм SKC/XLW-1 в десульфурации органической серы угля.

В работе [13] приведены данные об эффективности использования некоторых классов грибов при удалении органической серы из угля, что, вероятно, связано с продуцированием ферментов, в частности, сульфатаз, катализирующих окисление сульфированных фенольных соединений. В работе [41] сообщается об эффективности грибов–базидиомицетов *Agrocybe aegerita* в деградации ДБТ в *in vivo* и *in vitro*. Отмечается, что *A. aegerita* продуцирует около восьми различных продуктов метаболизма, в частности сульфоксид ДБТ, сульфан ДБТ и др., которые могут окислять до 100% ДБТ, в течение 16 сут инкубации.

Для обессеривания лигнита Михаличического региона (Эскишехир, Турция) с низким и высоким содержанием серы и золы были использованы изоляты 6 разных бактерий, 5 видов плесневых грибов и 7 разновидностей дрожжей, выделенных из разных мест (шахты открытых, закрытых и подземных карьеров, корма, растения и пищевые продукты) [42]. Полученные изоляты были использованы для исследования возможности биодесульфурации угля. В результате исследований был выделен эффективный изолят эндофитных грибов *Alternaria* sp. CF1. Оптимальными условиями, обеспечивающими удаление серы, были рН – 4, размер частиц 0.106–0.038 мм, 1%-ная плотность пульпы и 2%-ная концентрация инокулята. В течение 12 сут инкубации удалось достичь снижения органической серы в исследуемых образцах угля на 38% и сульфидной на 51%.

При десульфурации [43] низкосортных турецких лигнитов сырым лакказным ферментом, выделенным из лигнин разрушающего базидиомицета *Trametes versicolor* ATCC 200801, удалось снизить содержание как пиритной, так и органической серы на 35.13 и 25% соответственно. При этом, оптимальный размер угольных частиц составлял 200 мкм, рН – 4, процесс протекал при температуре 35°C. Сложная молекулярная структура органической серы в виде серосодержащих соединений, сложных тиофеновых кольцевых систем, ДБТ со связью С–S, ограничивало использование ацидофильных хемолитотрофных бактерий в удалении органической серы. Для удаления органической серы в углях могут быть использованы гетеротрофные микроорганизмы: бактерии родов *Pseudomonas*, *Sulfolobus*, *Rhodococcus*, а также бактериально-грибковые консорциумы и ферменты.

Таким образом, собранные в настоящем обзоре данные литературы свидетельствуют о значительных успехах исследований по удалению серы из углей с использованием различных микроорганизмов. Удаление неорганической серы может

осуществляться в основном мезофильными и умеренно термофильными ацидофильными хемолитотрофными бактериями родов *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* и некоторыми гетеротрофными бактериями, родов *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, смешанными культурами и микробными ассоциациями. Снижение содержания органической серы могут осуществлять гетеротрофные микроорганизмы родов *Pseudomonas*, *Sulfolobus*, *Rhodococcus*, *Brevibacterium* и др. В дополнение к ним, органическая сера также может быть удалена грибковой микрофлорой *Agrocybe aegerita*, *Alterneria sp*, бактериально-грибным консорциумом *Sulfolobus solfataricus* и *Phanerochaeta chrysosporium* ME446 и продуктами метаболизма грибов.

Биологическое обессеривание углей является, несомненно, сложным биологическим процессом и, по-видимому, обусловлено потенциалом микробных ферментов и циклических комплексных соединений, выделяемых различными микроорганизмами, обитающих на углях. Проведенные к настоящему времени исследования свидетельствуют о том, что биотехнологические методы биодесульфурации углей в настоящее время проводятся главным образом в масштабах лабораторий, а широкомасштабная коммерциализация этих технологий до сих пор остается недостаточно реализованной. Возможный коммерческий потенциал применения биоокисления пирита из угля был изучен в США, Италии и в Германии [44–46]. Полученные весьма многообещающие результаты способствовали проектированию и строительству в ряде стран Европы полукommerческих пилотных установок по биодепиритизации углей [11].

Подводя итоги обзора по биодесульфурации углей, следует отметить перспективность биотехнологического подхода в процессах их обессеривания, что позволит решить экологические проблемы, связанные с его сжиганием. Использование потенциальных способностей микроорганизмов окислять серу до сульфитов и сульфатов при биодесульфурации высокосернистых углей позволит создать биореакторы требуемых мощностей в промышленных масштабах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Назимко Е.И. // Вісті Донецького гірничого інституту. 2014. № 2. С. 60–65
2. Pawelec B., Navarro R.M., Campos-Martin J.M., Fierro J.L. // Catal. Sci. Technol. 2011. V. 1. № 1. P. 23–42.
3. Nuhu A.A. // Rev. Environ. Sci. Bio/Technol. 2013. V. 12. № 1. P. 9–23.
4. Demir U. // J. Environ. Sci. Eng. A. 2017. V. 6. P. 31–38. <https://doi.org/10.17265/2162-5298/2017.01.004>
5. Deska M., Głodniok M., Ulfig K. // J. Ecol. Eng. 2018. V. 19. № 2. P. 213–220. <https://doi.org/10.12911/22998993/82959>
6. Xia W. // J. Cleaner Product. 2018. V. 172. P. 2708–2710.
7. Mishra S., Pradhan N., Panda S., Akcil A. // Fuel Process. Technol. 2016. V. 152. P. 325–342.
8. Иванов И.П., Иванова Д.И., Баранова М.П., Михайленко С.А. // Сб. докл. Первого международного научно-технического конгресса “Энергетика в глобальном мире”. Красноярск: ООО “Версо”. 2010 г. С. 391–392.
9. Иванов И.П., Теремова М.И., Еремина А.О., Головина В.В., Фетисова О.Ю., Скворцова Г.П., Чесноков Н.В., Кузнецов Б.Н. // Журн. Сибирского федерального университета. Серия: Химия. 2014. Т. 7. № 2. С. 209–220.
10. Xia W., Xie G., Peng Y. // Powder Technol. 2015. V. 277. P. 206–221.
11. Rossi G. // Geobiotechnology II. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. P. 147–167.
12. Hong F.F., He H., Liu J.Y., Tao X.X., Zheng L., Zhao Y.D. // The Sci. World J. 2013. V. 2013. P. 1–9. doi.org/<https://doi.org/10.1155/2013/184964>
13. Jatoi A.S., Aziz S., Soomro S.A. // 4th Int. Conf. Energy Envir. Sustainable Development. Jamshoro, Sindh Pakistan: Energy. Environ. Eng. Res. Group, 2016.
14. Блайда И.А., Васильева Т.В. // Микробиология и биотехнология. 2017. № 3. С. 6–23. doi.org/[https://doi.org/10.18524/2307-4663.2017.3\(39\).110877](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2017.3(39).110877)
15. Li Z., Sun T., Jia J. // Fuel Process. Technol. 2010. V. 91. № 9. P. 1162–1167.
16. Marinov S. P., Gonsalvesh L., Stefanova M., Yperman J., Carleer R., Reggers G., Gadjanov P. // Thermochemica Acta. 2010. V. 497. № 1–2. P. 46–51.
17. Zhang S.F., Wen L.Y., Kun W.A.N.G., Chong Z.O.U., Jian X.U. // J. Iron. Steel Res. Inter. 2015. V. 22. № 10. P. 897–904.
18. Vera M., Schippers A., Sand W. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 97. № 17. P. 7529–7541.
19. Singh P.K., Singh A.L., Kumar A., Singh M.P. // Fuel. 2013. V. 106. P. 876–879.
20. Hedrich S., Schlömann M., Johnson D.B. // Microbiology. 2011. V. 157. № 6. P. 1551–1564.
21. Dopson M., Johnson D.B. // Environ Microbiol. 2012. V. 14. № 10. P. 2620–2631.
22. Vardanyan N.S., Vardanyan A.K. // Extremophiles. Eur. Ecosyst.: Ecol. Diversity Appl. Singapore: Springer, 2018. P. 187–218.
23. Nazari F., Kefayati M.E., Raheb J. // J. Sci. IRI. 2017. V. 28. № 3. P. 205–219.
24. Eghbali F., Ehsani M.R. // Iranian J. Chem. Chem. Eng. (IJCCCE). 2010. V. 29. № 4. P. 75–78.
25. Yang X., Wang S., Liu Y., Zhang Y. // Can. J. Microbiol. 2014. V. 61. № 1. P. 65–71.
26. He H., Hong F.F., Tao X.X., Li L., Ma C.Y., Zhao Y.D. // Fuel Process. Technol. 2012. V. 101. P. 73–77.
27. Aytar P., Kay C.M., Mutlu M.B., Cabuk A. // Energy Fuels. 2013. V. 27. № 6. P. 3090–3098.
28. Cardona I.C., Márquez M.A. // Fuel Process. Technol. 2009. V. 90. № 9. P. 1099–1106.
29. Kiani M.H., Ahmadi A., Zilouei H. // Fuel. 2014. V. 131. P. 89–95.
30. Liu T., Hou J., Peng Y. // Intl. J. Min. Process. 2017. V. 162. P. 6–11.

31. Caicedo G., Prada M., Pelaez H., Moreno C., Marquez M. // *Dyna*. 2012. V. 79. № 174. P. 114–118.
32. Singh P.K., Singh A.L., Kumar A., Singh M.P. // *Fuel*. 2013. V. 106. P. 876–879.
33. El-Midany A.A., Abdel-Khalek M.A. // *Fuel*. 2014. V. 115. P. 589–595.
34. Bhanjadeo M.M., Rath K., Gupta D., Pradhan N., Biswal S.K., Mishra B.K., Subudhi U. // *PloS ONE*. 2018. V. 13. № 3. P. e0192536. doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192536
35. Çelik P.A., Aksoy D.Ö., Koca S., Koca H., Çabuk A. // *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2019. V. 16. № 4. P. 2115–2132.
36. Singh A.L., Singh P.K., Singh M.P. // *Energ. Explor. Exploit.* 2012. V. 30. № 5. P. 837–852.
37. Mishra S., Panda S., Pradhan N., Satapathy D., Biswal S.K., Mishra B.K. // *Int. Biodet. Biodeg.* 2017. V. 120. P. 124–134.
38. Mishra S., Panda P.P., Pradhan N., Satapathy D., Subudhi U., Biswal S.K., Mishra B.K. // *Fuel*. 2014. V. 117. P. 415–421.
39. Gonsalvesh L., Marinov S.P., Stefanova M., Carleer R., Yperman J. // *Fuel*. 2012. V. 97. P. 489–503.
40. Handayani I., Paisal Y., Soepriyanto S., Chaerun S.K. // *Hydrometallurgy*. 2017. V. 168. P. 84–93.
41. Aranda E., Kinne M., Kluge M., Ullrich R., Hofrichter M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 82. № 6. P. 1057–1066.
42. Aytar P., Aksoy D.O., Toptas Y., Çabuk A., Koca S., Koca H. // *Fuel*. 2014. V. 116. P. 634–641.
43. Aytar P., Gedikli S., Şam M., Ünal A., Çabuk A., Kollankaya N., Yürüm A. // *Fuel Process. Technol.* 2011. V. 92. № 1. P. 71–76.
44. Olson G.J. // *Fuel Process. Technol.* 1994. V. 40. № 2–3. P. 103–114.
45. Beyer M., Ebner H.G., Klein J. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1986. V. 24. № 4. P. 342–346.
46. Uhl W., Höne H.J., Beyer M., Klein J. // *Biotechnol. Bioeng.* 1989. V. 34. № 11. P. 1341–1356.

Microorganisms in the Desulphurization of Coal (Review)

V. I. Kotelnikov^a, Ch. A. Saryglar^a, and R. B. Chysyma^{a,*}

^aTuva Institute for Exploration of Natural Resources of the Siberian Branch of the RAS, Kyzyl, 667007 Russia

*e-mail: chysyma@mail.ru

Information on the use of microorganisms and mixed consortia in the biological desulfurization of coal is summarized. Ecological problems are shown when burning high-sulfur coals, the prospects of environmentally friendly and resource-saving biotechnological approaches to desulfurization of coal are considered. The analysis of available literature indicates the enormous role of microorganisms of various taxonomic groups in the removal of inorganic and organic sulfur in coals. The dominant role of mesophilic and moderately thermophilic acidophilic chemolithotrophic bacteria (ACB) of the genus *Acidithiobacillus* – *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *A. caldus*, as well as some heterotrophic bacteria *Bacillus subtilis* and *Paenibacillus polymyxa* in the removal of inorganic sulfur. Mixed cultures and associations of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from coal mines or from the surface structure of coal are considered as one of the effective tools in the biosulfurization of pyrite sulfur. The possibilities of microbial desulfurization of organic coal sulfur using heterotrophic microorganisms of the genera *Pseudomonas*, *Sulfolobus*, *Rhodococcus*, fungi *Agrocybe aegerita*, *Alternaria sp* and bacterial-fungal consortia *Sulfolobus solfataricus* and *Phanerochaeta chrysosporium* ME446, a laccase enzyme of basidiomycetes *Trametes versicolor* ATCC 20080.

Keywords: coal, sulfur, desulfurization, mesophilic and thermophilic ACB, heterotrophic microorganisms, bacteria, fungi, dibenzothiophene

УДК 577.151;579.66

АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ЦЕФАЗОЛИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТАЗЫ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ-КИСЛОТ

© 2020 г. А. В. Скляренко¹, *, И. А. Грошкова¹, А. И. Сидоренко¹, С. В. Яроцкий¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный исследовательский центр
“Курчатовский институт” (НИЦ – “Курчатовский институт”), Москва, 123182 Россия

*e-mail: asklyarenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.03.2020 г.

После доработки 01.04.2020 г.

Принята к публикации 22.04.2020 г.

Сопоставлены два пути химико-биокаталитического синтеза антибиотика цефазолина (CEZ) из 7-амино-цефалоспороановой кислоты (7-ACA) с использованием в качестве биокатализатора иммобилизованной рекомбинантной синтетазы цефалоспоринов-кислот. Первый путь состоял в химическом замещении 3-ацетокси-группы 7-ACA с помощью 2-меркапто-5-метилтиадиазола с последующим биокаталитическим ацилированием аминогруппы полученной 7-амино-3-[2-метил-1,3,4-тиадиазол-5-ил]-тиометил]-3-цефем-4-карбоновой кислоты (TDA) метиловым эфиром 1(Н)-тетразолилуксусной кислоты. Альтернативой являлось биокаталитическое ацилирование аминогруппы 7-ACA с образованием полупродукта (S-p CEZ), который затем без выделения из реакционной смеси был химически трансформирован в CEZ. Изучение и оптимизация каждого из биокаталитических процессов показало ряд важных преимуществ ацилирования 7-ACA по сравнению с ацилированием TDA в отношении выхода процесса, концентрации продукта в конечной реакционной смеси и толерантности условий протекания процесса по отношению к активности и стабильности фермента. С учетом несомненных экологических преимуществ процесса химической трансформации S-p CEZ в CEZ по сравнению с процессом получения TDA из 7-ACA сделан вывод о предпочтительности химико-биокаталитического синтеза CEZ по второму пути.

Ключевые слова: цефазолин, биокаталитический синтез, биокатализ, синтетаза цефалоспоринов-кислот, растворимость, 7-аминоцефалоспороановая кислота

DOI: 10.31857/S055510992005013X

Цефазолин (6R,7R)-3-[(5-метил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)тиометил]-8-оксо-7-[(1Н-тетразол-1-ил)ацетиламино]-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоновая кислота (CEZ) является одним из важнейших представителей класса цефалоспоринов-кислот, включающего более полутора десятков полусинтетических парентеральных β-лактамных антибиотиков [1, 2]. Этот антибиотик входит в перечень основных лекарственных средств, рекомендуемых Всемирной организацией здравоохранения.

В настоящее время мировое производство CEZ составляет около 1000 метрических т в год (в пересчете на свободную кислоту) [3] и базируется на методах химического синтеза. Исходя из 3-(ацетилоксометил)-7-амино-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоновой кислоты (7-амино-цефалоспороановая кислота, 7-ACA) получают 7-амино-3-[2-метил-(1,3,4-тиадиазол-5-ил)-тиометил]-3-цефем-4-карбоновую кислоту (TDA) путем замещения 3-ацетокси-группы действием 2-меркапто-5-метилтиадиазола (ММТД) в

неводной среде в присутствии сильных кислот [4, 5]. Затем аминогруппу TDA ацилируют активированными производными 1(Н)-тетразолилуксусной кислоты (TzAA) в неводной или водно-органической среде при низкой температуре (–40°C), используя защиту карбоксильной группы [6, 7].

Перспективной альтернативой химическому синтезу β-лактамных антибиотиков, в том числе CEZ и других цефалоспоринов-кислот, является трансформация, катализируемая ферментами в форме гетерогенных биокатализаторов. Использование таких биокаталитических технологий позволяет снизить экологическую нагрузку на окружающую среду, а также повысить чистоту получаемых препаратов [2, 8–13].

Химико-биокаталитический синтез CEZ из 7-ACA может быть осуществлен двумя путями (рис. 1). В первом случае 7-ACA превращают в TDA традиционным химическим синтезом (рис. 1, трансформация 1), а затем осуществляют биокаталитическое ацилирование аминогруппы TDA с

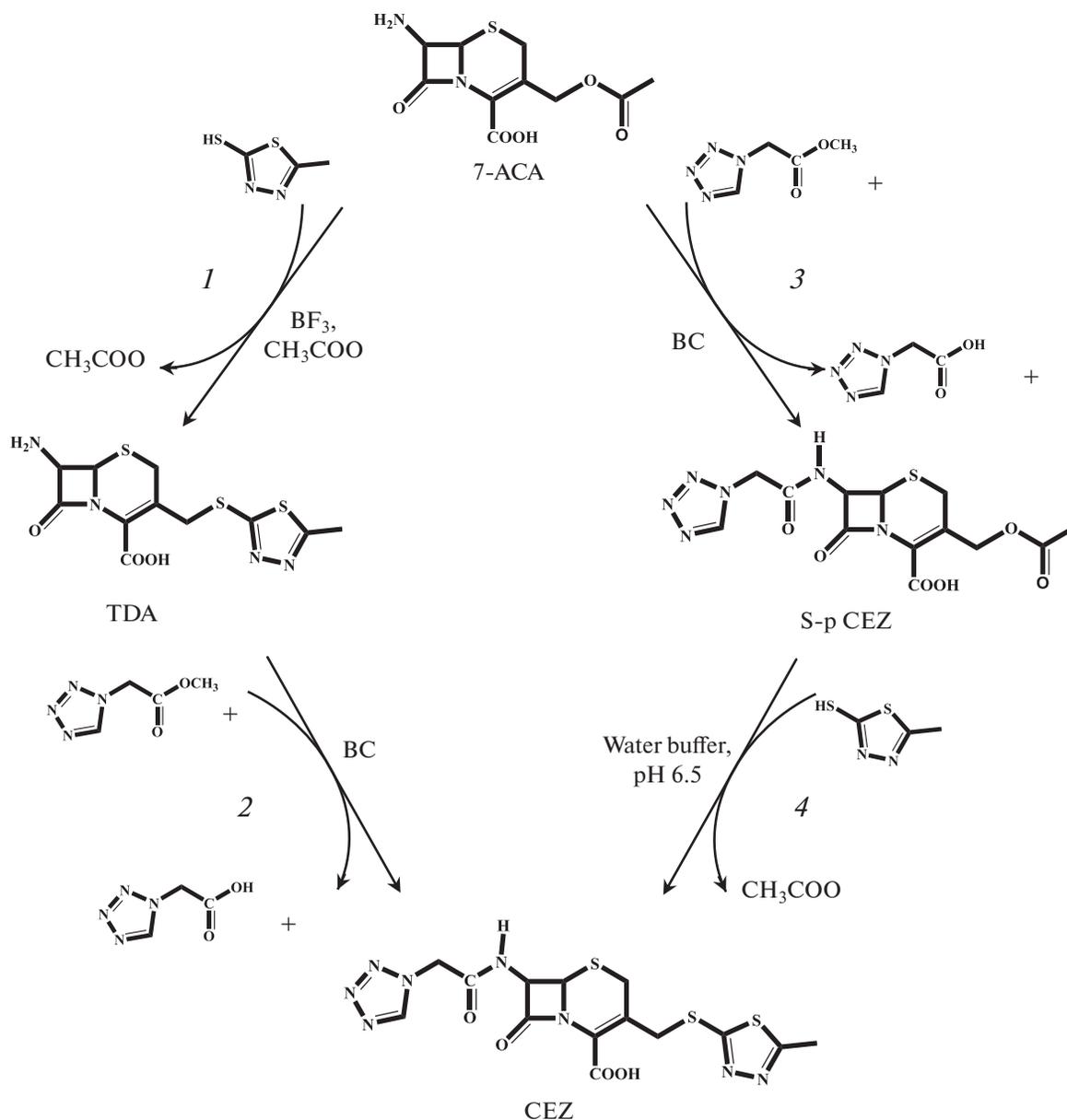


Рис. 1. Пути химико-биокаталитического синтеза CEZ. Трансформации: 1 – химический синтез TDA из 7-ACA; 2 – биокаталитический синтез CEZ из TDA; 3 – биокаталитический синтез S-p CEZ из 7-ACA; 4 – химический синтез CEZ из S-p CEZ.

образованием CEZ (рис. 1, трансформация 2). Альтернативным путем является использование биокатализа для ацилирования аминогруппы 7-ACA (рис. 1, трансформация 3) с последующим химическим превращением получаемого полупродукта CEZ (S-p CEZ) в целевой антибиотик (рис. 1, трансформация 4). В обоих случаях ацилирующим агентом служит активированное производное TzAA, а именно ее метиловый эфир (METzAA), то есть осуществляется процесс синтеза с ацильным переносом (кинетически-контролируемый синтез) [2, 14], где TDA или 7-ACA выступают в

качестве исходного β -лактама – ключевой аминокислоты (КА), а METzAA – в качестве ацилирующего агента (АА).

При проведении кинетически-контролируемого синтеза β -лактамного соединения (CEZ или S-p CEZ) фермент катализирует три конкурирующие реакции [2, 14]:

– синтез целевого продукта путем переноса ацильной группы АА (METzAA) на аминогруппу в положении С7 β -лактамного ядра КА (TDA или 7-ACA), сопровождающийся выделением метилового спирта;

– гидролиз целевого продукта с образованием соответствующей КА и TzAA;

– гидролиз METzAA с образованием TzAA и метилового спирта.

Достижимый выход целевого продукта определяется соотношением скоростей перечисленных реакций и зависит от условий их проведения и от начальных концентраций исходного β -лактама и АА.

Оптимизация биокаталитического синтеза β -лактаминового антибиотика для разработки экономически выгодного процесса должна быть направлена на достижение высокого выхода продукта трансформации при использовании возможно высокой начальной концентрации КА ($C_{КА}^0$) и возможно низкого мольного избытка АА над КА

$\left(X^0 = \frac{C_{АА}^0}{C_{КА}^0}, \text{ М/М} \right)$ [2]. Это обеспечивает достижение высокой концентрации целевого продукта (CEZ или S-p CEZ) в конечной реакционной смеси при минимизации остаточных концентраций субстратов (TDA или 7-АСА и METzAA) и побочного продукта (TzAA), что необходимо для разработки эффективной процедуры выделения антибиотика.

Одним из ферментов, высокоспецифичных к синтезу CEZ и других цефалоспоринов-кислот, является синтетазы цефалоспоринов-кислот (Cephalosporin-acid synthetase, **CASA КФ 3.5.1.11**), называемая также цефазолин синтетазой [2]. Фермент синтезируется штаммами *Escherichia coli*, которые были получены методами химического мутагенеза, такими как штаммы 1787 (Коллекция культур Государственного научного центра по антибиотикам, Россия) [15–17], FU-99-S [18], ВКПМ В-10182 [19, 20] и CGMCC No. 3508 [19]. Путем клонирования гена CASA, выделенного из штамма ВКПМ В-10182, были получены штаммы *E. coli* ВКПМ В-12206 [20, 21] и ВКПМ В-12316 [3], являющиеся высокоэффективными продуцентами рекомбинантной CASA. Ген CASA был идентифицирован как прямой гомолог гена пенициллин G ацилазы (Penicillin G acylase, **PGA**) из штамма *E. coli* ATCC 9637, несущего множественные мутации, способствующие повышению уровня синтеза фермента и его синтетазной активности [20].

В данной работе в качестве биокатализатора был использован фермент CASA из рекомбинантного штамма *E. coli* ВКПМ В-12316, иммобилизованный путем ковалентного связывания с эпоксиактивированным макропористым носителем [3] (Immobilized Enzyme CASA – **IECASA**).

В обзоре, посвященном синтезу цефалоспоринов-кислот [2], были суммированы предыдущие исследования по биокаталитическому получению CEZ, катализируемому PGA или CASA из штаммов *E. coli* [15–18, 22–24]. Высокий выход 98%

был достигнут при трансформации 7-АСА в полупродукт S-p CEZ путем биокаталитического ацилирования с помощью METzAA, но лишь при низкой начальной концентрации 7-АСА ($C_{КА}^0 = 50 \text{ мМ}$) и трехкратном мольном избытке METzAA над 7-АСА $X^0 = 3 \text{ М/М}$. Биокатализатором служила PGA, иммобилизованная на глиоксилагарозе [23, 24]. При биокаталитической трансформации TDA в CEZ в водной среде с использованием в качестве биокатализатора CASA из мутантного штамма *E. coli* FU-99-S, иммобилизованной в полиакриламидном геле [2, 18], или CASA из рекомбинантного штамма *E. coli* ВКПМ В-12206, ковалентно связанной с макропористым носителем [2, 21], был достигнут выход CEZ более 90%, однако лишь при относительно низкой начальной концентрации TDA ($C_{КА}^0 = 60\text{--}80 \text{ мМ}$) и высоком мольном избытке METzAA над TDA ($X^0 \geq 4 \text{ М/М}$).

Ранее авторами было проведено исследование влияния pH и исходных концентраций TDA и METzAA на эффективность кинетически-контролируемого синтеза CEZ, учитывающее pH-зависимости растворимости всех компонентов реакционной смеси [3]. На основе полученных данных был разработан способ биокаталитического синтеза CEZ в водной среде при регулируемом ступенчатом градиенте pH, делающий возможным осуществление процесса при высокой исходной концентрации TDA ($C_{КА}^0 = 150\text{--}200 \text{ мМ}$) и обеспечивающий выход CEZ 92–95% при $X^0 \leq 3.5 \text{ М/М}$. Использованный при этом биокатализатор, полученный нами путем иммобилизации рекомбинантной CASA из штамма *E. coli* ВКПМ В-12316 на макропористом носителе, продемонстрировал хорошую стабильность в ходе операционных испытаний, осуществленных в Сычуаньском индустриальном институте антибиотиков (Китай) [3].

Цель работы – разработка способа получения CEZ, включающего биокаталитический синтез полупродукта из 7-АСА методом ацильного переноса и сопоставление эффективности двух альтернативных методов получения антибиотика при использовании биокатализатора IECASA.

МЕТОДИКА

Материалы. Образцы METzAA (чистота 98%, определена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, **ВЭЖХ**) и MMTD, (чистота 97%, **ВЭЖХ**) предоставлены Сычуаньским индустриальным институтом антибиотиков (Китай). Остальные использованные реагенты: 7-АСА (“Anhui BBCA Pharmaceutical”, Китай, чистота 97%, **ВЭЖХ**); натриевая соль CEZ (“Sigma-Aldrich”, США стандарт, чистота 98%, **ВЭЖХ**); TzAA (“Sigma-Aldrich” США стандарт, чистота 99.9%,

Таблица 1. Условия анализа реакционных смесей методом ВЭЖХ

Реакционная смесь	Компонент	Мобильная фаза		Детекция, нм	RT, мин
		pH буфера	Содержание метанола, % (об./об.)		
Биокаталитический синтез S-p CEZ	7-ACA	2.1	21	254	3.2–3.5
	S-p CEZ				5.5–6.5
	TzAA				3.0–3.3
	METzAA				10–11
Модификация S-p CEZ с образованием CEZ	7-ACA	2.1	28	254	2.8–3.0
	S-p CEZ				3.9–4.3
	MMTD				5.3–5.7
	CEZ				9.0–9.5
Биокаталитический гидролиз S-p CEZ	7-ACA	2.1	21	254	3.2–3.5
Биокаталитический гидролиз CEZ	TDA	4.0	24	254	6.8–7.2
Растворимость 7-ACA	7-ACA	2.1	21	254	3.2–3.5
Растворимость S-p CEZ	S-p CEZ	2.1	21	254	5.5–6.5
Растворимость CEZ	CEZ	4.0	28	254	6.0–6.5

ВЭЖХ). Образец S-p CEZ с ВЭЖХ чистотой 94.8%, использовавшийся в качестве стандарта при анализах методом ВЭЖХ, а также для изучения растворимости, был выделен осаждением при pH 2.0 из реакционной смеси, полученной путем биокаталитического синтеза с последующей очисткой методом перекристаллизации.

Получение биокатализатора IECASA. Использованный в работе образец IECASA был получен путем выделения CASA из биомассы клеток штамма *E. coli* VKPM В-12316 и иммобилизации фермента на макропористом эпокси-активированном носителе Seplite LX-1000EP (“Sunresin New Materials”, Китай) как это описано в работе [3]. Синтетазная активность IECASA, определенная по синтезу CEZ [3], составила 420 МЕ/г влажного биокатализатора при содержании сухих веществ 37.2%.

За 1 международную единицу ферментативной (синтетазной) активности образца в реакции синтеза цефазолина (1 МЕ) принимали количество фермента, катализирующее получение 1 мкмоль продукта за 1 мин в растворе, содержащем 60 мМ TDA и 240 мМ METzAA при pH 7.5 и 30°C.

Анализ методом ВЭЖХ. Анализы проб методом ВЭЖХ осуществляли в изократическом режиме с использованием хроматографа фирмы Gilson (США), оснащенного УФ-детектором, на колонке Spherisorb ODS, 250 × 4 мм с размером частиц 7.5 мкм, при температуре 30°C, скорости потока 1.0 мл/мин и детекции при 214 или 254 нм. В качестве мобильной фазы использовали смесь 50 мМ фосфатно-аммонийного буфера с метанолом. Условия анализа различных реакционных смесей методом ВЭЖХ и времена удерживания компонентов (RT) приведены в табл. 1.

Проведение биокаталитического синтеза S-p CEZ.

Синтез S-p CEZ осуществляли в стеклянном реакторе, оснащенный механической лопастной мешалкой и системами контроля и поддержания pH и температуры, при начальном объеме реакционной смеси 75 мл. Исходный раствор субстратов (7-ACA и METzAA) с выбранными начальными концентрациями ($C_{КА}^0$ и C_{AA}^0) готовили при 30°C и постоянном перемешивании. Аликвоту 7-ACA суспендировали в 0.3 М фосфатно-натриевом буфере (ФБ) с pH 8.3, суспензию перемешивали до прекращения снижения pH, затем при интенсивном перемешивании небольшими порциями добавляли 2 М NaOH вплоть до полного растворения 7-ACA при pH 6.8–7.2. В полученный раствор вносили аликвоту METzAA, перемешивали до растворения и доводили объем раствора до 75 мл 0.3 М ФБ с pH 7.0. При умеренном перемешивании при 30°C запускали процесс синтеза внесением IECASA в раствор субстратов в количестве 1.8 г влажного биокатализатора (концентрация фермента в реакционной смеси $C_E = 10$ МЕ/мл). В ходе синтеза pH спонтанно снижался до 6.0, а затем его поддерживали на этом уровне путем добавления 2 М NaOH до завершения процесса. Процесс останавливали, отделяя биокатализатор от реакционной смеси фильтрованием на пористом стеклянном фильтре.

Для изучения динамики синтеза S-p CEZ в пробах, отбираемых из реакционной смеси по ходу процесса, методом ВЭЖХ определяли содержание четырех компонентов: S-p CEZ, 7-ACA, METzAA и TzAA. Процесс синтеза проводили до достижения стабильного плато на зависимости текущей концентрации S-p CEZ от времени. Максимальную степень трансформации 7-ACA в S-p

CEZ (максимальный выход S-р CEZ η^{\max} , %) рассчитывали по формуле $\eta^{\max} = \frac{C_{\text{prod}}^{\max}}{C_{\text{KA}}^{\circ}} \times 100$, где C_{prod}^{\max} – максимальная концентрация целевого продукта (средние данные на плато); C_{KA}° – начальная концентрация КА.

Определение бимолекулярных констант реакций гидролиза CEZ и S-р CEZ. Процессы гидролиза CEZ или S-р CEZ, катализируемые IECASA, проводили в конических колбах, помещенных в водяной шейкер-инкубатор, при постоянном перемешивании при 30°C в 0.3 М ФБ, pH 6.5, варьируя начальные концентрации гидролизуемого β -лактамного соединения (C° , мМ) в пределах от 5 до 30 мМ. Каждая реакционная смесь, объемом 10 мл содержала 30–40 мг влажного биокатализатора с известным содержанием сухих веществ. Текущую концентрацию образующейся аминокислоты (TDA или 7-ACA) в реакционной смеси определяли методом ВЭЖХ, отбирая пробы каждые 3–5 мин. По линейному участку кривой накопления продукта определяли начальную скорость гидролиза CEZ или S-р CEZ в пересчете на 1 г сухого биокатализатора (V , мМ мин⁻¹ г⁻¹). Результаты, согласно методу Лайнувера–Берка [25], представляли в виде зависимости $1/V$ от $1/C^{\circ}$, полученные прямые обрабатывали в программе Excel и рассчитывали бимолекулярные константы гидролитического процесса, отнесенные к 1 г сухого биокатализатора (V_{max}/K_m , мин⁻¹ г⁻¹), где K_m (мМ) – константа Михаэлиса, V_{max} (мМ мин⁻¹ г⁻¹) – максимальная скорость ферментативной реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Растворимость соединений, вовлеченных в процессы биокаталитического синтеза CEZ и S-р CEZ. В реакционной смеси, получаемой при биокаталитическом синтезе β -лактамного антибиотика методом ацильного переноса, присутствуют четыре компонента: целевой продукт (CEZ или S-р CEZ), КА (TDA или 7-ACA), AA (METzAA) и побочный продукт (TzAA). Учет их растворимости является важным инструментом оптимизации процессов биокаталитической трансформации и последующего выделения целевого продукта. [3, 26]. Имеющиеся в литературе данные о растворимости указанных выше соединений, а также результаты изучения растворимости 7-ACA, S-р CEZ и CEZ, полученные в настоящей работе, приведены в табл. 2.

Ранее [3] в условиях, моделирующих процесс синтеза CEZ, были изучены растворимость неэлектролита METzAA, pH-зависимость растворимости аминокислоты TDA и продемонстрирован эффект перенасыщения раствора TDA при

снижении pH. Полученные данные позволили разработать эффективный метод биокаталитического синтеза CEZ в ступенчатом градиенте pH с использованием исходной концентрации TDA ($C_{\text{KA}}^{\circ} = 150\text{--}200$ мМ), многократно превосходящей ее растворимость при нейтральных pH, оптимальных для функционирования биокатализатора.

В настоящем исследовании были изучены pH-зависимости растворимости таких компонентов реакционной смеси синтеза S-р CEZ, как КА (7-ACA) и целевой продукт S-р CEZ, а также антибиотика CEZ, получаемого в той же реакционной смеси без выделения полупродукта путем замещения в нем 3-ацетокси-группы с помощью MMTD. Влияние pH на растворимость 7-ACA, S-р CEZ и CEZ изучали методом насыщения [26, 27] в условиях, подобранных ранее для биокаталитического синтеза CEZ (0.3 М ФБ, 30°C) [3]. Методика проведения эксперимента описана в работах [3, 26].

Зависимость от pH растворимости (S , М) монокарбоновых кислот S-р CEZ и CEZ, а также TzAA описывается уравнением (1):

$$S = S^{\circ} + \frac{S^{\circ} K_1}{[H^+]}. \quad (1)$$

Зависимость от pH растворимости (S , мМ) аминокислот (7-ACA и TDA), имеющих по две ионенные группы, описывается уравнением (2):

$$S = S^{\pm} \frac{[H^+]^2 + K_1 [H^+] + K_1 K_2}{K_1 [H^+]}. \quad (2)$$

В условиях полного протонирования карбоксильной группы аминокислоты, то есть при нейтральных и щелочных значениях pH, применимо уравнение (2.1):

$$S = S^{\pm} + S^{\pm} K_2 \frac{1}{[H^+]}. \quad (2.1)$$

В уравнениях (1), (2) и (2.1) использованы следующие обозначения:

$[H^+]$ – концентрация ионов водорода при заданном pH, мМ;

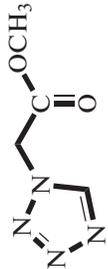
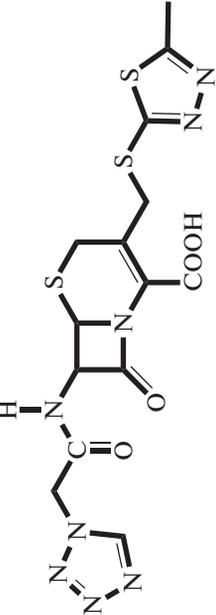
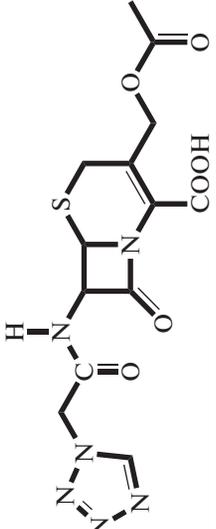
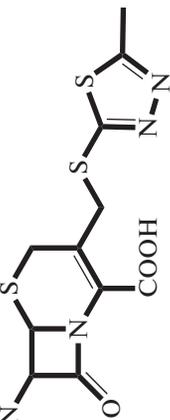
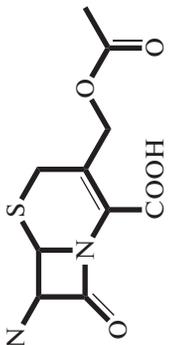
K_1 – константа ионизации карбоксильной группы монокарбоновой кислоты или аминокислоты, мМ;

K_2 – константа ионизации аминогруппы аминокислоты, мМ;

S° – растворимость индивидуальной незаряженной формы монокарбоновой кислоты (характеристическая растворимость электролита), мМ;

S^{\pm} – растворимость индивидуальной электро-нейтральной цвиттерионной формы аминокислоты (характеристическая растворимость электролита), мМ.

Таблица 2. Кислотно-основные свойства и растворимость соединений, вовлеченных в процессы получения CEZ

Соединение	Структура	Электрохимическая природа	Константы ионизации		Характеристическая растворимость, мм*	Условия определения, ссылка
			pK ₁	pK ₂		
MEtzAA		Неэлектролит	–	–	402	20°C, H ₂ O [15]
TzAA		Электролит, монокарбоновая кислота	2.2	–	1440	30°C, 0.3 М ФБ, рН 6.5 [3]
CEZ		Электролит, монокарбоновая кислота	2.38	–	0.66	20°C, H ₂ O [15]
S-p CEZ		Электролит, монокарбоновая кислота	2.16 ± 0.05	–	32.6 ± 1.6	30°C, 0.3 М PhNaВ (настоящая работа)
TDA		Электролит, аминокислота	2.46	5.04	0.29	20°C, H ₂ O [15]
7-ACA		Электролит, аминокислота	Н/о**	5.21	0.28	30°C, 0.3 М ФБ [3]
			2.64	4.83	2.64	20°C, 0.1 М NaCl [28]
			Н/о**	4.70 ± 0.05	2.79 ± 0.14	30°C, 0.3 М ФБ (настоящая работа)

* Характеристическая растворимость электролита — это растворимость его электронейтральной формы: цвиттерной формы аминокислоты (S[±]) или незаряженной формы монокарбоновой кислоты (S⁰).

** Н/о — не определяли.

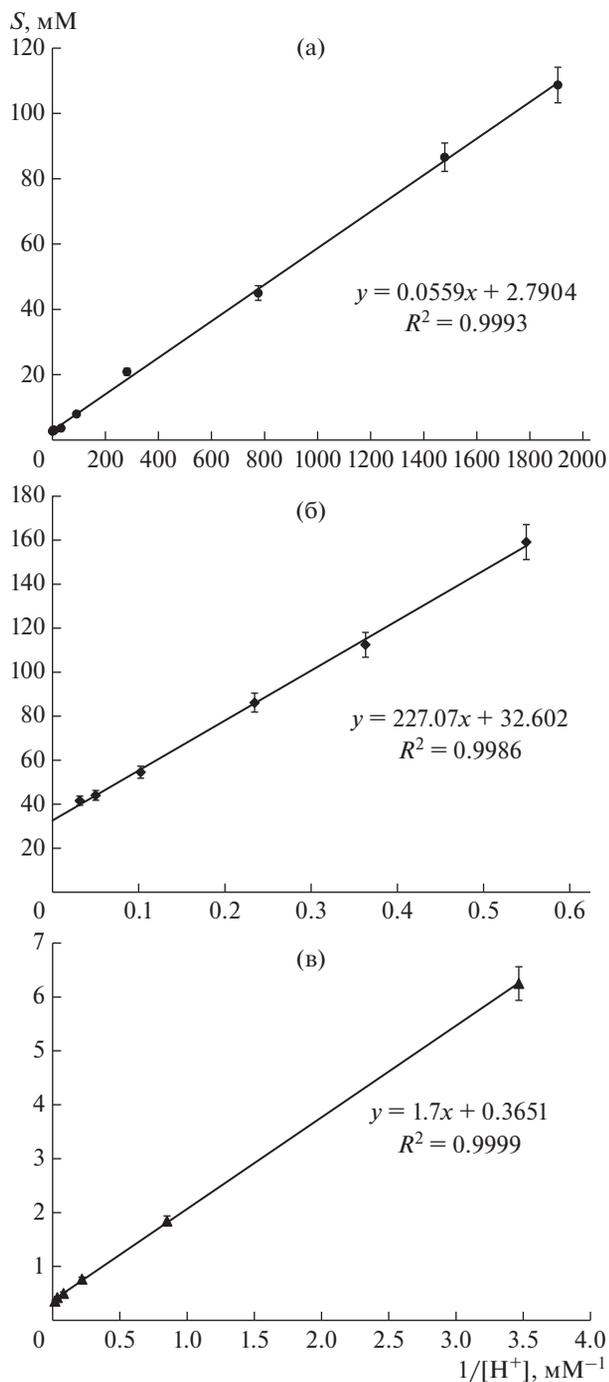


Рис. 2. Зависимость растворимости КА и продуктов биокаталитического синтеза от рН (30°C, 0.3 М ФБ): а – 7-АСА – в координатах уравнения (2.1); б – S-р CEZ, в – CEZ в координатах уравнения (1).

Использование приведенных выше уравнений позволяло рассчитывать константы, определяющие растворимость электролитов [26].

На рис. 2а показана линеаризация в координатах уравнения (2.1) (S vs. $1/[H^+]$) экспериментальных данных, полученных при изучении влияния рН на растворимость аминокислоты 7-АСА в обла-

сти рН, близкой к значению pK_2 , известному из литературных данных (табл. 2) [28]. Линеаризация экспериментальных данных, полученных при изучении влияния рН на растворимость монокарбоновых кислот S-р CEZ и CEZ в кислой области рН, представлена на рис. 2б и 2в соответственно. Рассчитанные значения характеристической растворимости (S^\pm или S^0) и констант ионизации аминокислоты (pK_2) или карбоксильной группы монокарбоновых кислот (pK_1) сопоставлены с опубликованными ранее данными в табл. 2. Величины pK_2 и S^\pm для 7-АСА, определенные нами в 0.3 М ФБ при 30°C, практически совпадали с константами, определенными в 0.1 М NaCl при 20°C [28]. Сопоставление констант, определенных для 7-АСА и TDA в одинаковых условиях (0.3 М ФБ, 30°C), показало, что замена 3-ацетокси-группы на ММТД приводило к смещению величины pK_2 , характеризующей ионизацию аминокислоты в С7 положении β -лактама, на 0.5 единиц в щелочную область и к 10-кратному уменьшению S^\pm . Это влечет за собой существенное снижение растворимости аминокислоты в диапазоне рН 6.0–8.0, используемом для осуществления биокаталитического синтеза. В случае монокарбоновых кислот S-р CEZ и CEZ замена 3-ацетокси-группы на ММТД также снижала характеристическую растворимость в 10 раз. При этом величина pK_1 , характеризующая ионизацию карбоксильной группы в С4 положении β -лактама, незначительно смещалась в щелочную область (на 0.17).

Сопоставление констант, определенных для CEZ в воде при 20°C [15] и в 0.3 М ФБ при 30°C, свидетельствовало о том, что увеличение ионной силы среды и повышение температуры не влияло на величину pK_1 , но почти вдвое снижало характеристическую растворимость S^0 .

На рис. 3 показаны рассчитанные с использованием констант, представленных в табл. 2, теоретические кривые зависимости растворимости компонентов реакционных смесей, получаемых при биокаталитическом синтезе CEZ и S-р CEZ, от рН.

Растворимость METzAA, не являющегося электролитом, не зависела от рН. Ранее было установлено [3], что в 0.3 М ФБ при 30°C она составляла 1440 мМ (табл. 2), что позволяло использовать METzAA в высоких концентрациях как АА при биокаталитическом синтезе. В случае TzAA низкое значение pK_1 и высокое значение S^0 (табл. 2) уже при рН 2.7 обеспечивали высокую растворимость $S = 2560$ мМ (рис. 3, 5). В области рН 6.0–8.0, где протекают реакции, катализируемые IECASA [3], растворимость этого побочного продукта процессов синтеза с ацильным переносом столь высока, что его выпадение в осадок не может осложнять процесс при доступных исходных концентрациях субстратов.

При биокаталитическом синтезе CEZ низкая растворимость TDA в рабочем диапазоне pH 6.0–8.0 (рис. 3, кривая 1) являлась основным осложняющим фактором для приготовления исходной реакционной смеси и осуществления процесса при высокой исходной концентрации КА ($C_{КА}^0$) без выпадения осадка в ходе синтеза [3]. В диапазоне pH 6.0–8.0 растворимость 7-АСА примерно в 32 раза превосходила растворимость TDA (рис. 3, кривые 1, 2), что обеспечивало существенные преимущества процесса биокаталитического синтеза S-р CEZ по сравнению с синтезом CEZ, как на стадии приготовления исходной реакционной смеси, так и при проведении биокаталитической трансформации.

Кривая, описывающая зависимость растворимости S-р CEZ от pH, сдвинута в сторону низких значений pH по сравнению с соответствующей кривой для CEZ (рис. 3, кривые 3 и 4), а уровень значений S для полупродукта более чем в 130 раз превосходит растворимость CEZ при том же pH. Например, при pH 4.0 растворимость S-р CEZ и CEZ составляла 2300 мМ и 17 мМ соответственно. В рабочем диапазоне pH 6.0–8.0 оба продукта прекрасно растворимы, что обеспечивало их сохранение в растворе в процессе биокаталитической трансформации. Растворимость продуктов в области низких pH важна для разработки метода выделения их из конечной реакционной смеси путем осаждения. Относительно высокая растворимость S-р CEZ при pH около 2.0 была негативным фактором, так как влекла за собой потери продукта при осаждении. В этой связи целесообразна разработка процесса химической трансформации S-р CEZ в CEZ непосредственно в конечной реакционной смеси после биокаталитической трансформации без выделения полупродукта.

Биокаталитический синтез полупродукта CEZ, катализируемый IECASA. Биокаталитическую трансформацию 7-АСА в S-р CEZ осуществляли в 0.3 М ФБ при 30°C, $C_E = 10$ МЕ/мл, варьируя $C_{КА}^0$ в диапазоне 55–320 мМ и X^0 в диапазоне 1.5–3.5 М/М при C_{AA}^0 не более 830 мМ, что не превышало растворимость METzAA в условиях опыта (табл. 2, рис. 3, кривая 6). Высокая растворимость 7-АСА при pH близких к нейтральному (рис. 3, кривая 2), позволила во всем использованном диапазоне $C_{КА}^0$ растворять ее при pH ~ 7.0. Это являлось существенным преимуществом перед процедурой приготовления раствора КА для синтеза CEZ [3], когда из-за низкой растворимости TDA ее необходимо растворять при высоком pH (вплоть до 8.5), неблагоприятном для стабильности β -лактама, при этом удавалось достичь $C_{КА}^0$ не более 200 мМ. Начинать синтез CEZ приходилось также при pH 8.2–8.3, неблагоприятном для активности и стабильности IECASA [3].

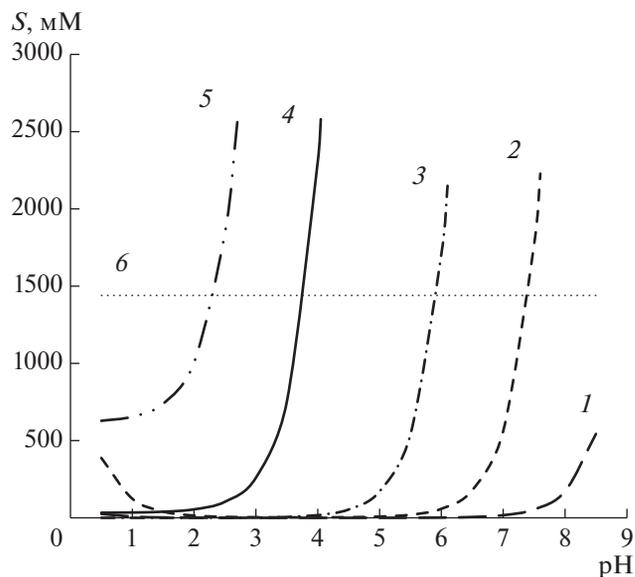


Рис. 3. Теоретические кривые зависимости растворимости от pH, рассчитанные с использованием констант в табл. 2: 1 – TDA, 2 – 7-АСА (30°C, 0.3 М ФБ), уравнение (2); 3 – CEZ; 4 – S-р CEZ (30°C, 0.3 М ФБ) уравнение (1); 5 – TzAA (20°C, вода), уравнение (1); 6 – METzAA (30°C, 0.3 М ФБ).

Синтез S-р CEZ начинали при pH 6.8–7.2 после последовательного внесения METzAA и биокатализатора в раствор 7-АСА и проводили при спонтанно снижающемся pH с 7.0 до 6.0, т.е. в условиях, оптимальных для функционирования и стабильности IECASA. Далее поддерживали pH 6.0 до завершения трансформации. Снижение pH по ходу процесса синтеза β -лактама обусловлено образованием свободной TzAA – продукта побочных гидролитических реакций, в первую очередь METzAA (рис. 1). Снижение pH может сопровождаться выпадением в осадок неацелированной КА, если ее остаточная концентрация, превысит растворимость данного соединения при текущем pH, как это наблюдалось при трансформации слабо растворимой TDA в CEZ в спонтанном градиенте pH от 8.2–8.3 до 6.0 [3]. Критическое значение pH, при котором происходило выпадение КА, зависит от констант ионизации аминокислоты, определяющих pH-зависимость ее растворимости (табл. 2), а также от операционных параметров $C_{КА}^0$ и X^0 , определяющих при заданных температуре и C_E степень трансформации КА в целевой β -лактаме к моменту достижения критического pH. Для осуществления процесса синтеза CEZ был разработан ступенчатый градиент pH, при котором на фоне самопроизвольного снижения pH реакционной смеси от начального значения 8.2–8.3 последовательно проводили его искусственное поддержание на уровнях 6.8 и 6.0, что обеспечивало сохранение TDA в растворе [3].

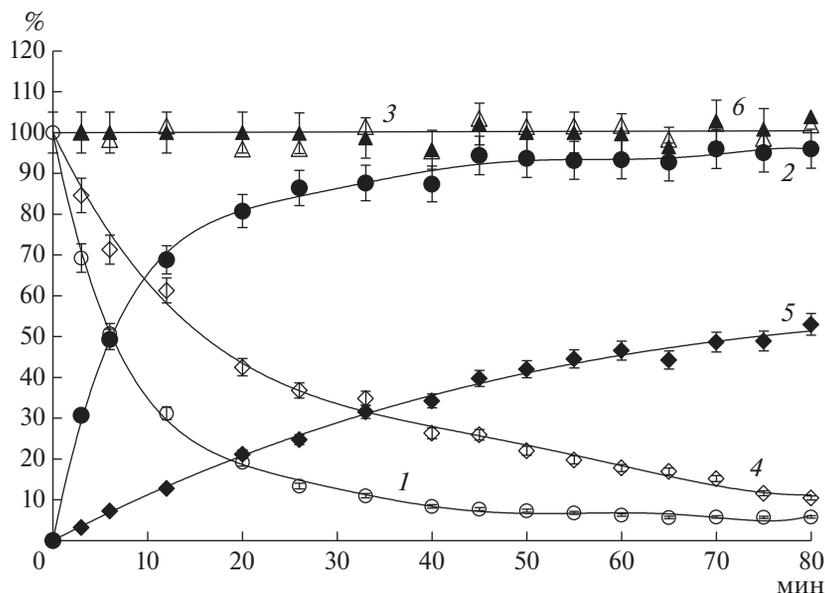


Рис. 4. Изменение состава реакционной смеси (относительные концентрации, %) от времени при синтезе S-р CEZ, катализируемом IECASA (30°C , 0.3 M ФБ, $C_E = 10\text{ ME/мл}$, $C_{\text{КА}}^{\circ} = 320\text{ mM}$, $C_{\text{АА}}^{\circ} = 800\text{ mM}$, $X^{\circ} = 2.5\text{ M/M}$). 1 – 7-АСА; 2 – S-р CEZ, рассчитаны по отношению к $C_{\text{КА}}^{\circ}$; 3 – баланс (%) по β -лактаму, сумма относительных концентраций 7-АСА и S-р CEZ; 4 – METzAA; 5 – TzAA, рассчитаны по отношению к $C_{\text{АА}}^{\circ}$; 6 – баланс (%) по TzAA – сумма относительных концентраций S-р CEZ, METzAA и TzAA.

В настоящем исследовании трансформацию 7-АСА в S-р CEZ в диапазоне pH от 7.0 до 6.0 осуществляли в спонтанном градиенте, и при этом процесс не был осложнен выпадением КА даже при высоком избытке METzAA ($X^{\circ} = 3.0\text{ M/M}$), способствующем интенсивному выделению TzAA, в сочетании с $C_{\text{КА}}^{\circ}$ вплоть до 275 mM. Растворимость 7-АСА закономерно падала при снижении pH (рис. 3, кривая 2) до $S = 60\text{ mM}$ при pH 6.0, однако в выбранных операционных условиях ее уровень во всем рабочем диапазоне pH был достаточно высок для сохранения нетрансформированной КА в растворе. Снижение избытка АА до $X^{\circ} = 2.5\text{ M/M}$ позволяло осуществить синтез S-р CEZ в спонтанном градиенте pH и при более высокой начальной концентрации 7-АСА $C_{\text{КА}}^{\circ} = 320\text{ mM}$.

На рис. 4 показана зависимость от времени состава реакционной смеси, образующейся при кинетически-контролируемом синтезе S-р CEZ, катализируемом IECASA, а именно, динамика расхода КА 7-АСА и АА METzAA, а также динамика накопления целевого β -лактама S-р CEZ и побочного продукта TzAA. При этом динамика относительной концентрации S-р CEZ отражает зависимость выхода целевого продукта синтеза от времени по отношению к содержащему β -лактаму субстрату (7-АСА). Важной особенностью процесса является наличие продолжительного плато на кривой накопления S-р CEZ, когда достигается максимальный выход продукта (η^{max}). Как и в

случае синтеза CEZ, катализируемого IECASA [3], наличие плато объясняется установлением продолжительного кинетического равновесия между процессами синтеза и гидролиза β -лактамого продукта. Сохранение 100%-ного баланса как по β -лактаму-, так и по тетразолил-содержащим компонентам (рис. 4) свидетельствовало об отсутствии в системе неконтролируемых побочных процессов, в том числе связанных с разрушением β -лактама.

С целью оптимизации процесса синтеза S-р CEZ, катализируемого IECASA, была осуществлена серия экспериментов при различных $C_{\text{КА}}^{\circ}$ (55–320 mM) и X° (1.5–3.5 M/M) в стандартных условиях, выбранных ранее [3] для синтеза CEZ (30°C , $C_E = 10\text{--}12\text{ ME/мл}$, 0.3 M ФБ). Был использован спонтанный градиент pH от $\text{pH } 7.0 \pm 0.2$ до $\text{pH } 6.0$, с последующим поддержанием $\text{pH } 6.0 \pm 0.1$ с помощью добавления 2 M раствора NaOH до завершения процесса. Эффективность процесса характеризовали величиной максимального выхода S-р CEZ (η^{max} , %), рассчитанного как среднее значение на плато накопления целевого продукта. Время достижения максимальной концентрации S-р CEZ в реакционной смеси составляло 25–50 мин, в зависимости от операционных условий.

Полученные результаты по синтезу S-р CEZ, катализируемому IECASA, обобщены в виде зависимостей максимального выхода продукта от $C_{\text{КА}}^{\circ}$

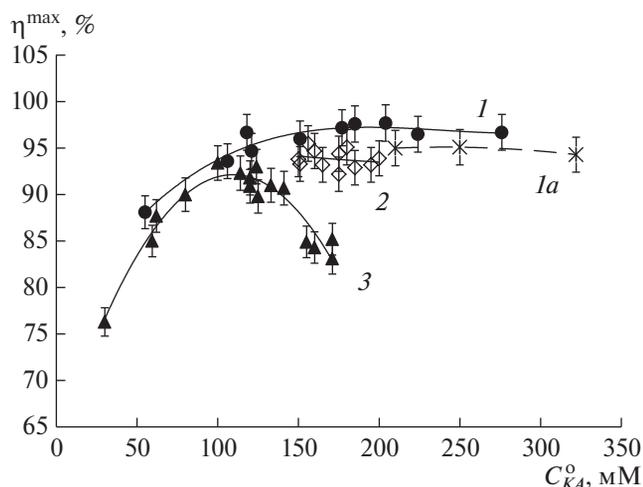


Рис. 5. Зависимость максимального выхода β-лактачного продукта (η^{\max} , %) от исходной концентрации КА ($C_{КА}^0$, мМ) при синтезе с ацильным переносом, катализируемом IECASA (30°C , 0.3 М ФБ , $C_E = 10\text{--}12 \text{ МЕ/мл}$): 1 – синтез S-р CEZ из 7-АСА и METzAA; спонтанный градиент рН в диапазоне от 7.0 ± 0.2 до 6.0 , далее поддержание рН 6.0 ± 0.1 ; $X^0 = 2.9\text{--}3.1 \text{ М/М}$; 1а – то же при $X^0 = 2.5 \text{ М/М}$; 2 – синтез CEZ из TDA и METzAA при $X^0 = 3.1\text{--}3.5 \text{ М/М}$, ступенчатый градиент рН от $8.2\text{--}8.3$ с поддержанием рН 6.8 ± 0.1 и рН 6.0 ± 0.1 ; 3 – синтез CEZ из TDA и METzAA при $X^0 = 3.1\text{--}3.5 \text{ М/М}$, спонтанный градиент рН от $8.2\text{--}8.3$ до 6.0 , далее поддержание рН 6.0 ± 0.1 .

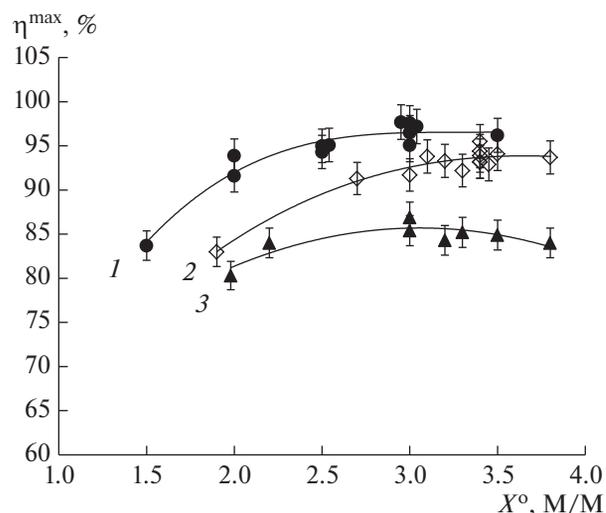


Рис. 6. Зависимость максимального выхода β-лактачного продукта (η^{\max} , %) от исходного мольного избытка АА над КА (X^0 , М/М) при синтезе с ацильным переносом, катализируемом IECASA при 30°C , 0.3 М ФБ , $C_E = 10 \text{ МЕ/мл}$: 1 – синтез S-р CEZ из 7-АСА и METzAA при $C_{КА}^0 = 180\text{--}330 \text{ мМ}$; спонтанный градиент рН в диапазоне от 7.0 ± 0.2 до 6.0 , далее поддержание рН 6.0 ± 0.1 ; 2 – синтез CEZ из TDA и METzAA; $C_{КА}^0 = 150\text{--}200 \text{ мМ}$; ступенчатый градиент рН от $8.2\text{--}8.3$ до 6.0 с поддержанием уровней рН 6.8 ± 0.1 и рН 6.0 ± 0.1 ; 3 – то же при $C_{КА}^0 = 145\text{--}170 \text{ мМ}$; спонтанный градиент рН от $8.2\text{--}8.3$ до 6.0 , далее поддержание рН 6.0 ± 0.1 .

(рис. 5, кривые 1, 1а) и от X^0 (рис. 6, кривая 1), а также сопоставлены с полученными ранее результатами по биокаталитическому синтезу CEZ [3] (рис. 5, кривые 2, 3; рис. 6, кривые 2, 3). Осуществление синтеза CEZ в спонтанном градиенте рН (рис. 5, кривая 3; рис. 6, кривая 3) позволило достичь $\eta^{\max} = (92 \pm 2)\%$, но только при $C_{КА}^0 = 100\text{--}140 \text{ мМ}$ и $X^0 = 3.1\text{--}3.5 \text{ М/М}$ (рис. 5, кривая 3). Повышение исходной концентрации TDA до $C_{КА}^0 \geq 145 \text{ мМ}$ приводило к падению выхода CEZ до 85% и ниже (рис. 6, кривая 3) из-за выпадения осадка TDA при снижении рН в ходе процесса. Выпадение TDA в осадок удавалось предотвратить при осуществлении синтеза CEZ в ступенчатом градиенте рН (рис. 5, кривая 2; рис. 6, кривая 2). При этом в диапазоне концентраций TDA $C_{КА}^0 = 150\text{--}200 \text{ мМ}$ при $X^0 = 3.1\text{--}3.5 \text{ М/М}$ достигался выход $\eta^{\max} = (93.5 \pm 1.5)\%$. Эти условия могут быть приняты как оптимальные для синтеза CEZ, катализируемого IECASA.

S-р CEZ удавалось синтезировать с более высоким выходом $\eta^{\max} = (96.5 \pm 1.5)\%$ в спонтанном градиенте рН в пределах концентраций 7-АСА

$C_{КА}^0 = 175\text{--}275 \text{ мМ}$ при $X^0 = 3.0 \text{ М/М}$ (рис. 5, кривая 1; рис. 6, кривая 1). Существенно, что при высоких концентрациях 7-АСА кривая зависимости η^{\max} от X^0 (рис. 6, кривая 1) выходила на плато при $X^0 = 3.0 \text{ М/М}$, а снижение мольного избытка до $X^0 = 2.5 \text{ М/М}$ сопровождалось незначительным падением выхода до $\eta^{\max} = (95.0 \pm 1.5)\%$ (рис. 5, кривая 1а).

Увеличение выхода в процессе кинетически-контролируемого синтеза, катализируемого IECASA, при замене TDA на 7-АСА являлось, в частности, результатом меньшей специфичности фермента к побочной реакции гидролиза целевого β-лактама (S-р CEZ по сравнению с CEZ). Специфичность IECASA к гидролизу CEZ и S-р CEZ оценивали по бимолекулярным константам соответствующих процессов, определенным по методу Лайнувера–Берка (рис. 7). Бимолекулярные константы гидролитических процессов (V_{\max}/K_m , $\text{мин}^{-1} \text{ г}^{-1}$), рассчитанные по представленным прямым, составляли $0.24 \pm 0.01 \text{ мин}^{-1} \text{ г}^{-1}$ и $0.18 \pm 0.01 \text{ мин}^{-1} \text{ г}^{-1}$ для CEZ и S-р CEZ соответственно, т.е. целевой продукт кинетически-контролируемого синтеза S-р CEZ гидролизировался

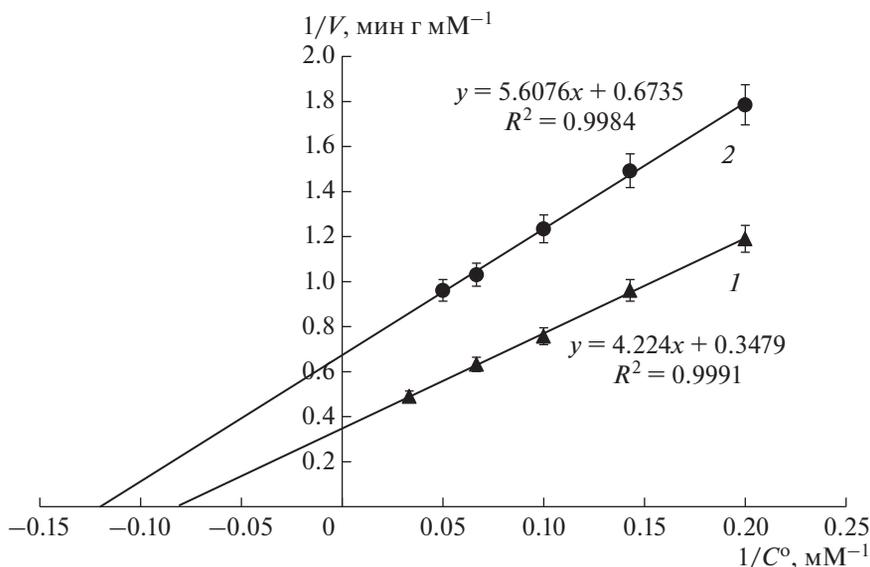


Рис. 7. Определение бимолекулярных констант гидролиза CEZ (1) и S-p CEZ (2), катализируемого IECASA при 30°C и 0.3 М ФБ, методом Лайнувера–Берка.

IECASA на 30% менее эффективно, чем продукт синтеза CEZ.

Оптимизация процесса синтеза β -лактама, катализируемого IECASA, была направлена на достижение максимального выхода целевого продукта при максимальной допустимой величине C_{KA}^0 и минимальной допустимой величине X^0 , что обеспечивало высокую концентрацию целевого продукта в реакционной смеси после трансформации при минимизации содержания примесей (остаточная КА и TzAA – продукт побочных гидролитических процессов). В табл. 3 результаты ряда экспериментов по синтезу CEZ и S-p CEZ в различных условиях сопоставлены по параметрам эффективности процесса, таким как максимальный выход продукта по отношению к β -лактамному субстрату (η^{\max} , %) и состав конечной реакционной смеси после трансформации. В конечной реакционной смеси определяли концентрации целевого продукта (CEZ или S-p CEZ) – C_{prod} (мМ), КА (TDA или 7-ACA) – C_{KA} (мМ) и суммарную концентрацию АА и побочного продукта (METzAA и

TzAA) – $C_{ME+TzAA}$ (мМ). Последние два компонента учитываются суммарно, так как перед выделением целевого продукта остаточный METzAA легко может быть гидролизован до TzAA.

Осуществление синтеза CEZ в оптимальных условиях с использованием ступенчатого градиента pH позволило при $X^0 = 3.4$ М/М, исходя из максимально допустимой $C_{KA}^0 = 200$ мМ (табл. 3), осуществить трансформацию с выходом $\eta^{\max} = 93.9\%$ и достичь в реакционной смеси концентрации антибиотика $C_{\text{prod}} = 190$ мМ при $C_{KA} = 12$ мМ и $C_{ME+TzAA} = 490$ мМ. Процесс синтеза S-p CEZ при практически такой же $C_{KA}^0 = 204$ мМ был осуществлен в более простом спонтанном градиенте pH с существенно более высоким выходом $\eta^{\max} = 97.7\%$, несмотря на использование меньшего избытка ацилирующего агента $X^0 = 3.0$ М/М (табл. 3). Это обеспечило повышение концентрации целевого β -лактама в реакционной смеси до $C_{\text{prod}} = 200$ мМ при соответствующем снижении C_{KA} и $C_{ME+TzAA}$ до 5 и 415 мМ соответственно. Использование

Таблица 3. Параметры эффективности процессов синтеза CEZ и S-p CEZ, катализируемых IECASA

Синтезируемый β -лактама	Условия процесса				η^{\max} , %	Конечная реакционная смесь		
	Исходный pH	Градиент pH	C_{KA}^0 , мМ	X^0 , М/М		C_{prod} , мМ	C_{KA} , мМ	$C_{ME+TzAA}$, мМ
CEZ	8.3	Ступенчатый	200	3.4	93.9	190	12	490
S-p CEZ	7.05	Спонтанный	204	3.0	97.7	200	5	415
	7.20	Спонтанный	276	3.0	95.7	265	12	565
	7.20	Спонтанный	322	2.5	94.5	305	18	500

более высоких исходных концентраций 7-АСА $C_{КА}^0 = 276$ мМ и $C_{КА}^0 = 322$ мМ (табл. 3) позволило достичь высокого выхода S-р CEZ около 95% и увеличить концентрацию целевого продукта в реакционной смеси в 1.3–1.5 раза по сравнению с оптимальным процессом синтеза CEZ практически без увеличения остаточного содержания КА. При этом по сравнению с оптимальным процессом синтеза CEZ величина $C_{МЕ + ТzAA}$ возросла на 15% при $X^0 = 3.0$ М/М и лишь на 2% при $X^0 = 2.5$ М/М.

S-р CEZ может быть трансформирован в CEZ непосредственно в реакционной смеси, полученной при биокаталитическом синтезе, после отделения биокатализатора. Инкубация с MMTD, взятом в трехкратном мольном избытке по отношению к S-р CEZ, позволяла при 65°C и pH 6.0–6.5 достичь степени трансформации полупродукта в CEZ, равной 96.5%. Оптимизация процесса трансформации будет осуществлена в ходе дальнейших исследований, связанных с разработкой процесса выделения и очистки CEZ.

Сопоставление биокаталитического синтеза CEZ, исходя из TDA, и S-р CEZ, исходя из 7-АСА, (рис. 1, стадии 2 и 3) свидетельствовало о ряде важных преимуществ второго процесса:

- приготовление исходного раствора 7-АСА при нейтральном pH (вместо pH 8.2–8.5 для раствора TDA) с достижением более высокой $C_{КА}^0$;

- осуществление процесса синтеза S-р CEZ в простом спонтанном градиенте pH 7.0–6.0, благоприятном для активности и стабильности фермента, вместо ступенчатого градиента pH от 8.3 до 6.0, используемого при синтезе CEZ;

- повышение выхода целевого β-лактама в оптимизированных для каждого процесса условиях с $(93.5 \pm 1.5)\%$ до $(96.5 \pm 1.5)\%$;

- повышение концентрации целевого β-лактама в конечной реакционной смеси в 1.3–1.5 раза;

- возможность использования продукта биокаталитического ацилирования 7-АСА метиловым эфиром TzAA в качестве полупродукта для получения не только CEZ, но и цефалоспоринового антибиотика цефтезола.

Получение CEZ через трансформации 3 и 4 (рис. 1) может быть осуществлено как единый процесс без выделения S-р CEZ из реакционной смеси. Следует отметить также, что процесс химической трансформации S-р CEZ в CEZ (рис. 1, трансформация 4), протекающий при 30°C в водной среде, с экологической точки зрения предпочтительнее получения TDA из 7-АСА (рис. 1, трансформация 1), осуществляемого при низкой температуре (–40°C) в среде токсичных реагентов (BF_3 , CH_3CN). Можно заключить, что химико-биокаталитический синтез CEZ по пути прямого биокаталитического ацилирования 7-АСА представляется перспективной заменой традицион-

ному пути, использующему биокаталитическое ацилирование TDA.

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 593-00003-19 ПР “Фундаментальные и прикладные научные работы в области биотехнологии”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ныс П.С., Курочкина В.Б., Скляренко А.В., Вейнберг Г.А. // Антибиотики и химиотерапия. 2000. Т. 45. № 11. С. 36–42.
2. Sklyarenko A.V., Eldarov M.A., Kurochkina V.B., Yarotsky S.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. V. 51. № 6. P. 627–640.
3. Wang Lu, Sklyarenko A.V., Li Duanhua, Sidorenko A.I., Zhao Chen, Li Jinjun, Yarotsky S.V. // Bioprocess Biosyst. Eng. 2018. V. 41. № 12. P. 1851–1867.
4. Патент США. 1995. № 5387679.
5. Saikawa I., Takano S., Momono K., Takakura I., Tanaka K., Kutani C. // Chem. Pharm. Bull. 1985. V. 33. № 12. P. 5534–5538.
6. Durckheimer W., Blumbach J., Lattrel R., Scheunemann K.H. // Angew. Chem. 1985. V. 24. № 3. P. 180–202.
7. Fernández-Lafuente R., Guisan J.M., Pregnotato M., Terreni M. // Tetrahedron Lett. 1997. V. 38. № 26. P. 4693–4696.
8. Elander R.P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 61. № 5–6. P. 385–392.
9. Barber M.S., Giesecke U., Reichert A., Minas W. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2004. V. 88. P. 179–215.
10. Schmidt F.-R. *The Mycota X. Industrial Applications.* / Ed.: K. Esser, M. Hofrichter. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. V. 5. P. 101–121.
11. Volpato G., Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R. // Curr. Med. Chem. 2010. V. 17. № 32. P. 3855–3873.
12. Rajasekar V.W. // Enz. Eng. 2016. V. 5. № 1. P. 138–139.
13. Rodriguez-Herrera R., Puc L.E.C., Sobrevilla J.M.V., Luque D., Cardona-Felix C.S., Aguilar-González C.N., Flores-Gallegos A.C. *Enzymes in the Pharmaceutical Industry for β-Lactam Antibiotic Production* / Ed. M. Kuddus: Acad. Press, 2019. Ch. 36. P. 627–643.
14. Kurochkina V.B., Sklyarenko A.V. // *Enzymatic Synthesis of beta-Lactam Antibiotics* / Ed. G.E. Zaikov. New-York: Nova Science Publishers, 2008. Ch. 20. P. 175–204.
15. Курочкина В.Б., Ныс П.С. // Антибиотики и химиотерапия. 1999. Т. 44. № 5. С. 12–16.
16. Kurochkina V.B., Nys P.S. // Biocatal. Biotransform. 2002. V. 20. № 1. P. 35–41.
17. Nys P.S., Kurochkina V.B. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2000. V. 88. № 1–3. С. 221–229.
18. Патент РФ. 2000. № 2210596.
19. Патент РФ. 2011. № 2420581.
20. Eldarov M.A., Sklyarenko A.V., Mardanov A.V., Beletsky A.V., Zhgun A.A., Dumina M.V., Medvedeva N.V., Satarova D.E., Ravin N.V., Yarockii S.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. V. 51. № 5. P. 505–510.
21. Эльдаров М.А., Скляренко А.В., Думина М.В., Медведева Н.В., Жгун А.А., Сатарова Д.Э., Сидоренко А.И.,

- Епремян А.С., Яроцкий С.В.* // Биомедицинская химия. 2015. Т. 61. № 5. С. 646–651.
22. *Park S.B., Lee S.B., Ryu D.D.* // J. Mol. Catal. B Enzym. 2000. V. 9. № 4–6. P. 275–281.
23. *Fernández-Lafuente R., Guisan J.M., Pregnotato M., Terreni M.* // Tetrahedron Lett. 1997. V. 38. № 26. P. 4693–4696.
24. *Hernandez-Justiz O., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M., Negri P., Pagani G., Pregnotato M.* // J. Org. Chem. 1997. V. 62. № 26. P. 9099–9106.
25. *Березин И.В., Клесов А.А.* // Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Издательство МГУ, 1976. С. 79.
26. *Kurochkina V.B., Sklyarenko A.V., Satarova D.E., Yarosky S.V.* // Bioprocess Biosyst. Eng. 2011. V. 34. № 9. P. 1103–1117.
27. *McDonald M.A., Bommarius A.S., Rousseau R.W.* // Chem. Eng. Sci. 2017. V. 165. P. 81–88.
28. *Бульчева М.С., Ныс П.С., Савицкая Е.М.* // Антибиотики. 1977. Т. 22. № 12. С. 1073–1076.

Alternative Synthesis of Cefazolin Using Cephalosporin-Acid Synthetase

A. V. Sklyarenko^{a,*}, I. A. Groshkova^a, A. I. Sidorenko^a, and S. V. Yarotsky^a

^aState Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

*e-mail: asklyarenko@yandex.ru

Two routes of chemical-enzymatic synthesis of cefazolin (CEZ) starting from 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) using immobilized recombinant cephalosporin-acid synthetase as the biocatalyst were compared. The first one consists of chemical substitution of 3-acetoxy group of 7-ACA using 2-mercapto-5-methylthiadiazol followed by enzymatic acylation of amino group of produced 7-amino-3-[2-methyl-(1,3,4-thiadiazol-5-yl)-thiomethyl]-3-cephem-4-carboxylic acid (TDA) with methyl ester of 1(H)-tetrazolylacetic acid. The alternative one consists of enzymatic acylation of amino group of 7-ACA and chemical transformation of produced semi-product (S-p CEZ) to CEZ without S-p CEZ isolation from the reaction mixture. Study and optimization of both enzymatic processes were performed. It was shown that acylation of 7-ACA has some important advantages as compared to the acylation of TDA, namely, in relation to the yield, to the concentration of the product in final reaction mixture, and to the tolerance of reaction conditions for the enzyme activity and stability. Taking in to account the environmental benefits of the chemical transformation of S-p CEZ to CEZ compare with the preparation of TDA from 7-ACA it was concluded that chemical-enzymatic synthesis of CEZ on the second route is promising.

Ключевые слова: cefazolin, enzymatic synthesis, biocatalysis, cephalosporin-acid synthetase, solubility, 7-aminocephalosporanic acid

КОНСТРУИРОВАНИЕ МЕТАНОТРОФА I ТИПА С ПОНИЖЕННОЙ СПОСОБНОСТЬЮ АККУМУЛИРОВАТЬ ГЛИКОГЕН И САХАРОЗУ

© 2020 г. С. Ю. Бут¹, С. Н. Дедыш², В. О. Попов³, Н. В. Пименов², В. Н. Хмеленина¹. *

¹ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук, Пушкино, Россия

²Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

³Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

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

Поступила в редакцию 09.03.2020 г.

После доработки 07.04.2020 г.

Принята к публикации 22.04.2020 г.

Получены мутантные штаммы галотолерантного метанотрофа I типа *Methylovivimicrobium alcaliphilum* 20Z с инактивированным геном *sps*, кодирующим сахарозофосфатсинтазу, и делецией кластера генов синтеза и распада гликогена. Блокирование путей синтеза сахарозы и гликогена приводило к увеличению содержания белка в клетках, но при этом несколько снижалась скорость роста метанотрофа на метане. В работе показана принципиальная возможность относительно стабильного роста метанотрофа в отсутствие синтеза запасных соединений углерода.

Ключевые слова: метанотрофные бактерии, *Methylovivimicrobium*, сахароза, гликоген, биосинтез белка из метана

DOI: 10.31857/S0555109920050062

Аэробные метанотрофы – бактерии, использующие метан в качестве единственного источника углерода и энергии, могут быть использованы в биотехнологиях получения разнообразных метаболитов с добавленной стоимостью из метана, включая кормовой белок “гаприн” [1, 2]. Среди продуцентов гаприна наиболее изучены представители рода *Methylococcus*, обладающие высокой скоростью роста и высокой метаболической гибкостью [3, 4]. Изучение метанотрофов в отношении их способности продуцировать биомассу, пригодную для использования в качестве эффективной белковой добавки в корм сельскохозяйственных животных, получило новый импульс в связи с увеличением числа новых таксонов этих бактерий и секвенированием геномов типовых представителей. Расшифровка последовательностей геномов метанотрофов позволила проводить направленную генетическую модификацию их метаболизма с целью расширения их биотехнологического потенциала. Активно идущие в настоящее время работы по метаболической инженерии метанотрофов в основном направлены на получение продуктов с высокой добавленной стоимостью [5–7], тогда как работы по улучшению каче-

ства кормовых добавок перспективных штаммов пока отсутствуют.

Одним из примеров метанотрофов с высокой скоростью роста является галотолерантный метанотроф *Methylovivimicrobium alcaliphilum* 20Z, выделенный из содового озера Шара-Нур (Тыва, Россия) [8, 9]. Полная последовательность генома штамма 20Z представлена в GeneBank (NC_016112.1) являясь основой для детальной характеристики основных путей метаболизма и реакций на осмотические стрессы [10]. В геноме метанотрофа выявлены три копии оперона рибосомальной РНК. Как известно, количество оперонов рРНК определяет важные физиологические свойства бактерий, такие как скорость и эффективность роста, а также быструю адаптацию к повышенной температуре и доступным ростовым субстратам [11, 12]. На основании сравнительного геномного анализа метанотрофов I типа, эта бактерия была недавно ре-классифицирована как представитель нового рода *Methylovivimicrobium* [13]. Способность *M. alcaliphilum* 20Z к быстрому и устойчивому росту в широком диапазоне солености среды (0.5–10% NaCl) и pH (7.5–10), позволила использовать штамм в качестве модельного орга-

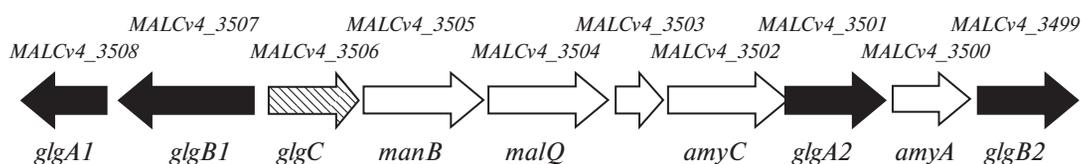


Рис. 1. Кластер генов, ответственных за метаболизм гликогена у *M. alcaliphilum* 20Z: *glgA1*, *glgA2* – гены гликогенсинтаз; *glgB1*, *glgB2* – гены ферментов ветвления гликогена; *glgC* – ген АДФ-глюкопирофосфорилазы; *manB* – ген α -маннозидазы; *malQ* – ген 4- α -глюкантрансферазы; *amyA*, *amyC* – гены α -амилаз; ? – ген белка с неизвестной функцией.

низма при изучении феномена метанотрофии и оценки метаболического потенциала этих бактерий [14]. Эти же характеристики ставят *M. alcaliphilum* 20Z в ряд потенциально перспективных продуцентов гаприна. Изучение метаболизма *M. alcaliphilum* 20Z показало, что штамм накапливает запасные углеводы – сахарозу и гликоген [8, 15, 16]. Накопление запасных углеводов сопровождается расходом значительной доли углерода и энергии ростового субстрата, снижая содержание белка в конечном продукте. Показано, что у метанотрофов, аналогично растениям и цианобактериям, синтез сахарозы происходит с участием двух ферментов – сахарозофосфатсинтазы (SPS) и сахарозофосфатфосфатазы (SPP). В предыдущих исследованиях было обнаружено, что мутант *M. alcaliphilum* с делецией гена *sps* не накапливал сахарозу и не отличался по скорости роста на метаноле от исходного штамма [15]. Влияние накопления внутриклеточных полисахаридов на ростовые характеристики штамма 20Z практически не изучено, но показано, что уровень гликогена в лимитированных по азоту условиях может достигать 35% от веса сухих клеток [8].

Цель работы – получение модифицированных штаммов *M. alcaliphilum* 20Z с нарушениями в биохимических путях синтеза сахарозы и гликогена и изучение влияния этих метаболических дефектов на относительное содержание белка в клетках.

МЕТОДИКА

Бактерии и условия культивирования. Культуру *Methylotuvimicrobium alcaliphilum* 20Z (VKM В-2133^T = NCIMB 14124^T) и модифицированные штаммы этого метанотрофа выращивали при 30°C в минеральной среде “2П”, являющейся модификацией среды “П” [17] и содержащей (г/л): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 1.5; KH_2PO_4 – 0.7; KNO_3 – 2.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; CaCl_2 – 0.04 и 2 мл/л раствора микроэлементов (в мг/л): ЭДТА- Na_2 – 5000; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.03; $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.04; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; Na_2MoO_4 – 0.03. В среду вносили 3% NaCl (оптимальная концентрация для

штамма 20Z), перед засевом добавляли NaHCO_3 в конечной концентрации 0.1 М. При определении удельной скорости роста, культуры выращивали в герметично закрытых флаконах объемом 200 мл, содержавших 30 мл среды. Во флаконы шприцем добавляли по 50 мл CH_4 или 0.5% метанола (об./об.). Штаммы *Escherichia coli* Top10 и S-17-1 выращивали при 37°C в жидкой или на агаризованной (1.5% агара “Difco”, США) среде ЛБ [18] с добавлением при необходимости 100 мкг/мл канамицина (Км).

Конструирование мутантных штаммов. Для элиминации гена *sps* (MALCv4_0614), кодирующего сахарозофосфатсинтазу (СФС, КФ 2.4.1.14), а также генного кластера (MALCv4_3499–MALCv4_3508), содержащего два гена гликогенсинтаз (рис. 1), фрагменты ДНК, фланкирующие данные локусы, амплифицировали с использованием праймеров (табл. 1) и клонировали в вектор pCM433Kan [19] по сайтам *Bgl*II и *Nde*I, *Sac*II и *Sac*I. Полученным вектором pCMsps трансформировали клетки *E. coli* S-17-1, затем плазмиду переносили в клетки метанотрофа с помощью конъюгации, как описано ранее в работе [20]. Культуры *M. alcaliphilum* 20Z и *E. coli* S-17-1 выращивали на соответствующих агаризованных средах, затем суспендированные клетки двух бактерий смешивали на чашках с агаризованной средой “2П”, содержащей 0.75% NaCl и 2.5% среды LB. Чашки выдерживали в атмосфере смеси метана и воздуха (1 : 1) в течение 2 сут, затем клетки высевали на агаризованную среду “2П”, содержащую 3% NaCl и 100 мкг/мл Км. Устойчивые к канамицину колонии выращивали в жидкой среде с Км, затем суспензию клеток (около 100 мкл) высевали на агаризованную среду “2П”, содержащую 2.5% сахарозы. Выросшие в результате, устойчивые к сахарозе колонии, представляли собой дикий тип или мутант с желаемой делецией [21]. Генотип устойчивых к сахарозе колоний проверяли с помощью ПЦР, отбирая колонии, не содержащие гена *sps*. В результате был получен делеционный мутант $\Delta\text{sps}^{\text{um}}$, не несущий маркеров устойчивости к антибиотикам. Для получения двойного мутанта $\Delta\text{spsglg}^{\text{um}}$ вышеуказанную процедуру повторяли, внося в клетки штам-

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Праймер	Мишень	Последовательность (5'-3')
sps-up-F	Участок ДНК, фланкирующий ген <i>sps</i> с 5'-конца	TTAGATCTGTTTGGATTTTAAAGAGTCGAGGATT
sps-up-R		TACATATGCGATTTGCCGAAGGCTATTT
sps-dw-F	Участок ДНК, фланкирующий ген <i>sps</i> с 3'-конца	TTCCGCGGCATGATATCGTTGCAGGGGATTCC
sps-dw-R		TTGAGCTCCAGGAAATTCGCGTTGTTGC
glg-up-F	Участок ДНК, фланкирующий ген <i>glgA1</i> с 5'-конца	GAGACGTCGCTCAACCGACTCATTGACG
glg-up-R		GTGATCTGGGATGAATCGGCCTCATTCG
glg-dw-F	Участок ДНК, фланкирующий ген <i>glgB2</i> с 3'-конца	GAGGGCCCGTGGAATAGTAGCGCTAAAC
glg-dw-R		GAGAGCTCGATCAAATCCGGCGTCCGGGGTCCG

ма Δsps^{um} плазмиду pCMglg, полученную клонированием в вектор pCM433Kan фрагментов ДНК, фланкирующих кластер метаболизма гликогена, по сайтам *AatII*, *BglII* и *ApaI*, *SacI*.

Олигонуклеотиды синтезировали в фирме “Евроген” (Россия), ДНК секвенировали в фирме “Генотех” (Россия).

Количественный анализ сахарозы и гликогена. Для количественного анализа метаболитов клетки дикого и мутантных штаммов *M. alcaliphilum* выращивали до начала стационарной фазы (ОП 1.0–1.2) в качалочных колбах объемом 750 мл с 200 мл среды “2П”. Газовую фазу в колбах заменяли смесью метана и воздуха в соотношении 1 : 1, или в качестве углеродного субстрата использовали метанол (0.5% вес/об.) Клетки собирали центрифугированием при 6000 g в течение 10 мин, полученную биомассу лиофилизировали. Для измерения содержания сахарозы навески сухих клеток (~30 мг) суспендировали в 80%-ном метаноле, обрабатывали ультразвуком 3 раза по 10 с с перерывами по 1 мин на дезинтеграторе “MSE” (Фирма, Англия), а затем центрифугировали 5 мин при 14500 g. Супернатант переносили в чистые пробирки и упаривали, сухой остаток растворяли в 200 мкл деионизованной воды и дважды экстрагировали хлороформом. Водную фракцию использовали для измерения сахарозы методом ВЭЖХ на колонке “Repro-Gel H + column” (9 мкм, 250 × 8 мм, “Dr.Maisch”, Германия) с использованием рефрактометрического детектора. В качестве подвижной фазы использовали 1.0 мМ H₂SO₄ со скоростью потока 0.5 мл/мин, температура колонки составляла 50°C.

Для экстракции гликогена 10 мг сухих клеток суспендировали в 30%-ном КОН, выдерживали при 95°C в течение 30 мин. Полученный лизат охлаждали во льду, добавляли два объема этанола, выдерживали при –20°C в течение 1 ч, центрифугировали при 14500 g 10 мин. Осадок растворяли в де-

ионизованной воде, доводя рН до 3.0 5 М HCl и вновь осаждали этанолом в соотношении 1 : 1 (об./об.). Образцы инкубировали 1 ч при –20°C, центрифугировали 10 мин при 14500 g, осадок высушивали и растворяли в деионизованной H₂O. Концентрацию гликогена определяли с помощью набора “Glycogen Assay kit” (“Sigma”, США) согласно рекомендациям производителя. Для определения содержания белка в биомассе навески лиофилизированных клеток (около 10 мг) суспендировали в 1 М NaOH, прогревали в микроволновой печи 3 раза по 10 с с мощностью 600 кВт. Образцы центрифугировали 10 мин при 14500 g, надосадочную жидкость переносили в чистые пробирки. Концентрацию белка определяли методом Лоури.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение мутантных штаммов и анализ их ростовых характеристик. Ранее инсерцией канамициновой кассеты в последовательность гена *sps* нами был получен штамм *M. alcaliphilum*, который не накапливал сахарозу [15]. Поскольку культивирование таких штаммов предполагает применение антибиотика, а для объединения в одном штамме ряда мутаций требуется нескольких антибиотиков, в работе использовали методологию получения безмаркерных мутаций контрселекцией с геном *sacB* [21], ранее применявшуюся для получения мутаций у галотолерантного метанотрофа *M. buryatense* 5GB1 [19]. Ген *sacB* кодирует периплазматическую левансахаразу, его экспрессия у грамотрицательных бактерий, инкубируемых в присутствии экзогенной сахарозы, вызывает летальный эффект, предположительно обусловленный синтезом фруктозильного полимера, левана, который полностью заполняет периплазматическое пространство клетки [22]. Сначала был получен безмаркерный штамм Δsps^{um} с делецией гена *sps*. Далее из хромосомы этого штамма был уда-

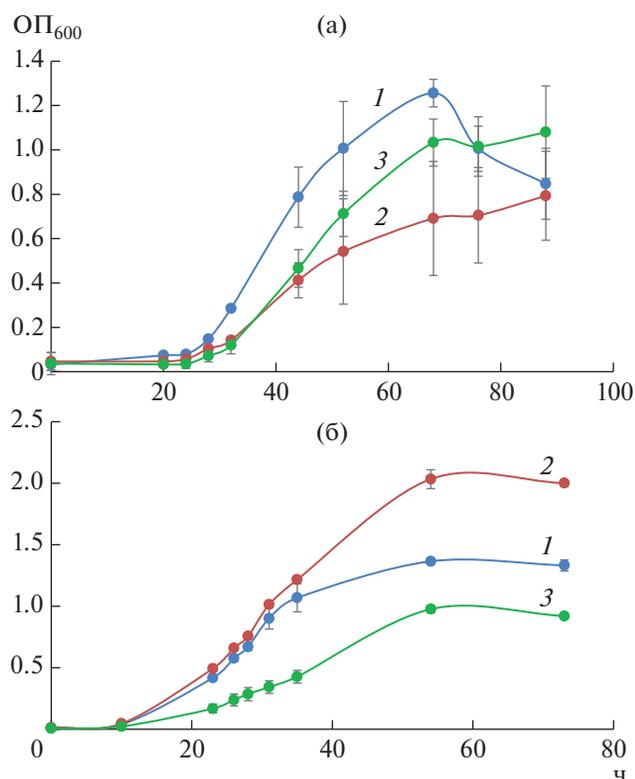


Рис. 2. Динамика роста *M. alcaliphilum* 20Z (1), штамма $\Delta\text{sps}^{\text{um}}$ с делецией гена синтеза сахарозы (2) и двойного мутанта $\Delta\text{spsglg}^{\text{um}}$ (3) на метане (а) и метаноле (б).

лен кластер, содержащий гомологичные гены *glgA1* и *glgA2*, кодирующие гликогенсинтазы (с 19%-ной идентичностью транслированных аминокислотных последовательностей), включающий также гены *glgB1* и *glgB2*, кодирующие ферменты ветвления гликогена (рис. 1). В результате получен штамм $\Delta\text{spsglg}^{\text{um}}$.

Скорость роста полученного мутанта $\Delta\text{sps}^{\text{um}}$ ($0.05 \pm 0.02 \text{ ч}^{-1}$) на метане оказалась ниже, чем штамма дикого типа ($0.094 \pm 0.006 \text{ ч}^{-1}$) и штамма $\Delta\text{spsglg}^{\text{um}}$ ($0.089 \pm 0.03 \text{ ч}^{-1}$), снижался также выход биомассы у мутантов (рис. 2). Однако начальная скорость роста штамма $\Delta\text{sps}^{\text{um}}$ на метаноле не отличалась от скорости роста штамма дикого типа, а оптическая плотность культуры к началу стационарной фазы была примерно на 30% выше.

Накопление сахарозы и гликогена клетками мутантных штаммов. Штаммы $\Delta\text{sps}^{\text{um}}$ и $\Delta\text{spsglg}^{\text{um}}$ не накапливали сахарозу, в то время как содержание этого дисахарида в клетках штамма дикого типа, растущего на метане, составило $25 \pm 10 \text{ мг/г}$ сухой биомассы и $45 \pm 3 \text{ мг/г}$ выращенных на метаноле клеток.

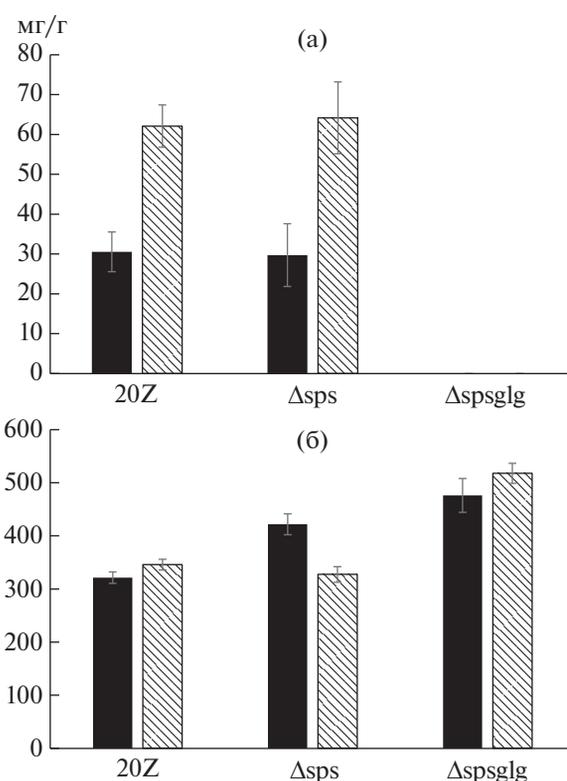


Рис. 3. Содержание гликогена (а, мг/г сухой биомассы) и белка (б, мг/г сухой биомассы) в клетках штамма *M. alcaliphilum* дикого типа (20Z) и штамма с делецией гена синтеза сахарозы ($\Delta\text{sps}^{\text{um}}$) и двойного мутанта ($\Delta\text{spsglg}^{\text{um}}$) при росте на метане (черные столбцы) и метаноле (штрихованные столбцы).

Уровень гликогена в клетках штаммов 20Z и $\Delta\text{sps}^{\text{um}}$, выращенных на метаноле, был в 2 раза выше, чем при выращивании на метане, но существенных различий в содержании гликогена между штаммами 20Z и $\Delta\text{sps}^{\text{um}}$ не выявлено. У штамма $\Delta\text{spsglg}^{\text{um}}$ гликоген не обнаружен (рис. 3а). В клетках штамма $\Delta\text{sps}^{\text{um}}$, выросших на метане, содержание белка было на 30% больше по сравнению с клетками дикого типа, а в клетках штамма $\Delta\text{spsglg}^{\text{um}}$ выше на 50% (рис. 3б). Однако видимых различий в содержании белка у выращенных на метаноле штаммов 20Z и $\Delta\text{sps}^{\text{um}}$ не выявлено.

Таким образом, получены модифицированные штаммы облигатного метанотрофа I типа *M. alcaliphilum* 20Z с нарушенным синтезом запасных углеродных соединений — сахарозы и гликогена. Данные метаболические дефекты по-разному влияли на физиологические свойства метанотрофа при его выращивании на метане или метаноле. Гликоген закономерно не обнаружен при элиминации кластера генов, который кроме ферментов синтеза гликогена, гликогенсинтаз, кодирует так-

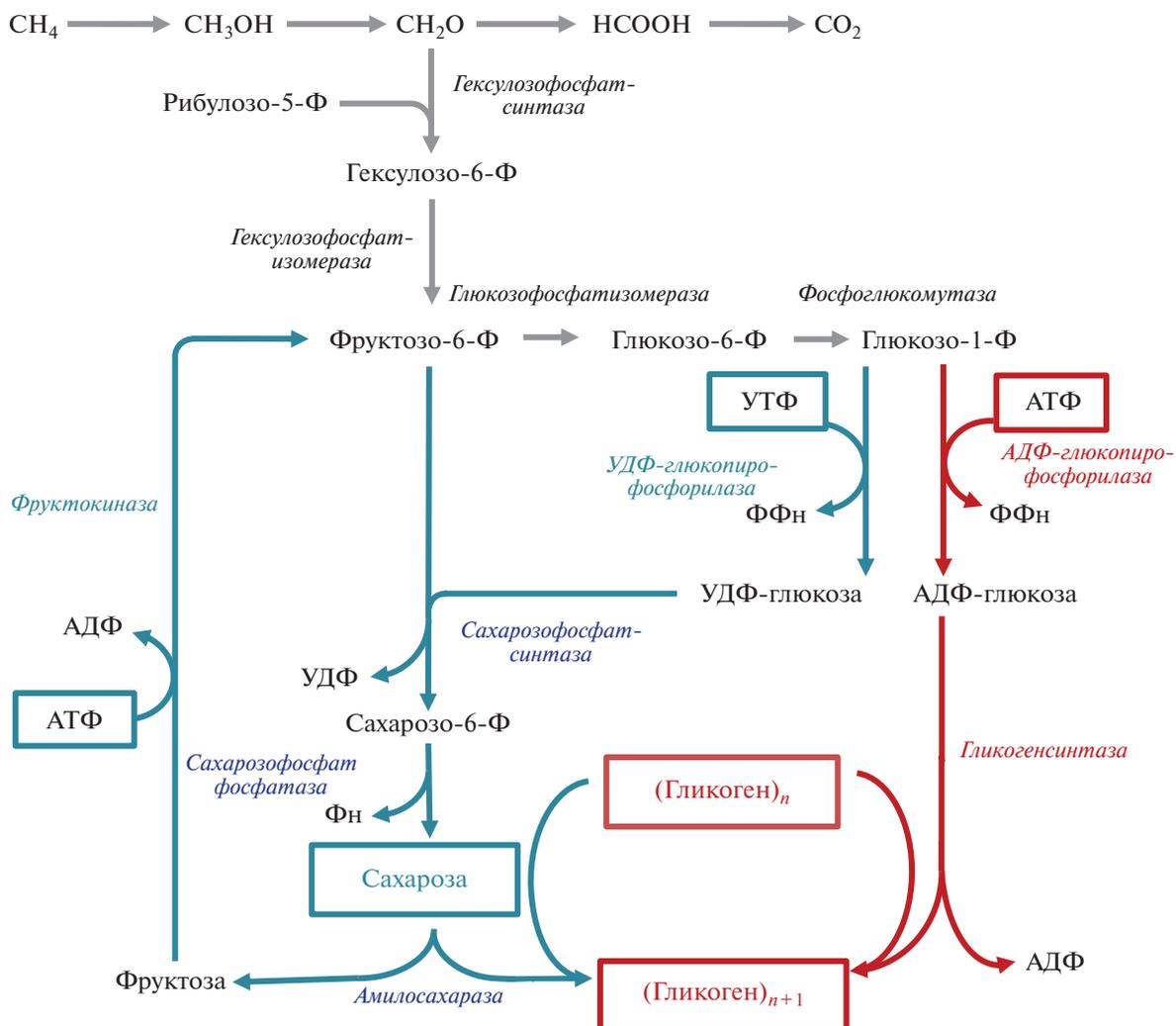


Рис. 4. Пути синтеза гликогена у *M. alcaliphilum* 20Z: через сахарозу в качестве промежуточного метаболита (синие стрелки) или прямой путь с участием гликогенсинтаз (красные стрелки).

же сопутствующие ферменты ветвления и распада гликогена (АДФ-глюкопирофосфорилазу, α -маннозидазу, 4- α -глюкантрансферазу и две α -амилазы) (рис. 1). В работе показана принципиальная возможность относительно стабильного роста метанотрофа в отсутствие синтеза запасных соединений углерода и энергии.

У *M. alcaliphilum* 20Z функционирует два механизма синтеза гликогена из первичных метаболитов рибулозомонофосфатного пути ассимиляции C_1 соединений (рис. 4). Метанотрофы синтезируют сахарозу с участием сахарозофосфатсинтазы (*Sps*, КФ 2.4.1.14) и сахарозофосфатфосфатазы (*Spp*, КФ 3.1.3.24), конденсируя фруктозо-6-фосфат и УДФ-глюкозу, выделяя при этом неорганический фосфат. На следующем этапе амилосахараза (*Ams*, КФ 2.4.1.4) осуществляет перенос гликозильного остатка сахарозы на гликоген с образованием сво-

бодной фруктозы. Фруктоза может быть преобразована обратно во фруктозо-6-фосфат АТФ-зависимой фруктокиназой (*FruK*, КФ. 2.7.1.4) [16]. Гены, кодирующие ферменты синтеза и последующего метаболизма сахарозы у метанотрофов I типа расположены в одном опероне *sps-spp-fruK-ams* и детерминируют так называемый “цикл сахарозы” [16]. Для синтеза гликогена через цикл сахарозы требуются две молекулы нуклеотидтрифосфата (НТФ). Этот путь является более энергозатратным по сравнению с путем, осуществляемым при участии АДФ-глюкопирофосфорилазы и гликогенсинтазы, в котором для присоединения гликозильного остатка к праймеру гликогена тратится только одна молекула НТФ (рис. 4). При этом негативное влияние элиминации *Sps* на скорость роста на метане весьма оказалось неожиданным. Известно, что монооксигенирование CH_4 проис-

ходит с потреблением восстановленных эквивалентов, потому что блокирование энергетически затратного пути синтеза гликогена через сахарозу в качестве промежуточного продукта должно оказывать стимулирующий эффект на рост бактерии. С другой стороны, окисление CH_4 сопровождается образованием активных форм кислорода [23]. Значительное замедление роста на метане, но не метаноле, штамма с нарушенным синтезом сахарозы позволяет предположить, что сахароза у метанотрофов может участвовать в защите клеточных мембран в процессе монооксигенирования.

Таким образом, элиминация путей биосинтеза запасных углеводов привела к значительному (~50%) увеличению содержанию белка в клетках *M. alcaliphilum* 20Z, что демонстрирует целесообразность генной модификации метанотрофов с целью повышения качества биомассы как кормовой добавки. Полученные в работе значения относительного содержания белка (32–34% для дикого типа и 48–51% для мутанта) ниже достигнутых ранее показателей для другого метанотрофа, *Methylococcus capsulatus* (70%) [4]. Необходимо принять во внимание, что выше приведенные показатели для *M. alcaliphilum* были получены в условиях периодического культивирования. При этом оптимизация условий культивирования не входила в задачи данной работы. Дальнейшее улучшение характеристик потенциальных штаммов-продуцентов гаприна может быть достигнуто путем оптимизации состава среды и условий ферментации.

Работа выполнена при поддержке гранта ФЦП № 075-15-2019-1830 Минобрнауки России, уникальный идентификатор проекта RF-MEF160719X0297.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов: Все авторы участвовали в концептуализации задач исследования и оформлении экспериментальных результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Григорян А.Н., Горская Л. Использование природного газа для микробиологического синтеза. М.: ОНТИ Микробиопром, 1970. 90 с.
2. Hamer G., Harrison D.E.F. // *Hydrocarbons in Biotechnology* / Eds. D.E.F. Harrison, I.J. Higgins. London W.R.: Heyden Institute of Petroleum, 1980. P. 59–73.
3. Zivotchenko A.G., Nikonova E.S., Jorgensen M.H. // *Biotechnology Techniques*. 1995. V. 9. № 3. P. 163–168.
4. Nunes J.J., Aufderheide B., Ramjattan D.M., Dass R. // *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* 2016. V. 6. № 3. P. 894–899.
5. Henard C.A., Smith H., Dowe N., Kalyuzhnaya M.G., Pienkos P.T., Guarnieri M.T. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Article 21585.
6. Gilman A., Fu Y., Hendershott M., Chu F., Puri A.W., Smith A.L., Pesesky M., Lieberman R., Beck D.A.C., Lidstrom M.E. // *Peer J.* 2017. V. 5. Article e3945. <https://doi.org/10.7717/peerj.3945>
7. Garg S., Wu H., Clomburg J.M., Bennett G.N. // *Metab. Eng.* 2018. V. 48. P. 175–183.
8. Khmelenina V.N., Kalyuzhnaya M.G., Sakharovsky V.G., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Gottschalk G. // *Arch. Microbiol.* 1999. V. 172. № 3. P. 321–329.
9. Kalyuzhnaya M.G., Khmelenina V.N., Eshinimaev B., Sorokin D., Fuse H., Lidstrom M., Trotsenko Y. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008. V. 58. № 3. P. 591–596.
10. Vuilleumier S., Khmelenina V.N., Bringel F., Reshetnikov A.S., Lajus A., Mangenot S. et al. // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194. № 2. P. 551–552.
11. Espejo R.T., Plaza N. // *Front Microbiol.* 2018. V. 9. Article 1232.
12. Roller B.R.K., Stoddard S.F., Schmidt T.M. // *Nat. Microbiol.* 2016. V. 1. Article 16160.
13. Orata F.D., Meier-Kolthoff J.P., Sauvageau D., Stein L.Y. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Article 3162.
14. Kalyuzhnaya M.G., Yang S., Rozova O.N., Smalley N.E., Clubb J., Lamb A., Gowda G.A., Raftery D., Fu Y., Bringel F., Vuilleumier S., Beck D.A., Trotsenko Y.A., Khmelenina V.N., Lidstrom M.E. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. Article 2785.
15. Бут С.Ю., Решетников А.С., Хмеленина В.Н., Мустахимов И.И., Троценко Ю.А. // *Микробиология.* 2013. Т. 82. № 2. С. 251–253.
16. But S.Y., Khmelenina V.N., Reshetnikov A.S., Mustakhimov I.I., Kalyuzhnaya M.G., Trotsenko Y.A. // *Arch. Microbiol.* 2015. V. 197. № 3. P. 471–480.
17. Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. М.: ГЕОС, 2001. 500 с.
18. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3 Ed. N.-Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 2100 p.
19. Puri A.W., Owen S., Chu F., Chavkin T., Beck D.A., Kalyuzhnaya M.G., Lidstrom M.E. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. № 5. P. 1775–1781.
20. Mustakhimov I.I., Reshetnikov A.S., Glukhov A.S., Khmelenina V.N., Kalyuzhnaya M.G., Trotsenko Y.A. // *J. Bacteriol.* 2010. V. 192. № 2. P. 410–417.
21. Marx C. // *BMC Res. Notes.* 2008. V. 1. Article 1.
22. Bramucci M.G., Nagarajan V. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. № 11. P. 3948–3953.
23. Murrell J.C., McDonald I.R., Gilbert B. // *Trends Microbiol.* 2000. V. 8. P. 221–225.

Construction of a Type I Methanotroph with a Reduced Ability to Accumulate Glycogen and Sucrose

S. Yu. But^a, S. N. Dedysh^b, V. O. Popov^c, N. V. Pimenov^b, and V. N. Khmelenina^{a,*}

^aFederal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research RAS", G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, Pushchino, Moscow reg., 142290 Russia

^bS.N. Vinogradski Institute of Microbiology, Federal Research Center "Fundamental basis of biotechnology" RAS, Moscow, 119071 Russia

^cA.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamental basis of biotechnology" RAS, Moscow, 119071 Russia

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

Mutant strains of the halotolerant type I methanotroph, *Methylovimicrobium alcaliphilum* 20Z, with the inactivated *sps* gene encoding sucrose phosphate synthase and deletion of a gene cluster for synthesis and degradation of glycogen, were obtained. Blocking the synthesis of sucrose and glycogen increased the protein content in cells, but slightly reduced the growth rate of the methanotroph under methane. This paper showed the possibility of a relatively stable growth of methanotroph in the absence of synthesis of the storage carbon compounds.

Keywords: methanotrophic bacteria, *Methylovimicrobium*, sucrose, glycogen, protein biosynthesis from methane

УДК 637.1

ОЦЕНКА ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ *Lactobacillus reuteri* LR1 *in vitro*

© 2020 г. А. В. Бегунова¹, О. С. Савинова², И. В. Рожкова¹, Ю. И. Крысанова¹, Т. В. Фёдорова², *

¹Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, Москва, 115093 Россия

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

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Поступила в редакцию 01.04.2020 г.

После доработки 17.04.2020 г.

Принята к публикации 22.04.2020 г.

Изучение влияния различных антимикробных препаратов на штамм *Lactobacillus reuteri* LR1 показало его чувствительность к линкомицину, амоксициллину и левомецитину и устойчивость к остальным исследованным антибиотикам. Установлено, что при ферментации молока штаммом *L. reuteri* LR1 в течение 24 ч происходило достоверное повышение антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностей на фоне снижения количества L-лейциновых эквивалентов по сравнению с исходным молоком. В процессе дальнейшего культивирования увеличивались протеолитическая, антиоксидантная и ингибирующая активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), достигая наибольшего значения через 96 ч. ВЭЖХ-МС/МС анализ пептидного профиля ферментированного лактобактерией молока показал наличие пептидов, обладающих АПФ-ингибирующей, антимикробной, антиоксидантной и иммуномодуляторной активностями. Анализ субстратной специфичности СЕР-протеиназы *L. reuteri* LR1 в отношении фрагмента (f1-23) α_{s1} -казеина показал его уникальную специфичность, что может указывать на его принадлежность к P1/P11 типу.

Ключевые слова: *Lactobacillus reuteri* LR1, устойчивость к антибактериальным препаратам, протеолитическая активность, антиоксидантная активность, АПФ-ингибирующая активность, пептидный профиль, биологически активные пептиды

DOI: 10.31857/S0555109920050049

Современная наука определяет микробиоценоз как единую систему организма человека и его микробиома. При этом микробиом представляет собой разнообразные ассоциации микроорганизмов и продукты их метаболизма, обитающие в определенном биотопе [1].

Появляется все больше доказательств того, что различные диеты и факторы окружающей среды оказывают значительное влияние на метаболизм, иммунный ответ и восприимчивость человека к болезни в результате изменения видового состава микробных ассоциаций в его желудочно-кишечном тракте [2–4].

С 2001 г. термин “пробиотики” означает живые микроорганизмы, прием которых в адекватных количествах оказывает благоприятное воздействие на организм хозяина [5]. Поэтому очень важно понимать механизм воздействия пробиотического микроорганизма на макроорганизм, что постоянно исследуется в экспериментах *in vitro*.

Полезные для здоровья человека свойства молочнокислых бактерий (МКБ) интенсивно изуча-

ются. В настоящее время проводятся исследования и накапливаются данные о более широкой пробиотической активности микроорганизмов, которые способны нормализовать функции микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), усиливать иммунитет, снижать проявления пищевой аллергии, облегчать симптомы непереносимости лактозы, оказывать гипохолестеринемическое, антиканцерогенное и антимуtagenное действие [6, 7]. В нижних отделах кишечника пробиотические микроорганизмы способны продуцировать антиоксиданты, гормоноподобные вещества и ферменты, которые участвуют в метаболических процессах макроорганизма [8].

Применение пробиотических, в том числе молочнокислых микроорганизмов при производстве кисломолочных продуктов направленного действия позволит добавить продукту ряд функциональных свойств [9, 10]. Доказано, что введение в организм пробиотических штаммов в составе кисломолочных продуктов более эффективно по сравнению с приемом пробиотических штаммов в ви-

де лекарственных форм [11]. В настоящее время представители рода *Lactobacillus* являются наиболее широко изученными пробиотическими микроорганизмами в группе молочнокислых бактерий [12]. Известно, что род *Lactobacillus* включает виды с различным спектром физиологических и биохимических свойств. Интерес к *Lactobacillus reuteri*, одному из уникальных микроорганизмов семейства *Lactobacillaceae* с различными механизмами действия, возрастает. В связи с тем, что пробиотические свойства лактобактерий являются штамм-специфичными, исследование свойств конкретного штамма с целью его дальнейшего применения в качестве заквасочной или пробиотической заквасочной культуры является актуальным.

Исследуемый в данной работе штамм *Lactobacillus reuteri* LR1, был выделен в 2014 г. в Центральной лаборатории микробиологии Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ, Россия) из фекалий (каловые массы) здорового человека и идентифицирован современными биохимическими и молекулярно-генетическими методами [13]. Ранее было показано, что штамм *L. reuteri* LR1 обладает антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и синтезирует в присутствии глицерина бактериоциноподобное соединение – реутерин [13, 14].

Цель работы – исследование пробиотического потенциала и функциональных свойств штамма *L. reuteri* LR1.

МЕТОДИКА

Культуры. В работе использовался штамм молочнокислых бактерий *L. reuteri* LR1 из фонда Коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ, Москва, Россия). Для культивирования лактобактерий использовали стерильное обезжиренное молоко.

Определение количества клеток. Количество клеток *L. reuteri* LR1 определяли методом посева на питательную среду MRS-агар (“НПЦ Биокомпас-С”, Россия). Культивирование проводили в анаэробных условиях при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в анаэроостате OXOID и газ-пакетах GasPak (“BD Biosciences”, США). Подсчитывали все выросшие на среде колонии в течении 72 ч.

Устойчивость к антибиотикам. Устойчивость штамма *L. reuteri* LR1 к антибиотикам *in vitro* определяли диско-диффузионным методом, который основан на способности антимикробных препаратов диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов на поверхности агаризованной среды. Интерпретацию результатов по оцен-

ке чувствительности лактобактерий проводили по МУ 2.3.2.2789-10 “Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов” (<https://ohrana-truda.ru/upload/iblock/846/4293757373.pdf>).

Получение белково-пептидных фракций. Аликвоту (15 мл) образца ферментированного молока центрифугировали при температуре 4°C в течение 30 мин при 10000 г на центрифуге 5702R (“Eppendorf”, Германия), фильтровали надосадочную жидкость вместе с жировым слоем через складчатый бумажный фильтр (MN 640W, “Macherey-Nagel”, Германия). рН фильтрата довели до 4.6 добавлением 0.1 М раствора гидроксида натрия с последующим центрифугированием полученной смеси при 4°C в течение 30 мин при 10000 г на центрифуге 5702R (“Eppendorf”, Германия) и фильтрацией надосадочной жидкости через шприцевые фильтры с гидрофильной мембраной с диаметром пор 0.2 мкм (“Sartorius”, Германия). Полученные белково-пептидные фракции замораживали и хранили при температуре -73°C до проведения анализа.

Перед проведением анализа образцы белково-пептидных фракций ферментированного молока размораживали и дополнительно фильтровали с помощью шприцевых фильтров с гидрофильной PVDF-мембраной с диаметром пор 0.45 мкм (“Carl Roth”, Германия).

В полученных таким образом образцах белково-пептидных фракций ферментированного молока определяли протеолитическую, антиоксидантную и АПФ-ингибирующую (гипотензивную) активности, а также содержание органических кислот.

Протеолитическая активность. Протеолитическую активность определяли количественно путем измерения количества высвобождаемых аминокислот в супернатантах с использованием метода, описанного в работе [15] с 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (TNBS) (“Sigma-Aldrich”, США). Оптическую плотность растворов определяли на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy2 (“BioTek”, США) при длине волны 340 нм. В качестве стандарта для определения протеолитической активности использовали L-лейцин (“Sigma-Aldrich”, США). Результаты измерений выражали в ммоль/л-эквивалентов лейцина.

Антиоксидантная активность. Антиоксидантную активность *in vitro* определяли флуоресцентным методом ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) с генерацией пероксильного радикала в реакционной среде с помощью микропланшетного фотометра-флуориметра BioTek Synergy 2, как описано [16, 17]. Пероксильный радикал генерировался не-

посредственно в реакционной среде при термическом распаде азосоединения 2,2'-азобис(2-иетилпропионамидина) дигидрохлорида (ААРН) (“Sigma”, США), при инкубации в течение 10 мин при 37°C. Кинетику уменьшения флуоресценции регистрировали в течение 1 ч с интервалом измерений 60 с при температуре 37°C на фотометре-флуориметре Synergy 2 в режиме регистрации интенсивности флуоресценции (длина волны возбуждения – 485 нм, длина волны испускания – 528 нм). Величину антиоксидантной активности образцов ферментированного молока по отношению к пероксильному радикалу рассчитывали в мМ эквивалентов тролокса (ТЭ).

АПФ-ингибирующая активность. Анализ АПФ-ингибирующей активности проводили в 96-луночных полипропиленовых черных несорбирующих микропланшетах (“Greiner Bio One”, Германия). Кинетику увеличения интенсивности флуоресценции исследовали в течение 15 мин с интервалом в 20 с на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy 2 при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ и длине волны возбуждения и регистрации флуоресценции – 320 и 420 нм соответственно.

С помощью графика зависимости ингибирования АПФ (%) от десятичного логарифма фактора разбавления исходного образца ферментированного молока методом линейной интерполяции определяли фактор разбавления образца, при котором наблюдалось 50%-ное ингибирование активности АПФ (IC_{50}). Величину IC_{50} для образцов ферментированного молока, выраженную в мг белка/мл, рассчитывали путем деления концентрации белка в образце (в мг/мл) на величину фактора разбавления, при котором наблюдалось 50%-ное ингибирование активности АПФ.

Содержание органических кислот. Определение содержания органических кислот (молочной и уксусной) в процессе ферментации молока штаммом *L. reuteri* LR1 проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе Agilent 1290 Infinity (“Agilent Technologies”, США) с детекцией на диодно-матричном детекторе при длине волны 210 нм с использованием колонки Zorbax SB-C8 (4.6×50 мм, 1.8 мкм).

Определение пептидного профиля. Анализ пептидного профиля был выполнен в системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 (“Agilent Technologies”, США) и tandemного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra (“Thermo”, Германия). Для разделения пептидов использовали обращенно-фазовую градиентную хроматографию [18]. Контроль результатов ВЭЖХ-МС проводили с помощью программы QualBrowser. С помощью программы Raw2msm из масс-хроматограмм были получены списки точных масс пептидов и масс их фрагментов и использованы для поиска и идентификации

белков по базе данных при помощи программы Peaks Studio (“Bioinformatics Solutions Inc.”, США, version 8.5). Для идентификации пептидов использовали аминокислотные последовательности белка согласно базе данных UniprotKB. Для идентификации использовали следующие параметры поиска: фермент – None (нативные пептиды); точность масс для родительского иона – 15 ppm; точность масс для MS/MS фрагментов – 0.50 Да. *De novo* секвенирование выполнено при помощи программы Peaks Studio.

Концентрацию белка в препаратах определяли с использованием набора BCA Assay kit (“ThermoFisher”, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Все экспериментальные работы проводились в 3–5 кратной повторяемости. Построение графиков диаграмм, таблиц и статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с использованием программ Microsoft Office и Statistica 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Многочисленные исследования доказали, что биологические эффекты и, как следствие, пробиотический потенциал разных штаммов лактобактерий одного вида могут достаточно сильно варьировать и являться штаммоспецифичной характеристикой [19–21]. Для повышения эффективности применения пробиотических микроорганизмов необходимо также понимать механизмы, обуславливающие биологическое действие конкретного штамма.

Проведенные ранее исследования показали выраженные антимикробные свойства у штамма *L. reuteri* LR1 при сокультивировании с условно-патогенными микроорганизмами, возбудителями нозокомиальных и пищевых токсикоинфекций, что является одним из основных показателей пробиотической активности данного штамма [13, 22].

Устойчивость к антибиотикам. Поскольку при использовании пробиотиков немаловажную роль играет их резистентность к антибиотикам, была изучена чувствительность штамма *L. reuteri* LR1 к 15 антимикробным препаратам, относящихся к различным группам: пенициллины, тетрациклины, аминогликозиды, фторхинолоны, макролиды и др. (табл. 1). Используемые препараты применяются в клинической практике для лечения различных кишечных инфекций, инфекций дыхательных и мочевыводящих путей и др. В результате проведенных исследований показано, что штамм *L. reuteri* LR1 был чувствителен к линкомицину, амоксицилину и левомицетину, проявлял промежуточную устойчивость к ампициллину и неомицину, и обладал устойчивостью к осталь-

Таблица 1. Устойчивость *Lactobacillus reuteri* LR1 к антимикробным препаратам

№ п/п	Препарат	Содержание вещества в диске, мкг	Диаметр зоны ингибирования роста, мм	Оценка чувствительности лактобактерий
Группа аминогликозидов				
1	Гентамицин	120 мкг	12	Устойчивый
2	Канамицин	30 мкг	8–10	Устойчивый
3	Неомицин	30 мкг	12–14	Промежуточно-устойчивый
Группа пенициллинов				
4	Амоксициллин	20 мкг	25–26	Чувствительный
5	Ампициллин	10 мкг	15–16	Промежуточно-устойчивый
6	Бензилпенициллин	10 Ед.	10	Устойчивый
7	Оксациллин	1 мкг	9–10	Устойчивый
Группа тетрациклинов				
8	Доксициклин	30 мкг	8	Устойчивый
9	Тетрациклин	30 мкг	–	Устойчивый
Группа фторхинолонов				
10	Левوفлоксацин	5 мкг	8–10	Устойчивый
11	Пефлоксацин	5 мкг	–	Устойчивый
Группа макролидов-азалидов				
12	Азитромицин	15 мкг	9	Устойчивый
Другие				
13	Линкомицин	15 мкг	27	Чувствительный
14	Левомецетин	30 мкг	30–32	Чувствительный
15	Фосфомицин	200 мкг	10	Устойчивый

ным тестируемым антимикробным препаратам. Полученные результаты свидетельствуют о том, что штамм *L. reuteri* LR1 является относительно устойчивым к антибиотикам и может быть рекомендован для применения в виде бактериального препарата или в составе кисломолочного продукта для нормализации микрофлоры ЖКТ при антибактериальной терапии различных инфекций.

Биологическая и протеолитическая активность *in vitro*. В процессе ферментации молока штаммом *L. reuteri* LR1 происходило снижение активной кислотности в результате сбраживания углеводов молока с образованием органических кислот, в первую очередь молочной кислоты, а также ферментативный гидролиз белков молока, преимущественно различных фракций казеина, синтезируемыми *L. reuteri* LR1 протеазами с образованием пептидов. Данные по изменению содержания количества органических кислот при культивировании *L. reuteri* LR1 в стерильном обезжиренном молоке представлены на рис. 1. При этом в течение 24 ч ферментации молока происходило достоверное повышение антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активности на фоне снижения количества эквивалентов L-лейцина по сравнению с исходным молоком (табл. 2). Это обусловлено достаточно низкой протеолитической активностью

штамма *L. reuteri* LR1 в отношении казеиновых белков молока, в связи с чем, наблюдался медленный рост клеточной биомассы, количество клеток *L. reuteri* LR1 увеличивалось незначительно с 1.2×10^7 КОЕ/мл до 1.9×10^7 КОЕ/мл. В последующие 24 ч культивирования количество клеток *L. reuteri* LR1 увеличивалось с большей скоростью и достигало наибольшего значения

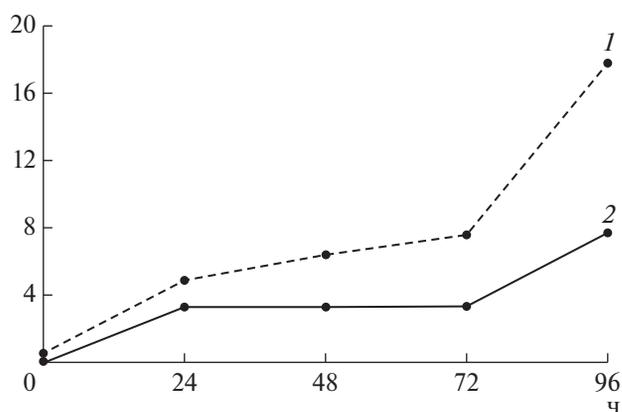


Рис. 1. Динамика изменения содержания органических кислот (мг/мл) при культивировании штамма *L. reuteri* LR1 на молоке: 1 — молочная кислота, 2 — уксусная кислота.

Таблица 2. Динамика изменения протеолитической, антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностей в процессе культивирования штамма *Lactobacillus reuteri* LR1 на молоке

Продолжительность культивирования, ч	Количество клеток <i>L. reuteri</i> LR1, КОЕ/мл	Антиоксидантная активность (ORAC), мкМ ТЭ/мг белка	АПФ-ингибирующая активность, (IC ₅₀) мг белка/мл	Протеолитическая активность, (эквиваленты L-лейцина), мМоль
0	1.2×10^7	205.6	26.2	8.1
24	1.9×10^7	374.9	12.6	6.2
48	3×10^9	295.1	11.2	6.0
72	9.4×10^8	361.5	7.1	8.5
96	9.3×10^8	453.6	1.6	10.4

Таблица 3. Количество идентифицированных уникальных пептидов казеиновых и неказеиновых белков в образцах исходного и ферментированного штаммом *Lactobacillus reuteri* LR1 молока

Образцы	Идентифицировано (всего)	Казеин β	Казеин α_{s1}	Казеин κ	Казеин α_{s2}	Неказеиновые белки
Контроль (молоко)	126	39	61	6	12	8
Ферментированное молоко	151	54	75	10	3	9

3×10^9 КОЕ/мл, при этом наблюдалось незначительное снижение антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностей на фоне неизменяющегося количества эквивалентов L-лейцина. При дальнейшем культивировании наблюдали увеличение протеолитической, антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностей, наибольшее значение которых достигалось на 96 ч культивирования (табл. 2). При этом количество жизнеспособных клеток *L. reuteri* LR1 практически не изменялось с 72 ч культивирования (табл. 2), что может быть объяснено достижением культуры стационарной фазы роста и возможным ингибированием роста из-за накопления в среде молочной и уксусной кислот (рис. 1).

Пептидный профиль и субстратная специфичность протеаз. В результате ВЭЖХ-МС/МС анализа пептидных фракций образцов не ферментированного (контроль) и ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1 молока идентифицировано 277 пептидов (табл. 3). В основном пептиды принадлежали казеиновым белкам, среди неказеиновых белков в наибольшем количестве были идентифицированы α -лактальбумин и β -лактоглобулин, лактоферин, остеопонтин и др.

В ферментированном молоке через 24 ч культивирования *L. reuteri* LR1 было идентифицировано порядка 150 олигопептидов, содержащих от 5 до 52 аминокислотных остатков (табл. 3, рис. 2 и 3). Анализ аминокислотных последовательностей олигопептидов показал, что большая часть из них, также присутствовала в исходном молоке до вне-

сения закваски, а другая часть являлась фрагментами этих пептидов (рис. 2 и 3). Из всех уникальных олигопептидов, идентифицированных в ферментированном *L. reuteri* LR1 молоке, только 7 образовались в результате гидролиза непосредственно β -казеина, а не олигопептидов, присутствующих в исходном молоке (рис. 2). Наличие пептидов в исходном неферментированном молоке указывало на активность эндогенных молочных протеаз, в основном, таких как плазмин, эластаза и катепсин D, B и G (рис. 2) [23]. При этом плазмин мало или совсем не активен в отношении κ -казеина и сывороточных белков, которых обнаружено значительно меньше, по сравнению с пептидами из β - и α_{s1} -казеинов (табл. 2, рис. 3). Отсутствие некоторых пептидов после ферментация молока, вероятно, обусловлено либо их гидролизом под действием внеклеточных протеаз *L. reuteri* LR1, или их потреблением клетками.

Полученные данные пептидного профиля согласуются с результатами определения протеолитической активности. Так в течение 48 ч культивирования *L. reuteri* LR1 наблюдали снижение количества эквивалентов L-лейцина с 8.1 мМ в исходном молоке до 6.0–6.2 мМ (табл. 2), что свидетельствовало об уменьшении суммарного количества пептидов, присутствовавших в молоке. Таким образом, в качестве источника азотного питания клетки *L. reuteri* LR1 использовали пептиды, исходно содержащиеся в молоке. Причем в течение ферментации молока штаммом *L. reuteri* LR1 сгусток не образовывался. Аналогичные резуль-

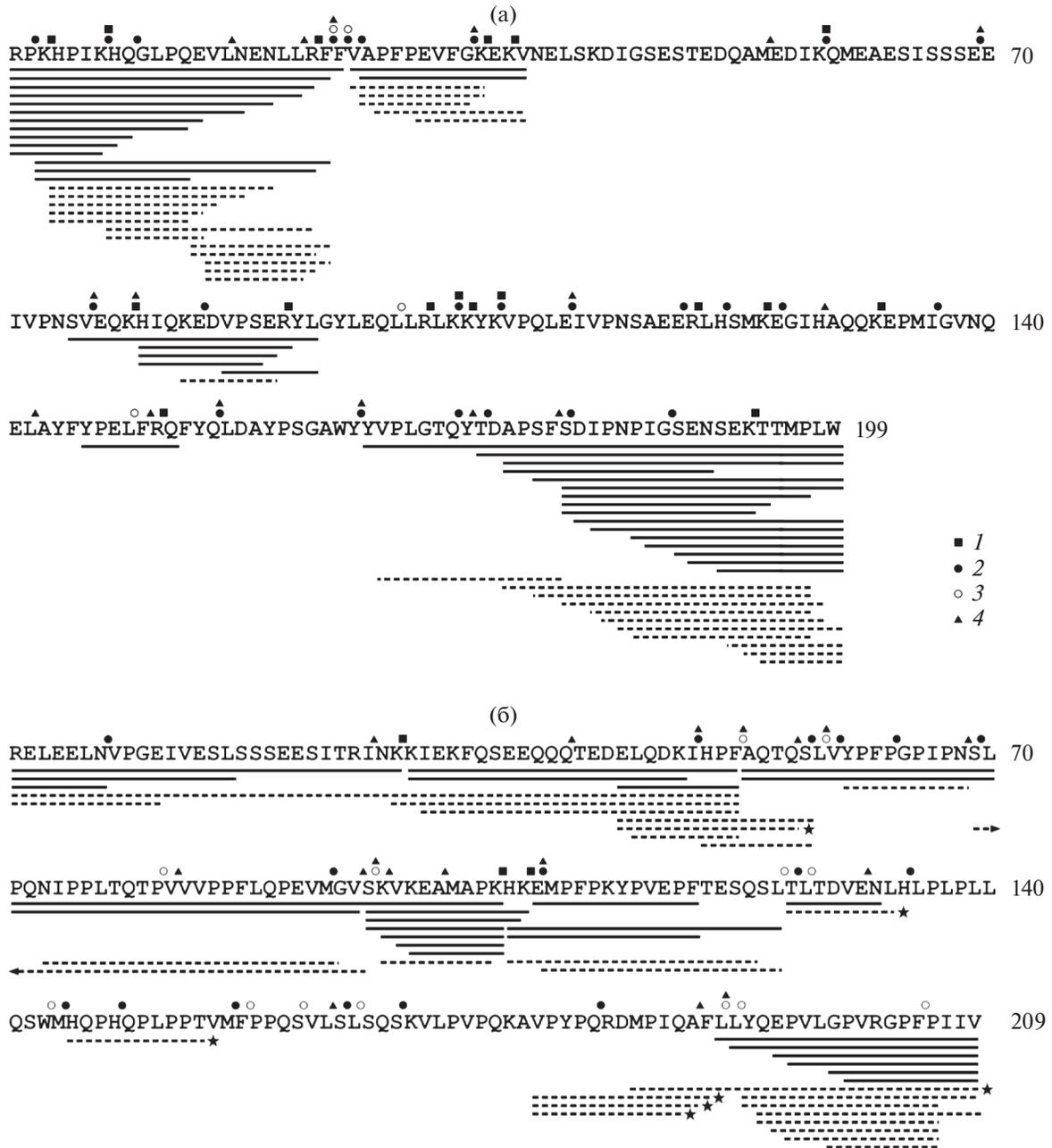


Рис. 2. Пептиды α_1 -казеина (а) и β -казеина (б), идентифицированные в составе образцов не ферментированного (контроль) и ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1 молока. Сплошная линия – пептиды, обнаруженные как в контрольном образце молока, так и в ферментированном *L. reuteri* LR1; пунктиром обозначены уникальные пептиды, обнаруженные только в образце ферментированного молока, звездочкой – пептиды, образовавшиеся в результате гидролиза β -казеина, а не его олигопептидов, присутствующих в исходном молоке. Сайты расщепления эндогенных молочных протеаз: 1 – плазмин; 2 – катепсин В; 3 – катепсин D; 4 – катепсин G [23].

таты были получены ранее в работе [24]. Авторы показали, что рост и развитие штаммов лактобацилл *L. reuteri* JCM 1112 и *Lactobacillus gasseri* JCM 1131 значительно улучшалось в предварительно гидролизованном молоке по сравнению с цельным обезжиренным. В качестве источника азота для роста в молоке этим штаммам требовались именно

олигопептиды, а не белки или свободные аминокислоты.

Лактобактерии содержат различные протеиназы клеточной стенки (ПКС, CEP – Cell Envelope Proteinase), ответственные за гидролиз преимущественно казеиновых белков и высвобождение различных биоактивных пептидов. В настоящее

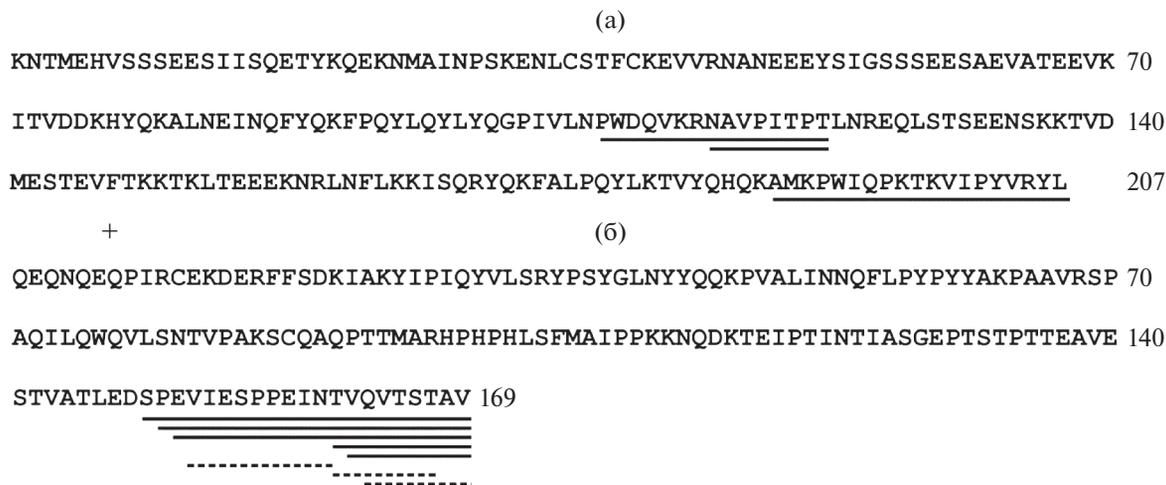


Рис. 3. Пептиды α_2 -казеина (а) и κ -казеина (б), идентифицированные в составе образцов не ферментированного (контроль) и ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1 молока. Сплошная линия – пептиды, обнаруженные как в контрольном образце молока, так и в ферментированном лактобациллой, пунктирные – пептиды, обнаруженные только в образце ферментированного молока.

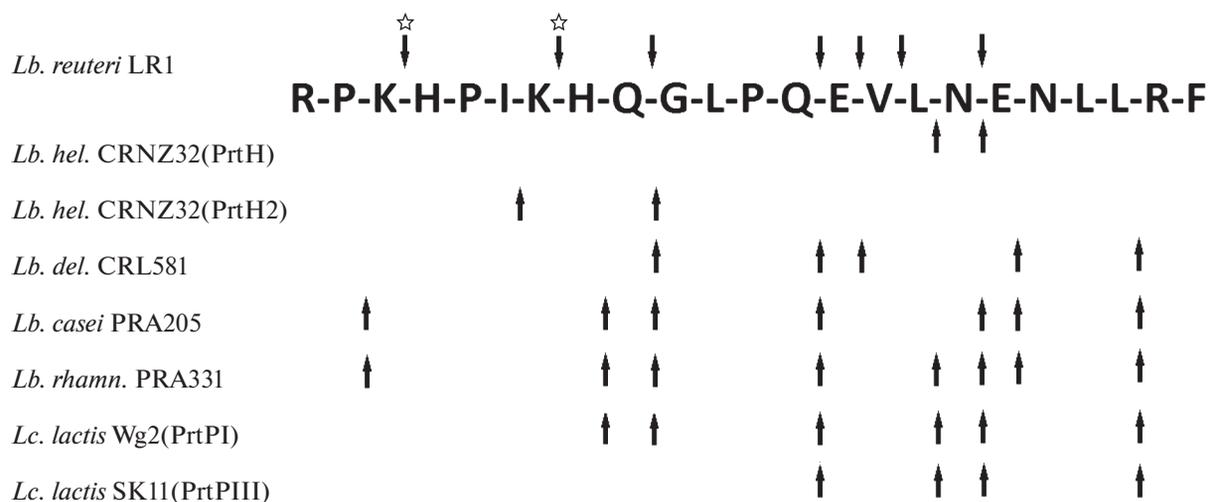


Рис. 4. Специфичность протеиназ клеточной стенки (ПКС) различных лактобактерий, в том числе штамма *L. reuteri* LR1 в отношении α_1 -казеина (f1–23). Сайты расщепления обозначены стрелками; сайты расщепления, не характерные для ПКС лактобактерий, отмечены звездочками. *Lb. hel.* – *L. helveticus* CRNZ32 [30]; *Lb. del.* – *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL581 [28]; *Lb. casei* – *L. casei* PRA205 [29]; *Lb. rhamn.* – *L. rhamnosus* PRA331 [29]; *Lc. lactis* Wg2 – *Lactococcus lactis* Wg2 [28]; *Lc. lactis* SK11 – *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 [32].

время охарактеризованы пять различных типов ПКС (СЕР) лактобактерий: **PrtP** из *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus paracasei*, **PrtH** из *Lactobacillus helveticus*, **PrtR** из *Lactobacillus rhamnosus*, **PrtS** из *Streptococcus thermophilus* и **PrtB** из *Lactobacillus bulgaricus* [25]. ПКС обычно классифицируются в соответствии с их спецификой гидролиза фрагмента α_1 -казеина, содержащего остатки от 1 до 23 [26]. Как правило, определяют два типа ПКС: PI и PIII тип. Предпочтительным субстратом протеиназ типа PI является β -казеин и, в меньшей степени, κ -казеин, в то время как тип PIII

способен гидролизовать α_1 -, β - и κ -казеины в равной степени. Для лактобацилл были показаны типы протеиназ: PI- и PIII-типов, а также промежуточного PI/PIII с новым типом субстратной специфичности [27].

L. reuteri LR1 гидролизует (f1–23) фрагмент α_1 -казеина в следующих положениях: K3–H4, K7–H8, Q9–G10, Q13–E14, E14–V15, V15–L16, N17–E18 (рис. 4). Большинство из данных сайтов расщепления типичны для ПКС смешанного типа PI/PIII, выделенных из лактобактерий, таких как *S. thermophilus* CNRZ385, *Lactobacillus delbrueckii* subsp.

lactis CRL581 и *L. helveticus* L89, *L. casei* PRA205 и *L. rhamnosus* PRA331 [25, 28, 29]. Для ПКС *L. reuteri* LR1 не характерны сайты рестрикции в положениях H8-Q9, L16-N17 и E18-N19, описанные для протеиназ других лактобактерий (рис. 4). Однако обнаружено 3 дополнительных сайта в позициях K3-N4, K7-N8 и V15-L16. Известно, что (f1–9) последовательность аминоконцевой области α_{s1} -казеина гидролизуеться только внутриклеточными эндопептидазами PerO2 и PerO3 из *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 по связи P5-I6 [30]. Кроме того, эти же авторы показали, что сайты K3-N4 и K7-N8 чувствительны к действию эндопептидазы PerE *L. helveticus* CNRZ32. Однако рост бактериальной биомассы и отсутствие лизиса клеток (табл. 2, рис. 1) в процессе ферментации в первые 24 ч исключает вероятность влияния внутриклеточных протеаз на наблюдаемый гидролиз казеина штаммом *L. reuteri* LR1. Более того ранее было показано наличие субстратной специфичности в отношении K3-N4 сайта у ПКС *L. helveticus* Zuc2 [31]. Сайты рестрикции K7-N8 и V15-L16 показаны впервые для ПКС лактобацилл, что подчеркивает уникальную специфичность данной протеиназы *L. reuteri* LR1, которая может быть отнесена к PI/PIII типу, демонстрируя более высокую активность в отношении β -, α_{s1} -казеинов, по сравнению с κ - и α_{s2} -казеинами коровьего молока.

Биологически активные пептиды. При сравнении идентифицированных пептидов с базой данных Milk Bioactive Peptide Database были обнаружены пептиды, функциональные свойства которых ранее были описаны в научной литературе [33]. Например, такие как β -казеиновые пептиды: YQEPVLG-PVRGPFPIIV (f193–209), YQEPVLG-PVRGPFPIIV (f193–206) и QEPVLG-PVRGPFPIIV (f194–209), обладающие АПФ-ингибирующей, антимикробной и иммуномодуляторной активностями; κ -казеиновый пептид VQVTSTAV (f162–169) – антимикробной и β -казеиновый YPFPGIPN (f60–68) – АПФ-ингибирующей активностями. Для обнаруженного α_{s1} -казеинового пептида EVLNENLLRF (f14–23) в работе [34] было показано наличие АПФ-ингибирующей активности, пептидная фракция, содержащая данный пептид, имела значение $IC_{50} < 10$ мкг/мл.

Среди идентифицированных обнаружены пептиды, содержащие остатки редокс-активных аминокислот (тирозина, триптофана, метионина, цистеина и гистидина), определяющих наличие у данных пептидов антиоксидантных свойств. Так в ферментированном молоке идентифицирован β -казеиновый октапептид VKEAMAPK (f98–104), для которого показано наличие антиоксидантной активности.

Анализ идентифицированных пептидов показал, что в состав ферментированного *L. reuteri* LR1 молока также входят пептиды, содержащие в своем составе фрагменты, для которых по литературным данным показано наличие гипотензивных свойств, обусловленных их АПФ-ингибирующим действием (табл. 4). В отличие от пептидов, обладающих АПФ-ингибирующей активностью, иммуномодулирующие пептиды, высвобождаемые из β -казеина, описаны реже. Однако те пептиды, которые были описаны как многофункциональные пептиды, такие как β -казеиновый пептид (f59–68), проявляющий антиоксидантную, опиоидную и АПФ-ингибирующую активности, и пептид (f193–209), проявляющий антимикробную, иммуномодулирующую, антитромботическую, АПФ-ингибирующую и антиоксидантную активности, происходят из С-концевой области β -казеина [33]. Недавно был охарактеризован β -казеиновый пептид DMPIQAFLLYQEPVLGPVR (f184–202), обладающий противовоспалительным действием [33]. В ферментированном *L. reuteri* LR1 молоке были также обнаружены пептиды из С-концевой области β -казеина, такие как MPIQAFLLYQEPVLGPVRG-PFPIIV (f185–209), VPYPQRDMPIQ (f178–188), VPYPQRDMPIQA (f178–189) и VPYPQRDMPIQAF (f178–190). Все эти пептиды образовались в результате гидролиза белковой последовательности β -казеина, а не его олигопептидов, присутствующих в исходном молоке, на рис. 2 обозначены звездочкой. Можно предположить, что пептиды, высвобождаемые из этой части β -казеина, могут быть ответственны за возможное противовоспалительное и/или иммуномодулирующее действие ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1 молока.

Таким образом, в результате детальной характеристики пептидного профиля белково-пептидной фракции молока, ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1, в его составе идентифицированы пептиды, отвечающие за антиоксидантные, гипотензивные и антимикробные свойства, что подтверждается наличием соответствующих активностей ферментированного молока в тестах *in vitro* (табл. 2). Полученные значения протеолитической и антиоксидантной активности для штамма *L. reuteri* LR1 соответствуют имеющимся в литературе данным для других пробиотических штаммов лактобацилл. Так ферментированное лактобациллой *L. plantarum* молоко через 48 ч культивирования имело сопоставимую с полученными в данной работе для штамма *L. reuteri* LR1 антиоксидантную активность – 250–350 мкМ эквивалентов тролокса (ORAC) [45]. Протеолитическая активность штамма *L. reuteri* LR1 через 72 ч ферментации на молоке составляла 8.5 мМоль L-лейциновых эквивалентов, что сопоставимо с активностью штаммов *L. rhamnosus* PRA331 и *L. casei* PRA205 через

Таблица 4. Предсказанные гипотензивные пептиды с АПФ-ингибирующей активностью, идентифицированные в составе ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1 молока

Идентифицированный пептид*	Пептид с гипотензивной активностью	IC ₅₀ , мкМ	Ссылка
SLPQNIPLTQTPVVPPFLQPEVMGV CASB (f69–95)	LVYFPFGPIPNSLPQNIPP	5.3	[35]
	NIPPLTQTPV	173	[36]
	TPVVPPFLQP	749	[37]
YFPFGPIPN CASB (f60–68)	YFPFGPI	500	[36]
	SKVYFPFGPI	1.7	[38]
	YFPFGPIPN	15	[39]
	TPVVPPFLQP	749	[37]
	IPPLTQTPVVPP	9.0	[40]
NIPPLTQTPVVPPFLQPEVM CASB (f73–93)	FAQTQSLVYP	25	[41]
	DKIHFP	257	[36]
ELQDKIHFPFAQTQ CASB (f44–56)	KIHFPFAQTQSLVYP	39	[41]
ELQDKIHFPFAQTQS CASB (f44–57)	ELQDKIHFP	–	[42]
LQDKIHFP CASB (f45–55)	VAPFPEVF	363	[43]
VAPFPEVFGK CASA1 (f25–34)	FVAPFPEV	476	
	FFVAPFPEVFGK	18	[44]
VAPFPEVFGKEKV CASA1 (f25–37)			
APFPEVFGK CASA1 (f26–34)			
APFPEVFGKEKV CASA1 (f26–37)			
APFPEVFG CASA1 (f26–33)			
PFPEVFGKEKV CASA1 (f27–37)			
EVFGKEKV CASA1 (f30–37)			
VLNENLLR CASA1 (f30–37)	NENLLRFFVAPFPEVFG	55	[42]
VLNENLLRF CASA1 (f30–38)	ENLLRFFVAPFPEVFG		
LNENLLR CASA1 (f31–37)	LNENLLRFFVAPFPEVFG		

* CASB – β-казеин; CASA1 – α_{s1}-казеин.

72 ч ферментации молока – 6.4 и 10.9 мМоль L-лейциновых эквивалентов соответственно [29]. По величине АПФ-ингибирующей активности ферментированное штаммом *L. reuteri* LR1 молоко (IC₅₀ = 7–11 мг/мл) по диапазону величин IC₅₀ не отличается от описанных в литературе для ферментированных молочных напитков [46]. Однако АПФ-ингибирующая активность ферментированного штаммом *L. reuteri* LR1 молока на порядок ниже, чем показана для штамма *L. acidophilus* ATCC 4356 и которая через 24 ч ферментации молока составляла IC₅₀ = 0.42 мг/мл [47], что связано с более низкой протеолитической активностью *L. reuteri* LR1 по сравнению с *L. acidophilus* ATCC 4356. У последнего уже через 24 ч роста протеолитическая активность составляла 10 мМоль L-лейциновых эквивалентов (рН 5.6), а количество жизнеспособных клеток 6.4 × 10⁸ КОЕ, в то время как у *L. reuteri* LR1 – 6.2 мМоль L-лейциновых эквивалентов и 1.9 × 10⁷ КОЕ.

Проведенные *in vitro* исследования позволяют сделать вывод, что штамм *L. reuteri* LR1 обладает выраженными антиоксидантными, гипотензивными и антимикробными свойствами и может

быть использован как заквасочная культура с пробиотическими свойствами.

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального государственного учреждения “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в части определения протеолитической, антиоксидантной, АПФ-ингибирующей активностей штамма *L. reuteri* LR1 и определения его пептидного профиля (проект № 16-16-00094).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kundu P., Blacher E., Elinav E., Pettersson S. // Cell. Elsevier Inc. 2017. V. 171. № 7. P. 1481–1493.
2. Ly N.P., Litonjua A., Gold D.R., Celedon J.C. // Allergy Clin. Immunol. 2011. V. 127. № 5. P. 1087–1094.
3. Zoumpopoulou G., Pot B., Tsakalidou E., Papadimitriou K. // Int. Dairy J. 2017. V. 67. P. 46–60.

4. Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Foligné B., Gänzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E.J., Hutkins R. // *Curr. Opin. Biotech.* 2017. V. 44. P. 94–102.
5. Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. World Health Organization. FAO Food and Nutritional Paper 85. Rome: FAO/WHO working group, 2006. P. 56
6. Freeman H.J. // *Cancer Research.* 1986. V. 46. № 11. P. 5529–5532.
7. Le-Blanc J.G., Garro M.S., Savoy de Giori G. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. V. 65. № 1. P. 119–123.
8. Ahotupa M., Saxelin M., Korpela R. // *Nutr. Today Suppl.* 1996. V. 31. P. S51–S52.
9. Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. № 9. P. 4322–4327.
10. O'Connor P.M., Ross R.P., Hill C., Cotter P.D. // *Curr. Opin. Food Sci.* Elsevier Ltd. 2015. V. 2. P. 51–57.
11. Буланова Е.М., Буланова У.М., Богданова Н.М., Лобанова Е.А., Габруская Т.В. // *Педиатрия.* 2010. Т. 89. № 3. С. 84–90.
12. Naghmouchi K., Belguesmia Y., Bendali F., Spano G., Seal B.S., Drider D. // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1688250>
13. Фёдорова Т.В., Васина Д.В., Бегунова А.В., Рожкова И.В., Раскошная Т.А., Габриэлян Н.И. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2018. Т. 54. № 3. С. 1.
14. Бегунова А.В., Рожкова И.В., Ширшова Т.И., Глазунова О.А., Фёдорова Т.В. // *Биотехнология.* 2019. Т. 35. № 5. С. 58–69.
15. Adler-Nissen J. // *J. Agric. Food Chem.* 1979. V. 27. № 6. P. 1256–1979.
16. Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R.L. // *J. Agric. Food Chem.* 2001. V. 49. P. 4619–4626.
17. Moore J., Cheng Z., Su L., Yu L. // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54. P. 9032–9045.
18. Торкова А.А., Рязанцева К.А., Агаркова Е.Ю., Кручинин А.Г., Центалович М.Ю., Фёдорова Т.В. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2017. Т. 53. № 6. С. 580–591.
19. Owusu-Kwarteng J., Tano-Debrah K., Akabanda F., Jespersen L. // *BMC Microbiology.* 2015. 15:261. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0602-6>
20. Fontana A., Falasconi I., Molinari P., Treu L., Basile A., Vezzi A., Campanaro S., Morelli L. // *Front. Microbiol.* 2019. 10:1380. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01380>
21. Pino A., Bartolo E., Caggia C., Cianci A., Randazzo C.L. // *Scientific Reports.* 2019. 9:3355. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40304-3>
22. Семенихина В.Ф., Рожкова И.В., Бегунова А.В., Фёдорова Т.В., Ширшова Т.И. // *Вопросы питания.* 2018. Т. 87. № 5. С. 54–61.
23. Baum F., Fedorova M., Ebner J., Hoffmann R., Pischetsrieder M. // *J. Proteome Res.* 2013. V. 12. P. 5447–5462. <https://doi.org/10.1021/pr4003273>
24. Arakawa K., Matsunaga K., Takihiro S., Moritoki A., Ryuto S., Kawai Y., Masuda T., Miyamoto T. // *J. Dairy Sci.* 2015. V. 98. P. 1593–1603. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8860>
25. Sadat-Mekmene L., Genay M., Atlan D., Lortal S., Gagnaire V. // *Int. J. Food Microbiol.* 2011. V. 146. P. 1–13.
26. Exterkate F.A. // *Int. Dairy J.* 1995. V. 5. P. 995–1018.
27. Villegas J.M., Brown L., Savoy de Giori G., Hebert E.M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. P. 4277–4286.
28. Hebert E.M., Mamone G., Picariello G., Raya R.R., De Giori G.S., Ferranti P., Addeo F. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 3682–3689.
29. Solieri L., De Vero L., Tagliacuzzi D. // *Int. Dairy J.* 2018. V. 85. P. 237–246.
30. Sridhar V.R., Hughes J.E., Welker D.L., Broadbent J.R., Steele J.L. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 6. P. 3025–3033. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3025-3032.2005>
31. Scolari G., Vescovo M., Zacconi C., Vescovi F. // *J. Dairy Sci.* 2006. V. 89. P. 3800–3809.
32. Reid J.R., Moore C.H., Midwinter G.G., Pritchard G.G. // *Appl. Microbiol. Biot.* 1991. V. 35. P. 222–227.
33. Nielsen S.D., Beverly R.L., Qu Y., Dallas D.C. // *Food Chem.* 2017. V. 232. P. 673–682.
34. Torres-Llanez M.J., González-Córdova F., Hernández-Mendoza A., García H.S., Vallejo-Cordoba B. // *J. Dairy Sci.* 2011. V. 94. P. 3794–3800. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4237>
35. Miguel M., Recio I., Ramos M., Delgado M.A., Alexandre M.A. // *J. Dairy Sci.* 2006. V. 89. P. 3352–3359.
36. Van der Ven C., Gruppen H., de Bont D.B., Voragen A.G. // *J. Agric. Food Chem.* 2002. V. 50. № 10. P. 2938–46.
37. Abubakar A., Saito T., Kitazawa H., Kawai Y., Itoh T. // *J. Dairy Sci.* 1998. V. 81. P. 3131–3138.
38. Korhonen H., Pihlanto A. // *Curr. Pharm. Des.* 2007. V. 13. P. 829–843.
39. FitzGerald R.J., Murray B.A., Walsh D.J. // *J. Nutr.* 2004. V. 134. P. 980S–988S.
40. Ali E., Nielsen S.D., Abd-El Aal S., El-Leboudy A., Saleh E., LaPointe G. // *Front. Nutr.* 2019. V. 6. P. 152. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00152>
41. Kohmura M., Nio N., Ariyoshi Y. // *Agric. Biol. Chem.* 1990. V. 54. P. 1101–1102.
42. Robert M.C., Razaname A., Mutter M., Juillerat M.A. // *J. Agric. Food Chem.* 2004. V. 52. P. 6923–6931. <https://doi.org/10.1021/jf049510t>
43. Del Mar Contreras M., Carrón R., Montero M.J., Ramos M., Recio I. // *Int. Dairy J.* 2009. V. 19. P. 566–573. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.05.004>
44. Tauzin J., Miclo L., Gaillard J.-L. // *FEBS Lett.* 2002. V. 531. P. 369–374.
45. Aguilar-Toalá J.E., Santiago-López L., Peres C.M., Peres C., Garcia H.S., Vallejo-Cordoba B., González-Córdova A.F., Hernández-Mendoza A. // *J. Dairy Sci.* 2017. V. 100. № 1. P. 65–75.
46. Nejati F., Rizzello C.G., DiCagno R., Sheikh-Zeinodin M., Diviccaro A., Minervini F., Gobbetti M. // *LWT – Food Sci. Technol.* 2012. V. 51. P. 183–189.
47. Pihlanto A., Virtanen T., Korhonen H. // *Int. Dairy J.* 2010. V. 20. P. 3–10.

***In vitro* Evaluation of Probiotic Potential and Functional Properties of *Lactobacillus reuteri* LR1**

A. V. Begunova^a, O. S. Savinova^b, I. V. Rojkova^a, U. I. Krisanova^a, and T. V. Fedorova^{b,*}

^aAll-Russian Research Institute of Dairy Industry, Moscow, 115093 Russia

^bBach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

A study of the strain *Lactobacillus reuteri* LR1 sensitivity to various antimicrobial agents showed its sensitivity to lincomycin, amoxicillin and chloramphenicol and resistance to other antibiotics studied. Upon fermentation of milk with the *L. reuteri* LR1 strain for 24 h, there was a significant increase in antioxidant and ACE inhibitory activities against the background of a decrease in the number of L-leucine equivalents compared to the original milk. During further cultivation, the proteolytic, antioxidant and inhibitory activity of the angiotensin converting enzyme (ACE) increased, reaching its highest value after 96 hours. HPLC-MS/MS analysis of the peptide profile of milk fermented with lactobacillus showed the presence of peptides with ACE-inhibiting, antimicrobial, antioxidant and immunomodulatory activity. Analysis of the substrate specificity of *L. reuteri* LR1 CEP proteinase for the (f1–23) α_{s1} casein fragment showed its unique specificity, which may indicate PI/PIII type.

Keywords: *Lactobacillus reuteri* LR1, resistance to antibacterial drugs, proteolytic activity, antioxidant activity, ACE inhibitory activity, peptide profile, biologically active peptides

УДК 582.284.51:577.115

АНАЛИЗ И ВЫДЕЛЕНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ГРИБА *Bipolaris sorokiniana* РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ ХРОМАТОГРАФИИ И СПЕКТР ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

© 2020 г. А. О. Берестецкий^{1, *}, А. А. Далинова¹, В. Р. Дубовик¹, Е. Н. Григорьева¹, Д. М. Кочура², И. В. Сендерский¹, С. Н. Смирнов³, Е. А. Степаньчева¹, С. М. Тураева⁴

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, 196608 Россия

²НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека, Санкт-Петербург, 188663 Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

⁴Институт химии растительных веществ АН РУз, Ташкент, 100170 Узбекистан

*e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru

Поступила в редакцию 30.12.2019 г.

После доработки 14.04.2020 г.

Принята к публикации 22.04.2020 г.

Выделены и охарактеризованы вторичные метаболиты четырех изолятов космополитного гриба *Bipolaris sorokiniana* различного географического происхождения. Анализ экстрактов культуральной жидкости и твердофазных культур методами ТСХ и ВЭЖХ-МС показал высокое сходство качественного состава метаболитов у изученных изолятов *B. sorokiniana*. С использованием колоночной хроматографии и препаративной ВЭЖХ из экстрактов твердофазных культур очищено 14 соединений (терпенов, ксантонов, хинонов и др.), 12 из которых было идентифицировано. Максимальную фитотоксическую активность на листьях пшеницы проявляла хлоромонилининовая кислота В (ХМКВ). Выделенные соединения в различной степени ингибировали рост *Bacillus subtilis*, наиболее сильно — метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат (МГМХК). Впервые у некоторых метаболитов *B. sorokiniana* (ХМКВ, МГМХК) обнаружена инсектицидная активность в отношении злаковой тли. Все выделенные метаболиты (особенно кохлиохиноны и фузапролиферин) были токсичны в отношении культуры клеток Sf9. Изученные вещества не проявляли острой токсичности в отношении инфузории-туфельки. Широкий набор синтезируемых биологически активных метаболитов может определять высокую токсигенность и конкурентоспособность *B. sorokiniana* в различных экологических нишах.

Ключевые слова: *Bipolaris sorokiniana*, химическая экология, вторичные метаболиты

DOI: 10.31857/S0555109920050050

Космополитный гриб *Bipolaris sorokiniana* поражает различные органы травянистых, преимущественно злаковых, растений и способен развиваться эндофитно, эпифитно и в почве. Этот микромикет является широко распространенным возбудителем корневой гнили и листовой пятнистости злаковых культур, нанося значительный экономический урон. Инфицирование зерна злаков этим фитопатогеном приводит к снижению их качества и всхожести, а также накоплению в них микотоксинов (например, стеригматоцистина) [1–4].

Начатые в середине 20 века исследования биологически активных метаболитов *B. sorokiniana* продолжаются до настоящего времени, позволяя обнаруживать все новые и новые соединения. Среди них встречаются вещества различной биологической активности (фитотоксической, антимицробной, нематотоксической, цитотоксической и др.) и

химической структуры (рис. 1, табл. 1). Возможно, метаболиты *B. sorokiniana* могут обладать и инсектицидными свойствами [5].

Исследования по выделению и характеристике метаболитов *B. sorokiniana* проводились рядом научных групп с использованием различных подходов и в разные годы. Это не позволяет представить общую картину разнообразия вторичных метаболитов этого гриба и спектр их биологической активности.

Цель работы — сравнение хроматографических профилей экстрактов из культур различных по географическому происхождению изолятов *B. sorokiniana*, идентификация биологически активных веществ (БАВ) экстрактов гриба и определение спектра биологической активности хроматографических фракций и полученных индивидуальных соединений.

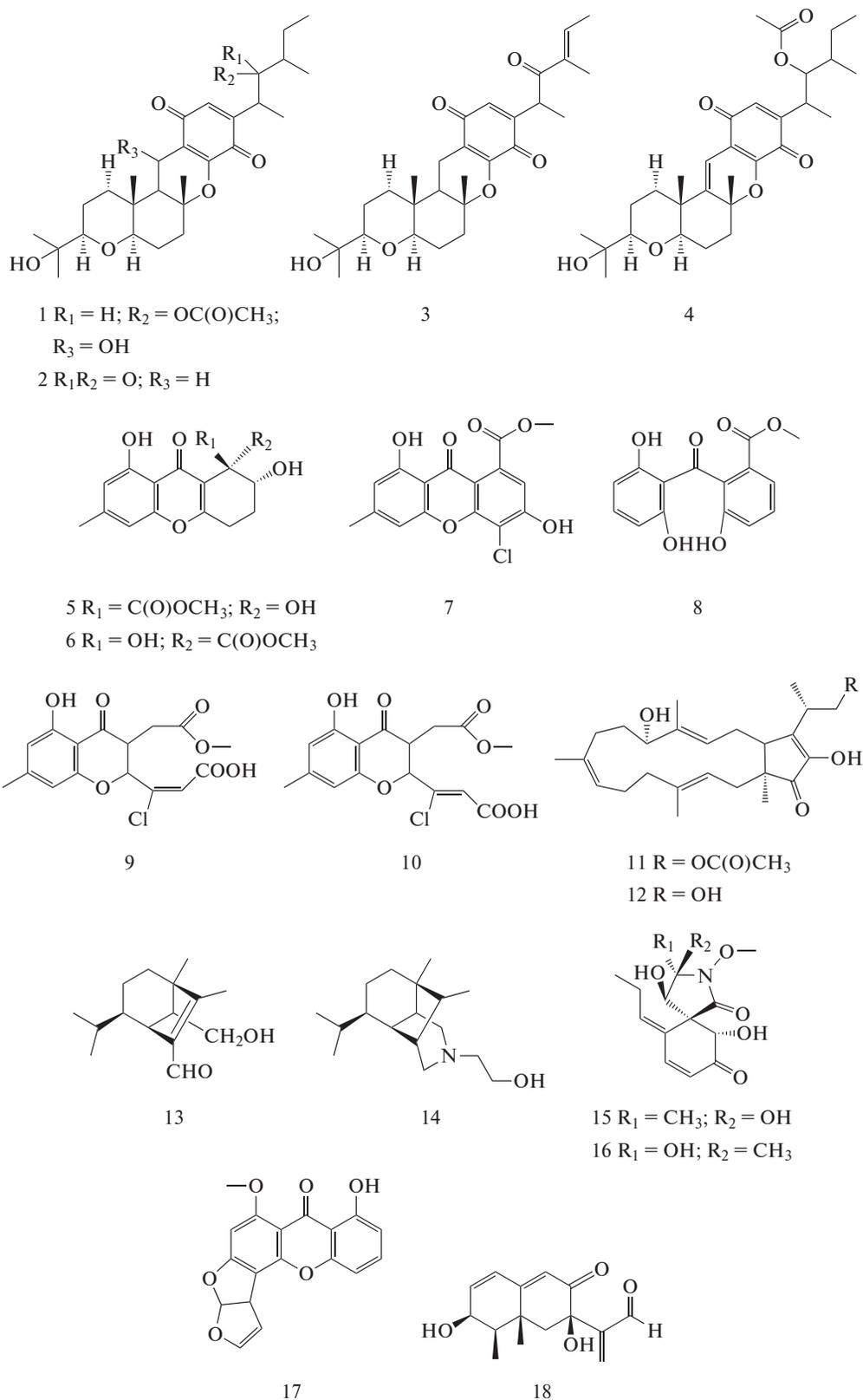


Рис. 1. Вторичные метаболиты, выделенные из *B. sorokiniana*: 1 – кохлиохинон А, 2 – кохлиохинон В, 3 – кохлиохинон D, 4 – ангидрокохлиохинон А, 5,6 – α,β -диверсолоновые эфиры, 7 – метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат, 8 – монилифенон, 9 – хлормонилиниковая кислота В, 10 – хлоромонилиниковая кислота D, 11 – фузапролиферин, 12 – терпестацин, 13 – гельминтоспорол, 14 – виक्टоксинин, 15 – спиростафлотрихин R, 16 – спиро-стафлотрихин U, 17 – стеригматоцистин, 18 – bipolarоксин.

Таблица 1. Биологически активные вторичные метаболиты *B. sorokiniana* и их характеристика

Название	М, Да	УФ λ макс, нм	Активность*	Ссылка
Стеригматоцистин	324	240, 282, 321	ЦА	[6, 7]
Хлоромониликовая кислота В	352	205, 247, 333	ФА	[8, 9]
Метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат	334	242, 309, 353	АМ	[9]
Цинодонтин	286	241, 295, 471, 483, 503, 514, 539, 552	АМ	[10]
Гельминтоспорин	270	252, 256, 287, 475, 490, 512, 526	АМ	
Прегельминтоспорол	236	Нет	ФА, АМ	[11]
Виктоксинин	263	Нет	ФА	[12]
Гельминтоспораловая кислота	250	Нет	ФА	[13]
Гельминтоспорол	236	266	ФА	
Гельминтоспорал	234	266	ФА	[14]
Сорокианин	308	Нет	ФА	[15]
Биполароксин	262	216, 279	ФА	[16]
Сорокиниол	374	Нет	ИФ	[17]
VZR котоксин-I	967	Нет	ФА, ИФ	
11-эпитерпестацин (терпестацин, сикканол)	402	264	ФА, АМ	[18, 19]
Кохлиохинон А	532	245, 280, 390, 270, 399	НА, ФА	[20, 21]
Кохлиохинон В	472	260, 395	ЦА, ФА	[22]
Кохлиохинон Н	470	203, 268	ЦА	
Кохлиохинон С	488	240, 280	ЦА, ФА	[23]
Кохлиохинон D	470	260, 400	ЦА	
Кохлиохинон Е	488	257	ЦА, ФА	
Биполарсеринол	302	264, 340	ИФ	[24]

* АМ – антимикробная, НА – нематическая, ИФ – ингибитор ферментов, ЦА – цитотоксическая, ФА – фитотоксическая активность.

МЕТОДИКА

Культивирование грибов и получение экстрактов. Изоляты *B. sorokiniana* были предоставлены сотрудником лаборатории иммунитета растений к болезням Всероссийского института защиты растений А.В. Анисимовой (Россия). Изоляты были выделены из образцов злаков, собранных в различных природно-климатических зонах России и Республики Беларусь: ЛО (листья ячменя, Ленинградская область, Россия), Бр20 (листья пшеницы, Республика Беларусь), К7 (листья пшеницы, Курганская обл., Россия), ПК (листья пшеницы, Приморский край, Россия). Культуры грибов хранили в пробирках на стандартной среде картофельно-глюкозном агаре (КГА) при температуре 5°C.

Экстракты *B. sorokiniana* получали согласно разработанному нами протоколу [5]. Для этого грибы культивировали в культуральных матрацах на 2 л с 400 мл жидкой питательной среды ДМГ, содержащей (г/л): дрожжевой экстракт – 4, мальтозный экстракт – 10, глюкоза – 10, а также в конических колбах объемом 500 мл на твердой среде, содержащей 60 г перловой крупы и 40 мл воды. Субстраты стерилизовали автоклавированием в течение 20 мин при 121°C. В качестве посевного материала использовали блоки диаметром 5 мм из

края недельных колоний *B. sorokiniana*, полученных на КГА при 24°C. Культуры грибов инкубировали в темноте в течение 3 нед при постоянной температуре 24°C. Для улучшения аэрации и предотвращения комкования твердофазных культур колбы ежедневно тщательно встряхивали. Культивирование грибов выполняли в 4 повторностях.

Метаболиты *B. sorokiniana* экстрагировали из культуральной жидкости (400 мл) этилацетатом (двумя порциями по 200 мл). Для извлечения метаболитов из твердофазных культур *B. sorokiniana* 10 г высушенного и грубоизмельченного биоматериала экстрагировали 50%-ным водным ацетоном (двумя порциями по 100 мл). Из экстракта, полученного 50%-ным ацетоном, упаривали органический растворитель на ротационном испарителе при 40°C, а затем метаболиты гриба переэкстрагировали из оставшейся водной вытяжки этилацетатом (двумя порциями по 50 мл). Остатки воды в этилацетатных экстрактах удаляли с помощью безводного сульфата натрия, после чего растворитель отгоняли на ротационном испарителе при 40°C. Сухой остаток взвешивали.

Биологическая активность. Для оценки фитотоксической и инсектицидной активности сухой остаток экстрактов или хроматографических ком-

понентов растворяли в этаноле и объем раствора доводили водой, чтобы конечная концентрация спирта составляла 5%, а остатков или компонентов – 0.5% (чистых веществ – 0.1%).

Для определения фитотоксической активности экстрактов во влажную камеру (контейнер с фильтровальной бумагой, смоченной водой) помещали отрезки листьев пшеницы длиной ~2 см. Каждый вариант включал 12 отрезков, в шести из которых в центре листа при помощи препарировальной иглы делали надкол. В центр каждого листового сегмента наносили 10 мкл 0.5%-го экстракта. Инкубацию проводили при переменном 12-часовом искусственном освещении и постоянной температуре 24°C. Через 48 ч измеряли длину некротического пятна.

Лабораторную популяцию обыкновенной злаковой тли (*Schizaphis graminum*) содержали на проростках пшеницы в термостатированном помещении при $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и длительности светового дня 16 ч. Для оценки инсектицидной активности полученными спиртовыми растворами пропитывали диски фильтровальной бумаги (по 250 мкл на диск), которые помещали на дно и крышку чашки Петри диаметром 4 см. Там же размещали отрезок листа пшеницы 2 см (сорт Саратовская 29), смоченный указанными выше спиртовыми растворами, и выпускали на него по 20 особей тли. Смертность насекомых и эффективность обработок учитывали через 1 сут инкубирования при температуре 24°C.

Цитотоксическую активность экстрактов метаболитов изучали по отношению к клеточной линии Sf9 (ECACC 89070101) кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), которая поддерживается в лаборатории микробиологической защиты ВИЗР (Санкт-Петербург, Россия). В лунки 48-луночного планшета вносили по 100 мкл 1%-ного экстракта, разведенного ацетоном, растворитель выпаривали. Сухой остаток растворяли в 20 мкл диметилсульфоксида, после чего в каждую лунку вносили 880 мкл питательной среды SF900II (“Thermo Fisher Scientific”, США) и 100 мкл суспензии активно растущих клеток (жизнеспособность не ниже 90%) в концентрации 3×10^5 кл./лунку. В результате концентрация экстракта была 100 мкг/мл, растворителя – 2%. Клетки инкубировали 24 ч при 27°C, окрашивали трипановым синим и определяли долю погибших (окрашенных) клеток по отношению к общему количеству (не менее 50) в нескольких полях зрения.

Оценку токсичности экстрактов проводили также и по отношению к клеткам инфузории-туфельки (*Paramecium caudatum*). Культуру инфузории, которая была предоставлена Д.О. Виноходовым (Санкт-Петербургский технологический университет, Россия), поддерживали на среде Лозина-Лозинского. В лунки 24-луночного планшета вносили по

0.5 мл суспензии клеток инфузории (примерно 100 кл./мл). К суспензии добавляли 5 мкл 1%-ного экстракта в ацетоне. Таким образом, конечная концентрация экстракта составила 100 мкг/мл, а ацетона – 1%. Каждый вариант включал 3 повторности. Выживаемость инфузорий анализировали через 3, 30 и 180 мин после начала эксперимента.

Антимикробную активность выделенных соединений определяли методом бумажных дисков (50 мкг/диск) на культуре *Bacillus subtilis* CIAM 106.

Хроматографический анализ экстрактов. *Тонко-слоистая хроматография (ТСХ).* Для анализа экстрактов методом ТСХ использовали нормально-фазовые пластины (TLC Silica gel 60 F254, 20 × 10 см, “Merck”, Германия) и хроматографическую систему (“Camag”, Швейцария), состоящую из автосамплера (ATS4) и УФ/ВИД-детектора (TLC Scanner). Сухой остаток экстрактов растворяли в ацетоне до концентрации 10 мг/мл и наносили распылением на пластины полосой, шириной 5 мм. Объем анализируемых проб составлял 10 мкл. Элюирование экстрактов осуществляли в камере 22 × 12 × 6 см (“Camag”, Швейцария) в системе растворителей толуол–этилацетат–уксусная кислота (60 : 40 : 1, об./об.). Предварительно были испытаны также системы толуол–этилацетат–уксусная кислота (70 : 30 : 1) и хлористый метиленаметанол (95 : 5). Компоненты экстрактов детектировали тремя способами: 1) с помощью УФ/ВИД-детектора при 200, 254, 270 и 340 нм; 2) визуально с помощью УФ-лампы на 254 нм (“Vilber-Lourmat”, Франция), 3) после дериватизации реагентом (серная кислота : анисовый альдегид : этанол в соотношении 1 : 1 : 8, по объему) с последующим нагреванием до 100°C 5 мин. Оценивали R_f веществ, их количество и площадь пиков или интенсивность полос, а также их окраску после дериватизации.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ-МС). Для растворения сухих остатков экстрактов и хроматографических фракций использовался ацетонитрил. Их анализировали с использованием системы ВЭЖХ Acella с трехкварупольным масс-спектрометрическим детектором TSQ Quantum Access™ (“Thermo Scientific”, США). Хроматографию осуществляли на колонке Acquity UPLC BEH C18 2.1 × 100 мм с зернением 1.7 мкм (“Waters”, США). Разделение экстрактов (объем вводимой пробы – 2 мкл) проводили при потоке элюента 250 мкл/мин при температуре колонки 40°C в системе ацетонитрил–0.1%-ная муравьиная кислота в градиентном режиме: концентрация ацетонитрила повышалась от 10 до 100% в течение первых 10 мин, 100%-ный ацетонитрил в течение 5 мин, а с 15 до 16 мин концентрация ацетонитрила понижалась до 10% и поддерживалась на этом уровне еще 4 мин. Тип ионизации масс-

детектора — термоэлектрораспыление, диапазон сканирования 50–1000 m/z в режиме положительно заряженных ионов. Детектирование веществ в экстрактах проводили сканированием в диапазоне 200–800 нм. Для сравнения метаболитных профилей экстрактов на хроматограммах анализировали время удерживания и УФ-спектры метаболитов, полученные с помощью диодно-матричного детектора. Хроматограммы анализировали с помощью программы MZmine 2 [25].

Препаративное разделение экстрактов и их анализ. Поскольку метаболитные профили экстрактов различных изолятов *B. sorokiniana* были качественно схожими, экстракты из культур, полученных на одинаковых субстратах, были объединены. Всего при помощи описанной методики извлечения было получено 3.7 г маслянистого экстракта из 1200 г сухого зернового субстрата, колонизированного *B. sorokiniana*. Из 1.6 л фильтрата жидкой культуры *B. sorokiniana* на ДМГ получено 335 мг экстракта. Компоненты экстракта были разделены колоночной хроматографией на силикагеле (диаметр частиц 60–200 мкм, “Merck”, Германия). Стеклообразные колонки с соответствующим содержанием силикагеля (500 и 30 г) уравновесили этилацетатом и гексаном, экстракт наносили на него методом сухой загрузки. Компоненты элюировали следующими системами растворителей: гексан—этилацетат 75 : 25 (элюент А), гексан—этилацетат 60 : 40 (элюент Б), этилацетат (элюент В) и метанол (элюент Г). Собранные фракции анализировали методом ТСХ в системах толуол—этилацетат—уксусная кислота (60 : 40 : 1, об./об.), а также хлористый метилен—метанол (9 : 1). Близкие по метаболитному составу фракции объединяли.

Из экстракта твердофазных культур *B. sorokiniana* получено 11 гомогенных фракций (ПФ 1–11), жидких культур — 6 фракций (ЖФ 1–6). Фракцию ПФ 11, проявившую широкий спектр биологической активности, дополнительно разделяли гель-фильтрацией на гидрофобном полимере Sephadex LH-20 (“GE”, США) в метаноле. Собранные фракции анализировали методом ТСХ в системе хлористый метилен—метанол (9 : 1) в результате чего было получено 6 гомогенных субфракций (ПФ 11.1–11.6). Все фракции анализировали при помощи ВЭЖХ-МС, их инсектицидную, цитотоксическую и фитотоксическую активность определяли, как описано выше.

Очистка и идентификация метаболитов. Для предварительной очистки метаболитов *B. sorokiniana* фракции, проявившие биологическую активность, разделяли при помощи обращенно-фазовой хроматографии на колонке Chromabond C18ec (масса сорбента 10 г, “Macherey—Nagel”, Германия). Сорбент кондиционировали 40 мл метанола и 40 мл воды. Фракции вносили в колонку методом сухой загрузки. Метаболиты элюировали во-

дой, смесями вода—метанол с содержанием метанола 10, 25, 50 и 75% (об./об.), а также метанолом (по 100 мл). Элюаты упаривали на ротационном вакуумном испарителе при 40°C. Индивидуальные соединения из полученных субфракций очищали препаративной ВЭЖХ в системе ацетонитрил—0.1%-ная муравьиная кислота на колонках XBridge Prep C8 10 × 150 мм и Symmetry Shield RP18 19 × 150 мм, обе с зернением 5 мкм (“Waters”, США) в условиях, приведенных в табл. 2. Для этого использовали хроматографическую систему фирмы “Waters” (США), состоящую из насоса (Quaternary Gradient Module 2545), детектора (UV/Visible Detector 2489) и коллектора фракций (Fraction Collector III).

Для идентификации выделенных соединений были получены 1H и ^{13}C спектры ЯМР на спектрометре Bruker AVANCE III 400 Ultrashield Plus (“Bruker”, Германия) с рабочей частотой 400.1 и 100.6 МГц соответственно. Для снятия спектров вещества были растворены в дейтерированном хлороформе ($CDCl_3$). ВЭЖХ-МС индивидуальных соединений проводили в условиях, описанных выше. Соединения идентифицировали на основании УФ- и масс-спектров, 1H - и ^{13}C -спектров ЯМР, известных по литературе, и биологической активности метаболитов, выделенных из культур *B. sorokiniana* (табл. 1) и других видов рода *Bipolaris*. Инсектицидную, цитотоксическую и фитотоксическую активность индивидуальных соединений определяли, как было описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ метаболитных профилей экстрактов. Предварительные исследования с экстрактами из твердофазных культур *B. sorokiniana* позволили подобрать систему растворителей для разделения экстрактов методом ТСХ (толуол—этилацетат—уксусная кислота в соотношении 60 : 40 : 1, об./об.) и способ проявления хроматограмм реактивом на основе анисового альдегида и серной кислоты.

Визуальный анализ полученных хроматограмм показал, что экстракты из твердофазных культур характеризовались более сложным составом компонентов, чем экстракты из культуральной жидкости. При этом в зависимости от происхождения изолята гриба в них при УФ-детектировании было обнаружено от 8 до 11 полос при 254 нм и от 9 до 13 — при окрашивании реагентом. В экстрактах из культуральной жидкости этим методом выявлено всего 2 компонента при 254 нм и существенно больше — от 3 до 9 полос — после окрашивания. На рис. 2 приведена ТСХ-хроматограмма, которая хорошо иллюстрирует общее сходство составов метаболитов экстрактов из культур различных изолятов гриба и влияние на них субстрата.

Таблица 2. Условия очистки и физико-химическая характеристика выделенных метаболитов *Bipolaris sorokiniana*

Вещество	Объем модификатора в подвижной фазе, %	Скорость потока, мл/мин	Колонка*	t_R , мин	λ_{max} , нм	Характеристические ионы в масс-спектрах, m/z	$^1\text{H NMR}$
Сесквитерпен-1	55	6	1	4.3	265.2	237.07 $[\text{M} + \text{H}]^+$	0.78 м, 0.90 м, 1.04 с, 1.05 м, 1.06 с, 1.45 дд, 1.76 м, 1.85 дд, 2.01 с, 3.17 м, 3.78 дд, 4.25 дд, 10.04 с
Метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат	45	24	2	5.4	241.5, 309.3, 353.0	334.93 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 302.91 $[\text{M} + \text{H} - \text{CH}_3\text{OH}]^+$	2.46 с, 4.04 с, 6.68 с, 6.87 с, 7.03 с, 12.10 с
Андрокохлиохинон А	55	6	1	8.4	275.9, 493.2	515.21 $[\text{M} + \text{H}]^+$	0.89 д, 0.90 т, 1.14 м, 1.16 м, 1.21 с, 1.22 с, 1.37 м, 1.56 с, 1.59 м, 1.60 м, 1.62 м, 1.71 м, 1.73 м, 1.82 м, 2.05 м, 2.06 с, 2.13 м, 2.32 м, 3.20 м, 5.04 дд, 6.33 с, 6.56 с, 6.6 ушс
Гельмингоспорол	45	24	2	6.0	268.8	237.10 $[\text{M} + \text{H}]^+$	0.77 д, 0.88 м, 0.98 ушс, 0.99 м, 1.04 с, 1.08 д, 1.41 м, 1.68 дд, 1.75 м, 2.02 с, 3.19 ушс, 3.33 дд, 3.65 дд, 10.0 с
Фузапролиферин	50	6.6	1	5.2	196.7, 261.7	445.12 $[\text{M} + \text{H}]^+$	1.02 с, 1.33 с, 1.59 м, 1.64 с, 1.66 м, 1.70 м, 1.72 м, 1.80 м, 1.95 м, 2.05 с, 2.04 м, 2.10 м, 2.12 м, 2.29 м, 2.40 м, 2.70 м, 4.08 дд, 4.28 м, 5.15 дд, 5.27 дд, 5.40 т, 5.51 с, 6.53 с
Кохлиохинон В	50	6.6	1	6.2	203.8, 260.5, 402.3	473.21 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 455.21 $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$	0.87 т, 0.89 с, 1.15 д, 1.17 с, 1.19 с, 1.20 м, 1.28 с, 1.29 д, 1.39 м, 1.46 дд, 1.50 м, 1.63 м, 1.80 м, 1.90 м, 2.14 дд, 2.18 м, 2.70 секс, 2.54 дд, 3.22 дд, 3.33 дд, 4.10 дкв, 6.50 д
Монилифенон	45	24	2	3.5	199.1, 284.2	303.05 $[\text{M} + \text{H}]^+$	2.21 с, 3.70 с, 6.21 с, 7.14 д, 7.29 т, 7.48 д
Сесквитерпен-2	45	24	2	5.3	248.6	235.10 $[\text{M} + \text{H}]^+$	0.81 д, 0.99 м, 1.00 с, 1.04 м, 1.05 д, 1.22 м, 1.37 м, 1.66 м, 1.75 м, 2.04 с, 3.19 с, 3.44 м, 3.69 м

Таблица 2. Продолжение

Вещество	Объем модификатора в подвижной фазе, %	Скорость потока, мл/мин	Колонка*	t _R , мин	λ _{max} , нм	Характеристические ионы в масс-спектрах, m/z	¹ Н ЯМР
Кохлиохинон D	55	6	1	4.1	199.1, 233.3, 401.1	471.16 [M + H] ⁺ , 453.09 [M + H - H ₂ O] ⁺	0.89 с, 1.17 с, 1.19 с, 1.20 м, 1.27 с, 1.27 д, 1.44 дд, 1.48 м, 1.77 ушс, 1.80 м, 1.87 д, 1.92 м, 2.13 м, 2.13 дд, 2.52 дд, 3.12 дд, 3.22 дд, 4.62 кв, 6.51 д, 6.86 кв
Кохлиохинон А	55	6	1	4.9	196.7, 270.0, 397.5	533.13 [M + H] ⁺ , 515.15 [M + H - H ₂ O] ⁺	0.88 т, 0.89 д, 1.02 с, 1.15 д, 1.18 с, 1.19 с, 1.44 м, 1.56 м, 1.64 м, 1.74 м, 1.80 м, 1.92 м, 1.99 с, 2.09 м, 3.19 м, 3.27 м, 3.80 ушс, 5.00 м, 5.06 дд, 6.59 с
Диверсолонные эфиры	30	22	2	7.7	239.2, 327.2	320.94 [M + H] ⁺ , 302.94 [M + H - H ₂ O] ⁺ , 270.94 [M + H - H ₂ O - CH ₃ OH] ⁺	2.18 м, 2.39 с, 2.84 м, 2.94 м, 3.78 д, 4.01 м, 6.58 с, 6.75 д
Терлестацин	40	6.6	1	7.6	190.9, 262.9	403.18 [M + H] ⁺ , 385.18 [M + H - H ₂ O] ⁺	0.99 с, 1.29 с, 1.57 с, 1.64 с, 1.63 с, 1.70 м, 1.72 м, 1.78 м, 1.92 м, 2.00 м, 2.09 м, 2.16 м, 2.26 м, 2.27 м, 2.37 м, 2.44 м, 2.68 м, 2.70 м, 3.80 дд, 3.89 дд, 4.06 дд, 5.13 м, 5.24 дд, 5.40 м, 6.90 ушс
Хлоромониликовая кислота В	40	20	2	10.6	205.0, 247.4, 333.2	352.93 [M + H] ⁺ , 320.91 [M + H - CH ₃ OH] ⁺	2.42 с, 3.52 с, 3.69 с, 6.66 с, 6.71 с, 6.82 с
Хлоромониликовая кислота D	40	20	2	11.4	203.8, 261.7, 335.5	352.91 [M + H] ⁺ , 320.90 [M + H - CH ₃ OH] ⁺	2.44 с, 3.65 с, 3.75 с, 6.68 с, 6.78 с, 6.86 с

* Колонка 1 – Xbridge Prep C8, колонка 2 – Symmetry Shield RP18 (см. раздел “Методика”).

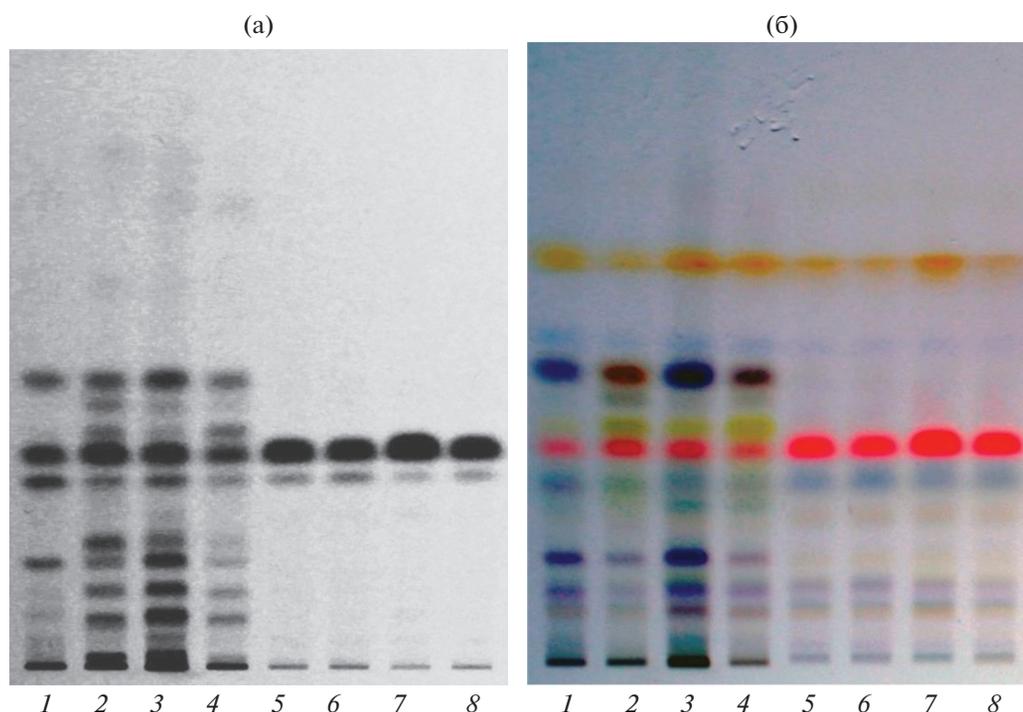


Рис. 2. Нормально-фазовые ТСХ-хроматограммы экстрактов *B. sorokiniana* в зависимости от происхождения изолята и состава субстрата, при использовании различных методик визуализации: а – визуализация при 254 нм, б – окрашивание реактивом на основе серной кислоты и анисового альдегида: 1 и 5 – изолят ЛО, 2 и 6 – Бр20, 3 и 7 – К7, 4 и 8 – ПК. 1–4 – экстракты из твердофазной культуры, 5–8 – из культуральной жидкости.

Эти же пластины были проанализированы при помощи УФ/ВИД-детектора при 200 нм (для выявления не поглощающих УФ сесквитерпенов) и 270 нм (для обнаружения поглощающих УФ терпенов и кохлиохинонов) (см. табл. 1). Сравнительный анализ полученных хроматограмм позволил дифференцировать экстракты по качественному составу метаболитов, образованных *B. sorokiniana* на жидком и твердом субстратах. В экстрактах из твердофазных культур различных изолятов *B. sorokiniana* при 200 нм было обнаружено до 11 компонентов и при 270 нм – до 9. Это оказалось несколько меньше, чем при визуальной оценке пластин, проявленных неспецифическим реактивом. В экстрактах из культуральной жидкости *B. sorokiniana* на среде ДМГ было детектировано до 7 компонентов при 200 нм и 5 – при 270 нм. При 270 нм мажорным во всех экстрактах было соединение с хроматографической подвижностью R_f 0.50, доминирующих пиков при λ 200 нм не было выявлено (рис. 3). Изучение состава экстрактов при других длинах волн было менее информативным.

Анализ экстрактов из культур различных изолятов *B. sorokiniana*, полученных на одних и тех же субстратах, методом ВЭЖХ-МС, показал их высокое сходство по качественному составу мажорных метаболитов (рис. 4). Так, в экстрактах были обнаружены по 11 мажорных компонентов, кото-

рые различались временем удерживания и массой молекулярных ионов. В экстрактах из культуральной жидкости гриба на ДМГ и твердофазных культур на перловой крупе обнаружено 5 одинаковых компонентов, которые характеризовались временем удерживания (t_R) 5.1 мин (m/z 262 Да), 5.4 мин (m/z 264 Да), 6.5 мин (m/z 235 Да), 7.1 мин (m/z 237 Да) и 8.7 мин (m/z 219 Да).

Мажорным метаболитом в экстрактах из культур гриба оказалось соединение с t_R 7.1 мин, m/z 237 Да (рис. 4) и УФ-спектром с максимумом при 266 нм [26] (табл. 1). По данным работы [27] имеющий такую молекулярную массу, но не поглощающий УФ прегельминтоспорол при ионизации термоэлектрораспылением образует основной пик m/z 219 Да $[M + N - H_2O]^+$, по-видимому, являясь менее стабильным, чем гельминтоспорол. Вещество с m/z 219 Да (t_R 8.7 мин) было также обнаружено как минорный компонент экстрактов из культуральной жидкости (КЖ) гриба на среде ДМГ. Другой мажорный компонент, который можно было предварительно идентифицировать как виктоксинин, характеризовался t_R около 5.4 мин и m/z 264 Да (рис. 4). Это соединение встречается у различных штаммов *B. sorokiniana* и обладает высокой фитотоксической активностью [12, 28].

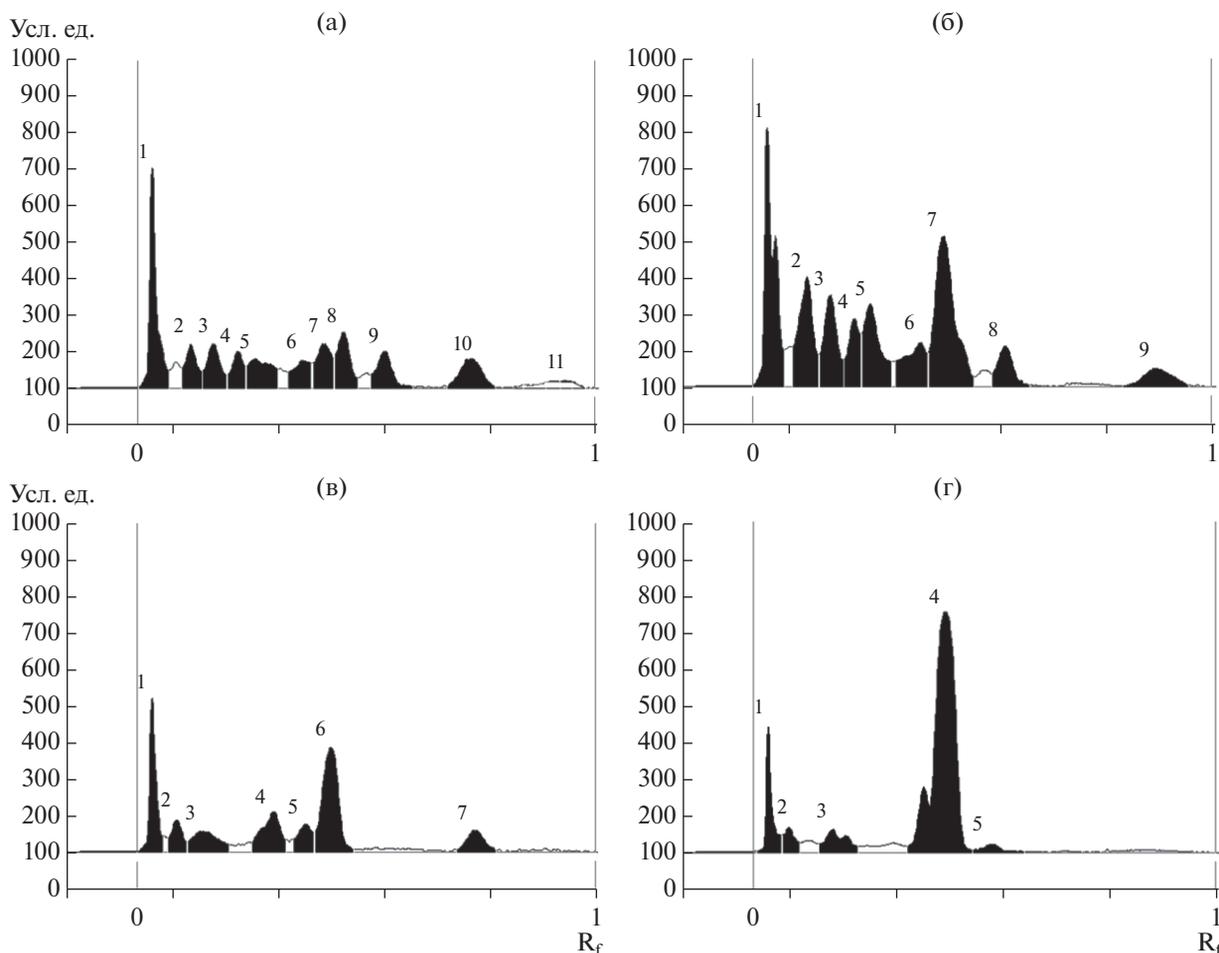


Рис. 3. Хроматограммы экстрактов твердых (а, б, перловая крупа) и жидких (в, г, КЖ, среда ДМГ) культур *B. sorokiniana*, полученные методом нормально-фазовой ТСХ при 200 (а, в) и 270 нм (б, г).

В экстракте КЖ на ДМГ выявлен мажорный компонент с t_R 1.0 мин и несколько минорных компонентов (t_R 3.4 мин и 3.7 мин) с m/z 280 (рис. 4). По литературным данным таким зарядом может обладать осколочный ион $[M + H - H_2O]^+$ некоторых спиростафилотрихинов (например, спиростафилотрихинов R и U) с молекулярной массой 297 Да [29]. Следует отметить, что соединения из группы спиростафилотрихинов ранее не обнаруживались у *B. sorokiniana*. Остальные соединения в экстрактах *B. sorokiniana* идентифицировать не удалось.

Биологическая активность и состав фракций. Из экстракта культуральной жидкости *B. sorokiniana* на ДМГ путем разделения на нормально-фазовой колонке получено 6 гомогенных фракций (ЖФ 1–6). Фитотоксическая активность была обнаружена во фракциях ЖФ 3, ЖФ 4 и ЖФ 6. Под воздействием соединений из фракций ЖФ 3 и 4 развивались поражения не только на поврежденных, но и на неповрежденных листовых отрезках пшеницы.

Относительно слабую цитотоксическую активность продемонстрировали фракции ЖФ 4 и 5 в концентрации 50 мкг/мл. Остальные фракции не проявляли цитотоксическую активность даже при увеличении концентрации до 100 мкг/мл. Умеренную инсектицидную активность продемонстрировали фракции ЖФ 3 и 6 (табл. 2).

Во фракции ЖФ 3 основным метаболитом было не идентифицированное соединение с t_R 5.1 мин и m/z 262 Да, а также три соединения с одной и той же молекулярной массой (m/z 468 Да), но с разными временами удерживания (7.5, 9.1 и 9.8 мин). Предположительно, эти соединения представляли собой кохлиохинон G (молекулярная масса 485 Да) и его изомеры, если осколочный ион 468 Да соответствовал $[M + H - H_2O]^+$. Во фракции ЖФ 4 основным было неизвестное соединение с m/z 332, а во фракции ЖФ 6 – соединение (предположительно виктоксинин) с t_R 5.4 мин (m/z 264). Пять мажорных соединений остались не идентифицированными (табл. 3).

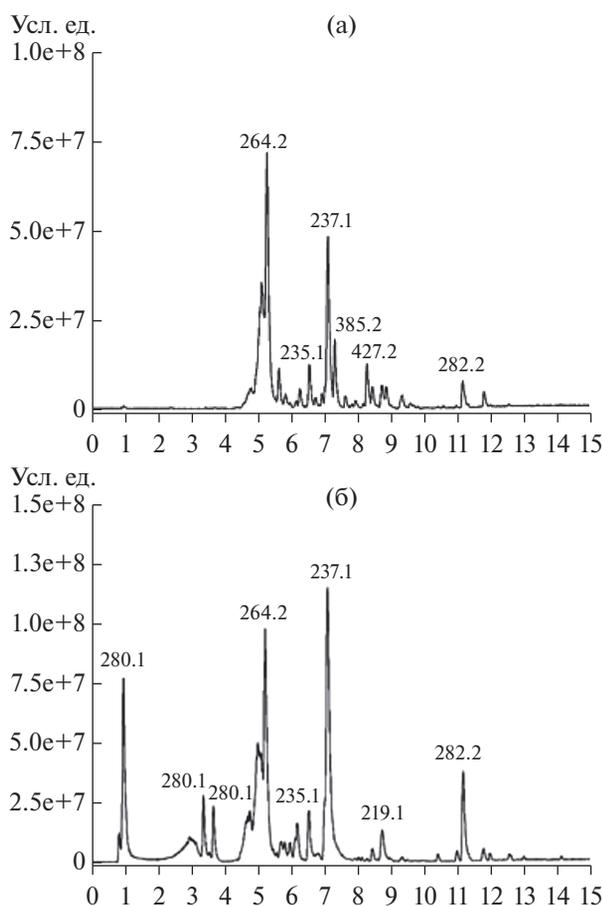


Рис. 4. ВЭЖХ/МС-хроматограммы экстрактов из твердофазной (а) и жидкой (б) культур *B. sorokiniana*.

К фитотоксинам гриба, образующимся на зерновом субстрате, были чувствительны только поврежденные отрезки листьев пшеницы. Наиболее высокой фитотоксичностью на них обладали фракции ПФ 10 и 11.3. Фракции ПФ 6–8 и ПФ 11, а также все субфракции последней продемонстрировали относительно высокий уровень цитотоксической активности при концентрации 10 мкг/мл. Инсектицидную активность проявляли фракции ПФ 5, 7, 8, 10 и ПФ 11, а также ПФ 11.2, 11.3 и 11.6. При этом инсектицидная активность фракций ПФ 5, 9 и 10 не была связана с их цитотоксической активностью, а фракций ПФ 8 – фитотоксической активностью (табл. 3).

Из хроматографических фракций, проявивших заметную биологическую активность, было очищено 14 индивидуальных соединений (табл. 3). Их структура была установлена спектральными методами путем сравнения с данными литературы (табл. 1). Однако значительная часть соединений осталась не идентифицированной. Так, из фракции ПФ 3 были выделены неидентифицированные сесквитерпен-1 (молекулярная масса 236 Да, УФ максимум при 265 нм) и сесквитерпен-2 (молеку-

лярная масса 234 Да, УФ максимум при 249 нм). Во фракциях ПФ 5–8 были обнаружены виктоксинин и гельминтоспорол, однако при этом отмечено высокое содержание соединений с молекулярными массами от 400 до 600 Да, которые предположительно можно было отнести к группе кохлиохинонов. Из них удалось выделить и идентифицировать 4 соединения этой группы. Во фракции ПФ 6 в качестве доминирующего оказалось неизвестное соединение, характеризующееся m/z 731 (табл. 3).

Выделенные и идентифицированные в работе метаболиты *B. sorokiniana* относились к таким группам природных соединений, как сесквитерпены (гельминтоспорол, виктоксинин и родственные им соединения), сестертерпеноиды (фузапролиферин и терпестацин), хиноны (кохлиохиноны А, В и D, ангидрокохлиохинон А), хромоны (диверсолонные эфиры и монилифенон) и хлорированные ксантоны (метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат) и их производные (хлоромонилиниковые кислоты В и D). Следует отметить, что ангидрокохлиохинон А [30], монилифенон [31] и диверсолонные эфиры [32], обнаруженные ранее у *B. oryzae*, *Monilinia fructicola* и *Penicillium diversum* соответственно, были найдены у *B. sorokiniana* впервые.

В результате анализа ВЭЖХ-МС и препаративного разделения экстрактов не удалось обнаружить и выделить биполароксин, который по данным работы [16] является доминирующим фитотоксином в экстрактах *B. sorokiniana*. Можно предположить, что это соединение, как и структурно близкие к нему эремофиланы, является крайне нестабильным и быстро разрушается в воде и на силикагеле [33]. Несмотря на наличие у некоторых компонентов экстрактов характерных для ксантонов УФ-спектров, основной микотоксин этого гриба – стеригматоцистин в анализируемых экстрактах различных изолятов гриба выявлен не был (табл. 2). Можно предположить, что этот микотоксин следует детектировать на начальных фазах роста гриба, как было показано ранее в работе [34].

Спектр биологической активности метаболитов *B. sorokiniana*. Большинство соединений, которые ранее выделялись из *B. sorokiniana*, были оценены по 1 или 2 типам биологической активности, преимущественно, фитотоксической или цитотоксической (табл. 1). В данной работе показано, что все 14 выделенных и идентифицированных соединений показали более широкий спектр действия.

Так, относительно высокой фитотоксической активностью на листьях пшеницы в концентрации 1 мг/мл обладали кохлиохинон А, терпестацин и хлоромонилиниковая кислота В, что подтверждало полученные ранее данные об их высокой фитотоксичности (табл. 1, 3). Фитотоксичными

Таблица 3. Спектр биологической активности хроматографических фракций, полученных из экстрактов *B. sorokiniana*, и обнаруженных в них соединений

Номер фракции	Масса, мг	ЦА ¹	ФА ²		ИА ³	Идентифицированные соединения или <i>m/z</i> мажорных компонентов
			БП	П		
Экстракт из культуральной жидкости культур на ДМГ						
ЖФ3	14	–	+	++	+	262, 468, 468, 468
ЖФ4	5	+	+	++	–	332
ЖФ5	143	–	–	+	–	Гельминтоспорол
ЖФ6	113	+	–	++	+	Виктоксинин
Экстракт из твердофазных культур						
ПФ2	162	–	–	–	–	Не определено
ПФ3	560	–	–	–	–	237
ПФ4	285	–	+	+	–	Не определено
ПФ5	505	–	–	+	++	Ангидрокохлиохинон А, метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат
ПФ6	939	++	–	+	+	Гельминтоспорол, фузапролиферин, кохлиохинон В, 731
ПФ7	410	++	–	+	++	Монилифенон, кохлиохинон А, кохлиохинон D, 335
ПФ8	74	++	–	–	++	
ПФ9	252	–	–	+	+	α,β-диверсолонные эфиры, терпестацин
ПФ10	359	–	–	++	++	
ПФ11	2034	++	–	+	++	Терпестацин, хлоромонилининовая кислота В, хлоромонилининовая кислота D
ПФ11.1	302	++	–	+	–	
ПФ11.2	287	++	–	+	+	
ПФ11.3	290	++	–	++	+	
ПФ11.4	360	++	–	+	–	
ПФ11.5	150	++	–	–	–	
ПФ11.6	7	++	–	++	+	

* ЦА – цитотоксическая активность, “–” – от 0 до 25%, “+” – от 25 до 75%, “++” – от 75 до 100% погибших клеток линии Sf9 через 24 ч после обработки 50 мкг/мл экстракта из КЖ или 10 мкг/мл экстракта из твердофазной культуры;

** ФА – фитотоксическая активность, (длина некротического пятна, мм) через 48 ч после обработки, “–” – от 0–1 мм, “+” – от 1–3 мм, “++” от 4–5 мм, БП – отрезки листьев пшеницы без повреждений, П – с повреждением.

*** ИА – инсектицидная активность (% гибели злаковой тли относительно контроля через 24 ч после обработки), “–” – от 0–25%, “+” – от 25–75%, “++” – от 75–100%.

для пшеницы были также гельминтоспорол, не идентифицированный сесквитерпен 2 и фузапролиферин (табл. 3).

Большинство выделенных соединений (исключение составляли лишь хлоромонилининовые кислоты) в различной степени ингибировало рост грамположительной бактерии *B. subtilis* в концентрации 50 мкг/диск. Подтверждена также относительно высокая антимикробная активность кохлиохинона А и метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилата (МГМХК), а также умеренная – гельминтоспорол (табл. 1) и ангидрокохлиохинона А [35]. Впервые была обнаружена антибактериальная активность у кохлиохинонов В и D, а также диверсолонных эфиров. Оба не идентифицированных сесквитерпена также обладали высокой антибактериальной активностью

(зона лизиса около 8 мм), в связи с этим идентификация их структуры представляет интерес для дальнейших исследований.

Можно предположить, что столь богатый набор веществ, проявляющих антимикробные свойства, одновременно образуемых *B. sorokiniana*, необходим для выживания в почве и на растительных остатках, а также для конкуренции с другим фитопатогенами. Библиотека выделенных веществ может представлять интерес для изучения их аддитивного и синергетического эффектов на широком круге микроорганизмов почвы и филлосферы, а также для определения их экологической роли в развитии *B. sorokiniana*.

В работе впервые изучена инсектицидная активность метаболитов *B. sorokiniana*. Относительно высокую активность при концентрации 1 мг/мл

Таблица 4. Спектр биологической активности метаболитов *Bipolaris sorokiniana*⁶

Метаболит	Активность					
	фитотоксическая ¹	антимикробная ²	инсектицидная ³	цитотоксическая		инфузории ⁴
				50 мкг/мл	5 мкг/мл	
Гельмингоспорол	1.5 ± 0.5	4.3 ± 1.5	8.6 ± 2.4	–	79.1 ± 13.3	0
Сесквитерпен-1	0.7 ± 0.5	8.0 ± 1.0	10.0 ± 1.1	–	85.9 ± 9.2	0
Сесквитерпен-2	1.8 ± 1.0	7.7 ± 1.2	17.2 ± 8.3	–	52.8 ± 28.4	0
Кохлиохинон А	2.0 ± 0.6	7.7 ± 0.6	45.0 ± 20.2	+	98.7 ± 1.6	100 ± 0
Ангидрокохлиохинон А	0	3.7 ± 0.6	26.3 ± 11.0	++	98.7 ± 0.9	100 ± 0
Кохлиохинон В	1.0 ± 0	5.0 ± 0.0	32.3 ± 12.6	+	100 ± 0	100 ± 0
Кохлиохинон D	1.3 ± 0.8	7.3 ± 1.5	27.3 ± 12.1	+	99.2 ± 0.5	99.6 ± 0.4
Фузапролиферин	1.7 ± 0.5	6.0 ± 1.0	17.3 ± 6.3	–	98.7 ± 0.9	99.3 ± 0.9
Терлестацин	2.2 ± 0.4	5.0 ± 0	14.8 ± 5.9	++	100 ± 0	0
Метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат	0.5 ± 0.5	12.0 ± 0	80.0 ± 8.5	++	100 ± 0	0
Монилифенон	1.5 ± 0.5	3.0 ± 1.0	42.5 ± 23.6	–	64.2 ± 8.2	0
Диверсолонные эфиры	0	6.7 ± 0.6	14.5 ± 9.4	–	82.3 ± 12.2	0
Хлоромонилининовая кислота В	2.8 ± 0.8	0	73.8 ± 9.1	–	46.3 ± 8.1	0
Хлоромонилининовая кислота D	1.2 ± 0.8	0	5.0 ± 4.8	–	53.0 ± 16.5	0

¹Длина некротического пятна на отрезках листьев пшеницы, мм (концентрация тестируемых веществ 1 мг/мл). ²Радиус зоны ингибирования роста *Bacillus subtilis*, мм (50 мкг/диск). ³Смертность злаковой тли относительно контроля, % (1 мг/мл, 0.2 мг/дм²). ⁴“+”, “++”, “+++”, “++++” – гибель инфузورий наступала через 180, 30 и 3 мин соответственно (50 мкг/мл), “–” – клетки не погибли. ⁵Смертность клеток в тестовых лунках относительно контрольных, %. ⁶Указаны средние значения и стандартные отклонения.

(0.2 мг/дм²) по отношению к злаковой тле с эффективностью на уровне 80% показали МГМХК и хлоромонилининовая кислота В. Примерно в 2 раза ниже была инсектицидная активность у кохлиохинонов А и В, а также у монилифенона (табл. 4). По данным работы [36] стеригматоцистин оказывал ларвицидные свойства по отношению к личинкам малярийного комара *Anopheles gambiae* с ЛД₅₀ 100 мкг/мл.

Все выделенные соединения обладали выраженной в различной степени цитотоксической активностью. Высокую цитотоксическую активность либо по отношению к клеткам инфузорий, либо линии клеток Sf9 продемонстрировали соединения из группы кохлиохинонов, фузапролиферин, терпестацин и МГМХК. Остальные соединения продемонстрировали умеренную токсичность для клеток насекомых в относительно высокой концентрации 50 мкг/мл (табл. 4). Высокая цитотоксическая активность кохлиохинонов [22] и терпестацина [37] хорошо известна, и они рассматриваются как перспективные соединения для лечения различных онкологических заболеваний. Фузапролиферин оценивается как микотоксин также и у некоторых грибов рода *Fusarium* [38].

Таким образом, исследование показало высокое сходство состава метаболитов у изученных изолятов *B. sorokiniana* различного географического происхождения. Подтверждена продукция ими широкого спектра вторичных метаболитов различных групп: терпенов, ксантонов, хинонов, алкалоидов и других. При этом, образование в культурах *B. sorokiniana* таких метаболитов, как биполароксин и стеригматоцистин, требуют уточнения с учетом нестабильности первого и времени продукции второго. Биосинтез вторичных метаболитов широкого спектра действия, по-видимому, определяет способность гриба к отличной выживаемости и высокой конкурентоспособности в различных экологических нишах – почве, растениях и семенах. Многие из выявленных метаболитов перспективны для разработки лекарственных средств или пестицидов, поэтому *B. sorokiniana* можно считать их возможным продуцентом для использования в биотехнологии. Продукция грибом таких высокотоксичных веществ, как стеригматоцистин, кохлиохиноны, фузапролиферин, терпестацин и метил-8,3-гидрокси-3-метил-4-хлорксантон-1-карбоксилат, свидетельствует о необходимости оценки их накопления в пораженном им зерне.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-04-01445), государственной программы “Провести фундаментальные исследования по химической экологии грибов филосферы и оценить их биотехнологический потенциал как продуцентов новых биорациональных пестицидов” № 0665-2019-0025 (AAAA-A16-116080510099-8), а

также при частичной поддержке Фонда Ель-Юрт (El-Yurt Umidi Foundation, Узбекистан).

Работа выполнена в Центре коллективного пользования “Инновационные технологии защиты растений” ФГБНУ ВИЗР и ресурсном центре “Магнитно-резонансные методы исследования” научного парка СПбГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семьнина Т.В. // Защита и карантин растений. 2008. № 9. С. 24–25.
2. Niessen L. // Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology / Eds. N.A. Bokulich, C.W. Bamforth. Poole (U.K.): Caister Academic Press, 2017. P. 197–244.
3. Cegiełko M., Kiecana I., Mielniczuk E., Waśkiewicz A., Bocianowski J. // Acta Sci. Pol. Hortorum Cultu. 2018. V. 17. № 2. P. 149–166.
4. Gupta P.K., Chand R., Vasistha N.K., Pandey S.P., Kumar U., Mishra V.K., Joshi A.K. // Plant Pathol. 2018. V. 67. № 3. P. 508–531.
5. Берестецкий А.О., Григорьева Е.Н., Петрова М.О., Степаньчева Е.А. // Микол. и фитопатол. 2018. Т. 52. № 6. С. 408–419.
6. Maes C.M., Steyn P.S. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1984. P. 1137–1140.
7. Nieto C.H.D., Granero A.M., Zon M.A., Fernández H. // Food Chem. Toxicol. 2018. V. 118. P. 460–470.
8. Masi M., Meyer S., Clement S., Pescitelli G., Cimmino A., Cristofaro M., Evidente A. // J. Nat. Prod. 2017. V. 80. № 10. P. 2771–2777.
9. Han J., Zhang J., Song Z., Liu M., Hu J., Hou C., Zhu G., Jiang L., Xia X., Quinn R.J., Feng Y., Zhang L., Hsiang T., Liu X. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 103. № 13. P. 5167–5181.
10. Engstrom K., Brishammar S., Svensson C., Bengtsson M., Andersson R. // Mycol. Res. 1993. V. 97. № 3. P. 381–384.
11. Åkesson H., Jansson H.-B. Monitoring Antagonistic Fungi Deliberately Released into the Environment. / Eds. D.F. Jensen, H.B. Jansson, A. Tronsmo. Dordrecht: Springer, 1996. P. 99–104.
12. Pena-Rodriguez L.M., Chilton W.S. // J. Nat. Prod. 1989. V. 52. № 4. P. 899–901.
13. Qader M.M., Kumar N.S., Jayasinghe L., Araya H., Fujimoto Y. // Mycology. 2017. V. 8. № 1. P. 17–20.
14. Mayo de P., Spencer E.Y., White R.W. // Can. J. Chem. 1961. V. 39. № 8. P. 1608–1612.
15. Nakajima H., Isomi K., Hamasaki T. // Tetrahedron Lett. 1994. V. 35. № 51. P. 9597–9600.
16. Jahani M., Aggarwal R., Gupta S., Sharma S., Dureja P. // Cereal Res. Comm. 2014. V. 42. № 2. P. 252–261.
17. Ali L., Khan A.L., Hussain J., Al-Harrasi A., Waqas M., Kang S.-M., Al-Rawahi A., Lee I.-J. // BMC Microbiology. 2016. V. 16. Article № 103. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0722-7>
18. Nihashi Y., Lim C.-H., Tanaka C., Miyagawa H., Ueno T. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002. V. 66. № 3. P. 685–688.

19. Cimmino A., Sarrocco S., Masi M., Diquattro S., Evidente M., Vannacci G., Evidente A. // Chemistry & Biodiversity. 2016. V. 13. № 11. P. 1593–1600.
20. Schaeffer J.M., Frazier E.G., Bergstrom A.R., Williamson J.M., Liesch J.M., Goetz M.A. // J. Antibiotics. 1990. V. 43. № 9. P. 1179–1182.
21. Miyagawa H., Nagai S., Tsurushima T., Sato M., Ueno T., Fukami H. // Biosci., Biotechnol., Biochem. 1994. V. 58. № 6. P. 1143–1145.
22. Wang M., Sun Z.-H., Chen Y.-C., Liu H.-X., Li H.-H., Tan G.-H., Li S.-N., Guo X.-L., Zhang W.-M. // Fito-terapia. 2016. V. 110. P. 77–82.
23. Lim C.-H., Miyagawa H., Akamatsu M., Nakagawa Y., Ueno T. // J. Pesticide Sci. 1998. V. 23. № 3. P. 281–288.
24. Khan A. L., Ali L., Hussain J., Rizvi T.S., Al-Harrasi A., Lee I.-J. // Molecules. 2015. V. 20. № 7. P. 12198–12208.
25. Pluskal T., Castillo S., Villar-Briones A., Orešič M. // BMC Bioinformatics. 2010. V. 11. Article № 395. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>
26. Abdel-Lateff A., Okino T., Alarif W.M., Al-Lihaibi S.S. // J. Saudi Chem. Society. 2013. V. 17. № 2. P. 161–165.
27. Carlson H., Nilsson P., Jansson H.-B., Odham G. // J. Microbiol. Methods. 1991. V. 13. № 4. P. 259–269.
28. Pringle R.B. // Can. J. Biochem. 1976. V. 54. № 9. P. 783–787.
29. De Almeida T.T., Ribeiro M.A. dos S., Polonio J.C., Garcia F.P., Nakamura C.V., Meurer E.C., Sarragiotto M.H., Baldoqui D.C., Azevedo J.L., Pamphile J.A. // Nat. Prod. Res. 2018. V. 32. № 23. P. 2783–2790.
30. Phuwapraisirisan P., Sawanga K., Siripong P., Tip-pyang S. // Tetrahedron Lett. 2007. V. 48. № 30. P. 5193–5195.
31. Kachi H., Sassa T. // Agric. Biol. Chem. 1986. V. 50. № 6. P. 1669–1671.
32. Holker J.S.E., O'Brien E., Simpson T.J. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1983. № 1. P. 1365–1368.
33. Wang L., Li M., Tang J., Li X. // Molecules. 2016. V. 21. № 4. Article 473. <https://doi.org/10.3390/molecules21040473>
34. Rabie C.J., Lubben A.L., Steyn M. // App. Environ. Microbiol. 1976. V. 32. № 2. P. 206–208.
35. Campos F.F., Ramos J.P., de Oliveira D.M., Alves T.M.A., de Souza-Fagundes E.M., Zani C.L., Sampaio F.C., Converti A., Cota B.B. // J. Biosci. 2017. V. 42. № 4. P. 657–664.
36. Matasyoh J.C., Dittrich B., Schueffler A., Laatsch H. // Parasitol. Res. 2011. V. 108. № 3. P. 561–566.
37. Jung H.J., Shim J.S., Lee J., Song Y.M., Park K.C., Choi S.H., Kim N.D., Yoon J.H., Mungai P.T., Schumacker P.T., Kwon H.J. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. № 15. P. 11584–11595.
38. Stanković S., Levic J., Petrovic T., Logrieco A., Moretti A. // European J. Plant Pathol. 2007. V. 118. № 2. P. 165–172.

Analysis and Isolation of Secondary Metabolites of *Bipolaris sorokiniana* by Different Chromatography Techniques and the Spectrum of Their Biological Activity

A. O Berestetskiy^{a,*}, A. A. Dalinova^a, V. R. Dubovik^a, E. N. Grigoryeva^a,
D. M. Kochura^b, I. V. Senderskiy^a, S. N. Smirnov^c, E. A. Stepanycheva^a, and S. M. Turaeva^d

^aAll-Russian Institute of Plant Protection, Saint-Petersburg, 196608 Russia

^bResearch Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Saint-Petersburg, 188663 Russia

^cSt. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

^dInstitute of the Chemistry of Plant Substances, Tashkent, 100170 Uzbekistan

*e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru

Secondary metabolites were isolated from cultures of four geographically distant isolates of the cosmopolitan fungus, *Bipolaris sorokiniana* for intense biological characterization. Analysis of extracts from their liquid and solid cultures with TLC and HPLC-MS showed high similarity of their composition despite on fungal origin. From the extracts of *B. sorokiniana* 14 metabolites (terpenes, quinones, xanthonones etc.) were isolated using column chromatography and preparative HPLC; among them, 12 known substances were identified. Chloromonilinic acid B (CAB) showed the highest level phytotoxic activity on wheat leaves. The most of isolated compounds inhibited growth of *Bacillus subtilis*, of which methyl-8,3-hydroxy-3-methyl-4-chloroxanthone-1-carboxylate (MMC) demonstrated the strongest activity. Some metabolites of *B. sorokiniana* (CAB and MMC) were shown to have insecticidal activity against common cereal aphid. All the compounds were cytotoxic (especially, cochlioquinones and fusaroproliferin) when tested on Sf9 cell line. However, no one was acute toxic for infusoria. Evidently, the production of multiple bioactive compounds makes *B. sorokiniana* a strong competitor in different ecological niches and a dangerous contaminant of grain.

Keywords: *Bipolaris sorokiniana*, chemical ecology, secondary metabolites

УДК 547.995.12:544.546.57

СИНТЕЗ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ СУКЦИНАМИДОМ ХИТОЗАНА

© 2020 г. В. А. Александрова^{1, *}, А. М. Футорянская^{1, **}, В. С. Садыкова²

¹Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

*e-mail: alexandrova@ips.ac.ru

**e-mail: futoraynskaya@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 12.03.2020 г.

После доработки 06.04.2020 г.

Принята к публикации 22.04.2020 г.

Методом восстановления из ионов при действии микроволнового облучения в присутствии восстановителя D-глюкозы получены наночастицы серебра с использованием в качестве полимерной матрицы водорастворимого производного хитозана — сукцинамид хитозана. Присутствие наночастиц серебра в синтезируемом коллоидном растворе подтверждено методом УФ-спектроскопии. Согласно данным просвечивающей электронной микроскопии синтезированные наночастицы серебра имели сферическую форму, при этом размер частиц составлял 10–34 нм. Полученные дифрактограммы подтвердили наличие рефлексов, характерных для кристаллической решетки металлического серебра. Синтезированный коллоидный раствор наночастиц серебра *in vitro* проявлял выраженную антибактериальную активность по отношению к штаммам грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и *B. coagulans* 429.

Ключевые слова: микроволновый синтез, наночастицы серебра, сукцинамид хитозана, антибактериальная активность

DOI: 10.31857/S0555109920050025

В настоящее время разработка новых нанокompозитов является стремительно развивающимся направлением в науке и технике. В связи с этим становится актуальной проблема создания нанокompозитных материалов медицинского назначения на основе нетоксичных биodeградируемых полимеров природного происхождения. В качестве таких полимеров могут быть использованы полисахариды, в частности хитозан и его производные. Такие материалы могут найти применение при разработке ранозаживляющих лекарственных средств, имплантов для регенерации костной ткани, матриц для тканевой инженерии, а также систем контролируемой доставки лекарственных веществ. С этой точки зрения большой интерес представляют металлополимерные нанокompозиты, поскольку включение различных металлов, в частности серебра, в их состав позволяет получать материалы с заданными свойствами, в том числе с антимикробной активностью [1].

Хитозан не растворим в воде и получение его водорастворимых производных, синтезируемых путем введения различных функциональных групп в макромолекулу, позволяет значительно расширить

возможности применения такого полимера в биологии и медицине. К числу таких производных относится сукцинамид хитозана [2].

В настоящее время достаточно широко исследуется биологическая активность сукцинамида хитозана и возможность его использования для иммобилизации лекарственных веществ. Важно отметить, что N-сукцинил хитозан безопасен при внутривенном введении [3, 4], что позволяет использовать данный полимер в системах доставки противоопухолевых препаратов [5]. Помимо этого, N-сукцинил хитозан проявляет антиагрегативную и антиоксидантную активность [6].

Синтез наночастиц серебра можно осуществлять непосредственно в растворе полимера. При этом сам полимер служит матрицей, контролирующей размер и форму наночастиц металла, а также является стабилизатором образующихся наночастиц, предотвращая их агрегацию [7].

Для синтеза наночастиц серебра в полимерной матрице могут быть использованы различные методы, такие как химическое, фотохимическое и радиационно-химическое восстановление [8–10]. В данном исследовании для синтеза наночастиц

серебра из ионов в матрице сукцинамида хитозана было использовано микроволновое облучение. К преимуществам этого метода следует отнести быстрый нагрев рабочего раствора по всему объему, что позволяет снизить термическое напряжение в системе и обеспечить однородность микроstructures композитного материала.

Цель работы — разработка метода синтеза наночастиц серебра из ионов в матрице водорастворимого сукцинамида хитозана при действии микроволнового облучения в присутствии восстановителя — D-глюкозы, а также исследование антибактериальной активности полученного коллоидного раствора наночастиц серебра, стабилизированных сукцинамидом хитозана.

МЕТОДИКА

Материалы. В качестве полимерной матрицы-стабилизатора в работе использовали сукцинамид хитозана (СХТЗ) с молекулярной массой (ММ) 200 кДа производства ЗАО “Биопрогресс” (Россия). Степень дезацетилирования хитозана, из которого был получен СХТЗ составляла 85%. Для проведения реакции в гомогенных условиях в качестве растворителя использовали бидистиллированную воду ($18 \text{ МОм} \times \text{см}^{-1}$), азотно-кислородное серебро, D-глюкозу и аммиачный раствор (NH_4OH) марки х. ч.

Синтез наночастиц серебра из ионов в матрице сукцинамида хитозана. Для подбора условий синтеза наночастиц серебра (НЧА_g) в матрице СХТЗ были проведены предварительные исследования. При этом концентрация полимера была подобрана таким образом, чтобы реакция протекала в гомогенных условиях. Подобранный время СВЧ-экспозиции (20 с) позволяло избегать интенсивного испарения воды из рабочего раствора. Концентрации AgNO_3 и D-глюкозы были выбраны в соответствии с данными приведенными в статье [11].

Сукцинамид хитозана растворяли в бидистиллированной воде при комнатной температуре на магнитной мешалке. К 10 мл раствора полимера в воде (концентрация 0.25% по массе) при перемешивании добавляли водный раствор AgNO_3 , с таким расчетом, чтобы его концентрация в растворе полимера составляла 0.0018 М. Затем в реакционную смесь добавляли восстановитель D-глюкозу, ее концентрация в рабочем растворе составляла 0.05 М. Полученную реакционную смесь доводили 10%-ным раствором NH_4OH до pH 7.0–7.5. Микроволновое восстановление ионов серебра проводили с использованием микроволновой печи “Midea” (MI 9252 RGI-B, Китай) мощностью 700 Вт. Время облучения рабочего раствора составляло 20 с.

УФ-спектроскопия. Электронные спектры полученных растворов регистрировали на УФ-спектрофотометре “SPECORD M-40” (“Carl Zeiss”, Германия) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 0.1 см при 25°C, раствор сравнения — бидистиллированная вода.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Размеры наночастиц серебра в водном растворе на основе СХТЗ изучали при помощи ПЭМ (“LEO — 912 ABOMEGA”, Германия).

Микробные штаммы, питательные среды, условия культивирования. Спектр антимикробной активности определяли на тест-культурах условно патогенных бактерий из коллекции культур научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе (Россия) методом диффузии в агар. Для определения антимикробной активности препаратов были использованы следующие культуры бактерий: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и *Bacillus coagulans* 429. Для выращивания микроорганизмов и постановки экспериментов по выявлению биологической активности полученных наночастиц использовали следующие жидкие и плотные питательные среды, такие как триптиказо-соевый агар, среда Гаузе 2, следующего состава (г/л): глюкоза — 10, пептон — 5.0, триптон — 5.0, NaCl — 5.0, CaCO_3 — 2.5, агар — 20, pH 7.0–7.2. Для определения антибактериального действия использовали также жидкую среду Мюллер–Хинтона (“Acumedia”, США) и раствор Хенкса (“ПанЭко”, Россия), содержащий индикатор феноловый красный.

Определение минимальной подавляющей концентрации тестируемых соединений *in vitro*. Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) тестируемых соединений *in vitro* производили методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде в 96-луночных стерильных планшетах в соответствии с требованиями клинических лабораторных стандартов [12]. Для экспериментов по определению антимикробной активности тестируемых соединений готовили инокулят бактериальных тест-культур, для чего использовали чистые суточные культуры бактерий, выращенные на соответствующих плотных питательных средах при температуре 35°C. Суспензию бактерий готовили в стерильном физиологическом растворе (0.85% NaCl), доводя ее до определенной плотности. Плотность бактериальных суспензий составляла 0.5 по стандарту Мак Фарланда (1.5×10^8 КОЕ/мл) и при дальнейшем разведении бульоном Мюллера–Хинтона в 100 раз концентрация микробных клеток снижалась до 5×10^5 КОЕ/мл.

Тестируемый полимер растворяли в стерильной воде, получая начальную концентрацию 84 мкг/мл.

Затем готовили серии двукратных разведений от 84 до 5.25 мкг/мл в растворе Хенкса с феноловым красным. Эксперименты проводили в стерильных 96-луночных плоскодонных планшетах. В лунки каждого планшета вносили сначала по 100 мкл растворов серийных разведений тестируемого соединения в растворе Хенкса, а затем по 100 мкл раствора инокулята тест-культуры в среде Мюллера–Хинтон. Эксперимент с одной концентрацией тест-образца повторяли не менее трех раз. В качестве контроля использовали варианты опыта без тестируемого соединения. Планшеты инкубировали при температуре 35°C. Оценку роста культур проводили визуально через 24 ч по изменению цвета индикатора. МПК определяли как минимальную концентрацию препарата, полностью ингибирующую рост тест-организма.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе исследовали возможность получения нанокомпозитов серебра с использованием в качестве матрицы-стабилизатора водорастворимого сукцинамида хитозана. Выбор в качестве матрицы СХТЗ обусловлен рядом его уникальных свойств, а также особенностью структуры этого полимера. Структура элементарного звена СХТЗ приведена на рис. 1.

Для синтеза наночастиц серебра из ионов использовали СХТЗ (ЗАО “Биопрогресс”, Россия), который получают путем взаимодействия хитозана с янтарным ангидридом, при этом степень замещения первичных аминогрупп в конечном продукте достигала 75%.

Этот полимер является полиэлектролитом, в структуре которого присутствуют как катионогенные (первичные аминогруппы-NH₂), так и анионогенные (карбоксильные -COOH) группы. При этом мольное соотношение этих групп составляло: n-0.25 и m-0.75 соответственно (рис. 1). Известно, что наличие карбоксильных групп в структуре полимера определяет его способность образовывать комплексы с ионами металлов, которые в дальнейшем отвечают за формирование кластеров и наночастиц металлов [13].

Была исследована возможность применения микроволнового облучения для синтеза наночастиц серебра в матрице СХТЗ. Использование такого метода воздействия способствовало быстрому и равномерному нагреву всего объема реакционного раствора, что обеспечивало однородность протекания нуклеации и рост числа зародышей наночастиц. Действие СВЧ-облучения в сочетании с высокой восстанавливающей способностью глюкозы приводил к образованию на начальном этапе превращений большого количества мелких

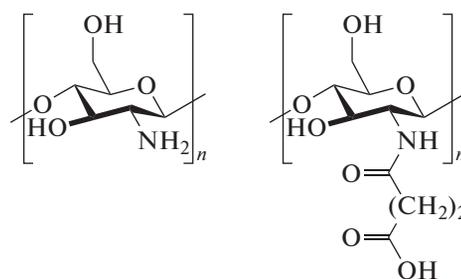


Рис. 1. Структура сукцинамида хитозана.

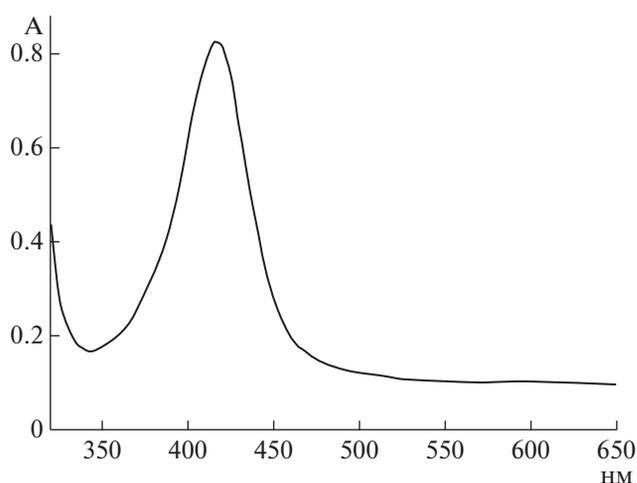


Рис. 2. Спектр оптического поглощения раствора НЧА_g в матрице СХТЗ (разбавление 1 : 1), полученный при воздействии микроволнового облучения (время облучения 20 с).

кластеров, из которых в дальнейшем формировались НЧА_g. В ходе окислительно-восстановительных процессов глюкоза превращается в глюконовую кислоту. После окончания микроволнового облучения наблюдали изменение окраски рабочего раствора от бледно-желтой до коричневой.

Образование наночастиц серебра в макромолекулярной системе подтверждали данными УФ-спектрофотометрии. Измерение оптического поглощения (ОП) растворов позволило выявить полосу в диапазоне 380–440 нм, с λ_{макс.} = 420 нм, характерную для наночастиц серебра (рис. 2).

Стабильность наночастиц серебра в полимерной матрице СХТЗ оценивали путем выдержки полученного коллоидного раствора в темноте при комнатной температуре в течение месяца. После чего проводили измерения ОП исследуемого раствора. Отсутствие уменьшения ОП коллоидного раствора по истечении контрольного периода подтвердило стабильность синтезированных НЧА_g в матрице СХТЗ.

Таблица 1. Антибактериальная активность (зона угнетения роста, мм) СХТЗ с НЧ серебра в отношении условно-патогенных бактерий*

Тест-организм	НЧ серебра–СХТЗ, мкг/мл			Контроль (СХТЗ)	Амоксилав (амоксициллин 20 мкг + клавулановая кислотата 10 мкг)
	84	42	21		
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	23 ± 0.09	20 ± 0.1	16 ± 0.2	Н/а	31 ± 0.1
<i>B. coagulans</i> 429	20 ± 0.7	17 ± 0.1	10 ± 0.3	Н/а	23 ± 0.1

* Н/а – неактивно.

Таблица 2. Минимальная подавляющая концентрация СХТЗ с наночастицами серебра в отношении условно-патогенных бактерий

Вещество	МПК, мкг/мл	
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>B. coagulans</i> 429
НЧАг–СХТЗ	5.25	5.25
Контроль (СХТЗ)*	Н/а	Н/а

* Н/а – неактивно.

Оценку формы и размеров, синтезированных НЧАг в коллоидном растворе полимера СХТЗ проводили с использованием метода ПЭМ. На основании представленных данных ПЭМ (рис. 3а) и соответствующей гистограммы (рис. 3), построенной с применением компьютерного приложения “DEAM” [14], можно заключить, что в результате микроволнового облучения образуются наночастицы серебра сферической формы. При этом содержание НЧАг, имеющих размер 10–34 нм составляло 94% от их общего числа. На врезке к рис. 3а представлена микродифрактограмма, на основании которой определены межплоскостные расстояния – 2.36, 2.04, 1.23, 1.17 Å, характерные для кристаллической решетки металлического серебра.

Результаты исследований морфологии и стабильности, полученных НЧ Ag подтверждают, что СХТЗ может быть использован в качестве матрицы и стабилизатора при микроволновом восстановлении ионов серебра в наночастицы.

При обсуждении возможного механизма стабилизирующего действия СХТЗ следует отметить, что особое место среди полимеров, используемых в качестве матрицы, занимают полиэлектролиты, в частности, содержащие карбоксильные группы. Такие группы способны образовывать комплексы с катионами серебра, а также взаимодействовать с положительно заряженными кластерами и атомами на поверхности образовавшихся НЧАг, обеспечивая их стабилизацию [15].

Было проведено исследование антибактериальной активности синтезированного коллоидного раствора НЧАг в матрице СХТЗ. Антимикробную активность макромолекулярной системы НЧАг–

СХТЗ оценивали методом диффузии в агар на тест-культурах условно-патогенных бактерий. В качестве тест-культуры использовали штаммы грамположительных бактерий *B. subtilis* ATCC 6633 и *B. coagulans* 429. Полученные результаты представлены в табл. 1. Из результатов, приведенных в табл. 1, видно, что полученный коллоидный раствор НЧАг в матрице СХТЗ проявлял выраженную антибактериальную активность в отношении штаммов грамположительных бактерий *B. subtilis* ATCC 6633 и *B. coagulans* 429.

Важной характеристикой антимикробной активности препарата является его минимальная подавляющая концентрация (МПК). Определение МПК тестируемой системы *in vitro* проводили методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде (табл. 2). Из результатов, приведенных в табл. 2, минимальная ингибирующая концентрация для кислотоустойчивого штамма *B. coagulans* 429 и *B. subtilis* ATCC 6633 составляла 5.25 мкг/мл. Следует отметить, что исходный полимер–СХТЗ (контроль) не проявлял антибактериальной активности в условиях тестирования.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать вывод, что синтезированные НЧАг в матрице СХТЗ проявляют антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий *B. coagulans* 429 и *B. subtilis* ATCC 6633.

Актуальность проблемы связана с резко возросшей в последнее время резистентностью различных микроорганизмов к антибиотикам. В связи с этим, возникает необходимость поиска новых антибактериальных средств с иным механизмом действия.

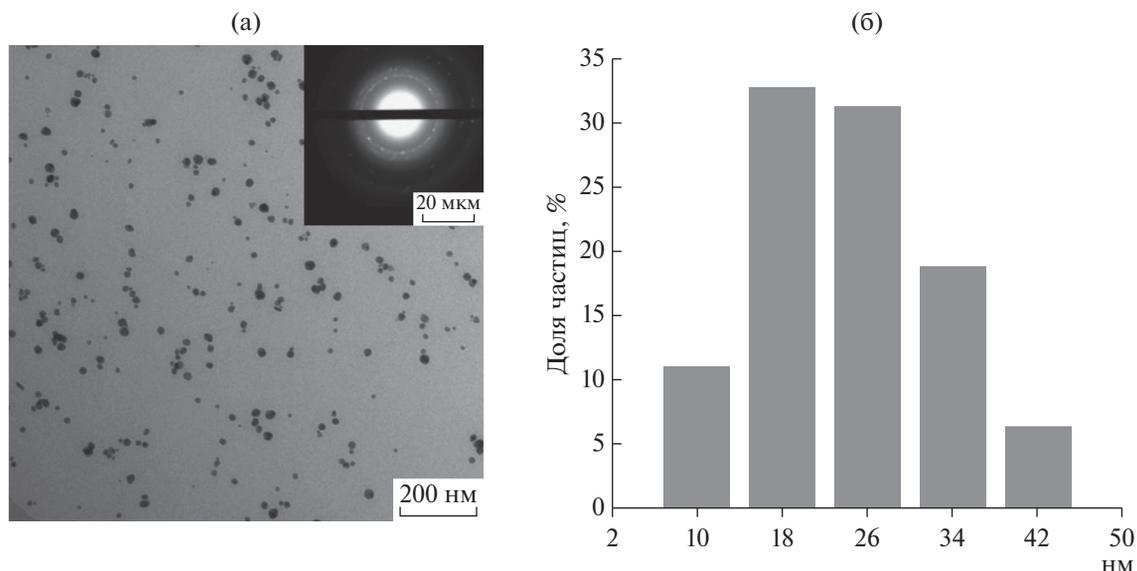


Рис. 3. Электронная микрофотография НЧА_g-СХТЗ (а), дифракционная картина пленки (на врезке) и соответствующая гистограмма (б).

В результате проведенных исследований показано, что водорастворимое производное хитозана – сукцинамид хитозана может служить матрицей-стабилизатором в процессе синтеза наночастиц серебра из ионов при действии микроволнового облучения в присутствии восстановителя – D-глюкозы.

Присутствие наночастиц серебра в системе было подтверждено данными УФ-спектроскопии, а именно – наличием полосы поглощения с $\lambda_{\text{макс.}} = 420$ нм. По данным ПЭМ синтезированные наночастицы серебра имели сферическую форму, при этом, частицы размером 10–34 нм составляли 94% от общего количества.

В опытах *in vitro* подтверждена антибактериальная активность полученного коллоидного раствора наночастиц серебра в матрице сукцинамида хитозана по отношению к штаммам грамположительных бактерий *B. subtilis* ATCC 6633 и *B. coagulans* 429.

Работа выполнена в рамках Госзадания ИНХС РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Базунова М.В., Шарафутдинова Л.А., Лаздин Р.Ю., Чернова В.В., Миксонов Д.Н., Захаров В.П. // Прикл. биология и микробиология. 2018. Т. 54. № 5. С. 472–476.
2. Галина А.Р., Зидиханова Л.Ф., Шуришина А.С., Кулиш Е.И. // Вестник Башкирского университета. 2017. Т. 22. № 4. С. 985–1585.
3. Kato Y., Onishi H., Machida Y. // Biomaterials. 2000. V. 21. № 15. P. 1579–1585.

4. Panevin A.A., Golyshev A.A., Skorik Y.A., Zhuravskii S.G., Sonin D.L. // Pharm. Chem. J. 2017. V. 50. № 11. P. 711–714.
5. Колесов С.В., Гурина М.С., Мударисова П.Х. // ВМС. Сер. В. 2019. Т. 61. № 3. С. 195–202.
6. Skorik Y.A., Kritchenkov A.S., Moskalenko Y.E., Golyshev A.A., Raik S.V., Whaley A.K., Vasina L.V., Sonin D.L. // Carbohydr. Polymers. 2017. V. 166. P. 166–172.
7. Kiryukhin M.V., Sergeev B.M., Sergeev V.G., Prusov A.N. // Polym. Sci. Ser. B. 2000. V. 42. № 5–6. P. 158–162.
8. Barrera N., Guerrero L., Debut A., Santa-Cruz P. // PLoS One. 2018. V. 13. № 7. P. 1–18.
9. Le Thi An Nhien, Nguyen Duc Luong, Le Thi Thuy Tien, Le Quang Luan // J. Nanomaterials. 2018. P. 1–9. DOI 10.1155/2018/7121549
10. Milad Torabfam, Hoda Jafarizadeh-Malmiri // Green Process Synthesis. 2018. № 7. P. 530–537.
11. Александрова В.А., Ревина А.А., Бусев С.А., Садыкова В.С. // Известия Академии наук. Сер. химическая. 2018. № 4. С. 757–761.
12. Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S.K. // J. Pharm. Anal. 2016. V. 6. № 2. P. 71–79.
13. Помогайло А.Д., Джардималиева Г.И. Металлополимерные гибридные наноконкомпозиты. М.: Наука, 2015. 494 с.
14. Васильев А.А., Карпачева Г.П., Дзидзигури З.Л., Сидорова Е.Н. Свидетельство 2019660702 № 2019616119 РФ. 2019. Реестр программ для ЭВМ. 1 с.
15. Сергеев Б.М., Кирюхин М.В., Бахов Ф.Н., Сергеев В.Г. // Вестник МГУ. Сер. 2. Химия. 2001. Т. 42. № 5. С. 308–314.

Silver Nanoparticles Stabilized with Chitosan Succinamide: Synthesis and Antibacterial Activity

V. A. Alexandrova^{a,*}, A. M. Futoryanskaya^{a,**}, and V. S. Sadykova^b

^a*A.V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis RAS, Moscow, 119991 Russia*

^b*G.F. Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia*

**e-mail: alexandrova@ips.ac.ru*

***e-mail: futoraynskaya@ips.ac.ru*

A water-soluble chitosan derivative, chitosan succinamide, was used as a polymer matrix for the formation of silver nanoparticles by ions reduction under microwave irradiation in the presence of a D – glucose reducing agent. Using the UV spectroscopy method, the presence of silver nanoparticles in the synthesized colloidal solution was confirmed. According to transmission electron microscopy data, the synthesized silver nanoparticles had a spherical shape. The obtained diffractograms confirm the presence of reflexes characteristic of the crystal lattice of metallic silver. As a result of in vitro studies, it was shown that the synthesized colloidal solution of silver nanoparticles exhibits pronounced antibacterial activity against strains of gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Bacillus coagulans* 429.

Keywords: microwave synthesis, silver nanoparticles, chitosan succinamide, antibacterial activity

УДК 576.5

РАЗРАБОТКА БЕССЫВОРОТОЧНЫХ СРЕД НА ОСНОВЕ ОПТИМАЛЬНОЙ КОМБИНАЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ-ДОБАВОК И ГИДРОЛИЗАТОВ НЕЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

© 2020 г. Д. С. Балабашин^{1, *}, Е. Н. Калиберда¹, И. В. Смирнов¹, Ю. А. Мокрушина¹,
Т. В. Бобик¹, Т. К. Алиев^{1, 2}, Д. А. Долгих^{1, 3}, М. П. Кирпичников^{1, 3}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, 117997 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Москва, 119991 Россия

*e-mail: dbalabashin@mail.ru

Поступила в редакцию 30.12.2019 г.

После доработки 14.04.2020 г.

Принята к публикации 22.04.2020 г.

Изучена возможность культивирования линии-продуцента рекомбинантных иммуноглобулинов (IgG1) в базовой среде культивирования IMDM (Iscove's Modified Dulbecco Medium) с внесением рекомбинантных белков и гидролизатов белков неживотного происхождения. Для обогащения среды использовали рекомбинантные инсулин, сывороточный альбумин человека, продуцируемые бактериями *E. coli*, трансферрин – дрожжами *Pichia pastoris*. Комбинация белков-добавок, входящая в состав разработанной среды, позволила повысить продуктивность стабильной культуры-продуцента рекомбинантных гуманизированных антител на основе клеток линии СНО на 44% по сравнению с используемой комплексной коммерческой добавкой ITS (Insulin-transferrin-selenium). Внесение в измененную среду IMDM гидролизатов белков гороха и риса, содержащих пептиды с молекулярной массой ниже 5 кДа, способствовало увеличению продуктивности линии в 3.9 и 4.5 раза соответственно.

Ключевые слова: гидролизаты растительных белков, дрожжевой экстракт, инсулин, трансферрин, селенит натрия, ЧСА, антитела, СНО DG44, стабильная клеточная линия

DOI: 10.31857/S0555109920050037

Рекомбинантные терапевтические белки расширили возможности современной медицины, позволяя разрабатывать новые и эффективные методы лечения для многих заболеваний, начиная от рака и заканчивая бесплодием [1]. Около 60–70% всех рекомбинантных фармацевтических белков получают в клетках млекопитающих. Многие из этих белков экспрессируются в иммортализованных клетках яичника китайского хомячка (СНО), что позволяет максимально сохранить не только их структуру, но и функцию, позволяя применять их во многих областях медицины, биотехнологии и сельского хозяйства. Другие клеточные линии эукариот такие, как миелома мыши (NSO), клетки почки хомячка (ВНК) и клетки эмбриональной почки человека (НЕК-293) также используются в производстве для получения рекомбинантных белков. Однако они обладают узкой спе-

цифичностью и направленностью действия, в связи с этим их использование строго ограничено областью применения [2]. Клетки линии СНО становятся все более важным инструментом для производства рекомбинантных терапевтических белков вследствие их быстрого роста, стабильности экспрессии в них чужеродных генов и высокого выхода рекомбинантных белков [3]. Увеличение выхода рекомбинантного белка и, следовательно, снижение издержек производства относится к основной биотехнологической цели [4]. Поскольку производительность клеток млекопитающих гораздо более низкая, по сравнению с прокариотическими, существует стратегия увеличения производства рекомбинантного белка в клетках СНО, включающая регулирование температуры культуры [5, 6], добавление различных химических веществ [6], контроль параметров в биореакторе [7]

и ингибирование клеточного апоптоза [8, 9]. Температура культивирования линии-продуцента является одним из наиболее важных параметров, при этом такие клетки животных, как СНО, для имитации окружающей среды организма наиболее часто культивируются при 37°C. Температура, рН среды культивирования [10–12] и содержание в ней растворенного кислорода (DO) [11, 12] влияют на некоторые важные клеточные характеристики (рост, жизнеспособность и синтез белка), которые были изучены для определения подходящих условий процесса производства белка [13]. Для выращивания клеток традиционно использовали смеси компонентов, включающие растворы основных питательных веществ для обеспечения метаболизма клеток, которые получили название базовых (MEM, DMEM, IMDM, RPMI-1640, 199 и др.). Базовые питательные среды имеют различный состав, но для получения клеточной массы к ним необходимо добавлять сыворотку крови. Ее традиционно вносят в культуры клеток, чтобы обеспечить их гормонами, факторами роста, связывающими и транспортными белками, а также другими дополнительными питательными веществами. Однако сывороточные композиции не постоянны, к тому же их состав, как правило, не известен. Кроме того для жизнедеятельности культуры клеток необходима лишь небольшая часть входящих в сыворотку компонентов.

Соединения, входящие в состав сыворотки, при культивировании могут влиять на жизнеспособность и пролиферацию клеточной массы, тем самым внося существенные погрешности при экспрессии целевого белка в линиях этих клеток [14, 15]. Содержание белка в сыворотке обычно намного больше, чем уровень его экспрессии клеточной линией-продуцентом. При этом сывороточные белки могут легко маскировать присутствие продукта специфической экспрессии линии-продуцента при анализе в том случае, если они схожи с ними по размеру. Таким образом, развитие биотехнологии и точного воспроизведения результатов экспрессии требуемых белков, а также облегчения процедуры очистки наработанного препарата остро нуждается в питательных средах, которые соответствовали этим требованиям. Удаление сыворотки из среды культивирования позволит исключить сывороточные гормоны, антитела и другие регуляторы, а также унифицировать состав питательной среды, что позволит достоверно изучить клеточную физиологию и иммунологию, межклеточные взаимодействия и кинетику накопления продукта линии-продуцента. Использование свободной от сыворотки среды значительно снижает также риск контаминации культуры. Следовательно, продукты, полученные из культуры клеток-продуцентов рекомбинантных белков, не содержащей сыворотку, становятся

пригодными для применения во многих областях экспериментальной медицины, особенно *in vivo* при лечении человека.

Основными белками, необходимыми клеткам культуры СНО для успешного роста, являются альбумин, инсулин и трансферрин, а из неорганических добавок – селенит натрия. Данные вещества входят в состав среды, свободной от сыворотки, и выполняют ряд специализированных функций. Так, альбумин служит в качестве носителя не только для незаменимых жирных кислот и некоторых минералов (например, ионов цинка), но и гормонов, а также пептидов и факторов роста. Он осуществляет детоксикацию H₂O₂ [15] и избыточных количеств микроэлементов [16, 17], а также обеспечивает механическую защиту клеток при перемешивании [18]. Концентрация альбумина в разных средах, свободных от сыворотки, составляет от 0.5 до 5.0 мг/мл. Для приготовления сред используют две различные формы альбумина, первая – представляет собой экстракт нативного сывороточного альбумина, ассоциированного с жирными кислотами неопределенной природы, а вторая – делипидированный альбумин (более очищенные среды), связанный с линолевой и олеиновой кислотами. Однако такие препараты являются дорогостоящими, поэтому для крупномасштабных производств моноклональных антител (mAb) их использование нецелесообразно. Все большее число исследователей культивируют клетки в отсутствие альбумина, но этот подход возможен не для всех линий клеток и гибридом.

Инсулин служит фактором роста и поддержания оптимального метаболического уровня клетки и считается важным компонентом в культуре гибридом, свободных от сыворотки. Он способствует стимуляции поглощения аминокислот (особенно лейцина и валина) клетками культуры, а также уридина и глюкозы, ответственных за синтез РНК, белка и липидов. Инсулин включается в большинство бессывороточных сред в концентрациях от 5 до 10 мкг/мл.

Трансферрин считается одной из основных добавок, стимулирующих рост клеток гибридом в бессывороточной среде [19, 20], но в некоторых случаях его отсутствие приводит к сильному ингибированию их роста. Трансферрин является гликопротеином, который связывает железо и облегчает его транспорт через плазматическую мембрану [21, 22]. Он используется в бессывороточной среде в концентрации 1–30 мкг/мл. При этом трансферрин взаимодействует с определенными рецепторами клеточной поверхности и может обладать *in vitro* такими дополнительными функциями как хелатирование токсичных металлов, содержащихся в малых и следовых количествах [21–23]. В зависимости от производи-

теля и состава коммерческие добавки инсулина и трансферрина их обозначают insulin-trasferrin-selenium-ethanolamine (ITSE), selenium-insulin-transferrin-ethanolamine (SITE), insulin-trasferrin-selenium-sodium pyruvate (ITS-A), insulin-trasferrin-selenium-ethanolamine (ITS-G) или insulin-trasferrin-selenium (ITS). Другие их различия включают сведения, является ли продукт рекомбинантным, не содержащим животных экстрактов, или полученным из тканей животных или донорской крови. Большинство продуктов, называемых на инсулин-трансферрин-селенит натрия, содержат белки, полученные из крови, включающие бычий трансферрин или трансферрин из плазмы человека, а также свиной инсулин. Однако существует несколько композиций рекомбинантных инсулина и трансферрина, полностью не содержащих животных добавок, которые предлагают компании “InVitria” и “Fisher Scientific” (США). Остальные композиции содержат нативные белки и не свободны от продуктов животного происхождения (<https://cellculturedish.com/combining-insulin-and-transferrin-in-cell-culture-supplements/>). Их цена, часто основанная на стоимости других составляющих, может различаться. Разработка концентрата, состоящего из растворов белков, имеющих рекомбинантную природу и структуру, полностью сходную с белками человека, позволит добиться высокого уровня безопасности. Следует отметить, что при терапии препаратами, полученными на основе бессывороточных сред с рекомбинантными белками-добавками, исключается вероятность заражения больного вирусами животных. В свою очередь замена коммерческой среды позволит снизить затраты на получение целевого IgG1, и таким образом снизить себестоимость фармацевтических препаратов, получаемых в результате биосинтеза в клеточных линиях-продуцентах.

В настоящее время успешно применяется несколько композиций и добавок для бессывороточных сред культивирования широкого спектра эукариотических клеток, и, в частности, клеток линий СНО. Однако необходимо отметить, что различные клеточные линии, полученные из исходной линии СНО, имеют специфический метаболизм и особенности использования питательных элементов. Известно, что при высокой плотности клеток продукция рекомбинантных антител может снижаться из-за истощения среды культивирования, и вследствие этого рост культуры замедляется и останавливается, а культура погибает. С гибелью культуры останавливается специфическая продукция. В фармацевтической промышленности особую трудность представляет оптимизация уровня экспрессии иммуноглобулинов в СНО клетках. Данная особенность связана со сложностью синтеза длинных аминокислотных последовательностей

легкой и тяжелой цепей, входящих в состав полноразмерного антитела, и последующей за этим его сборки из отдельных цепей полноразмерных молекул антитела. Поэтому клеточные линии, продуцирующие IgG1 из-за сложностей в сборке полноценных молекул показывают более низкую продукцию по сравнению с клетками-продуцентами других рекомбинантных белков. Для улучшения роста клеток и увеличения продукции ими терапевтических белков использовали внесение в бессывороточную среду добавок, содержащих гидролизаты белков растительного происхождения [24]. Такой подход позволил разработать стратегию добавления этого гидролизата в бессывороточную среду для культивирования [25].

Согласно литературным данным гидролизаты дрожжей способствуют значительному увеличению продуктивности клеток линии СНО в культуре [26]. Ряд других исследований подтверждает способность таких гидролизатов увеличивать плотность клеток СНО в процессе культивирования и специфическую продуктивность их линий [27, 28].

При выборе источника сырья широко используются гидролизаты растений и дрожжей, поскольку они исключают применение в биофармацевтике в качестве добавок к среде продуктов животного происхождения [29–31]. Было показано, что источник этих гидролизатов влиял на рост клеток и продукцию ими целевого белка [32]. Известен также ряд коммерческих добавок, включающих гидролизаты растительного происхождения. Данные добавки являются комплексными, однако состав таких композиций относится к коммерческой тайне.

Рекомбинантная низкобелковая среда позволила бы заменить дорогостоящие питательные среды и добавки, а применение компонентов неживотного происхождения избежать контаминации вирусами и иными опасными агентами при получении рекомбинантного IgG1 в клетках СНО.

Цель работы – создание композиции бессывороточной среды культивирования клеток-продуцентов СНО для эффективной экспрессии целевого белка в виде иммуноглобулинов IgG1, а также других рекомбинантных белков.

МЕТОДИКА

Материалы. В работе использовали белковый порошок гороха (Pisiva, “Hill Pharma Inc.”, США), клейковину, глютен из пшеницы (“Roquette”, Франция), соевый белковый изолят (Sunsoy, “Sunhide Impex”, КНР), рисовый белок (“Beneo”, Германия), белок из подсолнечника (“Biotechnologies”, Россия), экстракт дрожжей (“BD Bioscience”, Бельгия).

Клеточная культура и адаптация. Для проведения экспериментов использовалась стабильная клеточная культура на основе линии CHO DG44 (“Invitrogen”, США), стабильно экспрессирующая растворимые рекомбинантные антитела в среде культивирования. Культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 100 мл в 30 мл культуральной среды при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере S3.20L (“ELMI”, Латвия) при 150 об./мин, 37°C и 95%-ной влажности. Была получена культура клеток, которая культивировалась на среде OptiCHO (“Invitrogen”, США) с добавлением 8 мМ L-глутамина. Адаптацию культуры для проведения экспериментов осуществляли ступенчато, переводя клетки в среду, основанную на среде Iscove’s Modified Dulbecco Medium, (IMDM, “Biological”, Россия), содержащую 8 мМ L-глутамин, 0.1% Pluronic F-68 и 1% ротовой добавки Insulin-transferrin-selenium (ITS, “Gibco”, США). Перевод клеток осуществляли постепенно, изменяя содержание среды с 50, 75, 90, 95 и до 100%. Окончанием этого процесса считали увеличение времени удвоения популяции клеток, равным 24 ч. При последующих изменениях состава питательной среды клеточную массу осаждали при 450 g в течение 5 мин и переводили на экспериментальную среду для исследования продуктивности.

Проведение ИФА. Оценку уровня продукции антител культурами осуществляли с помощью метода непрямого ИФА. Для проведения ИФА использовали 96-луночные планшеты Maxisorp (“Nunc”, Дания). Для сорбции на подложку наносили 100 мкл очищенного рекомбинантного антигена (10 мкг/мл в лунку) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Промывали 3 раза по 200 мкл фосфатным буфером (ФБ) с 0.5% Твин-20, а затем добавляли 200 мкл на лунку ФБ с 0.5%-ным БСА для уменьшения неспецифического связывания с подложкой антител в исследуемом образце. Обработку осуществляли в течение 1 ч при 37°C. Затем наносили кондиционированную среду или очищенный препарат антител, титровали, промывали 3 раза ФБ, содержащим 0.5%-ный Твин-20. После этого вносили по 100 мкл в лунку раствора вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, который готовили разведением в соотношении 1 : 20000 в ФБ содержащим 0.1%-ный БСА. Инкубировали в течение 1 ч при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере с частотой 300 об./мин при 37°C. Лунки планшета промывали 3 раза 200 мкл ФБ с 0.5%-ным Твин-20, и вносили по 100 мкл в лунку готового для применения раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ, “Иммунотех”, Россия) и после развития окраски в течение примерно 15 мин реакцию останавливали внесением 100 мкл 10%-ной серной кислоты. Оценку результатов проводили на планшетном спектро-

фотометре Model 680 (“Bio-Rad”, США). В качестве контроля использовали очищенный препарат антител с известной концентрацией.

На всех этапах для анализа концентрации мАт в среде культивирования отбирали аликвоты объемом 200 мкл и центрифугировали при 450 g в течение 5 мин и определяли методом ИФА.

Получение и очистка белковых компонентов. Рекомбинантный трансферрин получали по методике, описанной в работе [33]. Для получения модифицированного рекомбинантного трансферрина человека (рТФР) был использован штамм метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* Yst-TFNG, полученный ранее [33]. Нарработку рекомбинантного белка осуществляли в биореакторе в условиях культивирования при высокой плотности биомассы штамма Yst-TFNG в солевой среде BSM (<http://www.img.bio.uni-goettingen.de/ms-www/internal/methods/Yeast/PichiaFermentation.pdf>) в присутствии глюкозы в качестве источника углерода. Для выделения и очистки рТФР была использована схема с некоторыми модификациями, описанная в работе [34]. После очистки рТФР на анионообменной смоле Q Сепфарозе Fast Flow (“GE Healthcare”, США) на второй стадии использовали катионообменный сорбент MonoS 5/50G. Элюцию проводили градиентом концентрации NaCl от 0 до 0.5 М в 50 мМ Na-ацетатном буфере, pH 5.0. На заключительной стадии очистки рТФР использовали гель-фильтрационную хроматографию на колонке Superdex S75 (“GE Healthcare”, США) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7.2, содержащим 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄ и 1.8 мМ KH₂PO₄. Чистота полученного препарата рТФР составляла более 95%, которую оценивали денситометрически после электрофоретического разделения в 12%-ном ПААГ в невосстанавливающих условиях по стандартной методике Леммли [34].

Для получения рекомбинантного инсулина человека использовали штамм-продуцент *E. coli* BI 21 (DE 3), трансформированный плазмидой pPINS 07. Получение телец включения, ренатурацию и очистку рекомбинантного белка с использованием анионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сепфарозе FF проводили, как описано ранее [35]. Полученный препарат подвергали ферментативному гидролизу трипсином и карбоксипептидазой В, а также для предотвращения образования дезтреонин (В30)-инсулина и модификации ε-аминогрупп остатков лизина, с помощью цитраконового ангидрида. Дальнейшая очистка рекомбинантного инсулина включала концентрирование, осаждение 0.1 М ацетатом цинка и хроматографическое фракционирование с использованием сорбента YMC-Basic C8-15-200 (“YMC Europe”, Германия) в соответствии с методикой, описанной в работе [36].

Далее инсулин осаждали ацетатом цинка, а полученный после центрифугирования осадок растворяли в 0.5 М уксусной кислоте и хроматографировали на Сефадексе G-50. Из основной фракции инсулин выделяли осаждением ацетатом цинка с последующим центрифугированием. Кристаллизацию инсулина осуществляли с помощью хлористого цинка при pH 6.7 в водном растворе лимонной кислоты, этанола и хлорида цинка. Нейтрализацию этого раствора проводили ступенчато: вначале раствором аммиака до pH 8.2 ± 0.2 и затем раствором соляной кислоты до pH 6.2. Выпавшие кристаллы отфильтровывали и лиофилизировали. Хроматографическая чистота полученного рекомбинантного инсулина человека составляла не менее 98.5%.

Рекомбинантный сывороточный альбумин человека (рЧСА) получали по методике, описанной в работе [37]. Для его получения на основе дрожжей *P. pastoris* был создан штамм-продуцент “PichiaPink Strain4” (“Thermo Fisher Scientific”, Англия) содержащий клетки, нокаутные по генам двух протеаз — *pep4* и *prb1*, вносящих значительный вклад в протеолитическую деградацию получаемого рекомбинантного белка. Для этого нуклеотидная последовательность проЧСА была амплифицирована с плазмидой pPIC9/ЧСА, полученной ранее [37], с использованием специфических олигонуклеотидов, содержащих сайты эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *KpnI*, и клонирована в вектор pPink-HC. Экспрессионная конструкция pPinkHSA была линейаризована с помощью эндонуклеазы рестрикции *PmeI* и трансформирована в клетки *P. pastoris* “PichiaPink Strain4” методом электропорации [38]. Нарработку рЧСА, как и в случае рТФР, проводили в биореакторе с использованием солевой среды BSM с метанолом в качестве источника углерода (<http://www.img.bio.uni-goettingen.de/ms-www/internal/methods/Yeast/PichiaFermentation.pdf>). Выделение и очистку рЧСА выполняли в соответствии с ранее описанной методикой [37]. Чистота полученного препарата рЧСА подтверждалась электрофоретическим анализом с последующей денситометрией и составляла не менее 95%.

Небелковые компоненты разрабатываемой среды. Селенит натрия (“Sigma-Aldrich”, Германия) растворяли в воде качества mQ в концентрации 1 мг/мл и стерилизовали через фильтр 0.22 мкм (“Millipore”, США).

Приготовление растворов — гидролизатов растительных белков и контроль реакции. Приготовление растворов (10–25 мг/мл) белков-субстратов (белковых порошков растений) проводили в 0.001 М ЭДТА · Na₂-буфере, pH 6.2, после экстракции в течение ночи при комнатной температуре. Белок, экстрагированный из порошков растений, отделяли центрифугированием при 9000 г

на центрифуге 5810R (“Eppendorf”, Германия) в течение 40 мин. Содержание экстрагированного из порошка белка оценивали по его разнице до и после центрифугирования. В надосадочной жидкости белок, содержание которого определяли по методу Брэдфорд с использованием реактива Quick Start Bradford 1x Dye Reagent #5000205 (“Bio-Rad”, США), гидролизывали папаином. При этом в 1/20 часть не вносили папаин, а оставляли для контроля, который использовали на всех стадиях гидролиза. Гидролиз растительных белков осуществляли в 0.001 М ЭДТА · Na₂-буфере, pH 6.2, содержащем 0.005 М Cys, на качалке (150 об./мин) в течение 20 ч при 39°C. Соотношение папаин—растительный белок составляло 1 : 20 (по количеству белка). Протеолитическую реакцию останавливали кипячением в течение 10 мин, реакционную смесь охлаждали до 7°C. Содержание экстрагированных и прогидролизированных папаином растительных белков контролировали методом электрофореза в 12%-ном ПААГ (восстанавливающие условия) по методу Лэммли [34], отбирая аликвоты раствора, содержащие 30–50 мкг белка. Затем pH реакционной смеси доводили до 7.2, выпавший осадок снова удаляли центрифугированием (9000 г, 40 мин), а надосадочную жидкость пропускали через ячейку с мембраной Amicon PM-5 (“Millipore”, США), полученный раствор использовали. Количество полученных пептидов (с молекулярными массами менее 5 кДа, гидролизат) определяли по количеству прогидролизованного белка.

В качестве положительного контроля использовали 10%-ный гидролизат дрожжевой культуры, который растворяли в 100 мл воды качества mQ и автоклавировали для стерилизации в течение 40 мин при 121°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения концентрации белковых компонентов неживотного происхождения, необходимых для роста культуры продуцента и продукции целевого белка использовали стоковые растворы рекомбинантных белков. Рекомбинантные белки-добавки (рЧСА и рТФР) были получены и очищены с использованием гель-фильтрации как описано в работах [33, 37] и растворены в ФСБ для получения стандартных растворов, концентрация которых приведена в табл. 1.

Каждый из белковых компонентов и низкомолекулярных добавок вносили в среду культивирования с помощью фильтров в виде шприц-насадок с диаметром поры 0.22 мкм, что обеспечивало стерильность. Перед добавлением их хранили при 4°C.

В качестве контроля продуктивности клеточной культуры при выращивании на бессыворо-

Таблица 1. Концентрации стоковых растворов белков и низкомолекулярных компонентов, входящих в состав бессывороточной среды культивирования

Компонент	Молекулярная масса, Да	Концентрация, мг/мл
Инсулин	5808	10
Трансферрин	80000	2.8
Селенит натрия	173	0.1
ЧСА	66500	140

точной среде использовали комплексную добавку инсулин-трансферрин-селенит натрия (ITS, "Gibco", США) в конечной концентрации, равной 1% (1:1:1) и 3% (3:3:3).

Для приготовления сред стоковые растворы добавляли в базовую среду культивирования IMDM в количествах, представленных в табл. 2. Для каждой из культур клеток в среду роста также вносили 8 мМ L-глутамин и 0.1% Pluronic F-68 ("Thermo Fisher Scientific", Англия). После внесения белковых и низкомолекулярных компо-

нентов среды хранили не более 14 сут при 4°C. Конечная концентрация белковых и небелковых компонентов в разрабатываемых средах представлена в табл. 3.

Для выявления наивысшей удельной продуктивности клеточной линии-продуцента при культивировании в условиях разрабатываемой бессывороточной среды были проведены 3 серии независимых культивирований. Усредненные данные представлены на рис. 1.

Из рис. 1 следует, что накопление продукта в начале культивирования происходило равномерно для каждой из тестируемых сред культивирования. Однако, относительно контроля удельная продуктивность линий, культивируемых с избытком инсулина или трансферрина, оказалась выше, чем для контрольного образца. Это могло свидетельствовать о компенсации изменения скорости роста культуры удельной продуктивностью.

Для получения максимальной концентрации мАт культивирование продолжали в течение 14 сут, когда происходило истощение питательных веществ в среде (рис. 2).

Таблица 2. Соотношение компонентов в тестируемой бессывороточной среде (объем в мл для приготовления 1 л среды роста)*

Компонент	Соотношение компонентов в среде, относительно концентрации в ITS										
	3:1:1	1:3:1	1:1:3	1/3:1:1	1:1/3:1	1:1:1/3	1:1:1	3:3:3	1/3:1/3:1/3	ITS 3:3:3	ITS 1:1:1
Инсулин	3.000	1.000	1.000	0.333	1.000	1.000	1.000	3.000	0.333	—	—
Трансферрин	1.964	5.893	1.964	1.964	0.655	1.964	1.964	5.893	0.655	—	—
Селенит натрия	0.067	0.067	0.201	0.067	0.067	0.022	0.067	0.201	0.022	—	—
ЧСА	7.14	7.14	7.14	7.14	7.143	7.140	7.14	7.14	7.140	—	—
Добавка ITS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	30	10

* "—" компонент не добавлялся.

Таблица 3. Соотношение компонентов в тестируемой бессывороточной среде (мг компонента/количество концентрата, необходимого для приготовления 1 л среды роста)

Компонент	Соотношение в среде относительно концентрации ITS										
	3:1:1	1:3:1	1:1:3	1/3:1:1	1:1/3:1	1:1:1/3	1:1:1	3:3:3	1/3:1/3:1/3	ITS 3:3:3	ITS 1:1:1
Инсулин	30	10	10	3.33	10	10	10	30	3.33	—	—
Трансферрин	5.5	16.5	5.5	5.5	1.8	5.5	5.5	16.5	1.8	—	—
Селенит натрия	0.0067	0.0067	0.0201	0.0067	0.0067	0.0022	0.0067	0.0201	0.0022	—	—
ЧСА	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	—	—
Добавка ITS*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	30 мл	10 мл

* "—" — компонент не добавлялся.

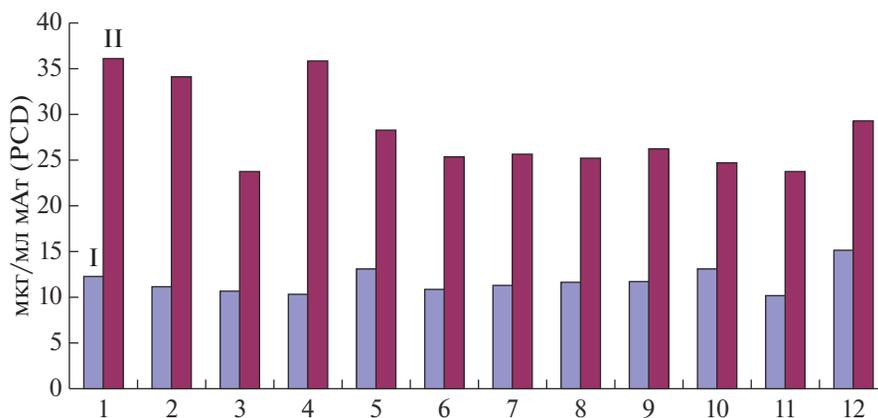


Рис. 1. Сравнительная абсолютная (I, мкг/мл) и удельная (II, пг МАТ/кл./сут) продуктивность клеток линии-продуцента МАТ на 44 ч выращивания на среде IMDM с различным сочетанием компонентов: 1 – IMDM 3 : 1 : 1, 2 – IMDM 1 : 3 : 1, 3 – IMDM 1 : 1 : 3, 4 – IMDM 1/3 : 1 : 1, 5 – IMDM 1 : 1/3 : 1, 6 – IMDM 1 : 1 : 1/3, 7 – IMDM 1 : 1 : 1, 8 – IMDM 3 : 3 : 3, 9 – IMDM 1/3 : 1/3 : 1/3, 10 – IMDM + ITS (3 : 3 : 3), 11 – IMDM + ITS (1 : 1 : 1), 12 – OptiCHO.

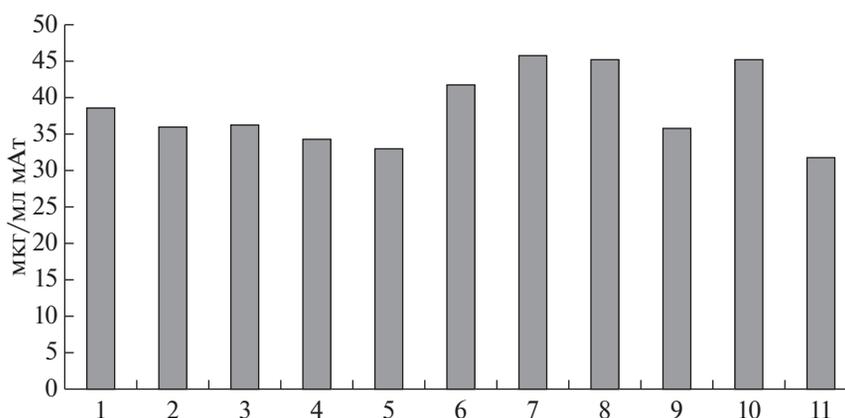


Рис. 2. Концентрация МАТ в среде после 14 сут культивирования на средах (1–11) с различным соотношением компонентов среды IMDM (даны средние результаты 4 независимых культивирований). 1–11 как и на рис. 1

Наиболее высокие концентрации МАТ при культивировании были получены в среде IMDM, содержащей однократную и трехкратную концентрации рекомбинантных белков неживотного происхождения. Для дальнейших исследований применяли среду, с содержанием белковых компонентов как в комплексной добавке ITS. Вместе со средой IMDM применяли белки неживотного происхождения и низкомолекулярные компоненты инсулина, трансферрина, ЧСА и селенит натрия, описанные выше.

Получение и применение гидролизатов. Для получения гидролизата растительные белки экстрагировали из порошков пшеницы, подсолнечника, гороха, риса, рисовой муки и сои. После экстракции белков проводили их количественную (табл. 4) и качественную характеристику (рис. 3). Необходимо отметить, что при экстракции буфером подбирали такое количество порошка, чтобы

концентрация экстрагируемого белка в растворе составляла 1 мг/мл. После гидролиза папайном растительных белков рН реакционной смеси доводили до 7.2 и центрифугировали, а в дальнейшем использовали надосадочную жидкость. Затем надосадочную жидкость пропускали через ячейку с мембраной для отделения молекул с молекулярной массой выше 5 кДа, что позволяло в дальнейшем исключить попадание в среды белков, не прогидролизованых папайном, и других высокомолекулярных соединений.

После проведения гидролиза растительных белков был получен набор пептидов (гидролизат). На рис. 3 представлена их электрофореграмма до и после гидролиза папайном. По результатам качественного контроля (рис. 3) было установлено, что белки из порошка риса и рисовой муки с молекулярной массой 25 кДа полностью гидролизировались до фрагментов с молекулярной массой

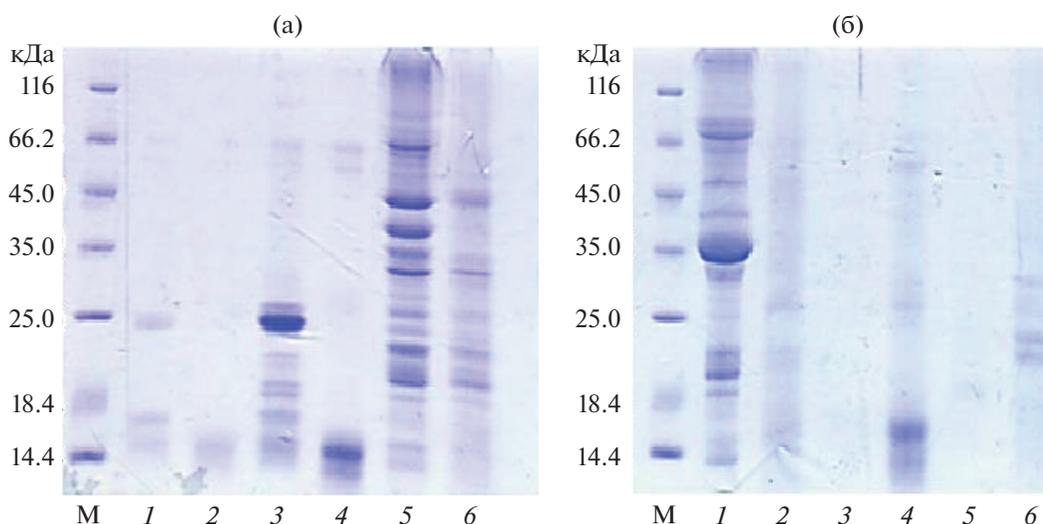


Рис. 3. Электрофореграммы водных экстрактов растительных белков риса (а, 1–4) и гороха (а, 5 и 6) до (1, 3 и 5) и после (2, 4 и 6) гидролиза папаином, а также соевых белков (б, 1 и 2), глютена (б, 3 и 4) и подсолнуха (б, 5 и 6). М – белки-маркеры молекулярной массы: β -галактозидаза – 16.0, бычий сывороточный альбумин – 66.2, овальбумин – 45.0, лактатдегидрогеназа – 35.0, РЕаза Vsp981 – 25.0, β -лактоглобулин – 18.4, лизоцим – 14.4.

14.4 кДа. Белки гороха гидролизовались равномерно, при этом полностью исчезали только белки с молекулярными массами 66, 40 и 35 кДа. Белки, экстрагированные из порошков сои, глютена и подсолнечника расщеплялись полностью. Для точного расчета прогидролизованного белка (пептиды) осадок, полученный после гидролиза, подсушивали при 65°C, взвешивали и вычитали из количества первоначально экстрагированного белка. Белок, полученный при концентрировании на мембране, исключая пептиды с молекулярными массами ниже 5 кДа (белок после гидролиза, табл. 1), также вычитали из количества первоначально экстрагированного белка. Белок, который составил разницу в результате вычитания осадка и пептидов с молекулярной массой более 5 кДа, был отнесен к низкомолекулярным пепти-

дам и аминокислотам (гидролизат), которые использовали в качестве добавок при изучении их влияния на пролиферативную активность клеток-продуцентов.

Результаты проведения гидролиза белков папаином представлены в табл. 4. Конечная концентрация пептидов гидролизата не нормировалась по массе и концентрации, однако для гидролиза были взяты одинаковые количества исходных белков. Получение более высоких конечных концентраций гидролизатов требует доработки методики гидролиза и проведения дополнительных исследований в этой области.

Для исследования факторов, влияющих на продуктивность линии-продуцента (выход целевого продукта в среду культивирования), были использованы гидролизаты белков риса, рисовой

Таблица 4. Содержание растительного белка после гидролиза папаином

Источник растительного белка	Экстрагированный белок, мг/%	Масса осадка, мг	Белок после гидролиза, мг	Количество образующихся пептидов, мг/%	Концентрация пептидов, мг/мл*
Рис (1)	14.0/1.4	1.0	4.3	8.7/62	0.22
Рисовая мука (2)	2.9/0.36	0.8	1.6	0.54/18.6	0.014
Горох (3)	75.4/18.6	42.0	9.1	24.3/32	0.6
Соя (4)	35.9/3.6	18.0	8.1	9.8/27	0.24
Пшеница (5)	23.8/2.9	9.7	6.5	7.6/32	0.19
Подсолнечник (6)	55.3/6.8	16.6	10.1	28.6/52	0.7

* См. Методика.

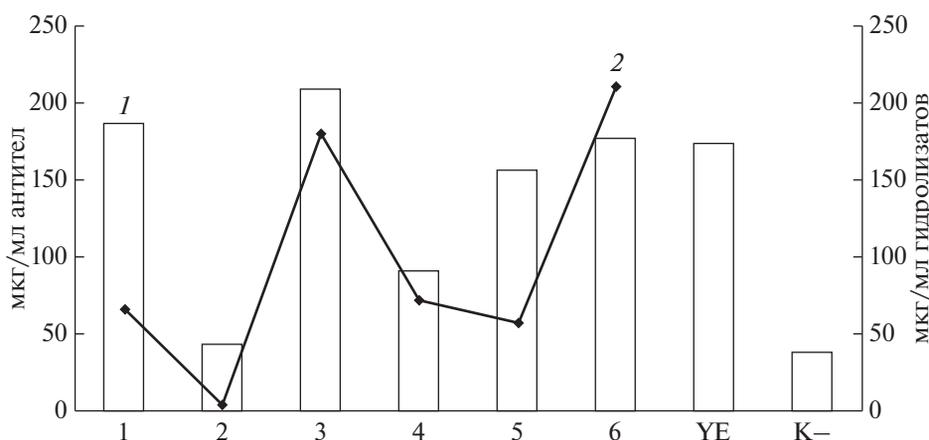


Рис. 4. Продуктивность линии клеток при внесении гидролизатов неживотного происхождения (1, мАт мкг/мл), увеличение продуктивности культуры при внесении гидролизатов в среды культивирования по отношению к содержанию в них пептидов (2, мкг/мл). К – контроль без внесения растворов гидролизатов, YE – внесение дрожжевого экстракта в объеме равном 10% объема культуральной среды; 1–6 – добавки, как в табл. 4.

муки, гороха, сои, пшеницы, подсолнечника и дрожжевого экстракта. Каждый из этих гидролизатов добавляли до 10% в среду культивирования, содержащую 3×10^5 кл./мл, а также дважды в ходе культивирования. В качестве отрицательного контроля вместо гидролизата добавляли буфер для получения растворов гидролизатов. Усредненные результаты трех независимых экспериментов представлены на рис. 4.

Применение гидролизатов рисового белка и белков гороха и подсолнечника оказалось наиболее эффективным. Такую эффективность трех гидролизатов, содержащих набор пептидов с молекулярной массой не более 5 кДа, можно было объяснить, с одной стороны, присутствием входящих в их состав аминокислот, витаминов и жирных кислот, а с другой – использованными концентрациями. Однако исходя из полученных результатов, не было очевидно, что увеличение конечной концентрации мАт после культивирования клеток линии-производителя связано с количеством внесенных гидролизатов. Так, наивысший уровень экспрессии рекомбинантных антител в среде IMDM с добавлением белковых и небелковых компонентов в количестве, указанном в табл. 2, наблюдался также при добавлении в среду гидролизата белков гороха, содержащих 180 мкг пептидов, который стимулировал продуцирование 208.4 мкг/мл мАт (конечная концентрация). Это соответствовало потреблению ~ 0.86 мкг пептидов/мкг целевого белка в 1 мл.

Вторая наиболее продуктивная комбинация культура-производитель-гидролизат была отмечена при использовании гидролизата рисового белка, содержащего 66 мкг пептидов, при которой продукция мАт в конечной концентрации составила 185 мкг/мл среды, что указывало на конверсию

0.36 мкг пептидов/мкг белка в 1 мл среды культивирования. Третья продуктивная культура содержала гидролизат белков подсолнечника. В этом случае при внесении 210 мкг пептидов продуктивность составила 176 мкг/мл, а конверсия составляла 1.193 мкг пептидов/мкг белка в 1 мл среды. Приведенные результаты не позволили сделать однозначный вывод о том, что увеличение количества гидролизата влияло на уровень продукции мАт, экспрессируемых в среде. Однако можно предположить, что большое значение имели природа и источник гидролизатов. Применение дрожжевого экстракта в качестве контроля позволило сравнить эффективность внесения в среду культивирования гидролизатов, полученных из растительных источников, ранее широко используемых в качестве источников питательных веществ и аминокислот. Следует отметить, что применение дрожжевого экстракта при культивировании клеток для получения специфической продукции линии невозможно без дополнительных исследований безопасности, поскольку он в отличие от гидролизатов растительных белков может содержать и вредные неидентифицированные компоненты различной природы, изучение которых не входило в цели данной работы.

Таким образом, были разработаны эффективные комбинации рекомбинантных белков-добавок и технология получения и применения гидролизатов неживотного происхождения для создания на основе среды IMDM бессывороточной среды культивирования. Совместное применение разработанных добавок или компонентов позволило получить среду для выращивания и эффективной экспрессии целевого белка в виде иммуноглобулинов IgG1, а также других рекомбинантных белков.

Комбинация белков-добавок, входящая в состав разработанной среды, позволила повысить продуктивность стабильной культуры-продуцента рекомбинантных гуманизированных антител на основе клеток линии СНО на 44% по сравнению с используемой комплексной коммерческой добавкой ITS (Insulin-transferrin-selenium). Внесение в измененную среду IMDM гидролизатов белков гороха и риса, содержащих пептиды с молекулярной массой ниже 5 кДа, способствовало увеличению продуктивности линии в 3.9 и 4.5 раза соответственно.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1391 от 19.06.2019, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60717X0177).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jayapal K.P., Wlaschin K.F., Hu W., Yap M.G. // Chem. Eng. Prog. 2007. V. 103. № 10. P. 40–47.
- Wurm F.M. // Nat. Biotechnol. 2004. V. 22. № 11. P. 1393–1398.
- Ryu J.H., Kim M.S., Lee G.M., Choi C.Y., Kim B.S. // Biomaterials. 2005. V. 26. № 14. P. 2173–2181.
- Yoon S.K., Hong J.K., Choo S.H., Song J.Y., Park H.W., Lee G.M. // J. Biotechnol. 2006. V. 122. № 4. P. 463–472.
- Fox S.R., Patel U.A., Yap M.G., Wang D.I. // Biotechnol. Bioeng. 2004. V. 85. № 2. P. 177–184.
- Kim D.Y., Lee J.C., Chang H.N., Oh D.J. // Cytotechnology. 2005. V. 47. № 1–3. P. 37–49.
- Nienow A.W. // Cytotechnology. 2006. V. 50. № 1–3. P. 9–33.
- Arden N., Betenbaugh M.J. // Cytotechnology. 2006. V. 50. № 1–3. P. 77–92.
- Liu C.H., Chen L.H. // Cytotechnology. 2007. V. 54. № 2. P. 89–96.
- Borys M.C., Linzer D.I., Papoutsakis E.T. // Biotechnology (N.Y.). 1993. V. 11. № 6. P. 720–724.
- Ozturk S.S., Palsson B.O. // Biotechnol. Prog. 1991. V. 7. № 6. P. 481–494.
- Lin A.A., Kimura R., Miller W.M. // Biotechnol. Bioeng. 1993. V. 42. № 3. P. 339–350.
- Furukawa K., Ohsuye K. // Cytotechnology. 1998. V. 26. № 2. P. 153–164.
- Barnes D., Sato G. // Cell. 1980. V. 22. № 3. P. 649–655.
- Darfler F.J. // In Vitro Cell. Dev. Biol. 1990. V. 26. № 8. P. 769–778.
- Kan M., Yamane I. // J. Cell Physiol. 1982. V. 111. № 2. P. 155–162.
- Guilbert L.J., Iscove N.N. // Nature. 1976. V. 263. № 5578. P. 594–595.
- Lambert K., Birch J. // Animal Cell Biotechnology. 1985. V. 1. P. 85–122.
- Kawamoto T., Sato J.D., Le A., McClure D.B., Sato G.H. // Anal. Biochem. 1983. V. 130. № 2. P. 445–453.
- Kovář J. // Folia Biol. 1987. V. 33. № 6. P. 377–384.
- Bretscher M.S. // Sci. Am. 1985. V. 253. № 4. P. 100–108.
- Trowbridge I.S., Omary M.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 5. P. 3039–3043.
- Iscove N.N., Melchers F. // J. Exp. Med. 1978. V. 147. № 3. P. 923–933.
- Baré G., Charlier H., De Nijs L., Verhoeve F., Schneider Y.-J., Agathos S., Thonart P. // 17th ESACT Meeting Tylösand. Eds. E. Lindner-Olsson, N. Chatzissavidou, E. Lüllau. Netherlands, Dordrecht: Springer-Science + Business Media, B.V., 2001. P. 217–219.
- Mols J., Peeters-Joris C., Agathos S.N., Schneider Y.J. // Biotechnol. Lett. 2004. V. 26. № 13. P. 1043–1046.
- Mosser M., Chevalot I., Olmos E., Blanchard F., Kapel R., Oriol E., Marc A. // Cytotechnology. 2013. V. 65. № 4. P. 629–641.
- Richardson J., Shah B., Bondarenko P.V., Bhebe P., Zhang Z., Nicklaus M., Kombe M.C. // Biotechnol. Prog. 2015. V. 31. № 2. P. 522–531.
- Gupta A.J., Gruppen H., Maes D., Boots J.W., Wierenga P.A. // J. Agric. Food Chem. 2013. V. 61. № 45. P. 10613–10625.
- Donaldson M.S., Shuler M.L. // Biotechnol. Prog. 1998. V. 14. № 4. P. 573–579.
- Franěk F., Hohenwarter O., Katinger H. // Biotechnol. Prog. 2000. V. 16. № 5. P. 688–692.
- Heidemann R., Zhang C., Qi H., Larrick Rule J., Rozales C., Park S., Chuppa S., Ray M., Michaels J., Konstantinov K., Naveh D. // Cytotechnology. 2000. V. 32. № 2. P. 157–167.
- Sung Y.H., Lim S.W., Chung J.Y., Lee G.M. // App. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 63. № 5. P. 527–536.
- Bobik T.V., Popov R.Y., Aliev T.K., Mokrushina Y.A., Shamborant O.G., Khurs E.N., Knorre V.D., Smirnov I.V., Gabibov A.G. // Bull. Exp. Biol. Med. 2019. V. 167. № 3. P. 335–338.
- Mizutani K., Hashimoto K., Takahashi N., Hirose M., Aibara S., Mikami B. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2010. V. 74. № 2. P. 309–315.
- Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
- Gusarova V., Vorobjeva T., Gusarov D., Lasman V., Bayramashvili D. // J. Chromatogr. A. 2007. V. 1176. № 1–2. P. 157–162.
- Gusarov D., Nekipelova V., Gusarova V., Lasman V., Baira-mashvili D. // J. Chromatogr. B. 2009. V. 877. № 11–12. P. 1216–1220.
- Бобик Т.В., Воробьев И.И., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г., Мирошников А.И. // Биоорг. химия. 2008. Т. 34. № 1. С. 56–62
- Wu S., Letchworth G.J. // Biotechniques. 2004. V. 36. № 1. P. 152–154.

**Development of Serum Free Media
Based on the Optimum Combination of Recombinant Proteins
and Non-Animal Derived Hydrolysates to Produce Immunoglobulins**

**D. S. Balabashin^{a,*}, E. N. Kaliberda^a, I. V. Smirnov^a, Y. A. Mokrushina^a,
T. V. Bobik^a, T. K. Aliev^{a,b}, D. A. Dolgikh^{a,c}, and M. P. Kirpichnikov^{a,c}**

^a*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow, 119991 Russia*

^c*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: dbalabashin@mail.ru*

In this work, we investigated the possibility of cultivating the stable cell line with specific product of recombinant immunoglobulins (IgG1) in the IMDM (Iscove's Modified Dulbecco Medium) culture medium with the additional recombinant proteins and non-animal derived protein hydrolysates. To enrich the medium, recombinant insulin, human serum albumin produced by *E. coli* bacteria, and transferrin by *Pichia pastoris* yeast were used. The combination of protein additives that is part of the developed medium allowed to increase the productivity of a stable cell line of recombinant humanized antibodies based on CHO cells by 44% compared to the complex commercial supplement ITS (Insulin-transferrin-selenium) used. The addition of pea and rice protein hydrolysates containing peptides with a molecular mass below 5 kDa into the modified IMDM medium contributed to an increase in the line productivity by 3.9 and 4.5 times, respectively.

Keywords: protein hydrolysates, pea, sunflower, rice, soy, wheat, yeast extract, insulin, transferrin, sodium selenite, HSA, CHO, antibody, DG44

УДК 579.6

АКУСТИЧЕСКАЯ СЕНСОРНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИЙ В ВОДНОЙ СРЕДЕ

© 2020 г. О. И. Гулий^{1,2,*}, Б. Д. Зайцев³, О. А. Каравеева¹,
А. К. М. Алсовэйди⁴, О. С. Ларионова², И. А. Бородина³

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, 410049 Россия

²Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, 410012 Россия

³Институт Радиотехники и Электроники им В.А. Котельникова РАН, Саратовский филиал,
Саратов, 410019 Россия

⁴Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
Саратов, 410005 Россия

*e-mail: guliy_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 10.03.2020 г.

После доработки 13.04.2020 г.

Принята к публикации 22.04.2020 г.

Разработан способ быстрого определения бактерий *Escherichia coli* в водопроводной воде с помощью акустического датчика. Способ основан на регистрации изменений глубины и частоты пиков резонансного поглощения на выходном сигнале датчика до и после инфекции микробных клеток специфичным бактериофагом. Проведены контрольные эксперименты, исключающие неспецифичное взаимодействие микробных клеток с бактериофагами. Предел определения бактерий составил $\sim 10^3$ кл./мл при времени анализа 5 мин. Отличительная особенность используемого датчика – наличие съемной жидкостной ячейки, что обеспечивало возможность ее многократного использования и облегчало процесс очистки ячейки от образца.

Ключевые слова: микробные клетки, бактериофаги, определение и идентификация бактерий, щелевая акустическая мода, акустическая линия задержки, частотная зависимость полных потерь

DOI: 10.31857/S0555109920050074

Одной из важных задач своевременного предотвращения пищевых отравлений и массовых заболеваний является исследование микробного загрязнения воды. В биологическом (эпидемиологическом) отношении безопасностью питьевой воды определяется полным отсутствием в ней болезнетворных бактерий, вирусов, простейших микроорганизмов, яиц гельминтов, вызывающих у человека инфекционные заболевания. Пригодная для питья вода должна соответствовать определенным физическим, химическим и микробиологическим стандартам. К наиболее распространенной относится оценка безопасности воды по косвенным бактериологическим показателям: степень общего бактериального загрязнения или общее микробное число, содержание кишечной палочки (*Escherichia coli*). Общее микробное число представляет собой количество клеток микроорганизмов в 1 мл воды, способных образовывать видимые колонии после посева на плотные питательные среды. По существующим нормам в 1 мл питьевой воды не должно содержаться более 100 микробов (сапрофитных аэробов и факультативных анаэробов).

Это косвенный показатель поступления в систему водоснабжения бактериального загрязнения. Содержание в воде кишечной палочки определяется коли-индексом или коли-титром. Коли-индекс – это количество клеток *E. coli*, содержащихся в 1 л воды. Коли-титр – это наименьший объем воды, в котором удается обнаружить 1 кишечную палочку. Наличие кишечной палочки является показателем фекального загрязнения воды. К наиболее надежным методам определения бактерий в воде относят метод прямого подсчета клеток и метод мембранной фильтрации. Методом прямого подсчета определяют количество микроорганизмов, вырастающих в виде колоний, что соответствует степени загрязнения воды и характеризует ее состояние. Общее количество микробов следует рассматривать как существенный косвенный показатель санитарного состояния воды. Метод мембранной фильтрации основан на фильтрации определенного объема воды через мембранные фильтры, выращивании собранных клеток на дифференциально-диагностической среде с последующей иден-

тификацией колоний по культуральным и биохимическим признакам. При использовании стандартных методов для получения результата о наличии/отсутствии обсемененности воды необходимо не менее 24 ч, поэтому актуально развитие быстрых методов определения микробных клеток.

Использование биосенсорных систем для определения бактерий позволяет решить эту задачу. Следует отметить, что большинство сенсорных устройств не адаптировано к проведению измерений в условиях высокой проводимости среды измерения (выше 20 мкСм/см). Так, в работах [1–4] дана краткая характеристика биосенсорных устройств для определения микробных клеток в воде и отмечается необходимость адаптации биосенсоров для определения бактерий в воде, используемой в промышленности, муниципальных и коммерческих учреждениях, удельная электрическая проводимость которой высокая за счет растворенных в ней ионных соединений. В работе [5] описан способ обнаружения клеток *E. coli* (в течение 8 мин) в питьевой воде с помощью биосенсора на основе флуоресценции химерного белка (**GFP-cols4**). Флуоресценция обеспечивается его субъединицей GFP, которая ковалентно связывается с бактериоцином, специфичным к *E. coli*, при линейном диапазоне определения клеток от 20 до 10^3 колониобразующих единиц (КОЕ). К сожалению, в работе не приводятся данные о проводимости исследуемого образца. В работе [6] описывается микрожидкостное устройство, которое обеспечивало определение микробных клеток непосредственно в физиологических образцах с высокой проводимостью и вязкостью (коровье молоко, кровь). Однако в работе не приводятся сведения о способах очистки устройства от измерительного образца, содержащего бактерии. Среди электрофизических методов анализа бактерий можно выделить акустические методы, применение которых до недавнего времени носило, в основном, описательный характер. Акустические датчики измеряют изменения в характеристиках акустических волн (скорость и затухание) при их распространении в пьезоэлектрическом кристалле, контактирующем с исследуемой средой. В предыдущих работах [7–9] было показано, что в результате инфекции микробных клеток специфичными бактериофагами происходит изменение измеряемых электрофизических параметров суспензии (проводимость, вязкость), которые фиксируются акустическими датчиками на основе резонатора с поперечным электрическим полем и двухканальной линии задержки. При развитии методов определения бактерий важно учитывать возможность проведения анализа в условиях повышенной проводимости среды измерения. Электрическая проводимость увеличивается с повышением содержания примесей (ионов калия, натрия, хлора, карбонатов, фосфатов и органических кислот, а

также белков и других органических соединений). Высокая проводимость среды значительно затрудняет возможность индикации бактерий, поэтому экспресс-анализ микробных клеток в жидкостях с высокой проводимостью является весьма актуальным направлением исследований.

Цель работы – экспресс-анализ бактерий при их инфекции бактериофагами в водопроводной воде с помощью акустического датчика.

МЕТОДИКА

Микробные клетки и условия их культивирования. В работе использовали микроорганизмы *Escherichia coli* XL-1 (IBPPM 632) и *Azospirillum lipoferum* Sp59b (IBPPM 173), полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Россия) (<http://collection.ibppm.ru/>).

Для получения бульонных культур микроорганизмов использовали жидкую питательную среду LB следующего состава (г/л): NaCl – 5; дрожжевой экстракт – 10 и пептон – 5. Культивирование проводили при интенсивном перемешивании на шейкере (160 об./мин) в течение 18 ч при $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Перед проведением измерений осуществляли трехкратную отмывку клеток используемых штаммов от культуральной среды центрифугированием (3354 г, 5 мин). Суспензию клеток доводили буферным раствором до оптической плотности $D_{540} = 0.40\text{--}0.42$ и использовали для анализа. Концентрацию клеток определяли на спектрофотометре “Specol-221” (“Carl Zeiss”, Германия). В работе использовали стандартный 0.1 М ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \cdot \text{KH}_2\text{PO}_4$) фосфатный буфер, pH 7.0, (проводимость 5, 10, 20, 30 и 50 мкСм/см), а также воду с проводимостью 990 мкСм/см. Проводимость растворов контролировали с помощью кондуктометра HI 8733 (“HANNA”, США).

Определение концентрации фаговых частиц. Количество фаговых частиц определяли в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” ИБФРМ РАН на приборе Specord BS-250 (“Analytik Jena”, Германия). Для расчета количества фаговых частиц использовали уравнение: $(A_{269} - A_{320}) \times 5 \times 10^{14}/15$, где A_{320} – оптическая плотность суспензии при 320 нм и A_{269} – при 269 нм [10].

Описание датчика и проведение анализа. Основным элементом датчика для определения микробных клеток являлась линия задержки, изготовленная из пластины Y–X ниобата лития толщиной 200 мкм [11]. На одной из сторон пластины были нанесены встречно-штыревые преобразователи для возбуждения и приема акустической волны с поперечно-горизонтальной поляризацией. На противоположной стороне пластины с некоторым зазором помещался жидкостный кон-

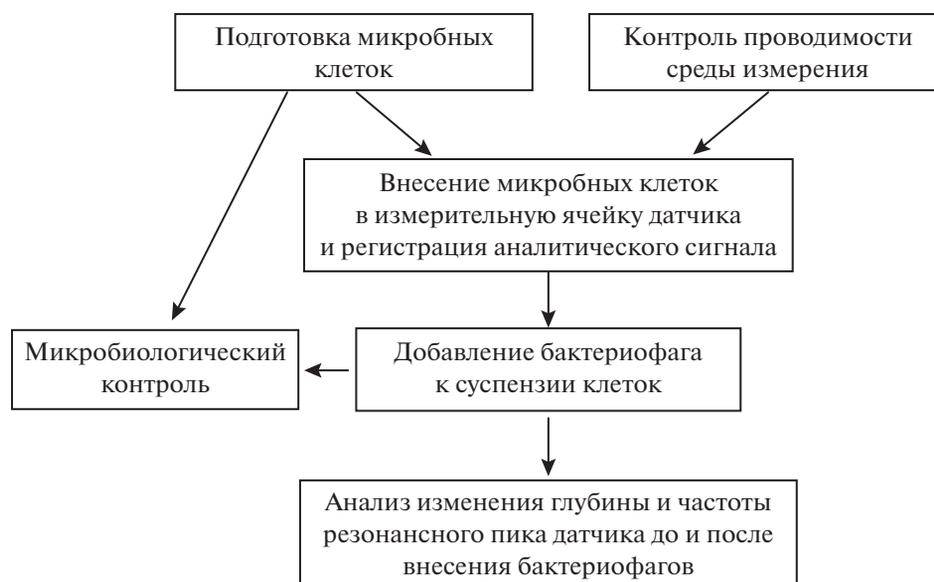


Рис. 1. Общая схема эксперимента.

тейнер, основание которого было выполнено из пластины ниобата лития $Z-X + 30^\circ$, среза толщиной 500 мкм. Зазор между дном контейнера и поверхностью пьезопластины обеспечивался с помощью полосок алюминиевой фольги толщиной 16 мкм. Скорость акустической волны, распространяющейся в такой структуре, изменяется при изменении проводимости жидкости, находящейся в контейнере. Изменение скорости волны приводит к изменению выходных параметров датчика (глубины и частоты пиков резонансного поглощения на частотной зависимости полных потерь акустической линии задержки) [12].

При помощи разработанного датчика экспериментально исследовалось специфическое и неспецифическое взаимодействие бактериальных клеток и бактериофагов непосредственно в жидкой фазе. Для этого датчик подключался к измерителю S-параметров E5071C (“Agilent”, США) в режиме измерения полных потерь выходного сигнала устройства. Первоначально измерялись характеристики датчика с контейнером без внесения жидкости, при этом было показано наличие ярко выраженных резонансных пиков на частотной зависимости полных потерь, связанных с возбуждением щелевой моды в исследуемой структуре [13]. Затем жидкостный контейнер заполнялся буферным раствором с заданной проводимостью (5–50 мкСм/см) или водопроводной водой (проводимость 990 мкСм/см) и измерялись частотные зависимости полных потерь датчика.

Далее жидкостный контейнер очищали, просушивали, добавляли в него суспензию микробных клеток в буфере и измеряли параметры датчика. Измерения проводились для концентрации клеток 10^6 , 10^4 и 10^3 кл./мл. Затем в контейнер до-

бавляли специфичный к клеткам бактериофаг и вновь проводили измерение частотной зависимости полных потерь датчика. Во всех измерениях использовали одинаковое количество бактериофага, выбранное на основании ранее проведенных экспериментов [7]. Аналитическим сигналом служило изменение глубины и частоты резонансных пиков при специфичном и неспецифичном взаимодействии бактериальных клеток с бактериофагом. Схема экспериментов представлена на рис. 1.

Все эксперименты проводились не менее пяти раз. Относительная погрешность результатов измерений составляла $\pm 2\%$, т.е. при проведении нескольких экспериментов с одним и тем же взаимодействием суспензии клеток с бактериофагом значение глубины резонансных пиков на частотной зависимости полных потерь имели разброс значений на любой частоте в пределах $\pm 2\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно принятым стандартам для оценки микробиологического качества воды проводят мониторинг бактерий группы кишечной палочки, поэтому для исследований использовали клетки представителя группы кишечной палочки *E. coli*. В качестве тестовой системы использовали клетки *E. coli* штамма XL-1 и специфичный им бактериофаг M13K07. Выбор такой модельной системы обусловлен тем, что бактериофаг M13K07 и процесс инфицирования клеток штамма XL-1 хорошо описан [14, 15]. Проведенные ранее исследования показали возможность регистрации инфекции клеток данным бактериофагом с помощью электроакустического датчика [7, 8].

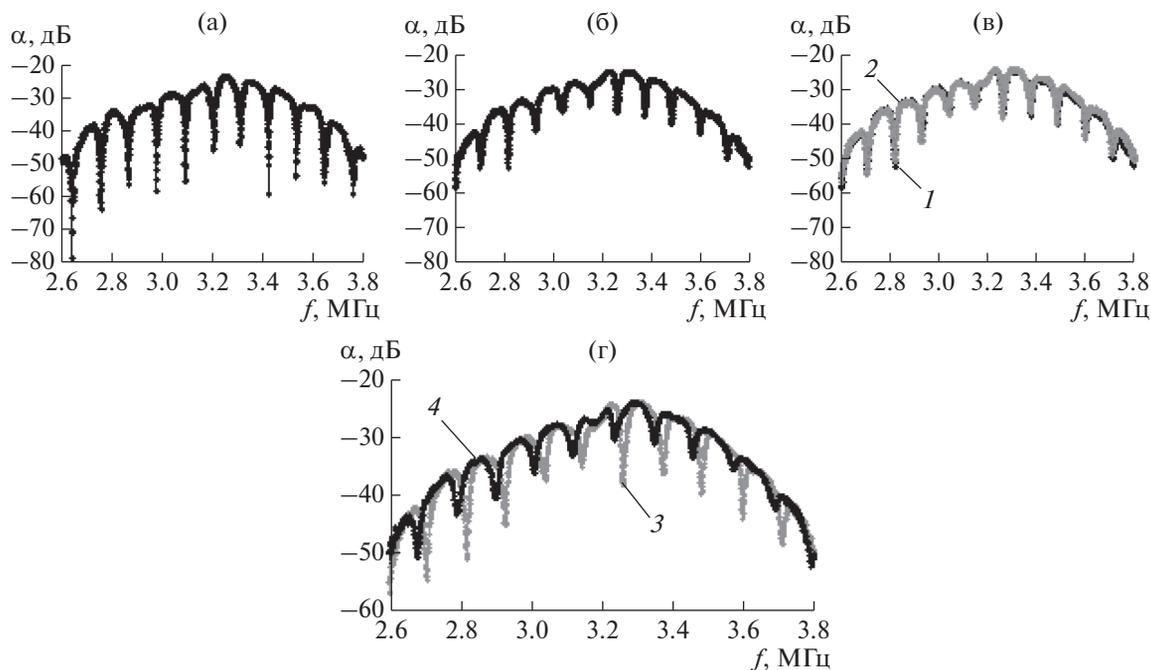


Рис. 2. Частотные зависимости полных потерь (α) датчика: пустой контейнер (а), контейнер с буферным раствором с проводимостью 50 мкСм/см (б), контейнер с буферным раствором до (1) и после (2) добавления микробных клеток *E. coli* XL-1 (в), контейнер с буферным раствором и микробными клетками до (3) и после (4) добавления специфичного бактериофага (г).

Измерения проводили с помощью акустического датчика на основе щелевой моды в линии задержки с поперечно-горизонтальной волной нулевого порядка. Как уже отмечалось, при измерении характеристик датчика с пустым контейнером были обнаружены ярко выраженные пики резонансного поглощения на частотной зависимости полных потерь (α) датчика (рис. 2а). Появление этих пиков связано с распространением и пере-отражением щелевой акустической волны в структуре из двух пьезоэлектрических пластин, разделенных воздушным зазором [11–13]. Добавление буферного раствора (с проводимостью 5–50 мкСм/см) в контейнер приводило к значительному уменьшению глубины резонансных пиков. Это свидетельствовало о том, что данное устройство чувствительно к присутствию жидкости. На рис. 2б в качестве примера представлены частотные зависимости полных потерь (α) датчика при добавлении в контейнер буферного раствора с проводимостью 50 мкСм/см. Дальнейшее добавление к нему микробных клеток практически не влияло на характеристики датчика. В процессе исследований концентрация микробных клеток составляла 10^6 , 10^4 и 10^3 кл./мл. На рис. 2в в качестве примера приведены частотные зависимости полных потерь датчика при добавлении клеток *E. coli* (10^6 кл./мл) (кривая 2) к буферному раствору с проводимостью 50 мкСм/см (кривая 1).

При последующем добавлении в контейнер бактериофага, специфичного для клеток *E. coli* XL-1, наблюдалось значительное уменьшение глубины резонансных пиков и сдвиг их частоты по сравнению с контейнером, загруженным только буфером с клетками. На рис. 2г в качестве примера представлены частотные зависимости полных потерь датчика, в случае заполнения контейнера буферным раствором проводимостью 50 мкСм/см с клетками *E. coli* XL-1 (концентрация – 10^6 кл./мл) до (кривая 3) и после (кривая 4) добавления специфичного бактериофага M13K07.

Полученные результаты свидетельствовали о чувствительности используемого датчика к регистрации инфекции микробных клеток специфичным бактериофагом. Причина регистрируемых изменений заключалась в следующем. При добавлении к суспензии клеток специфичного им бактериофага ее электрическая проводимость возрастала вследствие адсорбции фага на поверхности бактерий и повреждения клеточной мембраны. Нарушение целостности бактериальных мембран сопровождалось частичным выходом в суспензию компонентов клеточной цитоплазмы, что приводило к увеличению электрической проводимости суспензии. Это вызывало изменение скорости акустической волны в датчике, состоящем из двух разделенных зазором пьезоэлектрических пластин ниобата лития, одна из которых

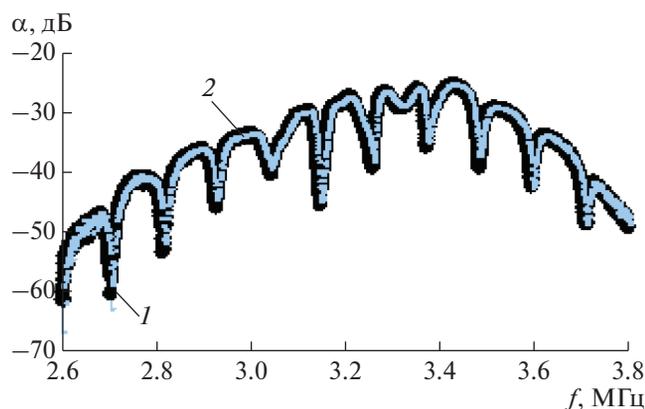


Рис. 3. Частотные зависимости полных потерь (α) датчика с контейнером, залитым буферным раствором с проводимостью 50 мкСм/см и клетками *A. lipoferum* Sp59b до (1) и после (2) добавления неспецифического бактериофага M13K07.

контактирует с исследуемой суспензией. Изменение скорости волны приводило к изменению выходных параметров датчика (глубина и частота пиков резонансного поглощения на частотной зависимости полных потерь датчика).

Для контроля полученных результатов проводили эксперименты, в которых применяли микробные клетки других штаммов и бактериофаг M13K07. В качестве балластных культур использовали клетки *A. lipoferum* Sp59b. Выбор клеток *A. lipoferum* обусловлен тем, что они имели близкие размеры с клетками кишечной палочки, но отличались таксономическим положением. Измерения проводились для тех же буферных растворов, что и в случае специфического взаимодействия (5–50 мкСм/см) при количестве клеток в контейнере 10^6 , 10^4 и 10^3 кл./мл. Полученные результаты показали (рис. 3), что добавление к суспензии клеток *A. lipoferum* Sp59b бактериофага M13K07 не приводило к изменениям глубины и частоты резонансных пиков на частотной зависимости полных потерь датчика при любой проводимости буфера. Максимальное изменение глубины пика вблизи частоты 2.8 МГц составило всего – 0.5 дБ для буферного раствора проводимостью 50 мкСм/см.

Таким образом, датчик позволял разграничивать инфицирование бактериальных клеток специфическими бактериофагами, от контрольных экспериментов, когда такое инфицирование не происходило.

Одним из основных вопросов при разработке датчиков для определения микробных клеток является проведение исследований в реальных (или приближенных к реальным условиям) образцах. Анализ микробных клеток в воде, используемой в промышленности, муниципальных и коммерческих учреждениях и больницах, представляет су-

щественную проблему, поскольку удельная электрическая проводимость воды в этих случаях очень высока за счет растворенных в ней ионных соединений. Для оценки чувствительности датчика при работе с реальными образцами жидкости были проведены исследования специфического взаимодействия микробных клеток *E. coli* XL-1 с фагом M13K07 и неспецифического взаимодействия микробных *A. brasilense* Sp7 с этим же фагом в водопроводной воде с проводимостью 990 мкСм/см. Методика проведения данного цикла экспериментов была аналогична описанной ранее. На рис. 4 (а, в) представлены частотные зависимости полных потерь датчика с контейнером, наполненным водопроводной водой с проводимостью 990 мкСм/см и клетками *E. coli* XL-1 при их специфическом взаимодействии с бактериофагом M13K07. На рис. 4 (б, г) представлены эти же частотные зависимости при неспецифическом взаимодействии клеток *A. brasilense* Sp 7 и бактериофага M13K07. Использовались суспензии клеток с концентрацией клеток 10^3 кл./мл (рис. 4а, 4б) и 10^6 кл./мл (рис. 4в, 4г). Кривые 1 соответствуют водной суспензии клеток без бактериофагов, кривые 2 – водной суспензии клеток с добавлением бактериофагов. Видно, что даже при такой высокой проводимости воды в случае специфического взаимодействия микробных клеток с бактериофагом наблюдается изменение глубины и частоты резонансных пиков на частотной зависимости полных потерь датчика. Максимальное изменение глубины резонансного пика на частоте 2.8 МГц составляло 2.9 дБ.

Очевидно, что регистрируемое изменение аналитического сигнала суспензии клеток при их инфицировании бактериофагом связано с наличием жизнеспособных бактерий. В табл. 1 в качестве примера представлены данные высева на среды *E. coli* XL-1 (начальная концентрация клеток 10^3 кл./мл) после воздействия используемого раствора различной проводимости и результаты изменения глубины резонансного пика вблизи частоты 2.8 МГц после специфического взаимодействия клеток и бактериофага M13K07. Аналогичные результаты получены для всех резонансных пиков и используемых концентраций клеток. Установлено, что проводимость среды не оказывала влияния на жизнеспособность бактерий.

Устойчивость микробных клеток к воздействию высокой проводимости среды может быть обусловлена тем, что бактерии выделяют внутренние ионы, а также различные метаболиты [16]. Клетки в условиях повышенной проводимости среды активируют открытие механико-чувствительных каналов для восстановления естественного тургора и проводят выброс осмолитов без лизиса клеток [17]. Таким образом, в этих условиях клетки остаются жизнеспособными. Однако

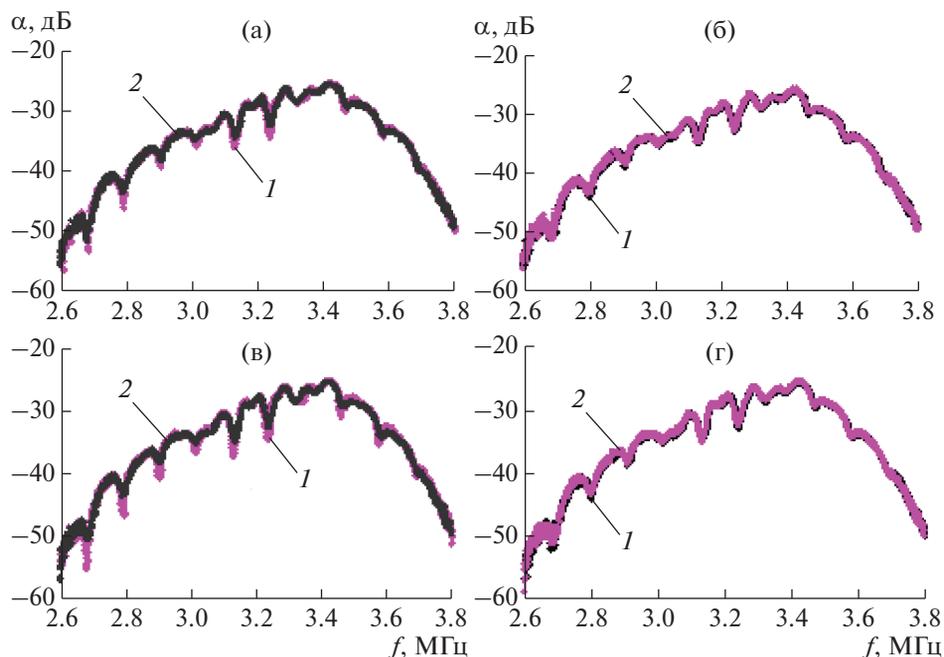


Рис. 4. Частотные зависимости полных потерь (α) датчика с контейнером, наполненным водопроводной водой проводимостью 990 мкСм/см при специфичном взаимодействии *E. coli* XL-1 и бактериофага M13K07 (а, в) и при неспецифичном взаимодействии *A. brasilense* Sp 7 и бактериофага M13K07 (б, г). Концентрация клеток – 10^3 (а, б) и 10^6 (в, г) кл./мл. 1 – вода с клетками без бактериофага, 2 – вода с клетками после добавления бактериофага.

на практике исследуемый образец может содержать смесь живых и мертвых клеток и способность различать такие клетки имеет решающее значение для практического применения. Это становится возможным при использовании бактериофагов в качестве селективного агента. При добавлении в исследуемую суспензию клеток специфичных бактериофагов можно не только определить микробные клетки, но и сделать вывод об их жизнеспособности, поскольку бактериофаги не инфицируют нежизнеспособные клетки.

Разработанный датчик на основе щелевой моды, представляет собой новую сенсорную платформу для быстрой регистрации взаимодействия микробных клеток с бактериофагами с целью обнаружения бактерий в воде. Как уже отмечалось, датчик основан на создании щелевой моды между двумя пьезоэлектрическими пластинами ниобата лития с зазором между ними. Верхняя пластина служит дном жидкостного контейнера, который заполнялся исследуемой суспензией клеток. После добавления специфичного бактериофага проводимость суспензии увеличивалась и, соответственно, изменялась скорость акустической волны, распространяющейся в такой структуре. Изменение скорости волны приводило к изменению выходных параметров датчика. По изменениям в выходных параметрах датчика для суспензии клеток до и после биологического взаимодействия можно было сделать заключение о наличии (или

отсутствии) исследуемых бактерий в анализируемой суспензии. Несомненное достоинство описанной методики заключается в возможности проведения анализа жидкости без дополнительной иммобилизации компонентов сенсорной системы. Конструкция датчика, имеющего зазор между пластинами, позволяет снимать жидкостный контейнер и проводить его очистку от исследуемого образца, что являлось важным условием при работе с микроорганизмами. Наличие съемной жидкостной ячейки позволяло использовать ее многократно.

Таблица 1. Результаты микробиологического анализа клеток *E. coli* XL-1 (начальная концентрация клеток 10^3 кл./мл) после воздействия раствора различной проводимости и изменение глубины резонансного пика вблизи частоты 2.8 МГц вследствие специфичного взаимодействия клеток с бактериофагом M13K07

Проводимость буфера, мкСм/см	КОЕ/мл	Изменение глубины резонансного пика датчика, дБ
5	1.8×10^3	-8.9
10	2.2×10^3	-5.4
20	2.1×10^3	-5.8
30	1.7×10^3	-5.1
50	1.4×10^3	-4.9
990	1.5×10^3	-2.9

Таким образом, проведенные эксперименты показали возможность определения бактериальных клеток в воде с высоким значением проводимости (вплоть до 990 мкСм/см) путем регистрации специфического взаимодействия бактериальной клетки с бактериофагом с помощью датчика на основе щелевой моды в акустической линии задержки с поперечно-горизонтальной волной нулевого порядка. Установлен предел детекции клеток, который оказался равным 10^3 кл./мл при времени анализа 5 мин. Предварительный санитарный анализ воды с помощью биосенсорных устройств является необходимым дополнением к используемым микробиологическим исследованиям. Разработанный метод позволяет проводить скрининг большого количества образцов воды в краткие сроки, выявлять источники микробиологической опасности и оценивать риски заболевания. Полученные результаты могут служить основой для создания соответствующей сенсорной системы определения бактерий в воде.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ (проекты №№ 19-07-00300 и 19-07-00304).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen S., Cheng Y.F. // Int. J. Biosen. Bioelectron. 2017. V. 2. № 6. P. 197–199.
2. Ejeiana F., Etedalia P., Mansouri-Tehrani H.-A., Soozanipoura A., Low Ze-Xian, Mohsen A., Asghar T.-K., Razmjou A. // Biosens. Bioelectron. 2018. V. 118. № 1. P. 66–79.
3. Tan L. and Schirmer K. // Curre. Opin. Biotechnol. 2017. V. 45. № 1. P. 59–68.
4. Raich J. Review of Sensors to Monitor Water Quality. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2013. 33 p. <https://doi.org/10.2788/35499>
5. Gutiérrez-del-Río I., Marín L., Fernández J., Álvarez San Millán M., Ferrero F.J., Valledor M., Campo J.C., Cobián N., Méndez I., Lombó F. // PLoS One. 2018. V. 13. № 1. e0184277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184277>
6. Cai D., Yi Q., Shen C., Lan Y., Urban G., Du W. // Bio-microfluidics. 2018. V. 12. № 1. 014109. <https://doi.org/10.1063/1.5016413>
7. Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Кузнецова И.Е., Шихабудинов А.М., Дыкман Л.А., Староверов С.А., Каравалева О.А., Павлий С.А., Игнатов О.В. // Биофизика. 2015. Т. 60. № 4. С. 722–728.
8. Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Бородина И.А., Шихабудинов А.М., Теплых А.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 4. С. 413–419.
9. Borodina I.A., Zaitsev B.D., Guliy O., Teplykh A.A., Shikhabudinov A.M. // Ultrasonics. 2017. V. 81. P. 174–177.
10. Smith G.P., Scott J.K. // Methods in Enzymol. 1993. V. 217. P. 228–257.
11. Borodina I.A., Zaitsev B.D., Burygin G.L., Guliy O.I. // Sensors and Actuators B. 2018. V. 268. P. 217–222.
12. Borodina I.A., Zaitsev B.D., Teplykh A.A. // Ultrasonics. 2018. V. 82. P. 39–43.
13. Borodina I.A., Zaitsev B.D., Kuznetsova I.E., Teplykh A.A. // IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control. 2013. V. 60. P. 2677–2681.
14. Endemann H., Model P. // J. Mol. Biol. 1995. V. 250. № 4. P. 496–506.
15. Deng L.W., Malik P., Perham R.N. // Virology. 1999. V. 253. № 2. P. 271–277.
16. Berrier C., Coulombe A., Szabo I., Zoratti M., Ghazi A. // Eur. J. Biochem. 1992. V. 206. № 2. P. 559–565.
17. Ebrahimi A., Alam M.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 26. P. 7059–7064. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606097113>

Acoustic Sensor System for Determining Bacteria in Aquatic Environment

O. I. Guliy^{a, b, *}, B. D. Zaitsev^c, O. A. Karavaeva^a,
A. K. M. Alsowaidi^d, O. S. Larionova^b, and I. A. Borodina^c

^aInstitute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia

^bSaratov State Agrarian University, Saratov, 410012 Russia

^cKotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, Saratov Branch, Saratov, 410019 Russia

^dChernyshevsky National Research State University, Saratov, 410005 Russia

*e-mail: guliy_olga@mail.ru

A method for the rapid determination of bacteria using as example *E. coli* cells in tap water by using a slot-mode sensor in the acoustic delay line has been developed. The method is based on recording the changes in the depth and frequency of resonance absorption peaks on the frequency dependence of the insertion loss of the sensor before and after the infection of microbial cells with specific bacteriophages. The control experiments excluding non-specific interaction of microbial cells with bacteriophages were carried out. The detection limit of bacteria turned out to be $\sim 10^3$ cells/mL with an analysis time of 5 min. A distinctive feature of the used sensor is the presence of a removable liquid container, which allows to reuse it and facilitates the process of cleaning the container from the sample.

Keywords: microbial cells, bacteriophages, detection and identification of cells, slot acoustic mode, acoustic delay line, frequency dependence of insertion loss