

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 5, 2021

Неферментативные реакции в метаболизме: роль в эволюции и адаптации

О. В. Космачевская, А. Ф. Топунов 417

Пептаиболы как потенциальные антифунгальные и противоопухолевые антибиотики: современные исследования и перспективы (обзор)

И. А. Гаврюшина, М. Л. Георгиева, А. Е. Куварина, В. С. Садыкова 432

Фотоокисление тетрагидробиоптерина – ключевой процесс фототерапии витилиго

Т. А. Телегина, Ю. Л. Вечтомова, М. С. Крицкий, Э. И. Мадиров,  
А. С. Низамутдинов, Ю. Н. Обухов, А. А. Буглак 441

Получение и свойства рекомбинантного протеолитически активного гомолога сериновой пептидазы SerPH122 *Tenebrio molitor*

В. Ф. Терещенкова, Н. И. Жиганов, Ф. И. Акентьев, И. И. Губайдуллин,  
Д. Г. Козлов, Н. В. Беляева, И. Ю. Филиппова, Е. Н. Элидина 450

Образование и свойства внеклеточной протеиназы микромицета *Aspergillus flavus* O-1, активной по отношению к фибриллярным белкам

А. А. Галиакберова, Д. М. Бедненко, В. Г. Крейер, А. А. Осмоловский, Н. С. Егоров 458

Сравнительная активность новых рекомбинантных L-аспарагиназ экстремофилов

М. В. Думина, А. А. Жгун, М. В. Покровская, С. С. Александрова,  
Д. Д. Жданов, Н. Н. Соколов, М. А. Эльдаров 467

Ферментативная деструкция целлюлозы: особенности кинетического взаимодействия литических полисахаридмонооксигеназ и индивидуальных целлюлаз

М. В. Семёнова, А. В. Гусаков, В. Д. Телицин, А. П. Синицын 477

Эффективность деполимеризации хитозана микробными хитиназами и хитозаназами с точки зрения антимикробной активности образуемых хитоолигомеров

В. Р. Сафина, А. И. Мелентьев, Н. Ф. Галимзянова, Е. А. Гильванова,  
Л. Ю. Кузьмина, С. А. Лопатин, В. П. Варламов, Андр. Х. Баймиев, Г. Э. Актуганов 485

Выделение и идентификация липопептидов штамма *Bacillus subtilis* 26Д

Е. А. Черепанова, И. В. Галяутдинов, Г. Ф. Бурханова, И. В. Максимов 496

Новые ассоциации аэробных бактерий, активно разлагающие линдан

Э. А. Назарова, Д. О. Егорова, Л. Н. Ананьина,  
Е. С. Корсакова, Е. Г. Плотникова 504

Михаил Анатольевич Эльдаров 14.02.1956–8.12.2020

519

# CONTENTS

---

Vol. 57, No. 5, 2021

---

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Non-Enzymatic Reactions in Metabolism: The Role in Evolution and Adaptation<br><i>O. V. Kosmachevskaya, and A. F. Topunov</i>                                                                                                                                                                                                       | 417 |
| Peptaibols as Potential Antifungal and Anticancer Antibiotics:<br>Current and Foreseeable Development (Review)<br><i>I. A. Gavryushina, M. L. Georgieva, A. E. Kuvarina, and V. S. Sadykova</i>                                                                                                                                     | 432 |
| Photooxidation of Tetrahydrobiopterin is a Key Process<br>in Vitiligo Phototherapy<br><i>T. A. Telegina, Yu. L. Vechtomova, M. S. Kritsky, E. I. Madirov,<br/>A. S. Nizamutdinov, Y. N. Obuhov, and A. A. Buglak</i>                                                                                                                | 441 |
| Preparation and Properties of the Recombinant <i>Tenebrio molitor</i> SerPH122 –<br>Proteolytically Active Homolog of Serine Peptidase<br><i>V. F. Tereshchenkova, N. I. Zhiganov, P. I. Akentyev, I. I. Gubaidullin,<br/>D. G. Kozlov, N. V. Belyaeva, I. Yu. Filippova, and E. N. Elpidina</i>                                    | 450 |
| Formation And Properties of Extracellular Proteinase<br>of Micromycete <i>Aspergillus flavus</i> O-1, Active Toward Fibrillary Proteins<br><i>A. A. Galiakberova, D. M. Bednenko, V. G. Kreyer,<br/>A. A. Osmolovskiy, and N. S. Egorov</i>                                                                                         | 458 |
| Comparison of Enzymatic Activity of Novel Recombinant<br>L-Asparaginases of Extremophiles<br><i>M. V. Dumina, A. A. Zhgun, M. V. Pokrovskaya, S. S. Aleksandrova,<br/>D. D. Zhdanov, N. N. Sokolov, and M. A. El'darov</i>                                                                                                          | 467 |
| Enzymatic Destruction of Cellulose: Peculiarities of the Kinetic Interaction<br>of Lytic Polysaccharide Monooxygenases and Individual Cellulases<br><i>M. V. Semenova, A. V. Gusakov, V. D. Telitsin, and A. P. Sinitsyn</i>                                                                                                        | 477 |
| Chitosan Depolymerization Efficiency by Microbial Chitinases and Chitosanases<br>in Viewpoint of Antimicrobial Effect Displayed by Generated Chitoooligomers<br><i>V. R. Safina, A. I. Melentiev, N. F. Galimzianova, E. A. Gilvanova, L. Yu. Kuzmina,<br/>S. A. Lopatin, V. P. Varlamov, Andr. H. Baymiev, and G. E. Aktuganov</i> | 485 |
| Isolation and Identification of Lipopeptides of <i>Bacillus subtilis</i> 26D<br><i>E. A. Cherepanova, I. V. Galyautdinov, G. F. Burkhanova, and I. V. Maksimov</i>                                                                                                                                                                  | 496 |
| New Associations of Aerobic Bacteria Actively Decomposing Lindane<br><i>E. A. Nazarova, D. O. Egorova, L. N. Anan'ina,<br/>E. S. Korsakova, and E. G. Plotnikova</i>                                                                                                                                                                | 504 |
| In Memory of Mikhail Anatolyevich El'darov (14.02.1956–08.12.2020)                                                                                                                                                                                                                                                                  | 519 |

---

УДК 577.121.9

## НЕФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ В МЕТАБОЛИЗМЕ: РОЛЬ В ЭВОЛЮЦИИ И АДАПТАЦИИ

© 2021 г. О. В. Космачевская<sup>1</sup>, А. Ф. Топунов<sup>1</sup>, \*

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

\*e-mail: aftopunov@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.04.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 22.04.2021 г.

Метаболизм может быть представлен как сеть ферментативных и неферментативных (спонтанных) биохимических процессов. Одной из важнейших частей неферментативного метаболизма являются реакции, включающие образование и окислительно-восстановительные превращения высоко реакционноспособных соединений: активных форм кислорода, азота, серы, галогенов и активных карбонильных соединений. Все эти активные формы объединяет одно общее свойство – спонтанное взаимодействие с аминокислотными остатками белков. Активные формы (или активные метаболиты) долгое время изучали с позиций их способности оказывать токсическое действие на клетки. Позже направление исследований сместилось в сторону изучения их сигнальных и регуляторных свойств. Стало понятно, что эти реакционноспособные соединения в низких концентрациях необходимы живым системам. Они могут регулировать рост и развитие организма. С одной стороны, они обеспечивают устойчивость биологических макромолекул и живых систем, с другой, способствуют фенотипической изменчивости через демаскирование скрытой вариабельности. В обзоре обсуждается роль этих соединений как регуляторов метаболической пластичности и эволюционности.

**Ключевые слова:** метаболизм, неферментативные реакции, реакционно-активные соединения, эволюция, адаптация

**DOI:** 10.31857/S055510992105010X

Формирование представления о метаболизме происходило на протяжении длительного времени и по мере развития биологического знания обогащалось новыми реакциями и процессами. При этом в классическом учебнике “Биохимия” Ленинджера [1], изданном в 1970 г., не было раздела, посвященного биохимии высоко реакционноспособных соединений (редокс-активных веществ). Нет такого раздела и в последующих изданиях, а также в других известных учебниках по биохимии. Дело в том, что редокс-активные вещества не причисляют к биомолекулам. Считалось, что, если они и образуются в живых организмах, то, как правило, случайно. Это мнение господствовало до тех пор, пока не накопилось достаточно доказательств их необходимости для нормальной жизнедеятельности клетки и организма [2].

Редокс-активными метаболитами чаще всего называют активные формы кислорода, азота, серы и галогенов. У этих разных по химическому строению веществ есть ряд общих свойств, благодаря которым их можно отнести к одной группе

реакционноспособных биологических соединений или просто активных соединений. Во-первых, многие из этих веществ являются “побочными” продуктами метаболизма. Во-вторых, их реакционная активность зависит от окислительно-восстановительных условий в клетке. В-третьих, они спонтанно (не контролируемо энзиматически) вступают в реакции с биомолекулами – белками, углеводами, липидами, нуклеиновыми кислотами, образуя широкий спектр модифицированных веществ с измененными структурными и функциональными свойствами. В-четвертых, эти вещества в зависимости от концентрации оказывают разнонаправленное действие на биологические системы.

В живых организмах активные метаболиты образуются либо целенаправленно при участии ферментов, либо спонтанно в неферментативных реакциях (табл. 1). Превышение этими веществами базального уровня приводит к развитию определенного типа метаболического стресса: окислительного (или оксидативного), вызванного действием активных форм кислорода (АФК),

**Таблица 1.** Ферментативные и неферментативные пути образования редокс-активных метаболитов в клетке

| ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ<br>МЕХАНИЗМЫ                                                                                                                                                                                             | Активные<br>метаболиты | НЕФЕРМЕНТАТИВНЫЕ<br>МЕХАНИЗМЫ                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Электрон-транспортная цепь<br>2. Оксидоредуктазы<br>3. НАДФН-оксидаза<br>4. Липоксигеназа<br>5. Циклооксигеназа<br>6. Ксантиноксидаза<br>7. NO-синтазы в состоянии разобщения<br>8. Цитохром P-450 монооксигеназа    | $O_2^{\cdot -}$        | 1. Автоокисление флавина, хинола, железа, катехоламинов<br>2. Реакция кислорода со свободными радикалами семихинона<br>3. Ионизирующая радиация                                             |
| 1. Электрон-транспортная цепь<br>2. Супероксиддисмутаза<br>3. НАДН-убихинонредуктаза<br>4. Убихинол-цитохром c редуктаза<br>5. Оксидазы аминокислот<br>6. Цитохром P450<br>7. Восстановление $ONOO^-$ цитохромоксидазой | $H_2O_2$               | 1. Спонтанная дисмутация $O_2^{\cdot -}$<br>2. Реакции гидроперекисного радикала с убихинолом<br>3. Взаимодействие $ONOO^-$ с GSH                                                           |
| Реакция пероксида водорода с ионами хлора, катализируемая миелопероксидазами, пероксидазой эозинофилов, лактопероксидазой, тиродипероксидазой                                                                           | $HOCl$                 |                                                                                                                                                                                             |
| 1. NO-синтаза<br>2. Нитритредуктазная реакция, катализируемая гемопротеидами<br>3. Одноэлектронное восстановление $ONOO^-$ цитохромоксидазой                                                                            | NO                     | 1. Восстановление нитритов эндогенными восстановителями в условиях ацидоза<br>2. Восстановление нитро- и нитрозо- органических соединений<br>3. Восстановление азотистой кислоты (растения) |
|                                                                                                                                                                                                                         | $ONOO^-$               | 1. Реакция NO с супероксидным-анион радикалом<br>2. Реакция $NO^-$ с молекулярным кислородом                                                                                                |
|                                                                                                                                                                                                                         | 4-HNE*                 | Переокисное окисление ненасыщенных жирных кислот, фосфолипидов, гликолипидов и холестерина активными формами кислорода                                                                      |
| 1. Метилглиоксаль-синтаза (прокариоты)<br>2. Псевдометилглиоксальсинтазная реакция, катализируемая цитохромом P450, миелопероксидазами, аминоксидазой                                                                   | MG**                   | 1. Спонтанный гидролиз фосфатной группы от дигидроксиацетонфосфата<br>2. Окислительная фрагментация глюкозы<br>3. Переокисное окисление липидов<br>4. Окисление ацетона                     |

\* 4-HNE — 4-гидрокси-2-ноненаль, \*\* MG — метилглиоксаль.

нитрозативного — действием активных форм азота (АФА), карбонильного — действием активных карбонильных соединений (АКС), галогенирующего — действием активных соединений галогенов. Все эти стрессы являются разнородными редокс-стресса [3], который также включает редуктивный и электрофильный стресс. Известно, что АФК и АФА играют в метаболизме клетки двойную роль: в низких концентрациях они выступают в роли сигнальных молекул, а в высоких концентрациях оказывают повреждающее действие на биомолекулы [2, 4–8]. Двойственным действием

обладают и активные карбонильные соединения (метилглиоксаль, глиоксаль, малоновый диальдегид, кротоновый альдегид, акролеин, 4-гидрокси-2-ноненаль, 4-гидрокси-2-гексаналь) [9–12]. Еще Сент-Дьердь в 1970 гг. показал, что усиленная утилизация активных карбонильных соединений приводит к прекращению роста клеток, точно так же, как и нарушения в системе детоксикации АКС [13].

К настоящему времени накоплено достаточно фактов, показывающих, что как недостаток реакционно-активных соединений, так и их избыток



негативно сказывается на состоянии клетки. Метаболизм клетки как бы запрограммирован на определенный баланс окислителей и восстановителей, акцепторов и доноров. Смещение этого баланса в сторону окислителей или акцепторов приводит к возникновению окислительного или электрофильного стресса. Напротив, смещение баланса в сторону восстановителей или доноров приводит к возникновению редуکتивного стресса.

## ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О НЕФЕРМЕНТАТИВНОМ МЕТАБОЛИЗМЕ

Понятие “метаболизм” является одним из фундаментальных понятий биохимии и физиологии. В современном понимании метаболизм рассматривается как сложная система с большим количеством веществ и взаимосвязей между ними. За последние 20 лет в нее вошли и реакции, не вполне укладывающиеся в традиционное понимание метаболизма, хотя бы потому, что они не высоко интегрированы и не всегда целенаправлены. Эти реакции образуют так называемый альтернативный метаболизм, для обозначения которого в литературе можно встретить следующие термины: “параметаболлизм”, “скрытый метаболизм”, “неканонический метаболизм”, “паралогический метаболизм”.

Первым, кто обратил внимание на присутствие в метаболизме неферментативных реакций и указал на их значение для живых систем, был Бартош [14]. Затем Голубевым были описаны основные спонтанно протекающие реакции и приведен перечень продуктов неферментативных взаимодействий [15]. Даже самим названием своей статьи “Изнанка метаболизма” он пытался показать, что понятие “метаболизм” шире традиционных представлений и включает реакции, не подчиняющиеся “молекулярной логике живого”. Для обозначения этой оборотной стороны метаболизма и были введены термины “параметаболлизм” и “параметаболиты”.

Параметаболиты — это побочные продукты канонических метаболических путей и продукты неканонических метаболических путей. Список веществ, которые можно отнести к группе параметаболитов, достаточно обширен и включает вышеупомянутые АФК и АФА, реакционноспособные соединения серы и галогенов [12, 15, 16]. Отдельную группу реакционно-активных параметаболитов образуют продукты окисления глюкозы и липидов — АКС, вступающие в реакции неферментативного гликирования [9–12]. Описано около 500 неферментативных реакций, обнаруженных в биологических системах [17], большинство из которых наблюдаются крайне редко, поскольку в них участвуют малораспространенные соединения. Среди неферментативных реакций наиболее широко представлены реакции с

участием свободных радикалов и реакции неферментативного гликирования.

В 1998 г. в биологическую науку было введено понятие о “скрытом метаболизме” (underground metabolism) [18]. Скрытый метаболизм включает реакции, которые катализируются нативными ферментами, в случае использования ими эндогенных метаболитов в качестве альтернативных субстратов. В 2015 г. Келлер с соавторами предложил использовать понятие “неканонического метаболизма”, объединяющего неферментативные реакции и побочные ферментативные [19, 20].

Появление реакционноспособных “случайных” метаболитов обусловлено несколькими причинами: 1) избыточной химической активностью метаболитов и 2) низкой избирательностью ферментов — появлением субстратной и/или каталитической мультиспецифичности, 3) реорганизацией метаболического потока.

Келлер предложил разделить неферментативные реакции, протекающие в клетке, на низкоспецифичные, действующие широкий диапазон субстратов, специфичные и реакции, протекающие одновременно с ферментативными и неферментативными путями [19]. В табл. 2 приведены примеры таких реакций.

В живых системах предусмотрены различные пути управления ферментативными и неферментативными реакциями. Регуляция ферментативных реакций (скорость и направленность) происходит за счет изменения конформации молекулы фермента, в то время как регуляция неферментативных реакций осуществляется за счет изменения физико-химических параметров среды, а также на уровне генерации и/или детоксикации активных форм (табл. 3). Между этими двумя путями нет четкой границы. С одной стороны, участвующие в неферментативных реакциях активные формы, осуществляя посттрансляционную модификацию белков и регуляторных РНК, изменяют их конформацию и тем самым влияют на ферментативный метаболизм [21]. С другой стороны, функционирование антиоксидантных и антигликирующих ферментов определяет стационарные концентрации активных форм.

## РОЛЬ НЕФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭВОЛЮЦИИ

Несмотря на то, что многие активные метаболиты играют значительную роль в развитии различных патологий, все чаще отмечается целесообразность их присутствия в клетке. Основные функции неферментативных реакций и процессов в клеточном метаболизме перечислены в табл. 4.

Появление активных метаболитов приобретает особое значение в условиях стресса, когда они выступают в роли медиаторов фенотипической и

**Таблица 2.** Примеры реакций в современном метаболизме, осуществляющиеся неферментативным способом

| Неферментативные реакции                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                   | Реакции, имеющие ферментативный путь                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Низкоспецифичные реакции                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Специфичные реакции                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Нитрозилирование, нитрование биомолекул и образование нитрозаминов в реакции с АФА</li> <li>■ Образование оснований Шиффа и аддуктов Михаэля в реакции электрофильных соединений с лизином, аргинином, гистидином и цистеином полипептидов</li> <li>■ Образование дисульфидной связи между остатками цистеина в полипептидах</li> <li>■ Карбоксилирование остатков лизина в белках</li> <li>■ Деамидирование остатков аспарагина и глутамина в полипептидах</li> <li>■ Образование нейротоксинов в реакции Пикте-Шпенглера (взаимодействие биогенных аминов с карбонилсодержащими соединениями)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Синтез витамина D3 под действием УФ лучей</li> <li>■ Фотоиндуцированная цис/транс изомеризация ретиноевой кислоты в родопсине</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Трансаминирование глиоксильной кислоты</li> <li>■ Декарбоксилирование аминотермической кислоты</li> <li>■ Образование оксистеролов из холестерина</li> <li>■ Глутатионирование белков.</li> <li>■ Ацилирование белков</li> <li>■ Изомеризация дигидроксиацетонфосфата в глицеральдегид-3-фосфат</li> <li>■ S-глутатионирование и S-нитрозилирование тиоловых групп цистеина белков</li> <li>■ Гликозилирование белков</li> <li>■ Сульфирование белков</li> <li>■ Восстановление дисульфидной связи в полипептидах</li> <li>■ Образование NO в реакции восстановления нитрит-ионов.</li> <li>■ Образование супероксидного радикала</li> <li>■ Восстановление пероксида водорода</li> </ul> |

**Таблица 3.** Пути управления ферментативными и неферментативными реакциями

| Неферментативные реакции                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Ферментативные реакции                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Изменение стационарных концентраций активных форм за счет их элиминации антиоксидантами или связывания в малоактивные и неактивные комплексы</li> <li>■ Действие неспецифических катализаторов (например, Fe, Cu) и ингибиторов (например, хелаторы Fe и Cu)</li> <li>■ Изменение параметров среды (например, pH, температура, ионная сила, слабые магнитные поля)</li> <li>■ Саморегуляция за счет организации реакций в сопряженные редокс-циклы</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Генетический/транскрипционный механизм.</li> <li>■ Доступность кофактора</li> <li>■ Аллостерический механизм</li> <li>■ Посттрансляционные модификации</li> <li>■ Диссоциация/ассоциация каталитической и регуляторной субъединиц</li> <li>■ Адсорбция на компонентах мембраны</li> <li>■ Самосборка белков в мультиферментные комплексы</li> <li>■ Специфический протеолиз</li> </ul> |
| Системы генерации и/или детоксикации активных форм                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

генетической изменчивости. Зачастую происходящая в условиях стресса реорганизация метаболических сетей допускает усиленную генерацию активных форм (АФК и АКС) [12, 22], которые могут разными путями повышать вероятность адаптации клетки или популяции клеток.

Влияние стрессовых состояний на метаболизм и метаболом подробно рассмотрено в статье [20].

Здесь мы лишь вкратце опишем основные способы повышения эволюционного потенциала биологических систем при участии случайных химически активных метаболитов.

Защитное действие активных форм может проявляться напрямую и опосредованно. Прямая защита заключается в стабилизации белков клетки, например за счет образования внутрибелковых

**Таблица 4.** Функции ферментативного и неферментативного метаболизма в клетке

| Неферментативный метаболизм                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Ферментативный метаболизм                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Неферментативные реакции                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Изменение ионного баланса                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Участие во внутриклеточной и межклеточной сигнализации</li> <li>■ Защита от чужеродных микробных агентов</li> <li>■ Регуляция деградации мембранных фосфолипидов посредством активации различных форм фосфолипаз</li> <li>■ Регуляция физико-химических свойств фосфолипидных мембран</li> <li>■ Регуляция ионных каналов</li> <li>■ Создание редокс-среды, формирующей определенные структурные и функциональные свойства макромолекул</li> <li>■ Фактор стресс-индуцированного мутагенеза в бактериальной популяции для формирования фенотипического полиморфизма</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Создание электрического мембранного потенциала</li> <li>■ Поддержание осмотического давления</li> <li>■ Обеспечение необходимого значения pH</li> <li>■ Регуляция трансмембранного переноса различных веществ</li> <li>■ Участие во внутри- и межклеточной сигнализации</li> <li>■ Регуляция вязкости наружных и внутренних мембран</li> <li>■ Создание микросреды, формирующей определенные структурные и функциональные свойства макромолекул</li> <li>■ Создание условий молекулярного краудинга</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Расщепление сложных органических соединений с высвобождением энергии</li> <li>■ Процессы биосинтеза веществ для построения и обновления клеточных структур и тканей</li> <li>■ Реализация генетической информации</li> <li>■ Поддержание электролитного баланса и pH</li> <li>■ Обеспечение функционирования систем клеточной сигнализации</li> <li>■ Борьба с неферментативными реакциями</li> <li>■ Репарация повреждений макромолекул</li> <li>■ Механическая работа</li> </ul> |

дисульфидных связей [23, 24] и комплексов с металлами [25, 27]. Опосредованная защита включает следующие процессы:

1) Регуляция центральных сигнальных путей клетки, в том числе ответственных за реакцию на стресс [11, 12, 28];

2) Перепрограммирование эпигенома через непосредственную модификацию гистонов и опосредованно через модификацию гистон-деацетилаз и ДНК-метилаз [11, 12];

3) Реорганизация метаболизма, появление дополнительных реакций за счет мультиспецифичности ферментов [29];

4) Запуск механизма стресс-индуцированного мутагенеза [22, 30].

Функционирование активных метаболитов в качестве датчиков стресса и регуляторов метаболической памяти мы описали в статье [12]. Здесь мы рассмотрим роль активных форм в реорганизации метаболизма и запуске стресс-индуцированного мутагенеза.

АФК, АФА и АКС, действуя как посттрансляционные модификаторы ферментов, могут влиять на их избирательность по отношению к каноническим субстратам или катализируемым реакциям. В результате этого в метаболизме появляются дополнительные реакции, некоторые из которых могут оказаться полезными для организма в изменившихся (стрессовых) условиях. Вышесказанное проиллюстрировано на рис. 1.

Описанный механизм имеет большое значения для повышения адаптивного потенциала популяций бактериальных клеток [22].

Для закрепления нового типа организации метаболических путей необходимы кодовые системы, которые не обязательно являются новыми, а могут быть побочным продуктом процессов, изначально направленных на другие цели. Такими кодовыми системами могут быть некоторые посттрансляционные модификации, которые возникли как случайные и вредные, но впоследствии были приспособлены для нужд метаболизма. Например, неферментативный характер нитрозилирования — широко распространенной модификации белков, использующейся в трансдукции сигнала, указывает на ее “случайное” прошлое в метаболизме [31].

Рассмотрим и другой потенциальный способ защиты клетки в стрессовых условиях, заключающийся в запуске механизма стресс-индуцированного мутагенеза. Считается, что эволюция организмов происходит в направлении уменьшения энтропии. Контроль над энтропией последовательно распространяется по этапам передачи информации от ДНК к белку [20]. Самый значительный антиэнтропийный механизм — многоуровневая система контроля частоты ошибок, действующая на уровне репликации, транскрипции, трансляции, укладки и сортировки белков. Однако глобальная антиэнтропийная направлен-



**Рис. 1.** Роль реакционноспособных метаболитов в реорганизации метаболизма в стрессовых условиях: выключение одних реакций из-за инактивации ферментов и появление дополнительных реакций, катализируемых модифицированными формами ферментов. Среди продуктов реакций могут быть активные формы: АФК, АФА и АКС.

ность эволюции не исключает одновременного существования механизмов, повышающих частоту ошибок.

Можно допустить, что образование редокс-активных молекул метаболически запрограммировано с целью поддержания определенной частоты фенотипических мутаций, которые не могут быть устранены антиэнтропийными механизмами, с целью обеспечения изменчивости, необходимой для эволюции. Обычно под фенотипическими мутациями понимают последствия ошибок транскрипции и трансляции. Мы полагаем, что вполне допустимо к фенотипическим мутациям отнести и стабильные неферментативные посттрансляционные модификации, вызванные химически активными метаболитами. В поддержку этой идеи выступает тот факт, что образование активных метаболитов в сильной степени стимулируется различными видами стресса. Эти соединения увеличивают фенотипическую изменчивость через совместный эффект посттрансляционных модификаций (непосредственное образование изменчивости) и проявления скрытой изменчивости (например, через HSP90) [12].

Описана роль АФК в эволюционном процессе и адаптации к стрессу [32, 33]. АКС в этом контексте менее изучены. В настоящее время активно обсуждается их роль в метаболизме, как посредников сигналов АФК [34, 36]. АФК индуцируют реакции перекисного окисления липидов, продукты которых – ненасыщенные альдегиды и кетоны, ковалентно модифицируют белки в не-

ферментативных реакциях образования оснований Шиффа и аддуктов Михаэля.

К настоящему времени достаточно хорошо изучен механизм эволюционированности с участием прионоподобных белков грибов. Показано функционирование прионов в качестве эволюционного “конденсатора”, накапливающего критические генетические вариации и обнажающего их в стрессовых условиях [37]. Прионы обеспечивают механизм быстрого появления в условиях стресса новых фенотипов, некоторые из которых могут иметь адаптивную ценность. Можно провести параллель между прионным механизмом эволюционированности и аналогичным механизмом с участием активных форм. Во-первых, образование прионов и активных метаболитов стимулируется стрессом. Во-вторых, и прионы и активные метаболиты прежде всего оказывают влияние на гомеостаз белков. В-третьих, эти вещества участвуют в передаче информации, построенной на основе белков. Прионы индуцируют автокаталитическую пролиферацию белковых агрегатов, активные метаболиты через посттрансляционные модификации индуцируют образование белковых агрегатов, а также влияют на белковые детерминанты эпигенетической наследственности. В обычных условиях прионные белки и активные метаболиты вредны, поскольку первые снижают точность трансляции, а вторые вызывают неконтролируемые посттрансляционные модификации. Однако в условиях стресса эти вещества обеспечивают возможный механизм для быстрого приобретения новых фенотипов.

Обобщая вышесказанное, можно заключить, что в основе своей организации биологические системы являются квази-детерминированными, т. е. сочетают предопределение и случайность. Случайность в сочетании с естественным отбором является инструментами эволюции не только обмена веществ, но и генома [38].

## РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ В РАЗВИТИИ АДАПТАЦИОННЫХ РЕАКЦИЙ КЛЕТКИ

**Неспецифический адаптационный синдром клетки.** Всем живым организмам для выживания необходимо адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды. Структурной и функциональной единицей организма является клетка, поэтому изменения в организме, происходящие при развитии адаптационных реакций, не могут не затрагивать клеточные системы. Ответ клеток на действие различных факторов сочетает общие (неспецифические) и специфические черты. Особенно отчетливо неспецифические реакции проявляются при высокоинтенсивных воздействиях, вызывающих повреждения.

Впервые стереотипный, неспецифический характер реакции на клеточном или тканевом уровне на действие разнообразных факторов описал Введенский [39]. Им был предложен термин “парабриоз” (около жизни), обозначающий состояние, близкое к смерти. В литературе можно встретить другие термины с аналогичным содержанием — “некробиоз” (на грани смерти и жизни) и “паранекроз” (около смерти). Все эти термины обозначают состояние клеток, развивающих комплекс признаков, соответствующих последним обратимым фазам повреждения.

Изучению стресса на клеточном уровне было посвящено огромное количество работ. Особого внимания заслуживают идеи основоположника этого направления в науке Насонова, и его последователей Александрова и Брауна. Насонов, воздействуя на различные клетки возрастающими дозами факторов различной природы, обнаружил двухфазный ответ клетки на стресс [40]. Впоследствии ученики Насонова связали это явление с разворачиванием нативной структуры белков и к освобождению реакционных центров, прежде всего SH-групп [41]. В этих работах было показано, что белки обнаруживают сходные изменения при раздражении и повреждении клетки, что позволило сформулировать “денатурационную теорию повреждения и возбуждения” [40]. Была также установлена роль конформационных изменений белков (лабилизации и стабилизации) в адаптации клеток [41]. Существование одноклеточных, неспецифических изменений физико-химических и метаболических параметров было описано при развитии адаптационной реакции клетки, что позволило применить по отношению к клетке

понятие неспецифического адаптационного синдрома [42], которое ранее употребляли только по отношению к организму [43, 44]. Матвеев предложил обозначать неспецифическую компоненту клеточного ответа термином универсальная клеточная реакция [45].

Развитие адаптационного синдрома клетки сопровождается изменениями морфологических, физико-химических и биохимических параметров. Приведем наиболее общие, ранние и постоянные признаки повреждения клетки:

- 1) активация свободнорадикального окисления фосфолипидов мембран;
- 2) нарушение функционирования мембранных ферментов;
- 3) изменение свойств мембран — микровязкости, фосфолипидного состава, проницаемости и т.д.;
- 4) выход из клеток различных веществ (неорганических ионов, молочной, пировиноградной, кетоглутаровой кислот, белков, аминокислот);
- 5) разобщение окислительного фосфорилирования, прекращение дыхания;
- 6) усиление аэробного гликолиза;
- 7) ацидотический сдвиг (сдвиг pH цитоплазмы с 7.32—7.45 до 6.5—5.39);
- 8) выход из клетки калия, вход натрия и воды.

Эти изменения могут быть биологически целесообразными, т.е. до определенной степени выраженности они носят адаптивный характер и направлены на стабилизацию метаболизма при стрессе. В табл. 5 мы привели некоторые такие процессы, которые происходят в клетке на ранних стадиях действия стрессовых факторов до синтеза стрессовых белков.

Многие из этих процессов направлены на повышение стабильности макромолекул, снижение чувствительности и функциональности клетки, что приводит к снижению метаболической активности. Это состояние можно обозначить как “аварийный режим”. Переход клетки в такой режим сопровождается блокировкой ряда реакций, без которых можно обойтись, и включением других реакций, обеспечивающих устойчивость клеточной системы. Сужение метаболической активности направлено на сохранение резервов клетки для последующего восстановления.

Одним из факторов, стабилизирующих белковые молекулы и снижающих их реакционную активность, являются активные метаболиты (АФК и АКС), уровень которых повышается на начальных стадиях повреждения (развития стрессовой реакции) [46]. АФК продуцируются в результате нарушения метаболизма или как часть сети восприятия и передачи стрессового сигнала. Метаболические АФК напрямую изменяют окислительно-восстановительный статус ферментов, тем са-

**Таблица 5.** Первичные неспецифические процессы, происходящие в клетках при действии различных факторов (механической деформации, света, химических агентов, температуры, электромагнитных волн) и их биологическое адаптивное значение

| Процесс                                                | Биологическое значение                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Образование АФК                                        | Изменение функции ключевых регуляторных белков за счет окислительно-восстановительных модификаций.<br>Окисление белковых цистеинов, образование S—S связей и комплексов с металлами, что приводит к временному снижению активности и увеличению стабильности белка.<br>Увеличение проницаемости мембран и торможение $H^+$ -АТФ-азы как следствие закисления цитоплазмы                                                                                                                                                                                            |
| Инициация реакций ПОЛ, приводящих к появлению АКС      | Модификация остатков цистеина и гистидина за счет образования аддуктов Михаэля и оснований Шиффа. Блокирование ряда идущих в нормальных условиях ферментативных процессов                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Внутриклеточный ацидоз                                 | Активация гидролитических ферментов с оптимум в кислой зоне. Усиление распада белков и липидов, приводящее к увеличению пула низкомолекулярных соединений (аминокислот, полиаминов, карнозина, неорганического фосфата, свободных жирных кислот и др.).<br>Участие продукты биodeградации в синтезе биополимеров, востребованных в условиях стресса.<br>Полимеризация актина, уменьшение доли реакционноспособных остатков цистеина в белках, торможение физиологических процессов.<br>Стабилизирующее действие внутриклеточной кислой среды на клеточную мембрану |
| Адсорбция белков на мембране                           | Адсорбция нефункционирующих белков на мембранах удлинняет время их жизни, в том числе за счет повышения устойчивости к протеолизу. Адсорбированные белки оказывают стабилизирующее действие на мембрану                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Разобщением окислительного фосфорилирования с дыханием | Начальная активация дыхания сменяется разобщением окислительного фосфорилирования с дыханием, что приводит к снижению уровня АТФ и прекращению энергозатратных процессов                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Активация аэробного гликолиза                          | Переход на гликолиз позволяет клетке поддерживать энергетическую функцию в стрессовых условиях, поскольку гликолитический механизм синтеза АТФ более устойчив, чем окислительное фосфорилирование                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Снижение содержания NADH и NAD(P)H                     | “Выжигание” избытков восстановительных эквивалентов” снижает продукцию активных форм кислорода                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Выход $K^+$ из клетки                                  | Снижение активности ферментов, функционирование которых зависит от присутствия ионов калия                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Повышение свободного $Ca^{2+}$                         | Ионы $Ca^{2+}$ оказывают стабилизирующее действие на белки и липиды мембраны, стимулируют активность фосфолипаз и НАДФН-оксидаз, что приводит к усилению продукции АФК                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Полимеризация актина                                   | Увеличение вязкости цитоплазмы, замедляющее диффузию                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

мым перестраивая метаболические потоки. Кроме того, они могут влиять на транскрипцию и трансляцию, изменяя активность ключевых регуляторных белков. Сигнальные АФК генерируются в ответ на стресс датчиками стресса, например, НАДФН-оксидазой.

Приспособление клетки к стрессовым условиям окружающей среды может быть краткосроч-

ным или долговременным. Во втором случае включаются изменения в аппарате транскрипции, что приводит к синтезу стрессовых белков (белки теплового шока, шапероны, антиоксидантные ферменты, белки-антифризы и др.) Кроме того длительное и систематическое повторение воздействия, не выходящего за границы физиологического стресса, может индуцировать перестройки в

эпигеноме [47]. Поскольку для реализации ответа, затрагивающего генную экспрессию, требуется время, в клетке предусмотрены механизмы быстрого ответа, формирующие краткосрочную адаптацию. Примером последнего является изменение конформации и биологической активности фермента при связывании активного метаболита с его регуляторным центром. Регуляторными центрами могут быть как структуры, комплементарные структуре биорегулятора, так и реакционноспособные аминокислотные остатки (например, цистеина или гистидина) в определенном участке полипептидной цепи. Первый тип регуляции является аллостерическим, второй — сайт-специфическим [12].

**Активные метаболиты — индукторы метаболической пластичности.** На различных экспериментальных моделях показано, что механизмы адаптации живых систем подчиняются правилу гормезиса. Гормезисом назван процесс, благодаря которому низкие дозы токсических веществ или факторов стресса делают клетку или весь организм более устойчивым к более высоким токсичным дозам стрессора за счет активации механизмов стрессоустойчивости. Гормезис — эволюционно консервативный универсальный адаптационный ответ, обеспечивающий метаболическую пластичность живых систем [48–50]. Графически он выражается в виде двухфазной U-образной или перевернутой U-образной кривой в координатах доза-ответ (рис. 2). Эта кривая описывает изменение уровня реактивности живой системы в зависимости от силы воздействия какого-либо фактора. Две фазы на гормезисной кривой (фаза активации и фаза угнетения функции) рассматриваются не как разные процессы, а как разные стадии одного и того же процесса развития адаптивного ответа [49]. Гормезисная кривая описывает пределы, до которых функции клетки (пролиферация, рост, миграция и др.) или организма (сложное поведение, обучение, память и др.) могут изменяться под действием химических или физических факторов [50].

История изучения двухфазных реакций берет начало с 1880 г., когда Шульц испытывал различные дезинфицирующие средства на дрожжевых клетках [51]. Термин “гормезис” впервые был упомянут в 1943 г. в работе Соутхама и Эрлиха, исследовавших действие экстрактов красного кедра на метаболизм грибов [52]. В настоящее время концепция гормезиса активно развивается группой Калабрезе [49, 50, 53].

Гормезисный ответ присущ разным уровням организации живой материи — от белков до целого организма [50]. Живые организмы таким образом адаптируются к краткосрочным и долгосрочным стрессам [50, 54]. Однако до сих пор нет полного понимания молекулярных механиз-

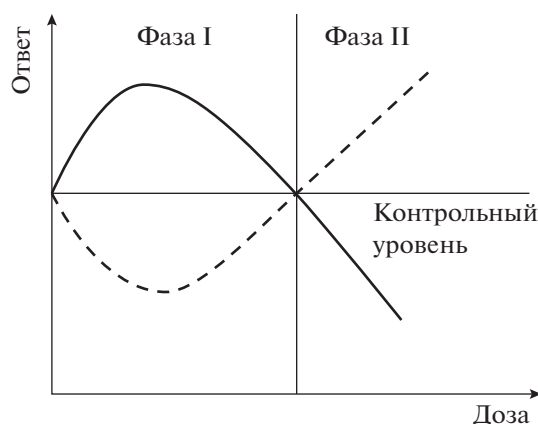
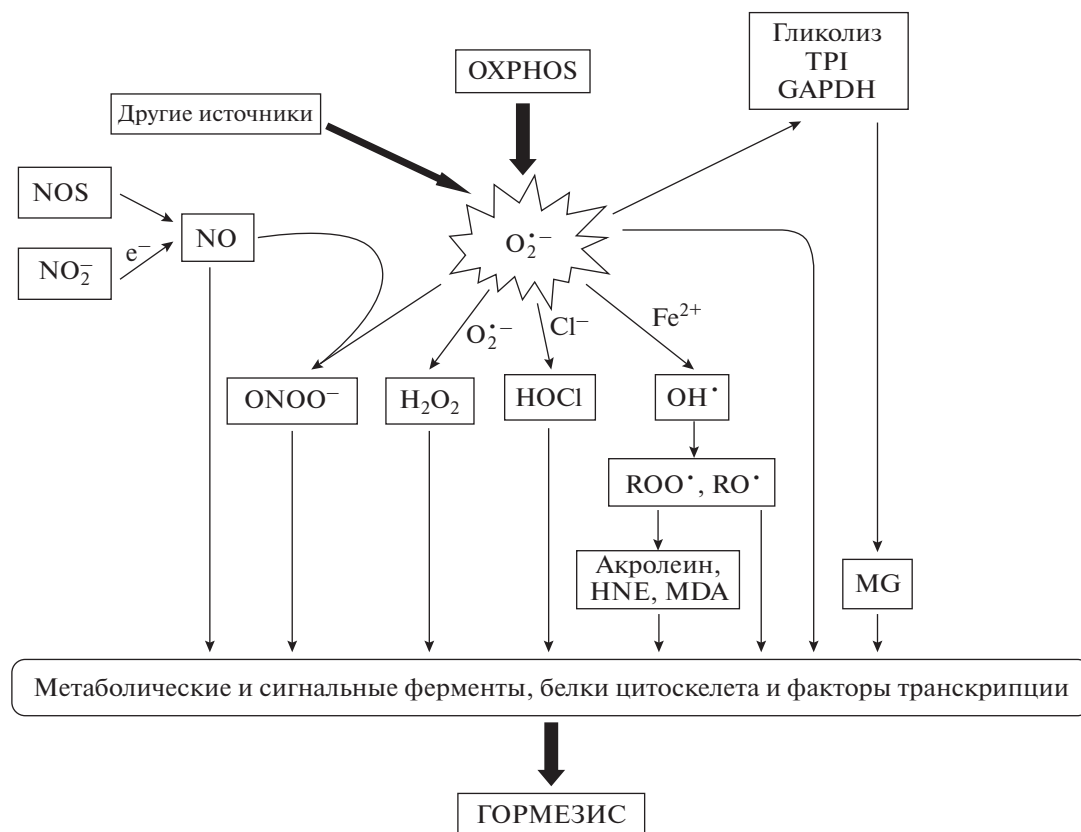


Рис. 2. Кривая, описывающая двухфазный ответ живой системы на различные факторы в зависимости от интенсивности воздействия.

мов, обеспечивающих гормезис. Можно лишь сказать, что на каждом уровне структурной организации действуют свои механизмы. Реакция клетки, как правило, включает комплексную адаптивную программу, направленную на повышение антиоксидантной и электрофильной защиты. Происходит это благодаря двойственному действию активных метаболитов (АФК, АФА и АКС), которые в низких дозах активируют сигнальные пути ответа на стресс через неферментативные ПТМ метаболических и сигнальных ферментов, белков цитоскелета и факторов транскрипции (NF- $\kappa$ B, FoxOs, Nrf2 и другие редокс-регулируемые факторы) [11]. На рис. 3 показана роль активных метаболитов как индукторов гормезиса. Активные метаболиты опосредуют адаптивный гормезисный ответ клетки или организма на стресс через неферментативные посттрансляционные модификации (ПТМ) белков: окисление, нитрование, нитрозилирование, хлорирование, липоксидирование, гликирование.

Существенная роль в обеспечении гормезиса отводится АФК [55, 57]. Считается, что их продукция при низком и умеренном стрессе помогает клетке или организму адаптироваться к более сильным воздействиям. Поэтому для улучшения состояния здоровья и общей резистентности организма рекомендуют регулярную умеренную физическую активность, при которой образуются АФК [56]. Источником АФК при физических упражнениях выступают не только митохондрии, но и ферментативные реакции, катализируемые НАДФН-оксидазой, ксантиноксидазой и моноаминоксидазой. Образование АФК может быть вызвано кратковременной гипоксией из-за интенсивного потребления кислорода скелетными мышцами [58]. Активация антиоксидантных систем происходит и в других случаях, например,





**Рис. 3.** Опосредование адаптивного гормезисного ответа клетки или организма на стресс через неферментативные посттрансляционные модификации белков. HNE – 4-гидрокси-2-ноненаль, MDA – малоновый диальдегид, MG – метилглиоксаль, TPI – триозофосфатизомераза, GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, OXPHOS – окислительное фосфорилирование, NOS – NO-синтаза.

при умеренном потреблении алкоголя, вызывающем продукцию АФК [59].

Помимо физической активности, улучшению здоровья и увеличению продолжительности жизни способствует снижение калорийности питания или низкоуглеводная диета [60–62]. Этот эффект связан с уменьшением гликолитического потока, что сопряжено со снижением продукции метилглиоксала, который за счет реакций неферментативного гликирования способствует старению клетки. С другой стороны, незначительные количества MG необходимы клетке для поддержания активности шаперона и антиапоптотического белка Hsp27 [62]. Поэтому обсуждается благотворный эффект периодического голодания, благодаря которому возможно поддержание продукции MG и АФК на уровне, достаточном для активации сигнальных путей защиты, и недостаточном для проявления токсического действия [61, 62].

Тот факт, что АФК и АКС необходимы организму для поддержания активности защитных систем, ставит под сомнение целесообразность

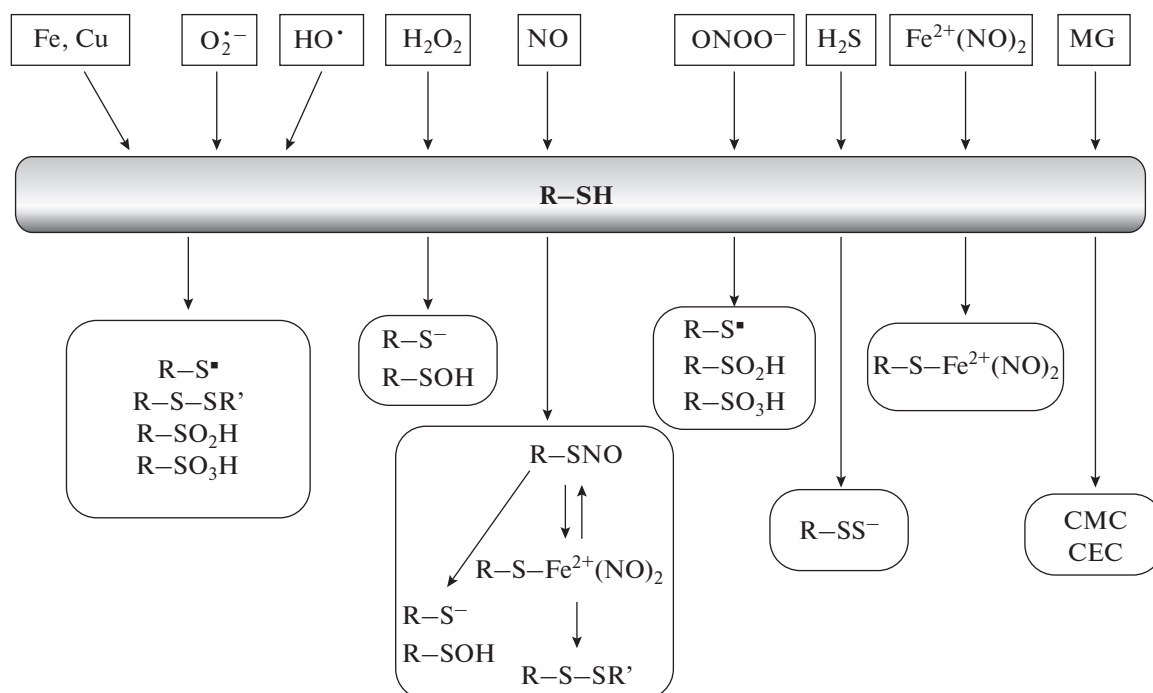
приема больших количеств антиоксидантов и исключение из диеты углеводов.

### БЕЛКОВЫЕ ЦИСТЕИНЫ – СЕНСОРЫ АКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ

Проявление неспецифической компоненты в адаптационном ответе клетки во многом является следствием взаимодействия активных метаболитов с реакционноспособными остатками цистеинов различных белков, в том числе ферментов, факторов транскрипции, мембранных каналов, рецепторов, белков цитоскелета [63–65]. Окислительно-восстановительные модификации цистеинов влияют на каталитическую активность, скорость обмена, субклеточную локализацию белков, белок-белковые [66] и белок-мембранные взаимодействия [67]. Они часто сочетаются с фосфорилированием/дефосфорилированием и с кальций-зависимыми путями передачи сигнала [68]. Таким образом происходит интеграция случайных реакций с ферментативным метаболизмом.

Цистеин не случайно был эволюционно выбран на роль датчика редокс-состояния клетки и активных метаболитов. Во-первых, эта аминок-





**Рис. 4.** Сопряжение окислительно-восстановительного метаболизма с ферментативным через цистеиновый протеом. CMC — карбоксиметилцистеин, CEC — карбоксиэтилцистеин, MG — метилглиоксаль.

кислота взаимодействует со многими АФК и АКС [36, 63, 64], а во-вторых, большая часть модификаций цистеина обратима. Обычно реакции между активными формами и белковыми цистеинами являются сайт-специфическими. Они зависят от микроокружения в молекуле белка, определяющего степень ионизации и доступность для воздействия активных метаболитов [12, 64, 69]. Белки, содержащие реакционноактивные SH-группы, получили название редокс-переключателей [36, 68]. На рис. 4 представлены основные продукты реакции цистеина с активными метаболитами. Совокупность посттрансляционных модификаций белковых цистеинов формирует так называемый цистеиновый протеом клетки.

Благодаря высокой чувствительности к редокс-активным метаболитам, цистеины функционируют как датчики окислительно-восстановительной среды клетки и активных метаболитов (окислителей и электрофилов). Окисленные или восстановленные тиолы — это своего рода переключатели для путей передачи сигнала, чувствительных к изменению окислительно-восстановительного состояния в условиях стресса [68]. Чаще всего цистеины подвергаются атаке со стороны АФК, а именно  $\text{H}_2\text{O}_2$  и органических перекисей. В реакцию вступают только депротонированные цистеины в форме тиолата ( $-\text{S}^-$ ). Окисление тиолата пероксидами приводит к образованию сульфеновой кислоты ( $-\text{SOH}$ ), которая является ключевым игроком в окислительно-восстановительной пере-

даче сигналов [64, 70]. Цистеинсульфеновые кислоты нестабильны и могут быть дополнительно окислены до необратимых форм: сульфеновой ( $-\text{SO}_2\text{H}$ ) и сульфоновой ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) кислот. Возможны и другие модификации: образование дисульфидных связей ( $-\text{SS}-$ ), S-глутатионилирование ( $-\text{SSG}$ ) и образование сульфенамида ( $-\text{SN}=\text{}$ ).

Разнонаправленное действие активных метаболитов отчасти объясняется их способностью активировать или блокировать сульфгидрильные группы белков редокс-переключателей в зависимости от концентрации. Благодаря этому настраивается чувствительность и резистентность клетки к данным окислительно-восстановительным условиям. В определенном интервале концентраций эти вещества могут высвобождать реакционный потенциал SH-групп. Механизмы активации могут быть разными. Наиболее интересен путь повышения реакционной способности SH-групп за счет распада лабильного комплекса, в состав которого они входят [23, 26, 69]. Это могут быть и комплексы с металлами (Fe, Zn, Cu, Ca).

Связывание белками металлов может быть одним из механизмов временного “выключения” белка из метаболических превращений в условиях сильного нарушения редокс-условий (окислительный, нитрозативный и карбонильный стресс).

В белках по мере нарушения пространственной структуры возникают дополнительные центры связывания металлов, в результате чего в

клетке образуются стабильные белковые агрегаты со сниженной функциональной активностью [71]. Прогрессивное образование металл-белковых комплексов наблюдается при старении и в результате действия на белок повреждающих агентов, накапливающихся при развитии окислительного стресса и/или нарушении обменных процессов в организме [72, 73].

Одним из способов стабилизации белков и снижения их реакционной способности может быть включение белковых SH-групп в комплексы с NO ( $R-S-Fe^{2+}(NO)_2$ ) [69] (рис. 4). Образование таких комплексов блокирует цистеиновые остатки в нормальных условиях и сенсibiliзирует их в условиях электрофильного/окислительного стресса, поскольку тиолы в составе комплекса находятся в активной ионизированной форме (в виде тиолат-аниона) и не нуждаются в предварительном депротонировании.

#### АКТИВНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ – РЕГУЛЯТОРЫ МЕТАБОЛИЗМА РАКОВЫХ КЛЕТОК

Очень важным процессом, который может обсуждаться в данном контексте, является роль АФК в регуляция метаболизма раковых клеток. Такая регуляция также подчиняется механизму гормезиса. Антиоксидантный потенциал опухолевых клеток поддерживает определенный уровень АФК, активирующих проонкогенные сигналы, которые увеличивают выживаемость и пролиферацию клеток, а также устойчивость к апоптозу, но при этом не оказывают повреждающего действия [74].

Как известно, выраженными особенностями метаболизма раковых клеток является усиленный гликолиз даже при наличии высокой концентрации кислорода (эффект Варбурга или аэробный гликолиз) и постоянные высокие уровни АФК [5, 74, 75]. Сначала в ответ на АФК раковые клетки активируют гликолиз, затем АФК ингибируют ферменты гликолиза – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, пируваткиназу M2 и фосфофруктокиназу [76]. Благодаря этому метаболический поток глюкозы перенаправляется на альтернативный пентозофосфатный путь [75], в котором образуется НАДФН – восстановительный эквивалент для антиоксидантных ферментов, включая систему глутатиона и тиоредоксина [77]. Однако инактивация или ингибирование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы способствует поступлению триозофосфатных интермедиатов гликолиза в глиоксалазный путь, в котором образуется активное карбонильное соединение – метилглиоксаль [78], чрезмерное накопление которого может привести к гибели клетки. Благодаря этому, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа яв-

ляется важной терапевтической мишенью при лечении рака.

#### АКТИВНЫЕ ФОРМЫ – ПРОТОБИОРЕГУЛЯТОРЫ

В биологических системах существует особый вид трансдукции сигналов, в основе которого лежит модификация белков активными формами (окислителями и электрофилами). Отрицательные и положительные стороны такой сигнализации продиктованы историей возникновения живых систем, корни которой уходят в глубь эволюционного прошлого клетки, возможно даже в доклеточную эпоху, когда только возникли первые белковые катализаторы.

Восприятие и передача сигнала в современных биологических системах осуществляются белками, которые при действии определенных веществ изменяют структуру и свойства. Современный метаболизм построен на избирательном взаимодействии белков с веществами, однако в протометаболических системах избирательность была скорее исключением, нежели правилом. Белки, скорее всего, реагировали комплексно всеми своими доступными реакционными центрами на различные агенты, воспринимая их как сигналы (раздражители). Способность неспецифически реагировать сохранилась и у современных белков. Она обнаруживается в условиях действия высоких доз раздражителей. Если в современном метаболизме неспецифические реакции, как правило, нежелательны, то в протометаболизме это был обычный способ рецепции сигналов, позволяющей системе приспосабливаться к окружающей среде. Последствия неспецифических взаимодействий могли быть как полезны, так вредны для системы.

Способность активных форм обратимо взаимодействовать с реакционными остатками цистеинов в белках составляет основу внутриклеточной окислительно-восстановительной сигнализации. Именно в спонтанном характере этих реакций, в отсутствие строгой избирательности, кроется причина двойственности их эффектов. В низких концентрациях редокс-активные молекулы преимущественно модифицируют регуляторные белки, в более высоких – и другие белки клетки. В первом случае они действуют как адекватные раздражители (сигнальные молекулы), во втором – как неадекватные, индуцируя комплекс неспецифических адаптационных изменений, которые могут перейти в патологические.

АФК, АФА и АКС можно причислить к универсальным агентам, которые действуют в качестве неспецифических аллостерических эффекторов, доставшихся в наследство современному метаболизму от его эволюционного прошлого, а

неспецифическую рецепцию — как одну из ступеней на пути возникновения специфической рецепции. Предположительно, окислительно-восстановительная сигнализация возникла благодаря стабилизации адаптивно ценных посттрансляционных изменений белков, которым они подвергались при нарушении гомеостатических параметров внутриклеточной среды еще на стадии первичных клеток. Такой сценарий происхождения рецепторов из пула белков, изначально подверженных модификации редокс-активными соединениями или участвующих в их метаболизме, представляется вполне правдоподобным.

Следует отметить и тот факт, что многие АФК и АКС являются побочными продуктами путей энергообеспечения клетки: электронтранспортных цепей митохондрий и гликолиза. Это означает, что их внутриклеточная концентрация несет информацию о состоянии катаболических путей, о недостатке пищевых субстратов или, наоборот, об их избытке. Например, побочный продукт гликолиза — метилглиоксаль сигнализирует о неспособности ферментативных путей утилизировать глюкозу. Кроме того, в условиях действия стрессовых факторов энергетические системы клетки страдают в первую очередь. В этом случае АФК и АКС выполняют функцию медиаторов стресса.

\* \* \*

К настоящему времени перечень физиологических процессов пополнился такими явлениями, как окислительный митогенез, эпигенетическое наследование, фенотипическая пластичность, гормезис. Для объяснения механизмов, лежащих в основе этих явлений, представлений о ферментативных метаболических путях оказалось недостаточно. Поэтому назрела необходимость обозначить область в общем метаболизме клетки, которая лишь отчасти обусловлена функционированием ферментных систем и по сути является сетью неферментативных окислительно-восстановительных реакций, вызывающих посттрансляционные модификации белков: окисление, нитрозилирование, нитрование, липоксидирование, хлорирование, гликирование, ацилирование, тиолирование, образование продуктов Михаэля и др.

Возникновение специфичности, основанной на комплементарности структур взаимодействующих молекул, стало предпосылкой для каналирования метаболизма. Как известно, ферменты катализируют реакции, которые могут протекать и в их отсутствие, поскольку они термодинамически возможны. За счет повышения скорости нужных реакций, вероятность побочных реакций сводится к минимуму. Несмотря на то, что большинство метаболических процессов взято под ферментативный контроль, неферментативные

реакции присутствуют в метаболизме и современных организмов.

Активные метаболиты играют важную роль в регуляции метаболической пластичности и эволюционируемости живых систем. С одной стороны, они обеспечивают устойчивость биологических макромолекул и систем, с другой, способствуют фенотипической изменчивости через демаскирование скрытой вариабельности. Сложно организованная система редокс-реакций с участием активных метаболитов и цистеинового протеома, а также широкое распространение этих реакций у всех живых организмов от бактерий до человека, не оставляет сомнений, что образование этих “случайных” активных форм совсем не случайно и представляет собой один из механизмов метаболической регуляции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ленинджер А.* Биохимия. М.: Мир, 1974. 957 с. (*Lehninger A.L.* Biochemistry: The Molecular Basis of Cells Structure and Function. New York: Worth Publ., 1970. 833 p.)
2. *Zarkovic N.* // Cells. 2020. V. 9. № 3. e767. <https://doi.org/10.3390/cells9030767>
3. *Gutteridge J.M.C., Halliwell B.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018. V. 502. № 2. P. 183–186.
4. *Beckman J.S., Koppenol W.H.* // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 1996. V. 271. P. 1424–1437.
5. *Moloney J.N., Cotter T.G.* // Seminars in Cell and Developmental Biology. 2017. V. 80. P. 50–64.
6. *Abalenikhina Yu.V., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 6. P. 611–623.
7. *Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Mel'nikova T.I., Zavadskiy S.P., Kuz'menko A.N., Terentiev A.A.* // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. Suppl. 1. P. S56–S78.
8. *Sies H., Jones D.P.* // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2020. V. 21. № 7. P. 363–383.
9. *Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S.* // Oxid. Med. Cell. Longev. 2014. V. 2014. P. 360438.
10. *Semchyshyn H.M.* // Sci. World J. 2014. article ID 417842.
11. *Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. № 3. P. 273–289.
12. *Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F.* // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. Suppl. 1. P. S206–S224.
13. *Szent-Gyorgyi A.* Bioelectronics. A Study in Cellular Regulations, Defense, and Cancer. New York: Acad. Press, 1968. 89 p.
14. *Bartosch G.* // J. Theor. Biol. 1981. V. 91. P. 233–235.
15. *Голубев А.Г.* // Биохимия. 1996. Т. 61. № 11. С. 2018–2039.
16. *Голубев А.Г.* Биология продолжительности жизни и старения. СПб.: издательство Л-Н, 2015. 384 с.
17. *Danchin A.* // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. P. 57–72.
18. *D'Ari R., Casades J.* // Bioessays. 1998. V. 20. P. 181–186.

19. Keller M.A., Piedrafita G., Ralser M. // Current Opinion in Biotechnology. 2015. V. 34. P. 153–161.
20. Piedrafita G., Keller M. A., Ralser M. // Biomolecules. 2015. V. 5. P. 2101–2122.
21. Козлов В.А., Сапожников С.П., Шентухина А.И., Голеньков А.В. // Вестник РАМН. 2015. Т. 70. № 4. С. 397–402.
22. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F. // Biochemistry (Moscow). 2015. V. 80. № 13. P. 1655–1671.
23. Giles N.M., Watts A.B., Giles G.I., Fry F.H., Littlechild J.A., Jacob C. // Cell Chemical Biology. 2003. V. 10. № 8. P. 677–693.
24. Karimi M., Ignasiak M.T., Chan B., Croft A.K., Radom L., Schiesser C.H., Pattison D.I., Davies M.J. // Sci. Rep. 2016. V. 6. № 1. P. 38572.
25. Desmet J., Joniau M., Van Dael H. // Studies in Organic Chemistry. 1993. V. 47. P. 299–307.
26. Arnold F.H., Zhang J.H. // Trends Biotechnol. 1994. V. 12. № 5. P. 189–192.
27. Sayre L.M., Moreira P.I., Smith M.A., Perry G. // Ann. Ist. Super Sanità. 2005. V. 41. № 2. P. 143–164.
28. Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M. // Endocrine Reviews. 2002. V. 23. № 5. P. 599–622.
29. Carbonell P., Lecointre G., Faulon J.-L. // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. № 51. P. 43994–44004.
30. Tenaillon O., Denamur E., Matic I. // Trends in Microbiology. 2004. V. 12. № 6. P. 264–270.
31. Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Feldman N.B., Lutsenko S.V. // Free Radic. Res. 2018. V. 52. № 5. P. 507–543.
32. Forman H.J. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2010. V. 1203. P. 35–44.
33. Tauffenberger A., Magistretti P.J. // Neurochem. Res. 2021. V. 46. № 1. P. 77–87.
34. Domingues R.M., Domingues P., Melo T., Pérez-Sala D., Reis A., Spickett C.M. // J. Proteomics. 2013. V. 92. P. 110–131.
35. Mano J., Biswas M.S., Sugimoto K. // Plants. 2019. V. 8. № 10. e391.  
<https://doi.org/10.3390/plants8100391>
36. Viedma-Poyatos Á., González-Jiménez P., Langlois O., Company-Marin I., Spickett C.M., Pérez-Sala D. // Antioxidants. 2021. V. 10. № 2. e295.  
<https://doi.org/10.3390/antiox10020295>
37. Tyedmers J., Madariaga M.L., Lindquist S. // PLoS Biol. 2008. V. 6. № 11. e294.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060294>
38. Кунин Е.В. Логика случая. М.: Центрполиграф, 2014. 527 с. (Koonin E.V. The Logic of Chance. The Nature and Origin of Biological Evolution. Upper Saddle River, NJ, USA: FT Press, 2012. 520 p.)
39. Введенский Н.Е. Избранные произведения. Т. 2. М.: Издательство Академии Наук СССР, 1951. С. 507–855.
40. Насонов Д.Н. Местная реакция протоплазмы и распространяющееся возбуждение. М.—Л.: Издательство Академии Наук, 1962. 426 с.
41. Александров В.Я. Реактивность клеток и белки. Л.: Наука, 1985. 318 с.
42. Браун А.Д., Моженко Т.П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. Л.: Наука, 1987. 232 с.
43. Selye H. The Case for Supramolecular Biology. N.Y.: Liveright, 1967. 168 p.
44. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского ун-та, 1979. 128 с.
45. Matveev V.V. // Cell Mol. Biol. 2005. V. 51. № 8. P. 715–723.
46. Choudhury F.K., Rivero R.M., Blumwald E., Mittler R. // Plant Abiotic Stress. 2017. V. 90. № 5. P. 856–867.
47. Vaiserman A.M. // Ageing Res. Rev. 2011. V. 10. P. 413–421.
48. Agutter P.S. // Bioessays. 2007. V. 29. № 4. P. 324–333.
49. Calabrese E.J. // Environ. Pollut. 2013. V. 182. P. 452–460.
50. Calabrese E.J. // Microb. Cell. 2014. V. 1. № 5. P. 145–149.
51. Schulz H. // Virch. Archiv Pathol. Anat. Phys. Klin. Med. 1887. V. № 108. P. 423–445.
52. Southam C.M., Ehrlich J. // Phytopathology. 1943. V. 33. P. 517–524.
53. Calabrese E.J., Dhawan G., Kapoor R., Iavicoli I., Calabrese V. // Gerontology. 2016. V. № 62. P. 530–535.
54. Zimmermann A., Bauer M.A., Kroemer G., Madeo F., Carmona-Gutierrez D. // Microbial. Cell. 2014. V. 1. № 5. P. 150–153.
55. Radák Z., Chung H.Y., Koltai E., Taylor A.W., Goto S. // Ageing Res. Rev. 2008. 7. P. 34–42.
56. Goto S., Radák Z. // Dose Response. 2010. V. 8. № 1. P. 68–72.
57. Oliveira M.F., Geijs M.A., França T.F.A., Moreira D.C., Hermes-Lima M. // Front. Physiol. 2018. V. 9. P. 945.
58. Clanton T.L. // J. Appl. Physiol. 2007. V. 102. P. 2379–2388.
59. Wang Q., Sun A.Y., Simonyi A., Kalogeris T.J., Miller D.K., Sun G.Y., Korthuis R.J. // Free Radic. Biol. Med. 2007. V. 43. P. 1048–1060.
60. Yu B.P., Chung H.Y. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006. V. 928. P. 39–47.
61. Hipkiss A.R. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006. V. 1067. P. 361–368.
62. Hipkiss A.R. // Biogerontology. 2007. V. 8. № 2. P. 221–224.
63. Winterbourn C.C., Hampton M.B. // Free Radic. Biol. Med. 2008. V. 45. № 5. P. 549–561.
64. Trost P., Fermani S., Calvaresi M., Zaffagnini M. // Plant Cell Environ. 2017. V. 40. № 4. P. 483–490.
65. Day N.J., Gaffrey M.J., Qian W.-J. // Antioxidants. 2021. V. 10. № 3. e499.  
<https://doi.org/10.3390/antiox10030499>
66. Liebthal M., Schuetze J., Dreyer A., Mock H.-P., Dietz K.-J. // Antioxidants. 2020. V. 9. № 6. e515.  
<https://doi.org/10.3390/antiox9060515>
67. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Blindar V.N., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. № 2. P. 83–98.

68. Klomsiri C., Karplus P.A., Poole L.B. // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. V. 14. № 6. P. 1065–1077.
69. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Novikova N.N., Topunov A.F. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020. V. 56. № 5. P. 512–520.
70. Claiborne A., Mallett T.C., Yeh J.I., Luba J., Parsonage D. // *Adv. Protein Chem.* 2001. V. 58. P. 215–276.
71. Reeg S., Grune T. // *Antioxid. Redox Signal.* 2015. V. 23. № 3. P. 239–255.
72. 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.
73. Kononov O.V., Novikova N.N., Kovalchuk M.V., Yalovega G.E., Topunov A.F., Kosmachevskaya O.V., Yurieva E.A., Rogachev A.V., Trigub A.L., Kremennaya M.A., Borshchevskiy V.I., Vakhrameev D.D., Yakunin S.N. // *Materials.* 2020. V. 13. № 20. e4635. <https://doi.org/10.3390/ma13204635>
74. Moloney J.N., Cotter T.G. // *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2017. V. 80. P. 50–64.
75. Movahed Z.G., Rastegari-Pouyani M., Mohammadi M.H., Mansouri K. // *Biomed. Pharmacother.* 2019. V. 112. e108690. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108690>
76. Mullarky E., Cantley L.C. // *Innovative Medicine: Basic Research and Development.* Tokyo: Springer, 2015. P. 3–23.
77. Stincone A., Prigione A., Cramer T., Wamelink M., Campbell K., Cheung E., Olin-Sandoval V., Gruning N.M., Kruger A., Tauqeer Alam M., Keller M.A., Breitenbach M., Brindle K.M., Rabinowitz J.D., Ralser M. // *Biol. Rev.* 2015. V. 90. P. 927–963.
78. Kosmachevskaya O.V., Novikova N.N., Topunov A.F. // *Antioxidants.* 2021. V. 10. № 2. e253. <https://doi.org/10.3390/antiox10020253>

## Non-Enzymatic Reactions in Metabolism: The Role in Evolution and Adaptation

O. V. Kosmachevskaya<sup>a</sup>, and A. F. Topunov<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup>*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: aftopunov@yandex.ru*

Metabolism can be represented as a network of enzymatic and non-enzymatic (spontaneous) biochemical reactions. One of the most important parts of non-enzymatic metabolism are the processes involving in the formation and redox transformations of highly reactive compounds: reactive forms of oxygen, nitrogen, sulfur, halogens and reactive carbonyl compounds. All these reactive forms have one common property – spontaneous interaction with protein amino acid residues. The reactive forms (or reactive metabolites) have long been studied in terms of their ability to make toxic effects on cells. Later, the direction of research shifted to the study of their signaling and regulatory properties. It became clear that these reactive compounds in low concentrations are necessary for living systems. They can regulate the growth and development of the organism. On the one hand, they ensure the stability of biological macromolecules and living systems, on the other – promote phenotypic variability by unmasking the latent one. The review discusses the role of these compounds as regulators of metabolic plasticity and evolutionability.

**Keywords:** metabolism, non-enzymatic reactions, reactive compounds, evolution, adaptation

УДК 579.6,606

## ПЕПТАИБОЛЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АНТИФУНГАЛЬНЫЕ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АНТИБИОТИКИ: СОВРЕМЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ (ОБЗОР)

© 2021 г. И. А. Гаврюшина<sup>1</sup>, М. Л. Георгиева<sup>1,2</sup>, А. Е. Куварина<sup>1</sup>\*, В. С. Садыкова<sup>1</sup>\*\*

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

\*e-mail: nastena.lysenko@mail.ru

\*\*e-mail: sadykova\_09@mail.ru

Поступила в редакцию 31.03.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 23.04.2021 г.

Одним из возможных путей преодоления сегодняшнего дефицита эффективных антибиотиков могут стать антимикробные пептиды, которые естественным образом синтезируются многими организмами, в том числе растениями, млекопитающими и микроорганизмами. Среди антимикробных пептидов, пептаиболы представляют собой давно изучаемые соединения с разнообразной биологической активностью, включая антибактериальную, антифунгальную, противоопухолевую, антимикоплазматическую, антитрипаносомную и др. В обзоре представлены обобщенные сведения о новых пептаиболах с противоопухолевой и антифунгальной активностями, механизмах их действия и современных тенденциях их потенциального применения в медицине, описанных с 2010 г.

**Ключевые слова:** пептаиболы, антибактериальное, противогрибковое, противоопухолевое действие, пептидные антибиотики

**DOI:** 10.31857/S055510992105007X

С момента открытия аламетицина в конце 1960 гг., пептаиболы привлекли к себе пристальное внимание как научного сообщества, так и фармацевтической промышленности [1]. Среди нерибосомных пептидов пептаиболы составляют самую большую группу. У них есть многообещающий потенциал для дальнейшей разработки лекарственных средств, поскольку они действуют на клеточные мембраны, а не на конкретную мишень, тем самым снижая вероятность возникновения множественной лекарственной устойчивости [2, 3]. В первом выпуске базы данных пептаиболов в 1997 г. собрано приблизительно 317 последовательностей [2–6], на сегодняшний день зарегистрировано более 1000 соединений. Большинство из них обобщены в автономной версии Comprehensive Peptaibiotics Database [7], онлайн-базах данных Norine <https://bioinfo.cristal.univ-lille.fr/norine/index.jsp>; Protein databases <https://www.rcsb.org/> и DBAASP <https://dbaasp.org/home> [8].

Основными известными продуцентами пептаиболов на сегодня считаются около 30 родов мицелиальных грибов, принадлежащих к порядку Нурокреалес. Способность продуцировать пептаиболы наиболее изучена у представителей грибов рода *Trichoderma*, среди которых активно

исследуются представители видов *T. viride*, *T. brevicompactum*, *T. longibrachiatum*, *T. virens*, *T. parceramosum* и *T. ghanense* [3–7, 9–13]. Грибы рода *Emericella* также продуцируют антимикробные пептиды из группы пептаиболов: зервамицины, бергофунгины, эмеримицины, эмерициллипсины и антиамоебин. Такая способность установлена для восьми видов этого рода [14–17]. Помимо *Trichoderma* и *Emericella*, продуцентами пептаиболов являются виды из родов *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, *Clonostachys*, *Stilbella*, *Bionectria*, *Monocillium*, *Nectriopsis*, *Niesslia*, *Sepedonium*. Также известно, что одни и те же пептаиболы могут синтезироваться разными видами грибов [18–23].

На фоне роста устойчивости патогенных микроорганизмов к имеющимся на рынке антимикробным препаратам, пептаиболы представляют интерес для поиска альтернативных источников антибиотиков “следующего поколения”. С фармакологической точки зрения они обладают разнообразной биологической активностью, включая антибактериальные, антифунгальные, противоопухолевые, иммуносупрессивные, антимикоплазматические, антитрипаносомные и ранозаживляющие свойства [2–7, 9, 18–23].

В настоящем обзоре обобщены имеющиеся в литературе современные сведения (с 2010 г.) о пептаиболах и липопептаиболах, которые обладают антифунгальными и противоопухолевыми свойствами. Уделено внимание продуцентам и источникам их выделения, антимикробной и цитотоксической активностям, структурным особенностям молекул, а также механизму их действия.

### СТРУКТУРНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ, СИНТЕЗ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ГРИБНЫХ ПЕПТАИБОЛОВ

Пептаиболы – самая большая группа пептаибиотиков, представляют собой антимикробные пептиды грибов, содержащие от 4 до 21 аминокислотных остатка, с молекулярной массой от 500 до 2200 Да. Бенедетти с соавт. [2, 24] в 1983 г. определили “пептаиболы” как небольшие пептиды с высоким содержанием остатков  $\alpha$ -аминоизомасляной кислоты (Aib), в основном, с N-концевой ацетильной группой и с C-концевой модификацией в виде аминспиртовой группы. Для них также характерно наличие дополнительных небелковых аминокислот, в частности, изовалина и 2-этилаланина. Пептаиболы классифицируются в соответствии с длиной их аминокислотной цепи: 1) пептаиболы с длинной последовательностью (18–21 аминокислотных остатков обычно с центральным расположением Pro и остатками Gln около обоих концов); 2) пептаиболы с короткой последовательностью (11–16 аминокислотных остатков, с несколькими Aib-Pro и обычно либо Ac-Aib-Asn-, либо Ac-Aib-Gln- в качестве N-конца); 3) ультракороткие липопептаиболы (7–11 аминокислотных остатков, с высоким содержанием Gly и N-концевых аминокислотных остатков, ацилированных жирной кислотой C8–C15) [2, 4, 16]. Содержание Aib составляет примерно 40% в длинных пептаиболах и от 14 до 56% в коротких. Основа молекулы пептаибола образует спиральную структуру из-за конформационных ограничений, обусловленных многочисленными Aib.

Существует большое структурное разнообразие пептаиболов. Многие описанные соединения этой группы представляют собой гомологи, отличающиеся локальными аминокислотными заменами, например, такие как атровиридины, неоатровиридины, лонгибрахины и эмерициллипсины (рис. 1). Внутри группы у гомологов может быть разный уровень цитотоксичности и специфичности, а также разные количественные уровни и спектры антимикробной активности (от 40 до 99% сходства, в зависимости от тест-культур) [25–28].

Длинноцепочечные пептаиболы (до 21 аминокислотного остатка), такие как лонгибрахины, могут образовывать потенциал-зависимые ионные каналы в липидных мембранах грибных фитопатогенов, влияя на их проницаемость и приводя клет-

ки к гибели [29, 30]. Ряд исследователей показали, что пептаиболы с короткими последовательностями также образуют потенциал-зависимые ионные каналы в липидных мембранах и взаимодействуют со специфическими молекулярными мишенями прямо или косвенно внутри клетки, моделируя различные сигнальные пути. Однако большинство исследований короткоцепочечных пептаиболов и ультракоротких липопептаиболов сосредоточено на изучении особенностей структур и гораздо меньше известно о механизме их действия внутри клетки [2, 8, 16, 29].

Синтез пептаиболов у грибов осуществляется большими многомодульными белковыми комплексами, известными как нерибосомные пептидные синтетазы (NRPS). Каждый модуль катализирует включение одной белковой или небелковой аминокислоты. Предполагается, что одна синтетаза способна продуцировать множество изоформ одного и того же пептаибола [2, 30].

Современные методы изучения механизма действия пептаиболов включают равновесный диализ, дифференциальную сканирующую калориметрию, мембранную фильтрацию, хроматографию и флуоресценцию [30], которые обычно необходимы для модификации пептида или липида. Твердотельная спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ss-ЯМР) и круговой дихроизм (CD) также были апробированы, но пока не дают очевидного представления, почему некоторые пептаиболы активны, а некоторые нет [31–35]. Ориентация и расположение пептаиболов на поверхности или в двойном слое клеточных мембран, а также взаимодействие между пептидом и липидной мембраной имеют решающее значение для понимания механизма их действия и антимикробной активности. Было показано, что аламетицин (Alm), взаимодействующий с мембраной посредством механизма бочкообразного стержня (“barrel-stave”), при котором отдельные пептиды собираются в пучки, проникающие через бислой, индуцирует реакции растения, определяющие его устойчивость к патогену [29, 33]. При более высокой концентрации Alm может проникать в апикальную меристему и клетки эпидермиса верхушек корней, но не в клетки базальной меристемы, клетки коры или корневой покров *Arabidopsis thaliana*. Однако если корень был предварительно обработан целлюлазой, проницаемости не наблюдалось, что доказывает индуцированную целлюлозой устойчивость и клеточно-специфическую проницаемость Alm для корней *A. thaliana* [32].

Пьета Е. с соавт. [33] описали порообразование Alm в монослое липидов 1,2-димиристоил-*n*-глицеро-3-фосфохолин/фосфоглицерин (DMPC/PG) с использованием электрохимической сканирующей туннельной микроскопии (EC-STM). Липиды PG составляют мембранную архитектуру грамп-

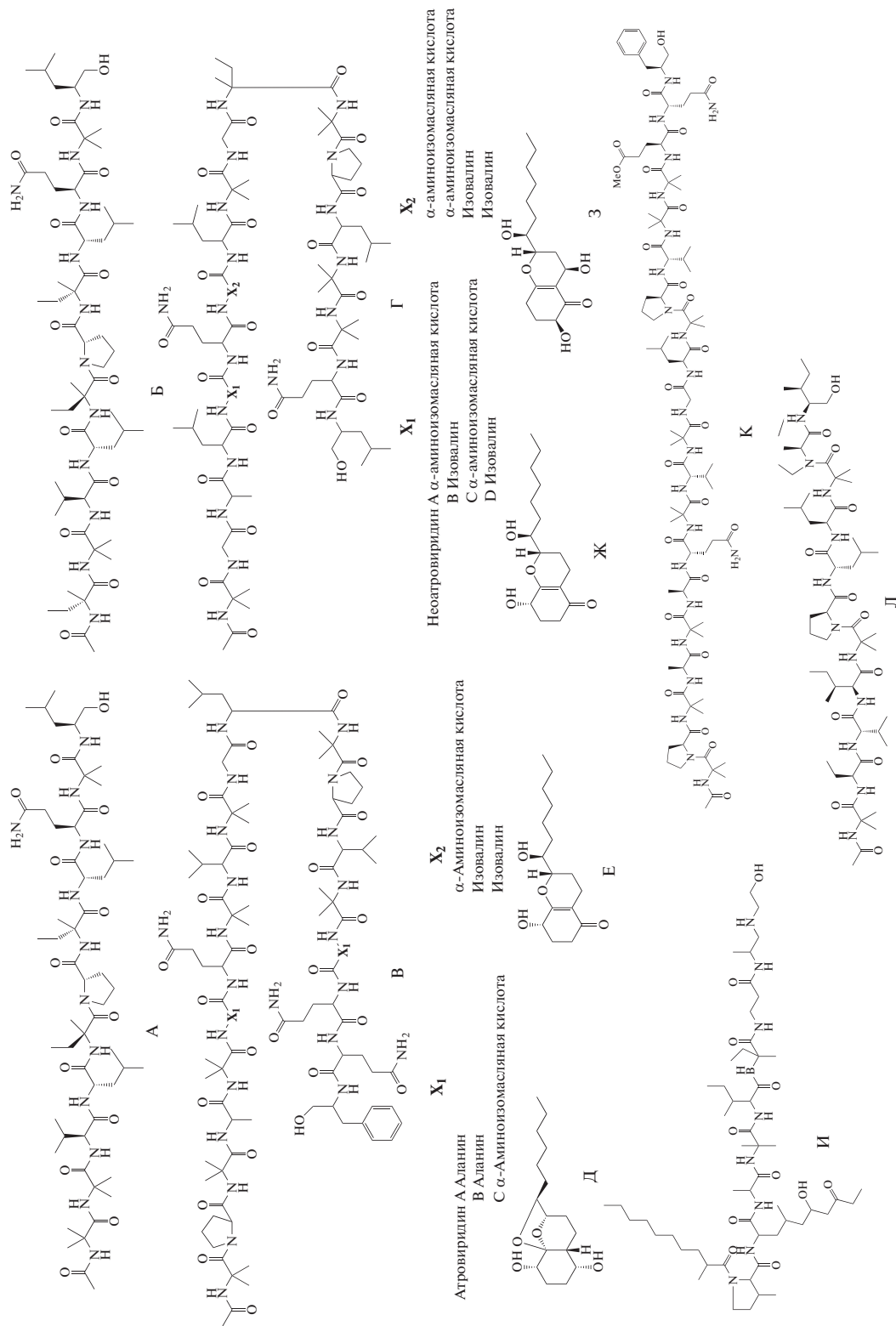


Рис. 1. Структура некоторых пептидов: А – альбупептин В [7]; Б – альбупептин Д [7]; В – атровиридин А – С [7]; Г – неоатровиридин А – Д [7]; Д – конингинин А; Е – конингинин Б [7]; Ж – конингинин Д [7]; З – конингинин Ф [7]; И – эмерициллин А [17]; К – Glu (OMe) 18-аланин В [7]; Л – трихоб-ревин ВПД-Д [7].



ложительных бактерий, а отрицательно заряженные головки PG обеспечивают электростатический поверхностный потенциал, способствующий внедрению амфипатического Alm в мембрану [16]. Также было показано, что другой пептаибол, трихоконин VI, вызывает изменение проницаемости мембран грибов и дезинтеграцию субклеточных структур, влияет на проницаемость митохондриальной мембраны и продукцию внутриклеточных АФК, индуцирует экспонирование фосфатидилсерина и, в конечном итоге, запускает метакаспазно-независимый апоптоз в *Fusarium oxysporum* [34, 35]. Лизию с соавт. [36] показала на пептидомиметических фолдамерах, что пространственная структура пептаибола является ключевой особенностью для проникновения в мембрану, и, предположительно, именно поэтому пептаиболы с низким содержанием Aib практически не могут нарушать ее целостность.

Полусинтетические аналоги на основе пептаибола трихогина, выделенного из *Trichoderma* sp., были разработаны и синтезированы для повышения их растворимости в воде и повышения антифунгальной активности в отношении экономически важного грибного патогена растений *Botrytis cinerea*. Эти молекулы имели одиночные аминокислотные замены, преимущественно Gly/Lys, расположенные внутри спиральной структуры [10]. Было показано, что подобная модификация увеличивала амфифильность пептидов и не приводила к критическим изменениям трехмерной ориентации. Что касается функциональных аспектов, большинство синтезируемых аналогов пептаиболов показали увеличение эффекта ингибирования в отношении *B. cinerea* [19, 20].

### ПЕПТАИБОЛЫ С АНТИФУНГАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Многие авторы указывают на антифунгальную активность пептаиболов, но в большинстве случаев эта активность проявляется в отношении грибов – фитопатогенов растений, которая в настоящее время активно изучается для внедрения этих соединений в качестве биофунгицидов [28–32, 34, 35, 37, 38]. Гораздо меньше исследований проведено в направлении изучения активности пептаиболов по отношению к клиническим изолятам патогенных микроскопических грибов [16, 39]. Такие недавно описанные соединения, а также спектр их антифунгальной активности представлены в табл. 1.

Атровиридины А – С и неоатровиридины А – D представляют собой 20- и 18-мерные пептаиболы *Trichoderma atroviride*, обладающие антимикробной активностью не только в отношении фитопатогенных грибов, но и в отношении *Candida albicans*. Пептаибин подавляет рост *Aspergillus fumigatus*, *C. albicans* и *C. neoformans*. Лонгибрахины А-II-b

проявляли ингибирующую активность в отношении условно-патогенного *A. fumigatus* [11]. Гипориенталин А, аналог пептаибола лонгибрахина-А-II, проявлял выраженную активность по отношению к клиническим изолятам *C. albicans* с минимальными ингибирующими концентрациями (МИК) от 2.49 до 19.66 мкМ, что сравнимо с таковой у антифунгального препарата амфотерицина В. Это указывает, что гипориенталин А подходит для лечения кандидоза [25, 40]. Септоцилиндрины А и В структурно родственны хорошо изученному пептаиболу аламетицину. Эти соединения проявляют умеренную активность в отношении *C. albicans* [41, 42]. Трихофунины А – D различаются своей способностью влиять на морфогенез *Phoma destructiva* [43]. Трибакопин AV, полученный из *T. lixii*, эндофита из *Vaccaria monnieri*, является новым пептаиболом с уникальной последовательностью (Ac-Gly-Leu-Leu-Leu-Ala-Leu-Pro-Leu-Aib-Val-Gln-OH). Было обнаружено, что этот пептаибол обладает активностью в отношении *C. albicans* при МИК 25 мкг/мл [34]. Четыре новых пептаибола с 11 аминокислотными остатками, альбупептины А – D, были выделены из мицелиальной культуры *Gliocladium album* KSH 719. Альбупептины В и D относятся к редкому классу пептаиболов, которые содержат оба стереоизомера изовалина (Iva) – D- и L-конфигурации. Альбупептины проявили умеренную активность в отношении *B. cinerea* и условно-патогенных *Aspergillus* sp. Примечательно, что эффект ингибирования роста *B. cinerea* увеличивался с увеличением количества присутствующих остатков Iva (IC50: один остаток Iva = 49.6 мкг/мл; два остатка Iva = 38.9 мкг/мл; три остатка Iva = 35.2 мкг/мл; четыре остатка Iva = 24.5 мкг/мл). Альбупептин А также не обладал значительной активностью в отношении *Phytophthora infestans* (IC50, 100 мкг/мл), а соединения В – D проявили только незначительную активность (IC50: два остатка Iva = 97.6 мкг/мл; три остатка Iva = 84.7 мкг/мл; четыре остатка Iva = 84.3 мкг/мл) [18].

Недавно Марик с соавт. [1, 10] идентифицировали две новые группы пептаиболов из грибов рода *Trichoderma*. Конингиопсины были получены из *T. koningiopsis*. Они структурно близки к триконингину KAV, который характеризуется наличием колеблющихся правых и левых спиральных конформаций. Ингибирующей активности экстрактов пептаибола на клинических дрожжах не было выявлено, тогда как условно-патогенные мицелиальные грибы проявляли значительную чувствительность [10]. Пептаиболы с последовательностью из 19 аминокислотных остатков – бревичеселсины, продуцируемые тремя видами (*T. flagellatum* SzMC 22608, *T. sinensis* SzMC 22609 и *T. parareesei* SzMC 22615), проявляли ингибирующее действие на условно-патогенные мицелиальные грибы [1].

Таблица 1. Пептаболы с антифунгальной, противоопухолевой и цитотоксической активностями, известные с 2010 г.

| Группа/Название       | Продуцент                                                                                        | Антифунгальная активность                                                                                                                                                          | Противоопухолевая и цитотоксическая активности                | Источник             |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------|
| Glu(OMe)18-аламетин   | <i>T. arundinaceum</i> MSX70741                                                                  | нд*                                                                                                                                                                                | Клеточные линии: HCT 116, DLD-1, HT-29, Hep-G2, Huh-7, HeLa   | [52]                 |
| Трихобревин ВІІІ-D    | <i>T. arundinaceum</i> MSX70741                                                                  | нд                                                                                                                                                                                 | HCT 116, HT-29                                                | [51]                 |
| Трихоконин VI         | <i>T. pseudokoningii</i>                                                                         | нд                                                                                                                                                                                 | HCC                                                           | [26]                 |
| Эмерициллипсины А – Е | <i>E. alkalina</i> ВКПМ F-1428                                                                   | <i>A. fumigatus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>Cr. neoformans</i> возбудители инвазивных микозов с мультирезистентностью | HepG2, Hela                                                   | [17, 39, 45, 46, 49] |
| Трихоконины (TKs)     | <i>T. longibrachiatum</i> SMF2                                                                   | <i>C. albicans</i>                                                                                                                                                                 | нд                                                            | [47]                 |
| Атровиридины А – С    | <i>T. atroviride</i>                                                                             | Фитопатогенные грибы                                                                                                                                                               | нд                                                            | [31]                 |
| Неоатровиридины А – D | <i>T. atroviride</i>                                                                             | Фитопатогенные грибы                                                                                                                                                               | нд                                                            | [31]                 |
| Гипориенталин А       | <i>T. orientale</i> LSBA1                                                                        | Клинические изоляты <i>C. albicans</i>                                                                                                                                             | Линия клеток Vero                                             | [6, 25, 40]          |
| Лонгибрахины А-II-b   | <i>T. longibrachiatum</i> MMS151                                                                 | Клинические изоляты <i>A. fumigatus</i>                                                                                                                                            | KB Cells                                                      | [11]                 |
| Трибакопин AV         | <i>T. lixii</i> ПІІМ-B4                                                                          | <i>C. albicans</i>                                                                                                                                                                 | нд                                                            | [34]                 |
| Конингиопсин          | <i>T. koningiopsis</i> SZMC 12500                                                                | <i>C. albicans</i> , <i>S. cerevisiae</i>                                                                                                                                          | нд                                                            | [1, 10]              |
| Триконингин KA V      | <i>T. koningiopsis</i> SZMC 12500                                                                | <i>A. alternata</i> , <i>R. solani</i> , <i>P. cucurbitacearum</i>                                                                                                                 | нд                                                            | [10]                 |
| Альбупептины B and D  | <i>G. album</i> KSH 719                                                                          | <i>B. cinerea</i> , <i>Septoria tritici</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Aspergillus</i> sp.                                                                               | нд                                                            | [18]                 |
| Гептабин              | <i>Emericellopsis</i> sp. BAUA828                                                                | <i>A. fumigatus</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i>                                                                                                                    | нд                                                            | [14, 35]             |
| Трихофумины А – D     | <i>Trichoderma</i> sp. HK10276                                                                   | <i>Phoma destructiva</i>                                                                                                                                                           | нд                                                            | [43]                 |
| Велутиболы А – D      | <i>T. velutinum</i>                                                                              | нд                                                                                                                                                                                 | Миелоидный лейкоз человека (HL-60)                            | [55]                 |
| Бревицелсины          | <i>T. flagellatum</i> SzMC 22608, <i>T. sinensis</i> SzMC 22609, <i>T. parareesei</i> SzMC 22615 | Опортунистические мицелиальные грибы                                                                                                                                               | нд                                                            | [1]                  |
| Сферостильбеллины     | <i>Sphaerosilbella toxica</i> (микопаразит)                                                      | Патогенные <i>C. albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>A. fumigatus</i>                                                                                               | Отсутствие токсического действия на мышечные клетки-макрофаги | [44]                 |
| Трилонгины BІ – BІV   | <i>Trichoderma</i> sp. P8BDA1F1 эндофит из <i>Begonia venosa</i>                                 | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>                                                                                                                                              | Амаститоты <i>Leishmania infantum</i>                         | [48]                 |

\* нд – нет данных.

Минимальные ингибирующие концентрации для сферостильбелинов А и В были установлены в размере 2.0 М для каждого из них в отношении *C. neoformans*, 1.0 М для *A. fumigatus* и 4.0 и 2.0 М, соответственно, для *C. albicans*. Хотелось бы отметить, что при этих концентрациях клетки макрофагов мыши оставались неизменными [44]. Наконец, последняя группа пептаиболов включает в себя эмерициллипсины А – Е из алкалофильного гриба *Emericellopsis alkalina*, продемонстрировавших многообещающую антифунгальную активность в отношении клинических изолятов *Aspergillus terreus* 1133m, *A. fumigatus* 163m, *A. ochraceus* 497m, *Saccharomyces cerevisiae* 77m и *Cryptococcus laurentii* с множественной лекарственной устойчивостью к флуконазолу и амфотерицину В [17, 39, 45, 46].

### ПЕПТАИБОЛЫ С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЯМИ

Некоторые пептаиболы также рассматриваются и в качестве основы для разработки противоопухолевых препаратов (табл. 1). Действительно, они проявляют избирательную цитотоксичность в отношении раковых клеток, которые отличаются физическими свойствами мембраны по сравнению со здоровыми клетками [46, 49]. Исследование пептидного комплекса из штамма *Trichoderma arundinaceum* MSX70741 привело к выделению трех новых пептаиболов с противоопухолевой активностью [50]. Цитотоксическая активность новых соединений оценивалась на линиях раковых клеток человека: НСТ 116 и DLD-1 (рак толстого кишечника), HT-29 (раковые клетки эпителия кишечника), SW948 (карцинома толстого кишечника), Hep-G2 и Huh-7 (гепатоцеллюлярные карциномы), HeLa (аденокарцинома). Трихобревин ВIII-D проявлял умеренную активность против клеток НСТ 116 и HT-29 со значениями IC<sub>50</sub> 6.8 и 6.7 мМ, соответственно, и не проявлял активности в отношении клеточных линий гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) и аденокарциномы [51]. Glu (OMe) 18-аламетицин F50 был наиболее активным соединением со значениями IC<sub>50</sub> от 2.5 до 6.5 мМ, у него отсутствовала селективность в отношении различных клеточных линий. Для 11 пептаиболов, о которых сообщалось ранее, выявлено, что их биоактивность коррелирует с гидрофобностью [52]. Айерс с соавт. [3] исследовали активность нескольких пептаиболов, полученных из экстрактов грибов порядка Нуроткреалес. Они смогли показать, что аламетицин, атровиридин, трихоконин и лонгибрахин проявляют не только цитотоксичность, но и избирательность в отношении раковых клеток. Ши с соавт. [26] обнаружили, что клетки ГЦК более чувствительны к трихоконину VI из *Trichoderma pseudokoningii*, чем нормальные клетки печени. Трихоконин VI вызывал апоптозную и аутофагическую гибель кле-

ток ГЦК, что указывает на потенциал пептаиболов в качестве новых противораковых агентов. Липопептаибол эмерициллипсин А проявил избирательную цитотоксическую активность в отношении двух клеточных линий: HepG2 и Hela (EC<sub>50</sub> 2.8 и 0.5 мкМ соответственно). Эмерициллипсин А проявлял меньшую цитотоксическую активность, чем доксорубин (EC<sub>50</sub> 14 и 0.34 мкМ соответственно), следовательно, он менее токсичен для нормальных клеток, чем последний (~40 раз), но оказывает более сильное цитотоксическое действие на линии опухолевых клеток [20, 49]. Пептаибол гипориенталин А синтезируется штаммом *T. orientale*, выделенным из средиземноморской морской губки *Cymbaxinella damicornis*. Цитотоксичность гипориенталина А оценивали на клеточной линии Vero. Было обнаружено, что при концентрации 33.84 мкМ он подавлял жизнеспособность клеток более чем на 90% [6]. Т. Марик с соавт. [1] исследовали частично очищенный экстракт пептаиболов из *T. reesei* QM9414. Они показали, что он ингибирует сперматозоиды кабана и клетки РК-15 почек свиней при концентрации раствора пептаиболов 8 мкг/мл, что вызвало опасения по поводу возможной токсичности *in vivo*. Дегенколб с соавт. предположили, что токсичность пептаиболов может быть ниже порога действия на человека [53].

Из библиотеки соединений Университета Оклахомы (Natural Products Discovery Group) были протестированы 52 пептаиболов и липопептаиболов на цитотоксическую активность в отношении гепатоцитов человека HepG2. Пять новых пептаиболов, аналогичных структуре трихорзина (Trichorzin NPDG А – Е) и восемь новых пептаиболов, аналогичных структуре гарцианина (Harzianin NPDG А-Н) из *T. harzianum*, подавляли рост клеток со значениями IC<sub>50</sub> 0.42 и 1.14 мкг/мл [54]. В рамках этого обширного исследования было собрано и охарактеризовано 30 новых пептаиболов и липопептаиболов, среди которых особенно стоит отметить гарцианин NPDG I. Было показано, что его показатель EC<sub>50</sub> в отношении полирезистентных простейших *Plasmodium falciparum* линии Dd2 – 0.10 мкМ. Отмечено также отсутствие общей токсичности в отношении HepG2 при самых высоких испытанных концентрациях (HepG2 EC<sub>50</sub> > 25 мкМ, индекс селективности >250) [54]. Велутибол А, новый пептаибол, содержащий 14 остатков аминокислот, был выделен из психрофильного гриба *T. velutinum*, обнаруженного в Гималаях. Была установлена его цитотоксическая активность в отношении линий раковых клеток. Анализ клеточного цикла был проведен на клетках миелоидного лейкоза человека (HL-60) и выявил образование апоптозных тел в клетках и повреждение их ДНК в зависимости от дозы [55]. Новый пептаибол RK-026A, полученный из *Trichoderma* sp. показал значения цитоток-

сичности IC<sub>50</sub> от 0.7 до 4.1 мкг/мл (1.5–8.1 мкг/мл) в отношении клеток K562, при этом отмечалась немедленная гибель раковых клеток [56]. Уникальное разнообразие синтезируемых химических соединений грибов расширяет наши представления о возможностях применения пептабиолов.

## ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИИ

Открытие новых пептабиолов среди продуцентов микроскопических грибов из морских глубин, из грибов, обитающих в холодных и засоленных почвах, а также из других уникальных экстремальных местообитаний расширяет возможности поиска новых пептидных антибиотиков из природных источников. В этот обзор мы включили информацию о некоторых недавно описанных пептидах, выделенных из экстремофильных грибов. Наличие Aib, придающего устойчивость к протеазам патогена, делает эти эксклюзивные пептидные антибиотики предпочтительными для фармакологических исследований. Несомненно, они будут играть важную роль в дальнейших разработках лекарственных соединений.

Лечение лейшманиоза с использованием пептабиолов — антиамебозина и сузукациллина А показало новые возможности для использования синергетических подходов к лечению с минимальным риском [56]. Новые антимикробные липопептабиолы эмерициллипсина могут стать альтернативой антифунгальным препаратам для терапии инвазивного микоза при аспергиллезе и криптококкозе с множественной лекарственной устойчивостью. Активность эмерициллипсина А в отношении резистентных патогенных клинических изолятов грибов была на уровне амфотерицина В. Кроме того, он показал низкую цитотоксическую активность по отношению к нормальной линии HPF, но обладал селективностью к раковым клеткам, в частности, по отношению к клеточным линиям K-562 и HCT-116. При этом он не проявлял гемолитической активности по отношению к эритроцитам человека [39, 46].

Хорошо известно, что основным молекулярным механизмом действия пептабиолов является мембранно-активный механизм, а линейная полипептидная цепь образует пространственную спиральную структуру. Можно предположить, что все пептабиолы с антифунгальной активностью также обладают цитотоксической активностью в отношении раковых клеток, что, однако, требует экспериментального подтверждения [42, 57, 58]. Доступность сложных биохимических методов и активное использование биоинформатики для открытия новых молекул и расшифровки их структуры, моделирование синтетических пептидов, использование синергетических эффектов двух или более пептабиолов для успешного лечения заболеваний

открывают новые возможности для дальнейших исследований этой группы соединений.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00992.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marik T., Tyagi C., Balázs D., Urbán P., Szepesi A., Bakacsy L., Endre G., Rakk D., Szekeres A., Andersson M.A., Salonen H., Druzhinina I., Vágvölgyi C., Kredics L. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. № 1434. P. 1–38. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01434>
2. Ramachander Turaga V.N. Peptaibols: Antimicrobial Peptides from Fungi // In Book: Bioactive Natural products in Drug Discovery. / Eds. J. Singh et al. Springer Nature Singapore Ltd. P. 713–730. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1394-7\\_26](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1394-7_26)
3. Ayers S., Ehrmann B.M., Adcock A.F., Kroll D.J., Carcache de Blanco E.J., Shen Q., Swanson S.M., Falkinham J.O., Wani M.C., Mitchell S.M., Pearce C.J., Oberlies N.H. // *J. Pept. Sci.* 2012. V. 18. № 8. P. 500–510. <https://doi.org/10.1002/psc.2425>
4. Zhao P., Xue Y., Li X., Jinghua L., Zhanqin Z., Chunshan Q., Weina G., Xiangyang Z., Xuefei B., Shuxiao F. // *Peptides*. 2019. V. 113. P. 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.02.002>
5. Park S.C., Park Y., Hahn K.S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2011. V. 12. № 9. P. 5971–5992. <https://doi.org/10.3390/ijms12095971>
6. Touati I., Ruiz N., Thomas O., Druzhinina I.S., Atanasova L., Tabbene O., Elkahoui S., Benzekri R., Bouslama L., Pouchus Y.F., Limam F. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 34. № 98. P. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2482-z>
7. Stoppacher N., Neumann N.K., Burgstaller L., Zeilinger S., Degenkolb T., Brückner H., Schuhmacher R. // *Chem. Biodivers.* 2013. V. 10. P. 734–743. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200427>
8. Waghu F.H., Idicula-Thomas S. // *Protein Science*. 2020. V. 29. P. 36–42. <https://doi.org/10.1002/pro.3714>
9. Anke H. // *ChemBioChem*. 2009. V. 10. P. 2266–2267. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900404>
10. Marik T., Tyagi C., Racic G., Rakk D., Szekeres A., Vágvölgyi C., Kredics L. // *Microorganisms*. 2018. V. 6. № 85. P. 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030085>
11. Mohamed-Benkada M., Pouchus Y.F., Vérité P., Pagniez F., Caroff N., Ruiz N. // *Chem. Biodivers.* 2016. V. 13. № 5. P. 521–530.
12. Oh L., Kim S.J., Yoo J.H. // *Tetrahedron Letters*. 2000. V. 41. № 1. P. 61–64. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(99\)02000-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(99)02000-6)
13. Degenkolb T., von Döhren H., Fog Nielsen K., Samuels G.J., Brückner H. // *Chem. Biodivers.* 2008. V. 5. P. 671–680. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890064>
14. Ishiyama D., Satou T., Senda H., Fujimaki T., Honda R., Kanazawa S. // *J. Antibiot (Tokyo)*. 2000. V. 53. P. 728–732. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.53.728>

15. Inostroza A., Lara L., Paz C., Perez A., Galleguillos F., Hernandez V., Becerra J., González-Rocha G., Silva M. // *Nat. Prod. Res.* 2018. V. 32. № 11. P. 1361–1364. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1344655>
16. Ovchinnikova T.V., Levitskaya N.G., Voskresenskaya O.G., Yakimenko Z.A., Tagaev A.A., Ovchinnikova A.Y., Murashev A.N., Kamenskii A.A. // *Chem Biodivers.* 2007. V. 4. № 6. P. 1374–1387. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200790117>
17. Rogozhin E.A., Sadykova V.S., Baranova A.A., Vasilchenko A.S., Lushpa V.A., Mineev K.S., Georgieva M.L., Kul'ko A.B., Krashenninnikov M.E., Lyundup A.V., Vasilchenko A.V., Andreev Y.A. // *Molecules.* 2018. V. 23(11). № 2785. P. 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules23112785>
18. Otto A., Laub A., Porzel A., Jürgen Schmidt J., Wessjohann L., Westermann B., Arnold N. // *Eur. J. Org. Chem.* 2015. V. 34. P. 7449–7459. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201501124>
19. Rivera-Chavez J., Huzefa A.R., Graf T.N., Gallagher J.M., Metri P., Xue D., Pearce C.J., Oberlies N.H. // *RSC Advances.* V. 7. № 72. P. 75733–75741. <https://doi.org/10.1039/c7ra09602j>
20. Höfer S., Berg A., Brückner H., Mayerhöfer T.G. // *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2019. V. 223. № 117368. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117368>
21. Brückner H., Fox S., Degenkolb T. // *Chem Biodivers.* 2019. V. 16(9):e1900276. P. 1–22. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900276>
22. Wang C., Wu P., Yao L., Xue J., Xu L., Li H., Deng W., Wei X. // *J. Antibiot. (Tokyo).* 2018. V. 71. № 11. P. 927–938. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0086-3>
23. Quandt C.A., Bushley K.E., Spatafora J.W. // *BMC Genomics.* 2015. V. 16:553. P. 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1777-9>
24. Benedetti E., Bavoso A., Di Blasio B., Pavone V., Pedone C., Toniolo C., Bonora G.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. V. 79. P. 7951–7954. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.24.7951>
25. Marik T., Urbán P., Tyagi C., Szekeres A., Leitgeb B., Vágvolgyi M., Manczinger L., Druzhinina I.S., Kredics L. // *Chem. Biodivers.* 2017. V. 14. № 6. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700033>
26. Shi M., Chen L., Wang X.W., Zhang T., Zhao P.B., Song X.Y., Sun C.Y., Chen X.L., Zhou B.C., Zhang Y.Z. // *Microbiology.* 2012. V. 158. P. 166–175. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052670-0>
27. Song X.Y., Shen Q.T., Xie S.T., Chen X.L., Sun C.Y., Zhang Y.Z. // *Microbiol. Lett.* 2006. V. 260. P. 119–125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00316.x>
28. Szekeres A., Leitgeb B., Kredics L., Antal Z., Hatvani L., Manczinger L., Vágvolgyi C. // *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2005. V. 52. P. 137–168. <https://doi.org/10.1556/AMicr.52.2005.2.2>
29. Neuhofer R., Dieckmann R., Druzhinina I.S., Kubicek C.P., von Döhren H. // *Microbiology.* 2007. V. 153. P. 3417–3437. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006692-0>
30. Tyagi C., Marik T., Vágvolgyi C., Kredics L., Ötvös F. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 4268. P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms20174268>
31. Oh S.U., Yun B.S., Lee S.J., Kim J.H., Yoo I.D. // *J. Antibiot. (Tokyo).* 2002. V. 55. P. 557–564. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.55.557>
32. Ding G., Chen L., Zhou C., Jia H.M., Liu Y.T., Chang X., Song B., Liu X.Z., Gu Y.C., Zou Z.M. // *J. Antibiot.* 2015. V. 68. P. 409–413. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.1>
33. Singh V.P., Yedukondalu N., Sharma V., Kushwaha M., Sharma R., Chaubey A., Kumar A., Singh D., Vishwakarma R.A. // *J. Nat. Prod.* 2018. V. 81. P. 219–226
34. Katoch M., Singh D., Kapoor K.K., Vishwakarma R.A. // *BMC Microbiology.* 2019. V. 19. № 98. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1477-8>
35. Zotti M.D., Biondi B., Peggion C., Park Y., Hahm K.S., Formaggio F., Toniolo C. // *J. Pept. Sci.* 2011. V. 17. P. 5855–5894. <https://doi.org/10.1002/psc.1364>
36. Lizio M.G., Campana M., de Poli M., Jefferies D.F., Cul-len W., Andrushchenko V., Chmel N.P., Bouř P., Khalid S., Clayden J., Blanch E., Rodger A., Simon J. Webb S.J. // *ChemBioChem.* 2021. V. 22. P. 1–13. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000834>
37. Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Lyukmanova E.N., Gizatullina A.K., Zhuravleva A.V., Tagaev A.A., Yakimenko Z.A., Telezhinskaya I.N., Kirpichnikov M.P., Ovchinnikova T.V., Arseniev A.S. // *Chem. Biodivers.* 2013. V. 10. № 5. P. 838–863. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200421>
38. Berg A., Grigoriev P.A., Degenkolb T., Neuhofer T., Härtl A., Schlegel B., Gräfe U. // *J. Pept. Sci.* 2003. V. 9. P. 810–816. <https://doi.org/10.1002/psc.498>
39. Baranova A.A., Rogozhin E.A., Georgieva M.L., Bilanenko E.N., Kulko A.B., Yakushev A.V., Alferova V.A., Sadykova V.S. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. V. 55. № 2. P. 145–151. <https://doi.org/10.1134/S0003683819020030>
40. Kredics L., Szekeres A., Czifra D., Vágvolgyi C., Leitgeb B. // *Chem. Biodivers.* 2013. V. 10. P. 744–771. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200390>
41. Summers M.Y., Kong F., Feng X., Siegel M.M., Janso J.E., Graziani E.I., Carter G.T. // *J. Nat. Prod.* 2007. V. 70. P. 391–396. <https://doi.org/10.1021/np060571q>
42. Nelissen J., Nuyts K., de Zotti M., Lavigne R., Lamberigts C., de Borggraeve W.M. // *PLoS One.* 2012. V. 7(12). № e51708. P. 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051708>
43. Berg A., Grigoriev P.A., Degenkolb T., Neuhofer T., Härtl A., Schlegel B., Gräfe U. // *J. Peptide Sci.* 2003. V. 9. P. 810–816. <https://doi.org/10.1002/psc.498>
44. Perlatti B., Nichols C.N., Alspaugh J.A., James B., Gloer J.B., Bills G.F. // *Biomolecules.* 2020. V. 10. № 1371. P. 1–15. <https://doi.org/10.3390/biom10101371>
45. Baranova A.A., Georgieva M.L., Bilanenko E.N., Andreev Ya.A., Rogozhin E.A., Sadykova V.S. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2017. V. 53. P. 703–710. <https://doi.org/10.1134/S0003683817060035>

46. Kuvarina A.E., Gavryushina I.A., Kulko A.B., Ivanov I.A., Rogozhin E.A., Georgieva M.L., Sadykova V.S. // *J. Fungi*. 2021. V. 7. № 153. P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/jof7020153>
47. Zhao P., Ren A., Dong P., Sheng Y. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018. V. 54. № 4. P. 396–403. <https://doi.org/10.1134/S0003683818040154>
48. Grigoletto D.F., Trivella D.B.B., Tempone A.G., Rodrigues A., Correia A.M.L., P. Lira S.P. // *Brazilian J. Microbiology*. 2020. V. 51. P. 989–997. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00270-9>
49. Rogozhin E.A., Sadykova V.S. // *Proceedings*. 2019. V. 22. № 1. P. 4. <https://doi.org/10.3390/proceedings2019022004>
50. Rivera-Chávez J., Raja H.A., Graf T.N., Gallagher J.M., Metri P., Xue D., Pearce C.J., Oberlies N.H. // *Royal society of chemistry*. 2017. V. 7. P. 45733–45741. <https://doi.org/10.1039/C7RA09602J>
51. Li M.-F., Li G.-H., Zhang K.-Q. // *Metabolites*. 2019. V. 9. № 58. P. 1–24. <https://doi.org/10.3390/metabo9030058>
52. Rivera-Chávez J., Raja H.A., Graf T.N., Gallagher J.G., Metri P., Xue D., Pearce C.J., Oberlies N.H. // *RSC Adv*. 2017. V. 7. P. 45733–45741. <https://doi.org/10.1039/C7RA09602J>
53. Degenkolb T., Fog K., Dieckmann N.D., Rocha F.B., Chaverri P., G.J. Samuels G.J., Thrane U., von Dohren H., Vilcinskis A., Bruckner H. // *Chem. Biodivers.* 2015. V. 12. P. 662–684. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201400300>
54. Lee J.W., Collins J.E., Wendt K.L., Chakrabarti D., Cichewicz R.H. // *J. Nat. Prod.* 2021. V. 84. № 2. P. 503–517. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01370>
55. Singh V.P., Pathania A.S., Kushwaha M., Singh S., Sharma V., Malik F.A., Khan I., Kumar A., Singh D., Vishwakarma R.A. // *RSC Advances*. 2020. V.10. № 52. P. 31233–31242. <https://doi.org/10.1039/D0RA05780K>
56. Rawa M.S.A., Nogawa T., Okano A., Futamura Y., Nakamura T., Wahab H.A., Osada H. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2021. V. 85. № 1. P. 69–76. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbab051>
57. Martinez A.F., Moraes L.A. // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2015. V. 68. № 3. P. 178–184. <https://doi.org/10.1038/ja.2014.120>
58. Claudon P., Violette A., Lamour K., Decossas M., Fournel S., Heurtault B., Godet J., Mely Y., Jamart-Gregoire B., Averlant-Petit M.C., Briand J.P., Duportail G., Monteil H., Guichard G. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010. V. 49. P. 333–336.

## Peptaibols as Potential Antifungal and Anticancer Antibiotics: Current and Foreseeable Development (Review)

I. A. Gavryushina<sup>a</sup>, M. L. Georgieva<sup>a,b</sup>, A. E. Kuvarina<sup>a,\*</sup>, and V. S. Sadykova<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup>Gause Institute New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

<sup>b</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow 119234 Russia

\*e-mail: nastena.lysenko@mail.ru

\*\*e-mail: sadykova\_09@mail.ru

Today's shortage of effective antimicrobial agents can be overcome by using antimicrobial peptides, which are produced naturally by a wide range of organisms, including microorganisms, plants, and mammals. Among these chemical groups, peptaibols are the well-known compounds with various biological activities, including antibacterial, antifungal, anticancer, antimycoplasmic, antitrypanosomal, and others. In this review, we summarize today's knowledge on the sources, direct surface applications, and the mode of action of the peptaibols with anticancer and antifungal activity produced by filamentous fungi.

**Keywords:** peptaibols, antibacterial, antifungal, anticancer activities, peptide antibiotics

УДК 577.112577.122

## ФОТООКИСЛЕНИЕ ТЕТРАГИДРОБИОПТЕРИНА – КЛЮЧЕВОЙ ПРОЦЕСС ФОТОТЕРАПИИ ВИТИЛИГО

© 2021 г. Т. А. Телегина<sup>1,2,\*</sup>, Ю. Л. Вечтомова<sup>1</sup>, М. С. Крицкий<sup>1</sup>, Э. И. Мадиров<sup>2,3</sup>,  
А. С. Низамутдинов<sup>3</sup>, Ю. Н. Обухов<sup>1,2</sup>, А. А. Буглак<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

<sup>3</sup>Казанский федеральный университет, Казань, 420008 Россия

\*e-mail: [telegina@inbi.ras.ru](mailto:telegina@inbi.ras.ru)

Поступила в редакцию 02.04.2021 г.

После доработки 12.04.2021 г.

Принята к публикации 23.04.2021 г.

В контексте патологии и терапии витилиго исследованы процессы автоокисления и фотоокисления тетрагидробиоптерина (**H<sub>4</sub>Бип**) – кофермента, присутствующего в 3–5-кратном избытке при витилиго. Изучение кинетики автоокисления **H<sub>4</sub>Бип** и ВЭЖХ анализ продуктов реакции показали, что автоокисление проходило интенсивно с константой скорости  $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$  с образованием дигидробиоптерина, дигидроптерина и их окисленных производных. Анализ данных по автоокислению привел к новому выводу о том, что окисление избытка **H<sub>4</sub>Бип** в меланоцитах, очевидно, запускает автокаталитический цикл синтеза избытка пероксида водорода (**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**), который в свою очередь активирует интерферон-индуцибельную ГТФ-циклогидролазу, синтезирующую избыток **H<sub>4</sub>Бип**. Автокатализический цикл избыточного синтеза **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**, по-видимому, лежит в основе патологии витилиго. Избыток **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** также частично расходуется для активации иммунной системы. Разорвать автокаталитический цикл можно путем перевода **H<sub>4</sub>Бип** в димеры дигидроптерина при его УФ-фотоокислении. Исследована кинетика фотоокисления **H<sub>4</sub>Бип**, идентифицированы продукты реакции и рассчитаны квантовые выходы образования димеров дигидроптерина. На основании данных по квантовым выходам построен спектр действия УФ-излучения, демонстрирующий, что диапазон 300–325 нм является эффективным для фототерапии витилиго.

**Ключевые слова:** витилиго, тетрагидробиоптерин, меланогенез, меланин, окислительный стресс, **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**, УФВ-фототерапия витилиго, автокаталитический цикл при витилиго

DOI: 10.31857/S0555109921050160

Витилиго – это дерматологическое заболевание, характеризующееся образованием депигментированных пятен вследствие нарушения биосинтеза меланина [1–3]. Заболеваемость витилиго по странам колеблется от 0.1 до 4.0% [4–7]. Наблюдается рост заболеваемости этой болезнью, что определяет актуальность данного исследования. Витилиго является иммуноопосредованным, многофакторным заболеванием, в патогенезе которого важна генетическая предрасположенность, а также факторы внутренней и внешней среды. Первоначальный взгляд на витилиго как на аутоиммунное заболевание уступает место пониманию того, что иммунной атаке на меланоциты предшествуют внутренние процессы в самих пигмент-синтезирующих клетках.

Пусковой момент нарушений меланогенеза в меланоцитах, по-видимому, связан с функционированием тетрагидробиоптерина (**H<sub>4</sub>Бип**) – ко-

фермента фенилаланин-гидроксилазы (фенилаланин-4-монооксигеназа, КФ 1.14.16.1). В меланоцитах тирозин образуется при гидроксилировании фенилаланина с участием кофермента **H<sub>4</sub>Бип**, далее тирозин с помощью медь-зависимой тирозиназы (КФ 1.14.18.1) преобразуется в диоксифенилаланин (ДОФА), и далее на пути к меланину образуется ДОФА-хром. При витилиго в меланоцитах фиксируется 3–5 кратный избыток **H<sub>4</sub>Бип**, который ингибирует тирозиназу – ключевой фермент в синтезе меланина [2, 8–11].

Важным является то, что, будучи восстановленным соединением **H<sub>4</sub>Бип** легко окисляется кислородом воздуха (автоокисление), как *in vitro*, так и *in vivo* [12]. Образование окисленных производных сопровождается образованием пероксида водорода (**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**). При витилиго в коже больных идентифицирован **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** в миллимолярных кон-

центрациях [11], т.е. имеет место окислительный стресс. В работе [13] было показано, что УФ облучение определенных диапазонов длин волн усиливает автоокисление за счет возбуждения самого  $H_4Бип$  ( $\lambda_{\text{max возб.}}$  298 нм), но в основном за счет возбуждения окисленного биоптерина, запускающего процесс фотосенсибилизированного окисления  $H_4Бип$  при облучении в области поглощения окисленного биоптерина (350 нм). Такое фотоокисление  $H_4Бип$  может приводить к накоплению  $H_2O_2$  и этим пролонгировать витилиго [13–15].

Метод УФВ-фототерапии, использующий средневолновый УФ (308 и 311 нм) для лечения витилиго [11, 16], является наиболее успешным методом лечения витилиго, но механизм терапевтического эффекта долго оставался невыясненным. Предложена гипотеза и приведены аргументы в ее пользу, согласно которой главной мишенью УФВ-излучения является  $H_4Бип$  [17]. Впервые было показано образование димеров азоциклобутанового типа при УФВ-фотоокислении  $H_4Бип$ . Доказано фотообразование из  $H_4Бип$  димеров дигидроптерина ( $(H_2Птр)_2$ ).

Выяснение роли  $H_4Бип$  в патогенезе и фототерапии витилиго проведено далеко не в полном объеме и требует дальнейших исследований. Цель настоящей работы – изучение механизма фотоокисления  $H_4Бип$ : идентификация продуктов реакции и нахождение максимума в спектре действия УФ-излучения с целью оптимизации УФВ-фототерапии витилиго.

## МЕТОДИКА

**Реактивы.** 5,6,7,8-тетрагидро-L-биоптерин ( $H_4Бип$ ), 7,8-дигидро-L-биоптерин ( $H_2Бип$ ), дигидроксантоптерин ( $H_2Ксп$ ), L-биоптерин (**Бип**), ксантоптерин (**Ксп**) и птерин (**Птр**) фирмы “Schircks Laboratories” (Швейцария). Остальные реактивы, использованные в работе, были получены от “Sigma-Aldrich” (США).

**Приготовление образцов.** В работе использовали растворы  $H_4Бип$  в 0.1 М Трис-НСl буфере, рН 7.2. Растворы готовили растворением сухого препарата  $H_4Бип$  непосредственно перед проведением эксперимента, концентрацию образцов определяли по молярному коэффициенту экстинкции ( $\epsilon_{297} = 10200 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$  для рН 7.0).

**УФ-облучение.** Свежеприготовленные растворы  $H_4Бип$  облучали при постоянном перемешивании на воздухе в 1 см кварцевой кювете, используя в качестве источника УФ-света спектрофлуориметр FluoroMax 4 (“Horiba Scientific”, Япония) или в кварцевой кювете 0.3 см, используя в качестве источника перестраиваемый УФ-лазер на активной среде  $LiLu_{0.7}Y_{0.3}F_4:Ce + Yb$ .

Облучение на спектрофлуориметре проводили при длинах волн 300, 305, 308, 311, 315, 320, 325, 330, 335, 340 и 350 нм со спектральной шириной щели 20 нм в течение различных промежутков времени (1 или 2 мин). Темновые интервалы, в течение которых производили запись спектров облученных образцов, составляли 2 мин. Темновые контроли к опытам по облучению ставили параллельно к каждому опыту. В темновых контролях протекал только процесс автоокисления  $H_4Бип$ .

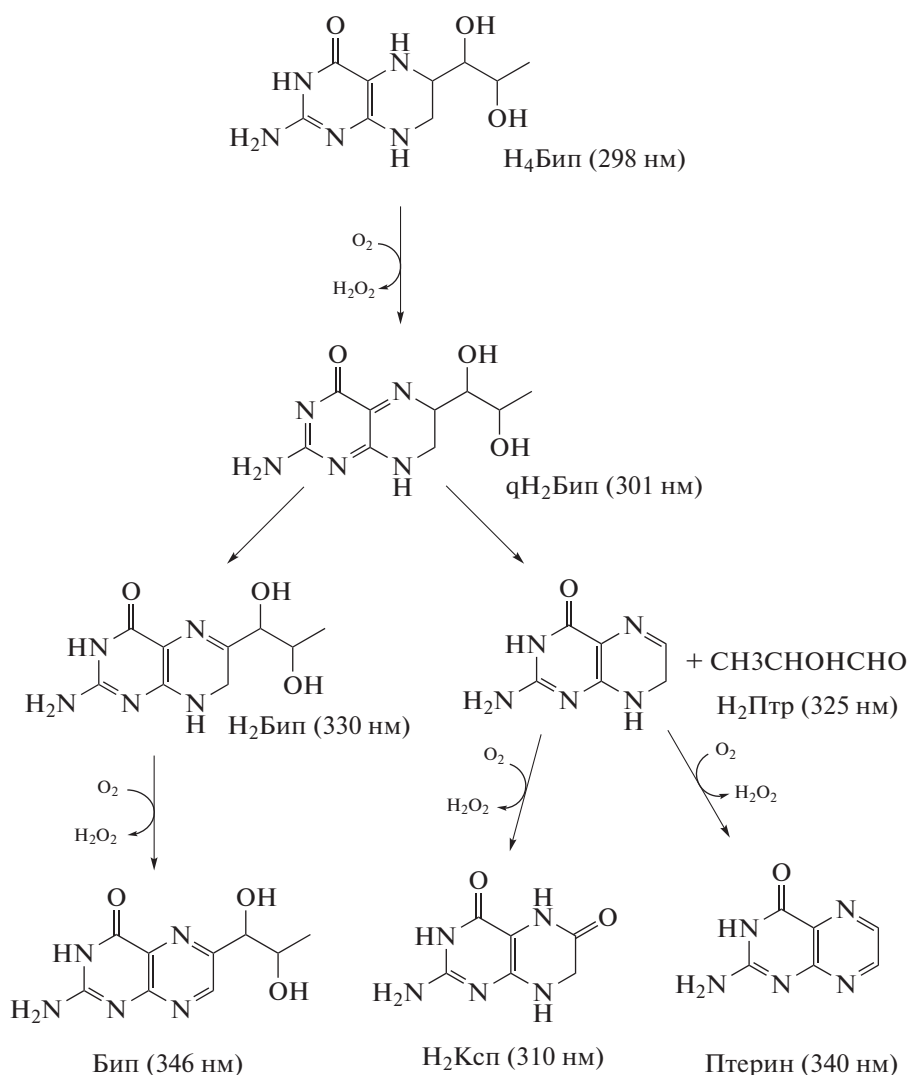
В работе использовался перестраиваемый УФ-лазер на основе кристалла  $LiLu_{0.7}Y_{0.3}F_4$ , активированного ионами  $Ce^{3+}$  и  $Yb^{3+}$ . В качестве источника накачки применялся лазер на кристалле  $LiCaAlF_6$ , активированном ионами  $Ce^{3+}$  (290 нм), источником возбуждения для которого в свою очередь служило 266 нм излучение 4-ой гармоники лазера YAG:Nd (LQ529B) “SolarLS” (Беларусь). Образец облучался лазером на длинах волн 290, 300, 308, 310, 312, 325 и 330 нм. Условия проведения эксперимента аналогичны облучению на спектрофлуориметре.

Концентрация димеров дигидроптерина определялась по изменению в поглощении полосы в области 245 нм и рассчитывалась с учетом коэффициента экстинкции ( $\epsilon_{245} = 37000 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$  для рН 7).

**Методы исследования.** Запись спектров поглощения темновых контролей и облучаемых образцов проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-1601 (Япония) или Cary 300 Bio (“Varian”, США) в Центре коллективного пользования ФИЦ “Биотехнологии” РАН. Плотность мощности ( $\text{Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ ) излучения, поглощаемого образцом, измеряли радиометром Аргус-04 (“ВНИИОФИ”, Россия).

ВЭЖХ анализ продуктов реакции проводили на катионообменной колонке Luna 5u SCX 100A (“Phenomenex”, США). Подвижная фаза содержала 0.1 М Na-цитратный буфер рН 2.7, предварительно дегазированный, продуваемый аргоном во время проведения хроматографии. Скорость потока  $0.4 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ , время анализа 40 мин. Время выхода веществ устанавливали по времени выхода свидетелей – препаратов  $H_4Бип$  и его окисленных производных. Свидетеля – дигидроптерина не было, так как это соединение неустойчиво и не производится ни одной фирмой. Детекцию продуктов реакции проводили с помощью трех детекторов подключенных последовательно: спектрофотометрического (267 нм), флуориметрического ( $\lambda_{\text{возб}}$  330 нм,  $\lambda_{\text{флуор}}$  440 нм) и электрохимического (+0.7 В). Такое подключение детекторов позволяло наиболее точно установить продукты реакции, поскольку все они имели разную степень окисления и флуоресцентные свойства.





**Рис. 1.** Схема автоокисления  $H_4$ Бип. В скобках указаны длинноволновые максимумы в спектрах поглощения [17].

Для проведения анализа аликвота образца смешивалась в соотношении 1 : 1 с раствором 0.1 М цитрата натрия pH 2.4, результирующее pH 2.7 соответствовало pH подвижной фазы на колонке. Далее раствор хранился при температуре 4°C до проведения анализа. В кислой среде все продукты реакции переходят в катионную форму, которая является более устойчивой к окислению, что позволяло разделять продукты реакции на катионобменной колонке и избежать дальнейшего окисления продуктов реакции.

**Расчет квантового выхода фотореакции.** Квантовый выход образования димера дигидроптерина ( $\text{H}_2\text{Птр}$ )<sub>2</sub> рассчитывали по формуле:

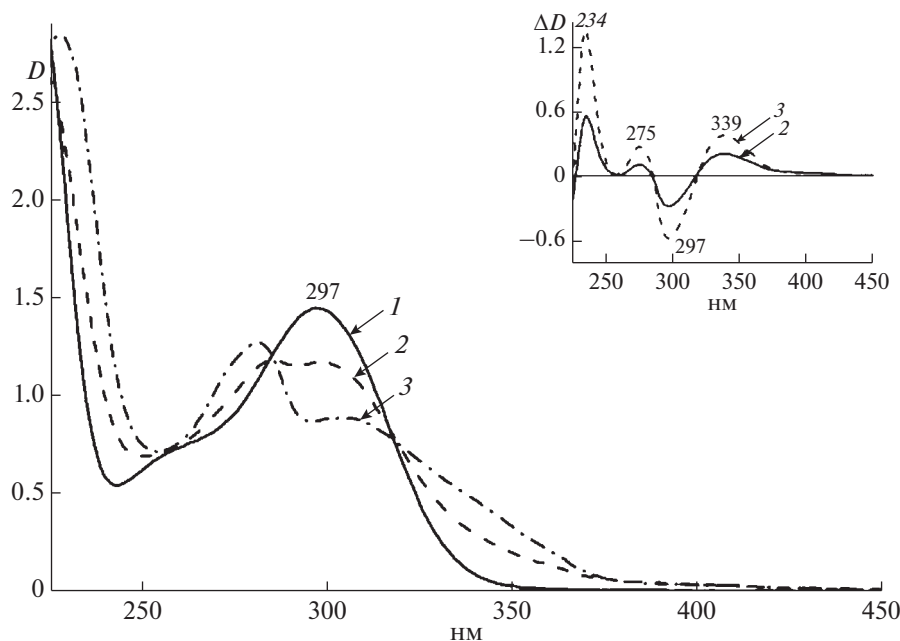
$$\Phi = \frac{\Delta A \times V \times Na}{\tau \times \Delta E \times l \times In},$$

где  $\Delta A$  — изменение концентрации облучаемого раствора при 245 нм в единицах оптической плотности:

$V$  – объем облучаемого раствора в литрах;  
 $Na$  – число Авогадро, моль<sup>-1</sup>;  
 $\tau$  – время облучения, с;  
 $l$  – толщина поглощающего слоя, см;  
 $In$  – интенсивность поглощаемого света, квант/с;  
 $\Delta E$  – разность молярных коэффициентов экстинкции димера дигидроптерина и Н<sub>4</sub>Бип при 245 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Автоокисление тетрагидробиоптерина.** Н<sub>4</sub>Бип является высокоактивным восстановленным соединением, которое подвержено спонтанному автоокислению молекулярным кислородом как *in vivo*, так и *in vitro* в водных растворах [12]. Как видно из рис. 1 первым продуктом автоокисления является неустойчивый 6,7-хиноноидный дигид-

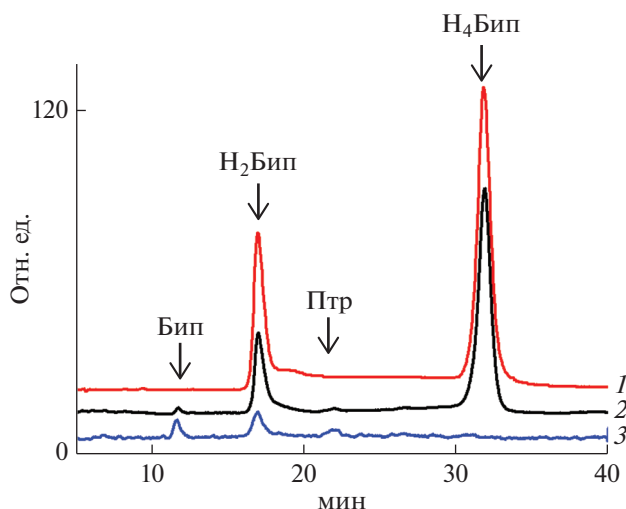


**Рис. 2.** Изменение во времени спектров поглощения раствора  $1.42 \times 10^{-4}$  М  $\text{H}_4\text{Бип}$  в 0.1 М Трис-НСI буфере рН 7.2 в присутствии кислорода воздуха. 1 — исходный раствор, 2 — через 15 мин, 3 — через 30 мин. На врезке разностные спектры (время в темноте — 0 мин).

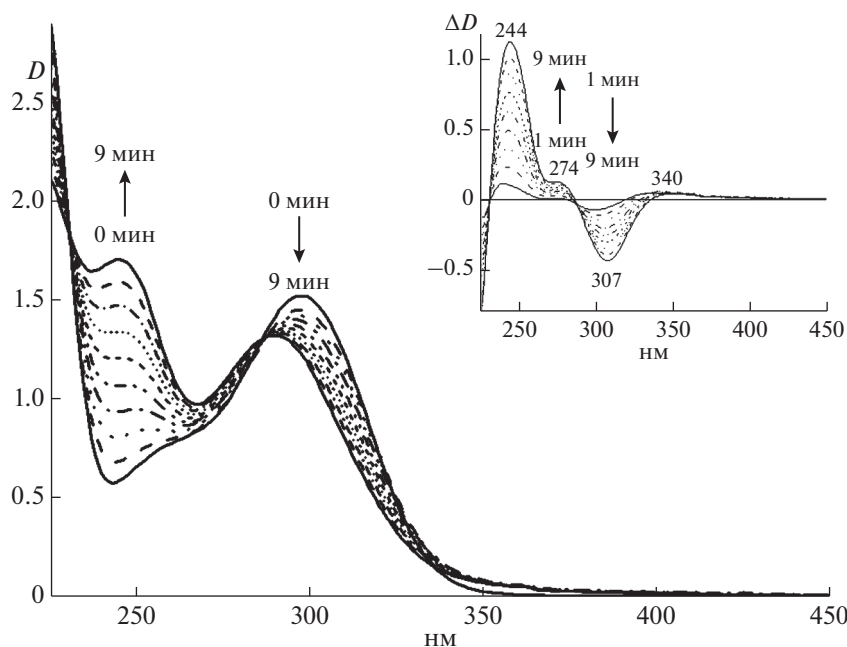
робиоптерин ( $\text{qH}_2\text{Бип}$ ) со временем жизни 1.5 мин. Затем он изомеризуется в более стабильный  $\text{H}_2\text{Бип}$  или трансформируется в  $\text{H}_2\text{Птр}$  с отрывом бокового радикала-дигидроксипропила. Далее  $\text{H}_2\text{Бип}$  переходит в полностью окисленную форму — биоптерин, а неустойчивый дигидропте-

рин ( $\text{H}_2\text{Птр}$ ) окисляется кислородом до птерина или до  $\text{H}_2\text{Ксп}$ .

В зависимости от рН среды, температуры и природы буфера будет преобладать  $\text{H}_2\text{Бип}$  или  $\text{H}_2\text{Птр}$  и их полностью окисленные формы. В серии экспериментов по исследованию темновых процессов автоокисления спектрофотометрически показано, что по мере протекания процесса убывает полоса поглощения  $\text{H}_4\text{Бип}$  (297 нм) и нарастает поглощение в области 275–280 нм и в области 325–340 нм, которые характеризуют накопление  $\text{H}_2\text{Бип}$ ,  $\text{H}_2\text{Птр}$ , Бип и Птр (рис. 2). Изучение кинетики автоокисления показало, что процесс идет довольно интенсивно с константой скорости  $1 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ . Уточнение характера окисления  $\text{H}_4\text{Бип}$  в условиях эксперимента и количественное определение продуктов темнового автоокисления было проведено методом ВЭЖХ (рис. 3). Как видно из рис. 3 в результате ВЭЖХ анализа установили образование  $\text{H}_2\text{Бип}$ , Бип и Птр при проведении автоокисления  $\text{H}_4\text{Бип}$  в течение 30 мин. Полученные результаты говорят о том, что за столь короткий промежуток времени может протекать довольно глубокое автоокисление  $\text{H}_4\text{Бип}$  с образованием дигидро- и полностью окисленных птериновых производных. Об образовании неустойчивого  $\text{H}_2\text{Птр}$  при окислении  $\text{H}_4\text{Бип}$  свидетельствует идентифицированный на хроматограмме продукт его дальнейшего спонтанного окисления — Птр.



**Рис. 3.** ВЭЖХ-анализ продуктов окисления  $1.42 \times 10^{-4}$  М  $\text{H}_4\text{Бип}$  (0.1 М Трис-НСI буфер, рН 7.2) через 30 мин в темноте. 1 — спектрофотометрический детектор (267 нм); 2 — электрохимический детектор (+0.7 В); 3 — флуориметрический детектор ( $\lambda_{\text{возб.}}$  330 нм,  $\lambda_{\text{флуор.}}$  440 нм).



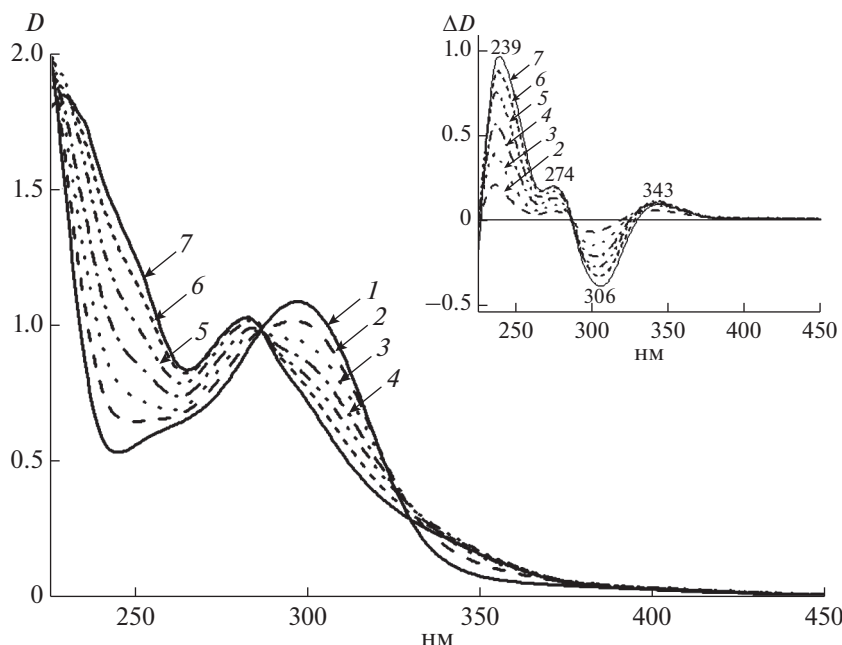
**Рис. 4.** Изменение спектров поглощения раствора  $1.46 \times 10^{-4}$  М  $\text{H}_4\text{Бип}$  в 0.1 М Трис-НСl буфере рН 7.2 при ступенчатом облучении  $325 \pm 10$  нм на флуориметре в присутствии кислорода воздуха. На врезке — разностные спектры (время облучения — 0 мин).

При этом на всех этапах окисления идет образование  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Благодаря процессам автоокисления 3–5-кратного избытка  $\text{H}_4\text{Бип}$ , имеющего место при витилиго, в коже накапливается  $\text{H}_2\text{O}_2$  в миллимолярных концентрациях, ведущих к окислительному стрессу.  $\text{H}_2\text{O}_2$  при посредстве цитокинов, в частности  $\gamma$ -интерферона, может активировать ГТФ-циклогидролазу (КФ 3.5.4.16), синтезирующую избыточное количество  $\text{H}_4\text{Бип}$ , который неизбежно будет автоокисляться с образованием  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Можно предположить, что, таким образом, может запускаться автокаталитический цикл избыточного синтеза  $\text{H}_2\text{O}_2$  при витилиго. Известно, что одной из функций активных форм кислорода, в частности  $\text{H}_2\text{O}_2$ , является индукция иммунной системы. Действительно при витилиго активируются системы гуморального и клеточного иммунитета, ведущие к уменьшению количества меланоцитов, продуцирующих меланин.

**Фотоокисление  $\text{H}_4\text{Бип}$ .** Было проведено несколько серий опытов по фотоокислению  $\text{H}_4\text{Бип}$ , в которых изменяли длину волны возбуждающего света. В сериях опытов, в которых изменяющейся величиной была длина волны УФ, раствор  $\text{H}_4\text{Бип}$  облучали ультрафиолетовым излучением с различными длинами волн в интервале 300–350 нм. Каждая отдельно взятая длина волны имела разброс в 10 нм, который обеспечивался спектральной шириной щели в 20 нм в спектрофлуориметре, используемом нами в качестве источника УФ-света.

На рис. 4 приведены результаты опыта по облучению раствора  $1.46 \times 10^{-4}$  М  $\text{H}_4\text{Бип}$  в Трис-НСl (рН 7.2) излучением с длиной волны  $325 \pm 10$  нм, при этом интервал облучения составлял 1 мин, а темновой интервал между облучениями составлял 2 мин. На разностном спектре поглощения (рис. 4, врезка) можно видеть, что по мере облучения убывало соединение с максимумом длинноволнового поглощения при 307 нм и нарастало поглощение в области 245 нм, а также перегиб в области 275 нм. Это может указывать на убыль промежуточного межмолекулярного комплекса хиноноидный дигидроптерин-дигидроптерин ( $\text{qH}_2\text{Птр}-\text{H}_2\text{Птр}$ ) и нарастание количества образующегося  $(\text{H}_2\text{Птр})_2$ . Промежуточный межмолекулярный комплекс может образовываться при донорно-акцепторных взаимодействиях бензоидной формы дигидроптеринов ( $\text{H}_2\text{Птр}$  или  $\text{H}_2\text{Бип}$ ) с хиноноидной формой дигидроптеринов ( $\text{qH}_2\text{Птр}$  или  $\text{qH}_2\text{Бип}$ ). Образующийся межмолекулярный комплекс имеет, очевидно, поглощение с максимумом при 307 нм, что выявлено по появлению полосы при 307 нм в спектре четвертой производной спектра поглощения исходного  $\text{H}_4\text{Бип}$ . Именно полоса поглощения с максимумом 307 нм убывала при проведении фотоокисления  $\text{H}_4\text{Бип}$  при всех исследуемых длинах волн в интервале 300–350 нм.

В качестве примера опытов по облучению с помощью перестраиваемого УФ-лазера раство-



**Рис. 5.** Изменение спектров поглощения раствора  $1.07 \times 10^{-4}$  М  $\text{H}_4\text{Бип}$  в 0.1 М Трис-НСl буфере рН 7.2 при ступенчатом облучении 325 нм на перестраиваемом лазере в присутствии кислорода воздуха: 1 – 0 мин; 2 – 2 мин; 3 – 4 мин; 4 – 6 мин; 5 – 8 мин; 6 – 10 мин; 7 – 12 мин. На врезке – разностный спектр (время облучения – 0 мин).

ров  $1.07 \times 10^{-4}$  М  $\text{H}_4\text{Бип}$  в Трис-НСl буфере рН 7.2 (световые интервалы 2 мин и темновые интервалы по 2 мин) приведены результаты опыта, когда облучение проводили при длине волны 325 нм (рис. 5). На рис. 5 можно видеть, что по мере облучения также падает поглощение в области 306 нм и возрастает поглощение в области 245 и 274 нм, что свидетельствует об образовании  $(\text{H}_2\text{Птр})_2$  из промежуточного межмолекулярного комплекса. Смещение максимума при 245 нм в сторону 239 нм на разностном спектре (рис. 5, врезка) говорит о том, что в растворе по мере облучения накапливались также продукты темнового окисления  $\text{H}_4\text{Бип}$ . ВЭЖХ анализ продуктов фотореакции показал, что действительно в системе образовывались  $(\text{H}_2\text{Птр})_2$  и продукты окисления. Это можно объяснить тем, что при проведении опытов по облучению лазером не использовалась мешалка и, по видимому, не весь объем раствора попадал под облучение. В целом полученные данные также свидетельствовали об образовании промежуточного межмолекулярного комплекса  $\text{qH}_2\text{Птр}-\text{H}_2\text{Птр}$  ( $\lambda_{\text{max}}$  307 нм), в котором при облучении поглощала молекула хиноноидной формы дигидроптерина и молекула  $\text{H}_2\text{Птр}$  ( $\lambda_{\text{max}}$  325 нм) с преобладанием поглощения УФ-излучения хиноноидной или бензоидной формой  $\text{H}_2\text{Птр}$  в зависимости от длины волны света, используемого для иницирования фотопроцесса.

При витилиго в меланоцитах накапливается 3–5-кратный избыток  $\text{H}_4\text{Бип}$ . Проводя УФ облу-

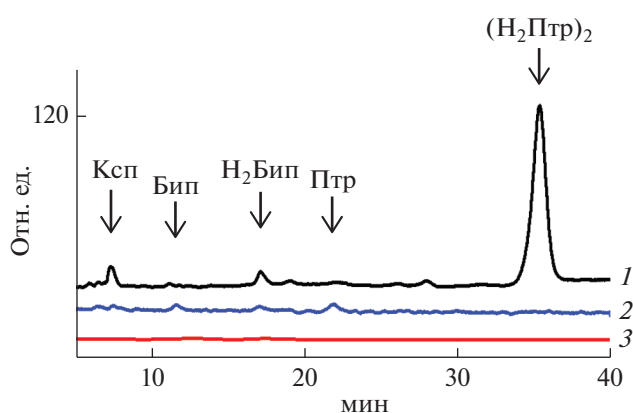
чение депигментированных участков кожи можно добиться удаления избытка  $\text{H}_4\text{Бип}$  и этим разорвать автокаталитический цикл синтеза избытка  $\text{H}_2\text{O}_2$  и способствовать предотвращению дальнейшего развития патологического процесса.

**ВЭЖХ анализ продуктов фотоокисления.** Разработан метод ВЭЖХ анализа для разделения и идентификации продуктов автоокисления и фотоокисления  $\text{H}_4\text{Бип}$  с использованием катионообменной колонки Luna 5u SCX после перевода неустойчивых продуктов реакции и исходного  $\text{H}_4\text{Бип}$  в более устойчивые катионные формы. На рис. 6 представлена типичная хроматограмма образца, полученного после облучения  $1.4 \times 10^{-4}$  М  $\text{H}_4\text{Бип}$  излучением  $320 \pm 10$  нм в течение 16 мин. Можно видеть, что среди продуктов преобладал (порядка 90%) димер дигидроптерина, который в отличие от других продуктов реакции не флуоресцирует и не дает сигнала на электрохимическом детекторе в данных условиях. Среди других продуктов реакции можно видеть небольшое количество продуктов окисления  $\text{H}_4\text{Бип}$ :  $\text{H}_2\text{Бип}$ , Бип, Птр и Ксп.

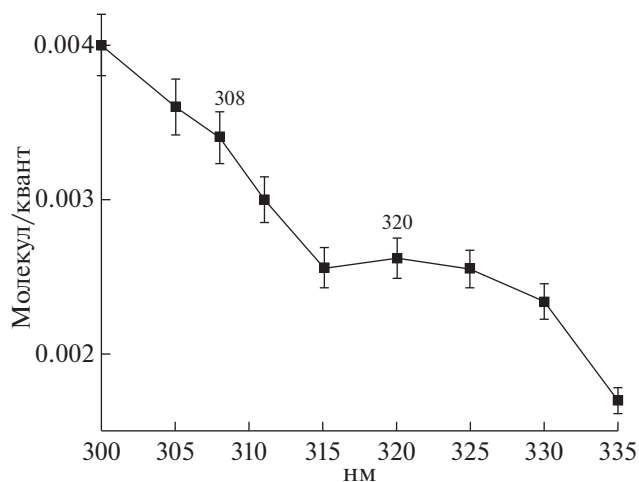
**Расчет квантовых выходов образования димера дигидроптерина.** Поскольку квантовый выход характеризует эффективность фотопроцесса, рассчитывали квантовые выходы образования  $(\text{H}_2\text{Птр})_2$  при фотоокислении  $\text{H}_4\text{Бип}$ . В табл. 1 приведены результаты расчета квантовых выходов для серии опытов, в которой для возбуждения использовали

излучение с длинами волн  $308 \pm 10$ ,  $320 \pm 10$ ,  $330 \pm 10$  и  $350 \pm 10$  нм. Из полученных результатов можно заключить, что эффективность фотохимического процесса в случае применения излучения с длиной волны 308 нм было максимальным. Квантовый выход при длине волны 308 нм, практически в 6 раз выше квантового выхода продукта реакции —  $(\text{H}_2\text{Птр})_2$ , образующегося при использовании для фотовозбуждения света с длиной волны 350 нм. Полученные результаты можно объяснить тем, что использованная нами длина волны 308 нм совпадала с максимумом спектра поглощения (307 нм) промежуточного молекулярного комплекса ( $\text{qH}_2\text{Птр}-\text{H}_2\text{Птр}$ ). При этом при 308 нм поглощал как хиноноидный дигидроптерин, имеющий очень широкий спектр с  $\lambda_{\text{max}}$  301 нм, так и дигидроптерин ( $\lambda_{\text{max}}$  325 нм при ширине спектра около 50 нм на полувысоте), внося некоторую прибавку в суммарный квантовый выход с учетом молярного коэффициента экстинкции. При длине волны 350 нм в составе молекулярного комплекса дигидроптерин поглощал на уровне полувысоты своего спектра, а хиноноидный дигидроптерин ниже полувысоты и этим объясняется значительное снижение квантового выхода.

**Построение спектра действия.** Для построения спектра действия УФ излучения в реакции образования димеров дигидроптерина использовали данные по квантовым выходам продукта реакции при действии УФ излучения в диапазоне 300–335 нм. На рис. 7 приведена зависимость квантового выхода от длины волны УФ излучения, используемого для проведения процесса фотоокисления  $\text{H}_4\text{Бип}$ . Можно видеть, что квантовый выход образования димеров падает по мере возрастания длины волны возбуждающего излучения и при этом падение не гладкое, а имеется два перегиба. Первый перегиб наблюдается в области 308 нм и второй перегиб в области 320–325 нм. Можно сделать вывод, что излучение в этих областях длин волн сильнее инициирует процесс фотообразования димеров в сравнении с излучением соседних длин волн. Полученный спектр действия показывает, что максимальная эффективность фотоокисления  $\text{H}_4\text{Бип}$  с образованием димеров  $(\text{H}_2\text{Птр})_2$  достигается при облучении в области



**Рис. 6.** ВЭЖХ анализ продуктов фотоокисления  $1.4 \times 10^{-4}$  М  $\text{H}_4\text{Бип}$  (0.1М Трис-НСI буфер, pH 7.2) при облучении  $320 \pm 10$  нм в течение 16 мин. 1 — спектрофотометрический детектор (267 нм); 2 — флуориметрический детектор ( $\lambda_{\text{возб}}$  330 нм,  $\lambda_{\text{флуор}}$  440 нм); 3 — электрохимический детектор (+0.7 В).



**Рис. 7.** Зависимость квантового выхода образования димеров дигидроптерина от длины волны УФ излучения, используемого для проведения процесса фотоокисления  $\text{H}_4\text{Бип}$ .

максимального поглощения  $\text{qH}_2\text{Бип}$  ( $\lambda_{\text{max}}$  301 нм), имеющего довольно высокий молярный коэффициент поглощения ( $\epsilon_{301} = 8700$ ) [18]. Перегибы на спектре действия отражают вклад в эффектив-

**Таблица 1.** Квантовый выход образования димеров дигидроптерина

| Длина волны, нм | Интенсивность поглощаемого света, Вт/м <sup>2</sup> | $\Delta A_{245}$ , ед. оптической плотности за 6 мин облучения | Квантовый выход (Ф), молекул/квант |
|-----------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| 308             | 41.4                                                | 1.7043                                                         | $2.33 \times 10^{-2}$              |
| 320             | 62.4                                                | 1.5075                                                         | $1.32 \times 10^{-2}$              |
| 330             | 85.0                                                | 1.6187                                                         | $1.02 \times 10^{-2}$              |
| 350             | 162.0                                               | 1.3526                                                         | $4.10 \times 10^{-3}$              |

ность фотопроцесса за счет поглощения света обеими частями межмолекулярного комплекса ( $qH_2Pтр-H_2Pтр$ ) ( $\lambda_{max}$  307 нм) и вклад за счет поглощения  $H_2Pтр$  в области максимума поглощения ( $\lambda_{max}$  325 нм). Облучение  $H_4Бип$  с использованием лазера, имеющего спектральную ширину излучения 1 нм, подтвердило полученный спектр действия и показало, что квантовый выход образования  $(H_2Pтр)_2$  при облучении длиной волны 290 нм ниже квантового выхода при 300 нм. Полученный спектр действия указывает диапазон длин УФ излучения, который может быть наиболее эффективным для использования в фототерапии витилиго. Различие в квантовых выходах менее чем в 2 раза в диапазоне длин волн 300–325 нм указывает на применимость этих длин волн для инициирования фотоокисления  $H_4Бип$  и это позволяет расширить арсенал источников УФ для фототерапии витилиго. В настоящее время для фототерапии витилиго используется УФВ излучение эксимерного лазера (308 нм) и излучение 311 нм эмиссионного спектра паров ртути в специальных лампах. Оба эти устройства генерируют УФВ излучение в области первого перегиба на кривой спектра действия и, по-видимому, этим можно объяснить эффективность УФВ фототерапии витилиго.

В целом, полученные экспериментальные данные по изучению процесса автоокисления  $H_4Бип$  и данные литературы по его избыточному синтезу при витилиго позволяют заключить, что в основе патологии витилиго лежит формирование автокаталитического цикла избыточного синтеза  $H_2O_2$ . Очевидно, что при УФВ-фототерапии витилиго будет разрываться автокаталитический цикл избыточного синтеза  $H_2O_2$  за счет удаления избыточного количества  $H_4Бип$  в виде  $(H_2Pтр)_2$ . Следовательно, такая УФВ-терапия будет способствовать восстановлению процесса меланогенеза. Условием успешного восстановления процесса меланогенеза является удаление избытка  $H_2O_2$ , образующегося в миллимолярных концентрациях в меланоцитах при витилиго, создающего условия окислительного стресса и активирующего иммунную систему. В условиях окислительного стресса  $H_2O_2$  может запускать автокаталитический цикл через цитокины, в частности интерферон, который активирует интерферон-индуцибельный фермент – ГТФ-циклогидролазу, синтезирующую избыток  $H_4Бип$ . Таким образом, может замыкаться автокаталитический цикл. В связи с этим лучшие результаты терапии витилиго могут быть получены, когда одновременно с УФВ-терапией применяют антиоксидантную терапию для удаления  $H_2O_2$  и предотвращения его накопления в меланоцитах. Так, например, хорошие результаты комплексной терапии достигают при применении УФВ-терапии и псевдокаталазы, разлага-

ющей  $H_2O_2$  [11, 16]. Дальнейшее развитие работ в этом направлении необходимо как для совершенствования методов терапии витилиго, так и для получения фундаментальных знаний об аутоиммунном ответе при витилиго, когда избыток  $H_2O_2$  активирует иммунную систему организма.

Работа поддержана грантом РНФ № 20-73-10029.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schallreuter K.U., Wood J.M., Pittelkow M.R., Gutlich M., Lemke K.R., Rödl W., Swanson N.N., Hitzemann K., Ziegler I. // *Science*. 1994. V. 263. № 5152. P. 1444–1446.
2. Schallreuter K.U., Moore J., Wood J.M., Beazley W.D., Peters E.M., Marles L.K., Behrens-Williams S.C., Dummer R., Blau N., Thony B. // *J. Invest. Dermatol.* 2001. V. 116. № 1. P. 167–174.
3. Bidaki R., Majidi N., Moghadam Ahmadi A., Bakhshi H., Sadr Mohammadi R., Mostafavi S.A., Kazemi Arababadi M., Hadavi M., Mirzaei A. // *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2018. V. 11. P. 383–386.
4. Cho H.K., Eun L.Y., Song J.S., Kang W.H., Ro B.I. // *Ann. Dermatol.* 2009. V. 21. № 1. P. 75–77.
5. Park J.M., Kim H.J., Bae B.G., Park Y.K. // *Ann. Dermatol.* 2009. V. 21. № 3 P. 330–333.
6. Hedayat K., Karbakhsh M., Ghiasi M., Goodarzi A., Fakour Y., Akbari Z., Ghayoumi A., Ghandi N. // *Health Qual. Life Outcomes*. 2016. V. 14. № 86. <https://doi.org/10.1186/s12955-016-0490-y>
7. Morales-Sánchez M.A., Vargas-Salinas M., Peralta-Pedrero M.L., Olguín-García M.G., Jurado-Santa Cruz F. // 2017. V. 108. № 7. P. 637–642.
8. Hasse S., Gibbons N.C., Rokos H., Marles L.K., Schallreuter K.U. // *J. Invest. Dermatol.* 2004. V. 122. № 2. P. 307–313.
9. Eskandani M., Golchai J., Pirooznia N., Hasannia S. // *Indian J. Dermatol.* 2010. V. 55. № 1. P. 15–19.
10. Spencer J.D., Gibbons N.C., Rokos H., Peters E.M., Wood J.M., Schallreuter K.U. // *J. Invest. Dermatol.* 2007. V. 127. № 2. P. 411–420.
11. Schallreuter K.U., Salem M.A., Holtz S., Panske A. // *FASEB J.* 2013. V. 27. № 8. P. 3113–3122.
12. Kaufman S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1963. V. 50. № 6. P. 1085–1093.
13. Buglak A.A., Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Vechtomova Y.L., Kritsky M.S. // *Photochem. Photobiol.* 2014. V. 90. № 5. P. 1017–10126.1.
14. Buglak A.A., Telegina T.A., Kritsky M.S. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2016. V. 15. № 6. P. 801–811.
15. Buglak A.A., Telegina T.A., Vorotelyak E.A., Kononov A.I. // *J. Photochem. Photobiol. A*. 2019. V. 372. P. 254–259.
16. Gawkrödger D.J. // *Br. J. Dermatol.* 2009. V. 161. № 4. P. 721–722.
17. Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Buglak A.A., Vechtomova Y.L., Biryukov M.V., Demin V.V., Kritsky M.S. // *J. Photochem. Photobiol. A*. 2018. V. 354. P. 155–162.
18. Davis M.D., Kaufman S. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 15. P. 8585–8596.



## Photooxidation of Tetrahydrobiopterin is a Key Process in Vitiligo Phototherapy

T. A. Telegina<sup>a, b, \*</sup>, Yu. L. Vechtomova<sup>a</sup>, M. S. Kritsky<sup>a</sup>, E. I. Madirov<sup>b, c</sup>,  
A. S. Nizamutdinov<sup>c</sup>, Y. N. Obuhov<sup>a, b</sup>, and A. A. Buglak<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

<sup>b</sup> *Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia*

<sup>c</sup> *Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

\*e-mail: telegina@inbi.ras.ru

In the context of the pathology and therapy of vitiligo, the processes of autooxidation and photooxidation of tetrahydrobiopterin (H<sub>4</sub>Bip), a coenzyme present in a 3–5-fold excess in vitiligo, have been investigated. The study of the kinetics of H<sub>4</sub>Bip autooxidation and HPLC analysis of the reaction products showed that autooxidation proceeds intensively with a rate constant of  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  with the formation of dihydrobiopterin, dihydropterin, and their oxidized derivatives. Analysis of the data on autooxidation led to a new conclusion that the oxidation of excess H<sub>4</sub>Bip in melanocytes apparently triggers an autocatalytic cycle of synthesis of excess hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which in turn activates interferon-inducible GTP cyclohydrolase, which synthesizes excess H<sub>4</sub>Bip. The autocatalytic cycle of excessive synthesis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apparently, underlies the pathology of vitiligo. Excess H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is also partially consumed to activate the immune system. The autocatalytic cycle can be broken by converting H<sub>4</sub>Bip into dihydropterin dimers during its UV photooxidation. The kinetics of H<sub>4</sub>Bip photooxidation was studied, the reaction products were identified, and the quantum yields of the dimers formation were calculated. Based on the quantum yields data, the UV action spectrum was designed, demonstrating that the range of 300–325 nm is effective for phototherapy of vitiligo.

**Keywords:** vitiligo, tetrahydrobiopterin, melanogenesis, melanin, oxidative stress, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UVB vitiligo phototherapy, autocatalytic cycle in vitiligo

УДК 577.15.08;577.152.34

## ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИ АКТИВНОГО ГОМОЛОГА СЕРИНОВОЙ ПЕПТИДАЗЫ SerPH122 *Tenebrio molitor*

© 2021 г. В. Ф. Терещенкова<sup>1</sup>, Н. И. Жиганов<sup>2</sup>, Ф. И. Акентьев<sup>3,4</sup>, И. И. Губайдуллин<sup>3,4</sup>, Д. Г. Козлов<sup>4</sup>, Н. В. Беляева<sup>2</sup>, И. Ю. Филиппова<sup>1</sup>, Е. Н. Элпидина<sup>5,\*</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

<sup>3</sup>НИИ “Курчатовский институт” – ГосНИИгенетика, Курчатовский геномный центр, Москва, 117545 Россия

<sup>4</sup>Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

<sup>5</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: elp@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 02.04.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 22.04.2021 г.

Псевдоферменты – гомологи активных ферментов, имеют аминокислотные замены в активном центре и в связи с этим обычно не обладают ферментативной активностью. В данной работе получен рекомбинантный пробелок (proSerPH122) гомолога сериновых пептидаз семейства S1 мучного хрущака (*Tenebrio molitor*) в штамме-продуценте дрожжей *Komagataella kurtzmanii*. В процессе секреции в дрожжах целевой белок, содержащий His<sub>6</sub>-tag, продуцировался в гликозилированной форме. Изучение свойств проводили параллельно для гликозилированной и дегликозилированной форм. Для изучения энзиматических свойств полученный в виде пробелка гомолог proSerPH122 с заменой Ser активного центра на Thr процессировали предварительно трипсином. Показано, что процессированный зрелый гомолог SerPH122 обладал невысокой, но достоверно детектируемой активностью по хромогенному субстрату Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, и эта активность не зависела от уровня его гликозилирования.

**Ключевые слова:** псевдоферменты, псевдопептидазы, гомолог сериновой пептидазы семейства S1, получение рекомбинантного белка, *Tenebrio molitor*

DOI: 10.31857/S0555109921050172

Сериновые пептидазы семейства S1 химотрипсина по классификации MEROPS [1] представляют обширную группу протеолитических ферментов. Родоначальником семейства является химотрипсин, активный центр которого составляет каталитическая триада аминокислотных остатков His57-Asp102-Ser195 (нумерация во введении дана по химотрипсину A *Bos taurus*, NCBI ID XP\_003587247 [2]). Субстратная специфичность сериновых пептидаз обусловлена аминокислотными остатками S1 субсайта связывания, сформированного 189, 216 и 226 остатками [3, 4]. В зависимости от состава S1-субсайта выделяют химотрипсины A/B (Ser-Gly-Gly), химотрипсины C (Ser-Gly-Val), трипсины (Asp-Gly-Gly), сериновые эластазы (Gly-Val-Ser/Thr), коллагеназы (Gly-Gly-Asp).

Подробный биоинформатический анализ последовательностей, широко используемый в последние годы, показал, что наряду с активными

ферментами, способными осуществлять катализ, существует целый ряд псевдоферментов, или псевдопептидаз, которые являются структурными гомологами ферментов, но содержат замены аминокислотных остатков активного центра, что приводит в большинстве случаев к полному отсутствию каталитической активности [5] или значительному ее снижению [6]. Данных о функциях многочисленной группы псевдоферментов в настоящее время очень мало, и они касаются, в основном, их биоинформатической характеристики [7, 8]. Псевдоферменты функционируют часто как компоненты сложных комплексов. Считается, что они могут принимать участие в регуляции своих каталитически-активных гомологов, выступая в качестве белков-партнеров, участвовать в регуляции метаболических и сигнальных путей, часто ассоциированных с патологическими состояниями, что делает их потенциальными ми-



шениями для разработки терапевтических агентов наряду с активными ферментами [9].

Растущая важность и актуальность изучения псевдоферментов подчеркивается как широким спектром процессов, в которых они участвуют, так и их многочисленностью. По мере выявления большего числа псевдоферментов возрастает необходимость в понимании их структуры, филогенетических связей, функциональной роли.

Исследования последних лет свидетельствуют о том, что большое количество псевдоферментов характерно для насекомых. Так, в частности, у *Anopheles gambiae* и *Drosophila melanogaster*, а также и у многих других родственных видов было найдено большое количество как неактивных, так и активных трипсиноподобных сериновых пептидаз, причем эволюция неактивных пептидаз и их новые функции предположительно оказались выгодными для насекомых [7]. Примером такого взаимодействия может служить белок CASPS18, найденный у комара *Aedes aegypti* и являющийся регулятором своего активного паралога каспазы CASPS19 [10]. Это предположение можно распространить на другие организмы, в том числе и человека. В связи с этим, большой интерес для изучения спектра и свойств псевдопептидаз могут представлять собой насекомые семейства Tenebrionidae, в частности, *Tenebrio molitor*, являющееся хорошо изученной биохимической моделью благодаря своим крупным размерам.

Ранее в лаборатории был получен обширный транскриптом из кишечника личинок *T. molitor* [11], анализ которого позволил выявить SerPH122 (Serine Peptidase Homolog) — белок-гомолог сериновых пептидаз из семейства S1 химотрипсина. Для детальной характеристики свойств гомолога SerPH122, а также для определения природных молекул или субстратов, способных к специфическому взаимодействию с SerPH122, необходимо получить рекомбинантный препарат исследуемого белка. Ранее было показано [12, 13], что метилотрофные дрожжи *Komagataella kurtzmanii* представляют собой основу системы экспрессии, альтернативную *K. phaffii* (ранее *Pichia pastoris*) и могут осуществлять эффективный биосинтез и секрецию рекомбинантных ферментов.

Цель работы — конструирование штамма-продуцента рекомбинантного пробелка-гомолога proSerPH122 *T. molitor*, получение белка proSerPH122, очистка профермента, его дегликозилирование, процессинг пробелка и тестирование наличия протеолитической активности у зрелого белка.

## МЕТОДИКА

**Конструирование плазмид и штаммов.** Фрагмент ДНК, кодирующий рекомбинантный пробелок-гомолог proSerPH122, получали с помощью

ПЦР-амплификации. Матрицей для амплификации служила плазида pAL-TA-31-1 (“Евроген”, Россия), содержащая кДНК пробелка-гомолога proSerPH122 (GenBank MW882981). ПЦР проводили с использованием ДНК-полимеразы Phusion (“Thermo Fisher Scientific”, США) и праймеров pNcoI (5'-tataccatggaaaagagatctaagcctggagctctataatt-3') и pXhoI (5'-taactcggagttaatggtgatggtgatggggattgatgatgttctgat-3'). Помимо сайтов рестрикции *NcoI* и *XhoI* (подчеркнуты в составе соответствующих праймеров) в ходе ПЦР в состав амплифицированного фрагмента ДНК были введены дополнительные последовательности, удлинившие N-конец рекомбинантного пробелка proSerPH122 на остаток серина и C-конец — на пептид His<sub>6</sub>-tag.

Амплифицированный фрагмент ДНК клонировали в вектор pPH727-AOX727 [14] по сайтам рестрикции *NcoI/XhoI* как описано ранее [13], в результате получили плазмиду pPH727-proSerPH122. Корректность последовательности структурного гена proSerPH122 в составе плазмиды pPH727-proSerPH122 подтверждена секвенированием. Регуляция экспрессии целевого гена находилась под контролем индуцируемого метанолом промотора гена *AOX1* штамма ВКПМ Y-727 *K. kurtzmanii* (pAOX727) [14], секрецию целевого белка направляла лидерная область artHH, как описано ранее [13]. В процессе клонирования и амплификации плазмиды pPH727-proSerPH122 использовали клетки Top10 *Escherichia coli* (“Invitrogen”, США). Культивировали при температуре 37°C на среде LB с добавлением ампициллина в концентрации 50 мкг/мл.

Трансформацию клеток реципиентного штамма дрожжей *K. kurtzmanii* Y727his4Δ проводили по методике, описанной в работе [14]. Перед трансформацией интегрируемый фрагмент ДНК линаризовали путем гидролиза плазмиды pPH727-proSerPH122 по рестрикционным сайтам *MluI*.

Для культивирования полученных трансформантов использовали среду YPGM следующего состава (%): дрожжевой экстракт — 1.0 (0207; “BioSpringer”, Франция), пептон соевый — 2.0 (P140; “Amresco”, США), глицерин — 0.5 (“Panreac”, Испания), метанол — 1.0 (техническая марка “А” ГОСТ 2222-95, Россия). Метанол вносили в среду до конечной концентрации 1% при засеве дрожжей и далее с периодичностью в 24 ч. Нарработку образцов культуральной жидкости (КЖ), содержащих белок proSerPH122, проводили в течение 72 ч при температуре 29°C с использованием ротационного шейкера со скоростью вращения 250 об./мин.

**Электрофорез белков.** Электрофорез белков КЖ трансформантов pPH727-proSerPH122 проводили в 15%-ном ПААГ в восстанавливающих условиях (ДДС-ПААГ) как описано ранее [13]. Использовали предокрашенные белковые марке-

ры “Thermo Fisher Scientific” (США). При подготовке образцов перед нанесением на гель белки концентрировали как описано ранее [15]. На дорожки наносили препараты, сконцентрированные из 100 мкл КЖ.

**Очистка рекомбинантного пробелка proSerPH122 *T. molitor*.** Очистку рекомбинантного пробелка из КЖ дрожжей проводили с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии, как описано ранее [13], с тем отличием, что перевод очищенного белка из буфера А в воду mQ осуществляли методом ультрафильтрации с использованием ультрафильтрационной ячейки (“Amicon”, США) и мембраны с порогом отсека 3 кДа (Millipore, США). Непосредственно после обессоливания раствора белка чистоту препарата оценивали с помощью электрофореза в ПААГ с Na-ДДС. Концентрацию измеряли фотометрически при длине волны 280 нм на спектрофотометре NanoDrop 1000 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Препарат замораживали в жидком азоте и лиофилизовали на приборе FreeZone (“Labconco”, США).

**Дегликозилирование рекомбинантного пробелка proSerPH122 *T. molitor* с использованием эндогликозидазы-Н.** Для реакции дегликозилирования использовали лиофилизированный препарат, полученный на предыдущем этапе. Дегликозилирование проводили с помощью эндогликозидазы Endo H (“New England Biolabs”, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Обессоливание и перевод белка в воду mQ осуществляли методом ультрафильтрации, как описано выше, концентрацию измеряли фотометрически при длине волны 280 нм на спектрофотометре NanoDrop 1000. Препарат замораживали в жидком азоте и лиофилизовали на приборе FreeZone (“Labconco”, США).

**Масс-спектрометрический анализ.** Масс-спектрометрический анализ очищенного белка проводили на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme (“Bruker Daltonics”, Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd). Масс-спектры получены в линейной моде режима положительных ионов с использованием рефлектрона. Точность измеренных средних масс составляла 10 Да. Для расчета значений масс белков использовали программный пакет Vector NTI (“Thermo Fisher Scientific”, США).

**Биоинформатический анализ последовательности SerPH122 *T. molitor*.** Полную аминокислотную последовательность белка SerPH122 *T. molitor*, полученную в результате трансляции кодирующей ее последовательности GenBank MW882981, выравнивали с родоначальником семейства S1 химо трипсином быка NCBI ID XP\_003587247 с использованием сервера для множественного выравнивания последовательностей Clustal Omega [16]. Анализ и визуализацию активного центра и субстратсвязывающего субсайта проводили в Gene-

Doc [17]. Сигнальный пептид предсказывали на сервере SignalP-5.0 [18].

**Процессинг пробелка proSerPH122 *T. molitor*.** Для активации proSerPH122 лиофилизированные гликозилированный и дегликозилированный препараты пробелка растворяли до концентрации 15 мкг/мл в 0.1 М ацетатно-фосфатно-боратном универсальном буфере pH 7.9, добавляли раствор трипсина до конечной концентрации 0.25 мкг/мл и инкубировали в течение 60 мин при температуре 37°C в термостатируемом шкафу (“Binder”, Германия).

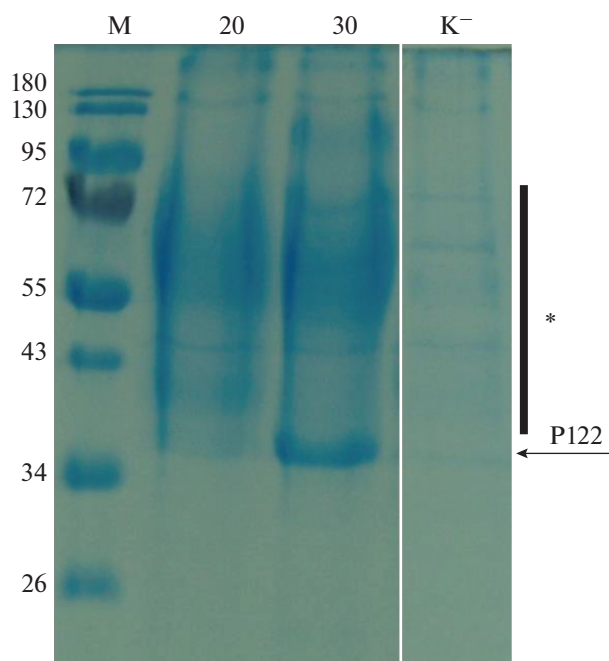
**Определение ферментативной активности рекомбинантного гомолога SerPH122 *T. molitor*.** Для тестирования ферментативной активности исходного пробелка и процессированного гомолога SerPH122 в качестве хромогенного субстрата использовали N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-(*n*-нитроанилид) — Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (“Bachem”, Швейцария). Реакцию и расчет ферментативной активности проводили по опубликованной ранее методике [19]. Измерение активности проводили при pH 7.9, и 5.6 в 0.1 М ацетатно-фосфатно-боратном универсальном буфере [20].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Получение, очистка и структурное исследование proSerPH122.** Биосинтез рекомбинантного пробелка proSerPH122 проводили с использованием экспрессионной системы *K. kurtzmanii*, зарекомендовавшей себя в качестве эффективной альтернативы широко распространенной системе экспрессии на основе *K. phaffii*, ранее *P. pastoris* (“Invitrogen”, США) [13, 14].

С целью получения штамма-продуцента рекомбинантного пробелка proSerPH122 клетки реципиентного штамма дрожжей *K. kurtzmanii* Y727his4Δ трансформировали экспрессионной конструкцией pPH727-proSerPH122. Трансформанты выращивали в стеклянных колбах в условиях индукции метанолом при температуре 20 и 30°C в течение 4 и 3 сут соответственно. Полученные образцы КЖ анализировали с использованием электрофореза в ПААГ с Na-ДДС. Результат представлен на рис. 1. В образцах КЖ были обнаружены белковые продукты, представленные на электрофореграмме в виде отдельной полосы, расположенной в области 36 кДа, и в виде диффузного шмера, распределенного в области мол. масс от 40 до 80 кДа. Окраска этих продуктов была существенно более интенсивной в образце с индукцией при 30°C, в образце реципиентного штамма *K. kurtzmanii* Y727his4Δ (отрицательный контроль) такие продукты отсутствовали (рис. 1). Вероятно, несоответствие полученных молекулярных масс и расчетной (26.6 кДа) обусловлено гликозилированием.

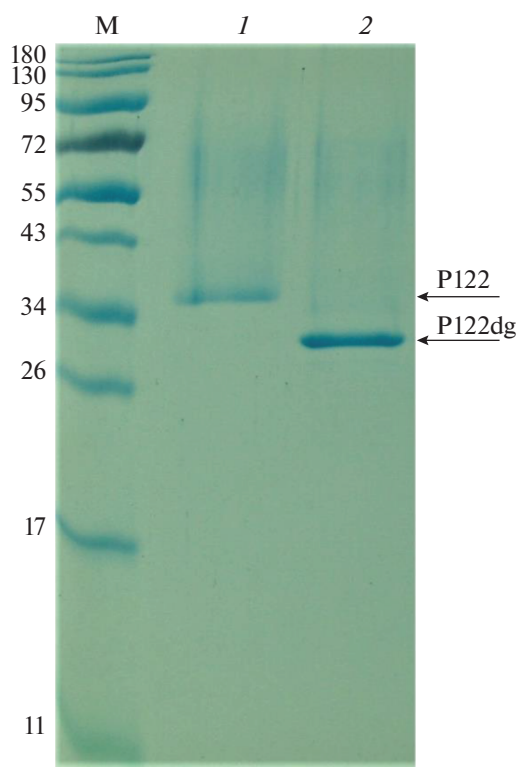
Последовательность рекомбинантного белка proSerPH122 содержала два потенциальных сайта



**Рис. 1.** Электрофорез белков КЖ трансформантов rPH727-proSerPH122. М — маркеры молекулярной массы; K<sup>-</sup> — отрицательный контроль (Y727his4Δ); 20 и 30 — образцы целевого белка proSerPH122, полученные при культивировании трансформантов rPH727-proSerPH122 при температуре 20 и 30°C соответственно. Стрелкой показано расположение мажорной полосы целевого гликозилированного белка (P122). \*Обозначена область распределения гипергликозилированных форм целевого белка.

N-гликозилирования: N<sub>48</sub>АТ и N<sub>118</sub>ЕТ (нумерация остатков соответствует зрелому активированному ферменту). Обработка белка эндогликозидазой Endo Н и последующий анализ продуктов реакции методом электрофореза в ПААГ с Na-ДДС (рис. 2) и масс-спектрометрии (рис. 3 и табл. 1) показал, что секрция целевого белка действительно осуществлялась в форме N-гликозилированного продукта. В частности, согласно данным электрофореза, в результате обработки продукта секрции Endo Н молекулярная масса мажорной полосы белка снижалась с 36 до 28 кДа (рис. 2). При этом интенсивность мажорной полосы значительно увеличивалась, а в области гипергликозилирования окраска практически исчезала.

По данным масс-спектрометрии средняя молекулярная масса спектра белковых продуктов снижалась с примерно 31 до 27 кДа (рис. 3). Анализ производных целевого белка (табл. 1) позволил предположить, что мажорным дегликозилированным продуктом является белок, содержащий 2 остатка N-ацетилглюкозамина (ММ = 27003, табл. 1). Появление такого продукта ожидалось в качестве результата полного дегликозилирования белка по двум сайтам, содержащим углеводные



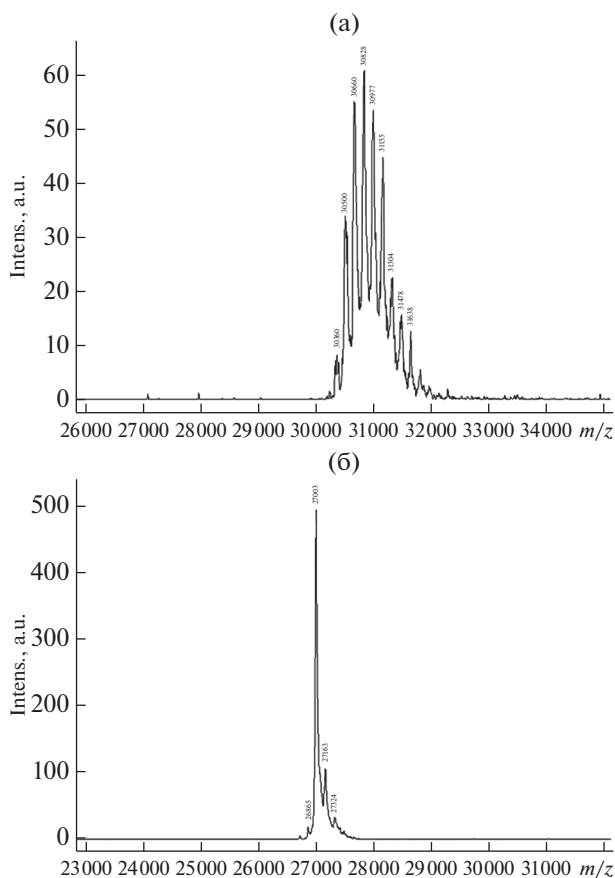
**Рис. 2.** Электрофоретический контроль дегликозилирования очищенного препарата proSerPH122 с использованием эндогликозидазы Endo Н. М — маркеры молекулярной массы; 1 — препарат белка proSerPH122 после очистки методом металл-хелатной аффинной хроматографии; 2 — препарат очищенного белка proSerPH122 после дегликозилирования. Стрелками показано расположение мажорных полос гликозилированного (P122) и дегликозилированного (P122dg) белков.

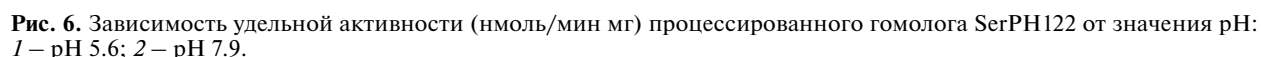
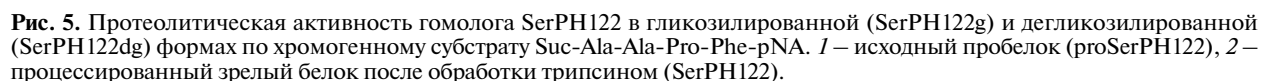
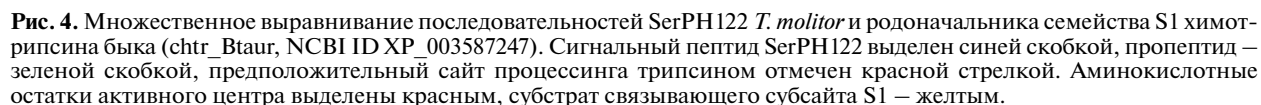
компоненты, связанные с остатками аспарагина N-гликозидной связью. Наиболее вероятно, что другими вариантами были производные мажорного дегликозилированного продукта, содержащие 1 или 2 остатка маннозы Man и Man<sub>2</sub> (табл. 1), являющиеся потенциальными продуктами O-гликозилирования белка, и продукт деградации белка, у которого отсутствовал концевой гистидин (desHis<sub>Cend</sub>).

**Энзиматические свойства SerPH122.** Полная последовательность белка-гомолога SerPH122 (GenBank MW882981) содержит сигнальный пептид (рис. 4, выделен синей скобкой), который по современным представлениям отщепляется в процессе секрции, а пропептид (рис. 4, выделен зеленой скобкой), заканчивающийся остатком аргинина (рис. 4, отмечен красной стрелкой), обычно подвергается дальше процессингу с помощью трипсина [21, 22]. По сравнению с родоначальником семейства S1 химотрипсином быка (NCBI ID XP\_003587247), имеющим каталитическую триаду His-Asp-Ser, гомолог SerPH122

содержит в активном центре аминокислотные остатки His-Asp-Thr (рис. 4, отмечены красным). Замена существенного для катализа аминокислотного остатка Ser на синонимичный остаток Thr у гомолога все же позволила предположить наличие у него протеолитической активности.

Для поиска возможных энзиматических свойств полученный в виде пробелка гомолог proSerPH122 процессировали предварительно трипсином. Оказалось, что протеолитическая активность зрелого процессированного гомолога SerPH122 проявлялась по хромогенному пептидному субстрату Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, который широко используется для тестирования активности химотрипсина. Обе процессированные формы (гликозилированная, SerPH122g и дегликозилированная, SerPH122dg) были протеолитически активны и гидролизуют субстрат Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (рис. 5). Интересно, что обе непротестированные формы пробелка proSerPH122 (гликозилированная и дегликозилированная) также обладали протеолитической активностью, однако она была в 1.5 раза ниже, чем у процессированных зрелых форм (рис. 5). Полученный результат может свидетельствовать о том, что гликозилирование не влияет на проявление активности гомолога. По сравнению с пептидазой *T. molitor* из семейства S1 SerP38 (NCBI ID QRE01764) [13], удельная активность по тому же субстрату Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA у SerPH122 была в 600 раз ниже. Протеолитическая активность недавно была описана у гомолога сериновой пептидазы из яда эктопаразитоида *Scleroderma guani*. Активный центр белка содержал аминокислотные остатки Ser-Asp-Ser вместо типичной каталитической триады сериновых пептидаз His-Asp-Ser. Гомолог проявлял трипсиноподобную активность при гидролизе субстрата Bz-Arg-pNA (N $\alpha$ -бензоил-Arg-(п-нитроанилида)) [6].





показано, что активность SerPH122 выше при значении pH 7.9.

Таким образом, разработан метод получения рекомбинантного белка-гомолога сериновых пептидаз proSerPH122 *T. molitor*, подобраны условия его очистки с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии, проведены дегликозилирование эндогликозидазой Endo H и процессинг пробелка до зрелой формы. Показано, что: (1) полученный гомолог подвергался процессингу под действием трипсина, (2) проявлял невысокую, но достоверно детектируемую химотрипсин-подобную активность при использовании в качестве субстрата Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, причем при pH 7.9, в слабощелочных условиях, характерных для содержимого задней части средней кишки личинок *T. molitor*, активность SerPH122 значительно выше, чем при pH 5.6, в условиях содержимого передней части средней кишки, (3) гликозилирование не оказывало влияния на изученные свойства. Настоящая работа вносит вклад в исследование малоизученной области функционирования псевдопептидаз и может послужить основой для выяснения связи между структурой и функцией сериновых пептидаз и их гомологов.

Авторы выражают благодарность к. х. н. М.В. Серебряковой за проведение масс-спектрометрического анализа препарата рекомбинантного гомолога proSerPH122.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00080).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rawlings N.D., Barrett A.J., Thomas P.D., Huang X., Bateman A., Finn R.D. // *Nucleic Acids Res.* 2018. V. 46. № D1. P. D624–D632. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>
2. Brown J.R., Hartley B.S. // *Biochem. J.* 1966. V. 101. № 1. P. 214–228. <https://doi.org/10.1042/bj1010214>
3. Perona J.J., Hedstrom L., Rutter W.J., Fletterick R.J. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. № 5. P. 1489–1499. <https://doi.org/10.1021/bi00005a004>
4. Perona J.J., Craik C.S. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. № 3. P. 337–360. <https://doi.org/10.1002/pro.5560040301>
5. Wex T., Lipyansky A., Brömme N.C., Wex H., Guan X.Q., Brömme D. // *Biochemistry.* 2001. V. 40. № 5. P. 1350–1357. <https://doi.org/10.1021/bi002266o>
6. Wu C.Y., Huang J.M., Zhao Y.J., Xu Z.W., Zhu J.Y. // *Toxicon.* 2020. V. 183. P. 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.05.011>
7. Pils B., Schultz J. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 340. № 3. P. 399–404. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.04.063>
8. Yang L., Lin Z., Fang Q., Wang J., Yan Z., Zou Z., Song Q., Ye G. // *Dev. Comp. Immunol.* 2017. V. 77. P. 56–68. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.07.014>
9. Reynolds S.L., Fischer K. // *Biochem. J.* 2015. V. 468. № 1. P. 17–24. <https://doi.org/10.1042/BJ20141506>
10. Bryant B., Ungerer M.C., Liu Q., Waterhouse R.M., Clem R.J. // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2010. V. 40. № 7. P. 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.04.011>
11. Martynov A.G., Elpidina E.N., Perkin L., Oppert B. // *BMC Genomics.* 2015. V. 16. № 75. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1306-x>
12. Naumov G.I., Naumova E.S., Tyurin O.V., Kozlov D.G. // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2013. V. 104. № 3. P. 339–347. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9956-7>
13. Горбунов А.А., Акентьев Ф.И., Губайдуллин И.И., Жиганов Н.И., Терещенкова В.Ф., Элиидина Е.Н., Козлов Д.Г. // *Биотехнология.* 2020. Т. 36. № 6. С. 78–86. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-6-78-86>
14. Матвеева А.Ю., Губайдуллин И.И., Федоров А.С., Козлов Д.Г. // *Биотехнология.* 2019. Т. 35. № 5. С. 3–11. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-3-11>
15. Kozlov D.G., Yagudin T.A. // *Biotechnol. Lett.* 2008. V. 30. № 9. P. 1661–1663. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9739-9>
16. Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. // *Mol. Syst. Biol.* 2011. V. 7. P. 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
17. Nicholas K.B., Nicholas H.B. Jr., Deerfield D.W. II. // *Embnw. News.* 1997. V. 4. P. 14. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>
18. Almagro Armenteros J.J., Tsirigos K.D., Sonderby C.K., Petersen T.N., Winther O., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. // *Nat. Biotechnol.* 2019. V. 37. № 4. P. 420–423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
19. Терещенкова В.Ф., Клячко Е.В., Беневоленский С.В., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е., Филиппова И.Ю., Элиидина Е.Н. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2019. Т. 55. № 3. С. 231–236.
20. Frugoni J.A.C. // *Gazz. Chem. Ital.* 1957. V. 87. P. 403–407.
21. Parry M.A., Fernandez-Catalan C., Bergner A., Huber R., Hopfner K.P., Schlott B., Gührs K.H., Bode W. // *Nat. Struct. Biol.* 1998. V. 5. № 10. P. 917–923. <https://doi.org/10.1038/2359>
22. Hedstrom L. // *Chem. Rev.* 2002. V. 102. № 12. P. 4501–4524. <https://doi.org/10.1021/cr000033x>
23. Vinokurov K.S., Elpidina E.N., Oppert B., Prabhakar S., Zhuzhikov D.P., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A. // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2006. V. 145. № 2. P. 126–137. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.05.005>



## Preparation and Properties of the Recombinant *Tenebrio molitor* SerPH122 – Proteolytically Active Homolog of Serine Peptidase

V. F. Tereshchenkova<sup>a</sup>, N. I. Zhiganov<sup>b</sup>, P. I. Akentyev<sup>c, d</sup>, I. I. Gubaidullin<sup>c, d</sup>, D. G. Kozlov<sup>d</sup>,  
N. V. Belyaeva<sup>b</sup>, I. Yu. Filippova<sup>a</sup>, and E. N. Elpidina<sup>e, \*</sup>

<sup>a</sup>Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, 119991 Russia

<sup>b</sup>Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119991 Russia

<sup>c</sup>National Research Center “Kurchatov Institute” – GOSNIIGENETIKA, Kurchatov Genomic Center, Moscow, 117545 Russia

<sup>d</sup>National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

<sup>e</sup>Lomonosov Moscow State University, A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: elp@belozersky.msu.ru

Pseudoenzymes – are homologs of active enzymes that have amino acid substitutions in the active center and, therefore, usually do not possess enzymatic activity. In this work, we obtained a recombinant proprotein (pro-SerPH122) of the homolog of serine peptidases of the S1 family from the yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) in the yeast producer strain *Komagataella kurtzmanii*. The target His<sub>6</sub>-tagged protein was produced in a glycosylated form during secretion in yeast. The study of properties was carried out for both glycosylated and deglycosylated forms. To study the enzymatic properties, the proSerPH122 homolog with the replacement of active site Ser by Thr was pretreated with trypsin. The processed mature homolog SerPH122 was shown to have low, but reliably detectable activity with the chromogenic substrate Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, and this activity did not depend on the level of its glycosylation.

**Keywords:** pseudoenzymes, pseudopeptidases, homolog of serine peptidases of the S1 family, production of a recombinant protein, *Tenebrio molitor*

УДК 579.222.3:577.152.34

## ОБРАЗОВАНИЕ И СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ МИКРОМИЦЕТА *Aspergillus flavus* O-1, АКТИВНОЙ ПО ОТНОШЕНИЮ К ФИБРИЛЛЯРНЫМ БЕЛКАМ

© 2021 г. А. А. Галиакберова<sup>1</sup>, Д. М. Бедненко<sup>1</sup>, В. Г. Крейер<sup>1</sup>,  
А. А. Осмоловский<sup>1, \*</sup>, Н. С. Егоров<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

<sup>2</sup>Международный биотехнологический центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

\*e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 17.03.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 23.04.2021 г.

Показано, что микромицет *A. flavus* O-1 секретирует комплекс по меньшей мере из двух протеолитических ферментов. Методом препаративного изоэлектрофокусирования был выделен наиболее активный фермент и охарактеризован как сериновая протеиназа с молекулярной массой 17 кДа и pI 7.82. Протеиназа обладала широкой субстратной специфичностью и была способна расщеплять такие фибриллярные белки, как коллаген, эластин и фибрин.

**Ключевые слова:** *Aspergillus flavus*, протеиназы, сериновые протеиназы, протеолитическая активность

**DOI:** 10.31857/S0555109921050068

Протеиназы микроорганизмов составляют около 60% всех промышленных ферментов в мире [1]. Микроскопические грибы – микромицеты, способны продуцировать различные протеолитические ферменты, в большинстве случаев – внеклеточные, относящиеся к классам сериновых, аспартильных и металлопротеиназ [2]. Протеиназы микромицетов разнообразны как по условиям секретирования, условиями действия (температура, pH), так и по молекулярной массе, строению и субстратной специфичности.

В настоящее время протеолитические ферменты активно применяются в различных отраслях, таких как пищевая промышленность (обработка мяса, ускорение созревания сыров и пр.), сельское хозяйство, кожевенное и меховое производство (для удаления волос, размягчения и обезжиривания), бытовая химия (в качестве детергентов в моющих средствах). Целевое применение они приобрели также в фармакологии и медицине, так как входят в основу препаратов, направленных на улучшение пищеварения, уменьшение воспаления, ускорение ранозаживления, восстановление гемостаза [3, 4]. Наиболее широко применяются протеиназы, активные в щелочных условиях: при получении моющих средств, в пищевой промышленности, при выделке кож, в медицине [5]. В медицине и косметологии в основном используются

ферменты, расщепляющие коллаген (коллагенолитическая активность), эластин (эластолитическая активность), фибрин (фибринолитическая активность) и фибриноген (фибринолитическая активность) [5].

Большинство видов аспергиллов в процессе роста и развития секретируют протеиназы с разными свойствами, что определяет их прикладное значение. *Aspergillus flavus* – условно патогенный представитель рода *Aspergillus*, наиболее часто выделяемый из почвы, воздуха, обитающий на старых книгах и перьевых подушках, в кондиционерах и увлажнителях воздуха. Отдельные штаммы *A. flavus* выделены из зерен пшеницы и бобовых [6].

Известно, что микромицет *A. flavus* образует протеиназы, способные расщеплять эластин [7], гидролизовать фибрин, проявляя плазминоподобную активность, и активировать некоторые проферменты системы гемостаза [8]. В экзопротеоме *A. flavus* преобладают различные изоформы щелочной сериновой протеиназы, а также металлопротеиназы с эластолитической активностью [9]. Металлопротеиназы микромицета были охарактеризованы как эластазы, способные расщеплять не только эластин, но также коллаген, овальбумин и др. [10, 11]. Для некоторых изоформ сериновых протеиназ была также показана эластолитическая активность [12, 13]. Предположительно, именно



сериновая протеиназа является основным IgE-связывающим аллергеном *A. flavus* [14]. В определенных условиях культивирования *A. flavus* способен выделять протеиназы, обладающие коллагенолитической активностью [15].

Цель работы — изучение особенности образования и протеолитические свойства внеклеточных протеиназ микромицета *A. flavus* О-1 по отношению к фибриллярным белкам.

## МЕТОДИКА

**Культивирование микромицета.** Микромицет *A. flavus* О-1 был получен из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Культуру поддерживали на скошенном сусло-агаре, хранили при температуре 25°C.

**Получение препарата внеклеточных протеиназ микромицета *A. flavus* О-1.** Для выделения протеолитических ферментов микромицет культивировали в глубинных условиях в шейкере-инкубаторе ES — 20/60 (“Biosan”, Латвия) при 200 об./мин в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды при 28°C в течение 2 сут на посевной среде (%): сусло — 6.7, глюкоза — 2.0, пептон — 0.1. После окончания сроков выращивания часть полученного посевного материала переносили в ферментационную среду следующего состава (в %): глюкоза — 3.0, глицерин — 7.0, гидролизат рыбной муки — 0.5, NaNO<sub>3</sub> — 0.2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 0.05, MgSO<sub>4</sub> — 0.05.

Для подбора оптимальных условий для секреции культурой *A. flavus* О-1 внеклеточных протеиназ, поддерживали различные значения pH среды (от 3 до 9), и температуры (24, 28, 30 и 32°C). Изучали динамику роста и образования протеиназ микромицетов в течение 7 сут, ежедневно определяя прирост биомассы и накопление протеолитических ферментов. Биомассу гриба отделяли фильтрованием, а затем высушивали при 86°C до постоянной массы, рассчитывая ее прирост в мг/мл среды.

Для получения препарата внеклеточных протеиназ продуцента биомассу отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через фильтровальную бумагу (“ФС”, Россия). Внеклеточные белки осаждали сульфатом аммония, доводя его концентрацию до 80% от насыщения. Осадок белков формировался при 4°C в течение 12 ч, после чего его отделяли центрифугированием при 15000 g 20 мин при 4°C, затем растворяли в минимальном объеме 0.01 М Трис-НСl-буфера, pH 8.2, с 0.002 М ацетатом кальция, а затем диализовали в диализных мешочках против этого же буфера 12 ч при 4°C на магнитной мешалке. Диализованный раствор белков центрифугировали в тех же усло-

виях для удаления нерастворимой части осадка и лиофильно высушивали.

**Определение белка.** Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом по поглощению при 280 нм. Поглощение при 280 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см, равное 1.0 в 1 мл принимали за одну оптическую единицу (о.е., A<sub>280</sub>) [16].

**Разделение препарата внеклеточных протеиназ.** Фракционирование протеиназ лиофильно высушенного препарата осуществляли в колонке объемом 110 мл (“LKB”, Швеция) в градиенте плотности сахарозы 0–40% по методу Вестерберга [17], используя амфолины с pH 3.5–10 (“LKB”, Швеция) при 4°C, напряжении 800 В в течение 36 ч. После проведения изоэлектрофокусировки содержимое колонки собирали фракциями объемом 1.5 мл с помощью коллектора фракций. В каждой фракции определяли потенциометрически изoeлектрическую точку (pI), поглощение при 280 нм и протеолитическую активность.

**Электрофорез белков в ПААГ.** Для определения молекулярной массы протеиназы использовали электрофорез в ПААГ с ДСН по Лэммли [18] на приборе для вертикального электрофореза VE-10 (“Helicon”, Россия). Концентрация акриламида в верхнем слое геля была 6.0%, нижнем — 7.5%. Электрофоретическое разделение белков проводили при силе тока 100 мА и напряжении 200 В. Для определения молекулярной массы протеиназ использовали набор метчиков Unstained Protein Molecular Weight Marker (“Thermoscientific”, США). Окрашивание белков в геле проводили раствором Кумасси G-250 в 3.5%-ной хлорной кислоте. Отмывку гелей от красителя осуществляли 7%-ной уксусной кислотой.

**Ингибиторный анализ.** Для изучения действия ингибиторов на активность протеиназ, секретлируемых культурой *A. flavus* О-1, использовали следующие соединения: ЭДТА (1.1 мг/мл) — ингибитор металлопротеиназ, *n*-хлормеркурибензоат (*n*-ХМБ, 0.5 мг/мл) — ингибитор цистеиновых протеиназ, фенолметилсульфонил фторид (PMSF, 0.3 мг/мл) — ингибитор сериновых протеиназ, TLSK (0.4 мг/мл) — ингибитор трипсиновых протеиназ и TPSK (0.4 мг/мл) — ингибитор химотрипсиновых протеиназ; соевый ингибитор трипсина (1.1 мг/мл) — ингибитор трипсиновых протеиназ. Действие ингибиторов исследовали при соотношении фермент : ингибитор — 1 : 10 и 1 : 100 [19]. После инкубации фермента с ингибитором в течение 1 ч определяли остаточную активность фермента по описанному выше методу и выражали в процентах от контроля (без ингибитора).

**Определение протеолитической активности с нативными белковыми субстратами.** Общую протеолитическую активность проверяли с помощью реакции расщепления казеина модифицированным

методом Ансона-Хагихары [20, 21], определяя количество тирозина в неосаждаемых трихлоруксусной кислотой (ТХУ) продуктах протеолиза после десятиминутного гидролиза 1%-ного раствора казеина в 0.1 М Трис-НСl буфере, pH 8.0–8.2 при 37°C. К 200 мкл пробы добавляли 400 мкл раствора казеина. Реакцию останавливали добавлением 600 мкл 10%-ной ТХУ. Осадок центрифугировали 10 мин при 12400 g и определяли поглощение раствора при 275 нм. За единицу активности ( $E_{\text{Тир}}$ ) принимали количество мкмоль тирозина, образовавшегося за 1 мин в заданных условиях.

Фибринолитическую активность определяли, добавляя к 200 мкл пробы 400 мкл 1%-ной суспензии фибрина в 0.1 М Трис-НСl буфере, pH 8.2. Время реакции при 37°C составляло 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 600 мкл 10%-ной ТХУ, осадок отделяли центрифугированием и определяли поглощение при 275 нм. Активность выражали в  $E_{\text{Тир}}$ .

**Определение протеолитической активности с окрашенными белковыми субстратами.** Определение коллагенолитической активности проводили с использованием в качестве субстрата азоколл ("Sigma-Aldrich", США). К 200 мкл пробы добавляли 400 мкл суспензии 2%-ного азоколл в 0.05 М Трис-НСl буфере, pH 8.2. Полученную смесь инкубировали при 37°C на термошейкере (600 об./мин) в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 600 мкл 10%-ной ТХУ, после чего осадок отделяли центрифугированием и спектрофотометрически определяли поглощение пробы при длине волны 519 нм. За единицу активности ( $E_{\text{азк}}$ ) принимали количество фермента, приводящее к увеличению оптической плотности продуктов реакции на 0.1 ед.

Протеолитическую активность с High Powder Azur (НРА, "Calbiochem", США) определяли, добавляя к 250 мкл пробы 400 мкл суспензии 0.2%-ного НРА в 0.05 М Трис-НСl буфере, pH 8.2. Полученную смесь инкубировали при 37°C на термошейкере при 600 об./мин в течение 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 750 мкл 10% ТХУ, после чего осадок центрифугировали и спектрофотометрически определяли поглощение пробы при длине волны 525 нм. За 1 ед. активности принимали количество фермента, приводящее к увеличению оптической плотности продуктов реакции на 0.1.

Азоказеиназную активность определяли с использованием субстрата азоказеина ("Sigma-Aldrich", США). В реакционной смеси к 100 мкл пробы добавляли 250 мкл суспензии 0.2%-ного азоказеина в 0.1 М Трис-НСl буфере, pH 8.2. Полученную смесь инкубировали при 25°C в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 10%-ного ТХУ, после чего осадок центрифугировали и спектрофотометрически определяли

поглощение пробы при длине волны 340 нм. За 1 ед. активности принимали количество фермента, приводящее к увеличению оптической плотности продуктов реакции на 0.1.

**Определение амидолитической активности с хромогенными пептидными субстратами.** Активность определяли по реакции с субстратами эластазы (Suc-Ala-Ala-Ala-pNA), субтилизина (Z-Ala-Ala-Leu-pNA), плазмина (H-DVal-Leu-Lys-pNA), тромбина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), тканевого активатора плазминогена (dIle-Pro-Arg-pNA), урокиназы (pGlu-Gly-Arg-pNA), фактора Ха (Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA), активированного протеина С (pGlu-Pro-Arg-pNA) и химотрипсина (Ac-Phe-pNA). Для проведения реакций к 200 мкл пробы добавляли по 100 мкл субстрата 0.5 мг/мл в Трис-НСl буфере, pH 8.2 и 50 мкл 0.05 М Трис-НСl буфера, pH 8.2. Время реакции при 37°C – 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 50%-ной уксусной кислоты, после чего определяли поглощение спектрофотометрически при 405 нм. За 1 ед. активности ( $E_{\text{pNA}}$ ) принимали количество отщепившегося pNA за 1 мин.

**Определение протеолитической активности методом фибриновых пластин.** Фибринолитическую и активаторную по отношению к плазминогену активности определяли на фибриновых пластинках по методу Аструпа–Мюллерца–Лассена [22, 23]. Для приготовления фибриновой пластинки в чашке Петри смешивали 9 мл раствора 0.5%-ного фибриногена ("Sigma-Aldrich", США) и 250 мкл 0.4%-ного тромбина. На поверхность пластинок наносили по 30 мкл пробы, после чего чашки инкубировали в термостате при 37°C. Измерения зон лизиса проводили через 3 и 24 ч инкубации. Активность выражали в условных единицах на 1 мл пробы. За 1 усл. ед. принимали количество фермента вызывающего зону гидролиза фибриновой пластины в 1 мм<sup>2</sup>.

Для приготовления фибриновой пластины со смесью фибриллярных белков в чашке Петри смешивали 9 мл раствора, содержащего 0.5% фибриногена, 0.5% коллагена ("Sigma-Aldrich", США), 0.5% эластина ("Sigma-Aldrich", США) и 250 мкл 0.4%-ного тромбина ("Sigma-Aldrich", США). Для растворения фибриллярных белков и тромбина использовали смесь физиологического раствора и 0.05 М Трис-НСl буфера, pH 8.2. На поверхность пластинок наносили по 30 мкл пробы, после чего чашки инкубировали в термостате при 37°C. Измерения зон лизиса проводили через 3 и 24 ч инкубации. Активность выражали в условных единицах на 1 мл пробы.

**Определение наличия углеводных фрагментов в составе протеиназы *A. flavus* O-1.** Реакцию на гликопротеины, присутствующие в белковом образце, проводили методом дот-блоттинга на нитроцеллюлозных мембранах, как описано ранее [24].

В качестве положительного контроля на реакцию использовали раствор внеклеточной дрожжевой инвертазы, в качестве отрицательного — БСА, в концентрациях 0.5 мг/мл.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

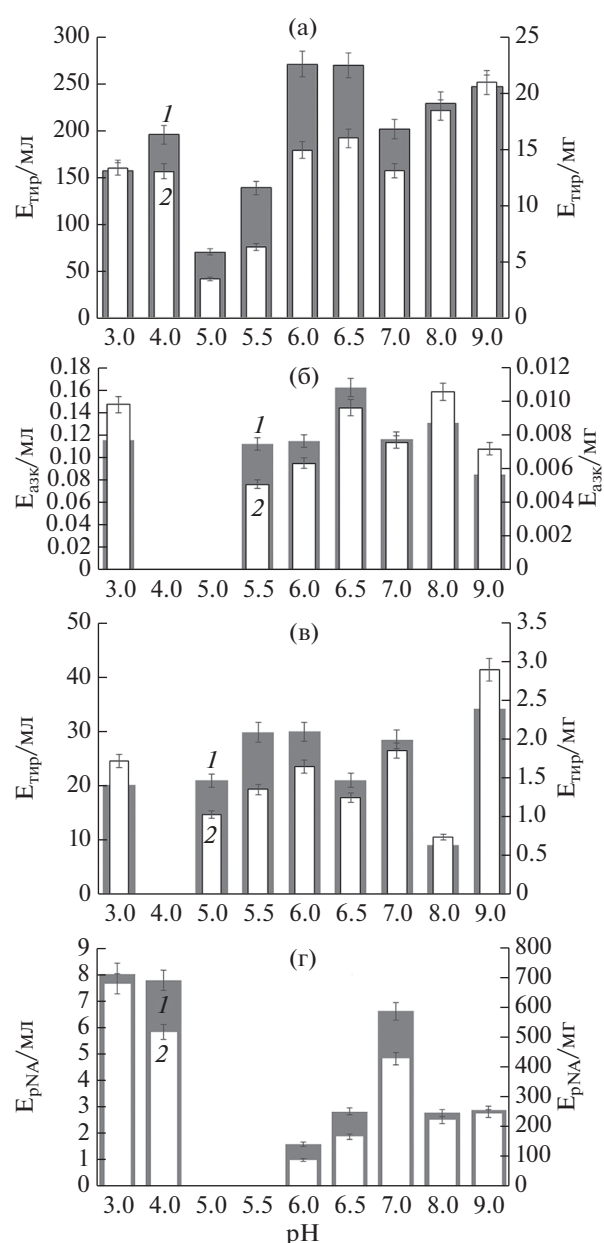
Микромицет *Aspergillus flavus* Link принадлежит к анаморфам грибов аскомицетного аффинитета: роду *Aspergillus*, семейству Aspergillaceae, порядка Eurotiales, класса Eurotiomycetes, отдела Ascomycota. Обычно представителей этого вида выделяют из почвы, растительных и животных остатков; встречаются условно-патогенные и патогенные виды.

Подбор оптимального pH среды для роста и образования протеаз *A. flavus* O-1 показал, что наибольшая общая протеолитическая (казеинолитическая) активность наблюдалась при pH 6–6.5, в то время как продуктивность мицелия по образованию фермента была выше при культивировании в среде с pH 8.0–9.0 (рис. 1а). Максимальное значение фибринолитической активности и продуктивность образования фермента наблюдали при трех значениях pH — 9.0, а также 6.0 и 7.0, при pH 4.0 фермент не секретировался в среду совсем (рис. 1в). Наибольшая эластолитическая активность *A. flavus* O-1 и ее образование на единицу биомассы наблюдались на среде с pH 3.0 и 4.0, при выращивании на среде с pH 5.0 и 5.5 активность не детектировалась (рис. 1г). Результаты определения активности коллагеназы в культуральной жидкости (КЖ) *A. flavus* O-1 показали, что оптимальный pH среды для синтеза фермента — 6.5. При этом pH наблюдались высокие как активность фермента, так и продуктивность мицелия гриба. Также высокая продуктивность наблюдалась при pH 3.0 и 8.0. При выращивании на среде с pH 4.0 и 5.0 активность не обнаруживали (рис. 1б).

В результате эксперимента по подбору оптимальной температуры, для образования протеиназ у *A. flavus* O-1 установлен диапазон температур от 24 до 30°C (рис. 2а). Фибринолитическая и эластолитическая активности, а также продуктивность микромицета, были наибольшими при температуре культивирования 24° (рис. 2б, 2г), а коллагенолитическая — 30°C (рис. 2в).

Таким образом, для *A. flavus* O-1 характерно образование нескольких протеолитических ферментов с различной специфичностью при различных условиях культивирования при различных температурах и pH среды.

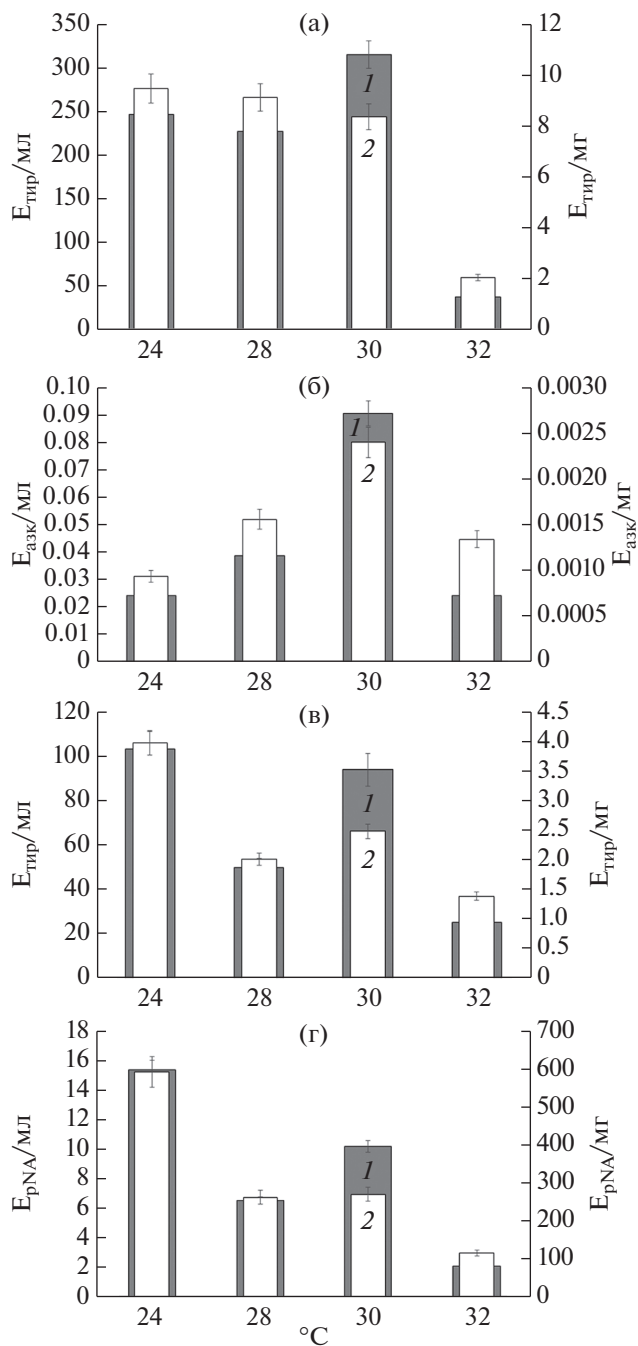
Дальнейшее культивирование гриба проводили при pH среды 6.5 и температуре 28°C. Изучение динамики образования протеолитических ферментов культурой *A. flavus* O-1 показало, что фибринолитическая активность имела один максимум, соответствующий экспоненциальной фазе



**Рис. 1.** Влияние pH среды культивирования на активность протеолитических ферментов *A. flavus* O-1: а — общая протеолитическая активность (I) и продуктивность (2), б — коллагенолитическая активность (I), продуктивность (2), в — фибринолитическая активность (I), продуктивность (2), г — эластолитическая активность (I), продуктивность (2).

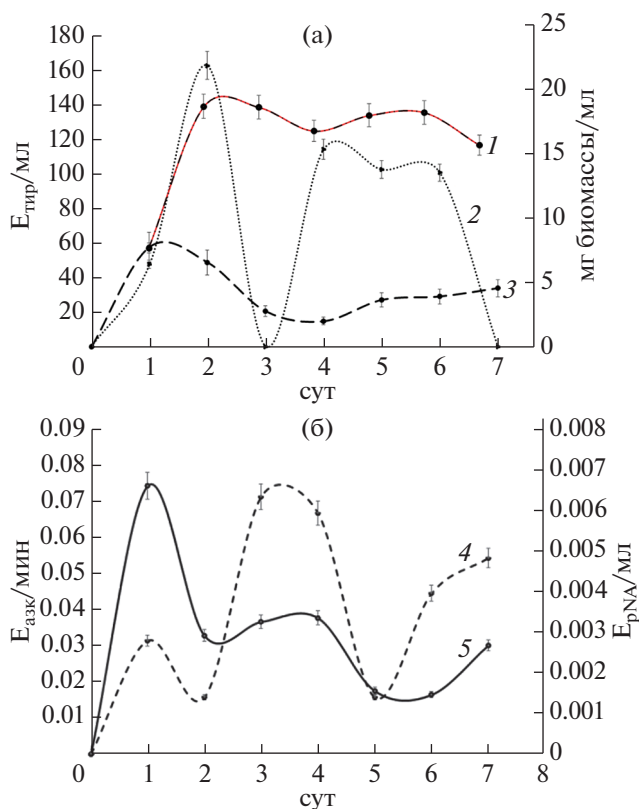
роста, приходящейся на 1 сут роста, а казеинолитическая — несколько. Первый пик протеолитической (казеинолитической) активности приходился на 2 сут и соответствовал фазе замедления роста. Второй пик приходился на 4 сут и соответствовал фазе отмирания (рис. 3а).

Для коллагенолитической и эластолитической активности выявлено несколько максимумов об-



**Рис. 2.** Влияние температуры на активность протеолитических ферментов *A. flavus* O-1: а – общая протеолитическая активность, б – коллагенолитическая активность, в – фибринолитическая активность, г – эластолитическая активность. 1 – общая активность; 2 – продуктивность.

разования – на 1 и 4 сут для первой и на 1 и 3 для второй соответственно. Первые максимумы активности соответствовали экспоненциальной фазе роста культуры, тогда как вторые – фазе отмирания (рис. 3б). Так как максимумы изученных активностей приходились на одни и те же сутки культиви-



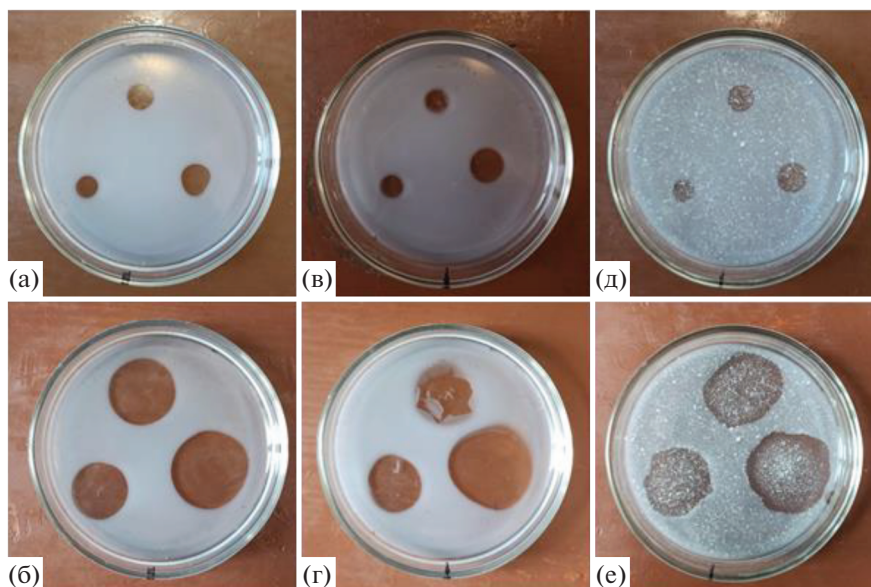
**Рис. 3.** Динамика роста культуры *A. flavus* O-1 (б) и образования внеклеточных протеиназ (а): 1 – биомасса, 2 – общая протеолитическая активность, 3 – фибринолитическая активность, 4 – эластазная активность, 5 – коллагенолитическая активность.

рования, то, можно предположить, что микромицет секретировал фермент, обладающий обоими типами активности.

Для всех изученных видов активности наблюдался волнообразный характер образования ферментов, что часто встречается у микромицетов, и вероятнее всего связано с особенностями транспорта внеклеточных ферментов из клеток.

Таким образом, по результатам изучения динамики накопления протеиназ, можно предположить, что *A. flavus* O-1 секретировал два фермента. Один фермент обладал фибринолитической, коллагенолитической и эластолитической активностью с максимумом активности на 1 сут, второй – с общей протеолитической активностью и максимумом на 2 сут.

На следующем этапе был получен лиофилизированный комплексный препарат протеиназ *A. flavus* O-1, который исследовали на протеолитическую активность по отношению к фибриллярным белкам. Анализ проводили с использованием азоколлагена, НРА (High Power Azur), азоказеина, фибриновых пластин и пластин со смесью белков (коллаген, фибрин, эластин) (табл. 1 и 2).



**Рис. 4.** Протеолитическая активность комплексного препарата протеиназ *A. flavus* O-1 по отношению к фибриллярным белкам: а, б – фибриновая пластина с примесью плазминогена (фибринолитическая и активаторная к плазминогену активность); в, г – фибриновая пластина (фибринолитическая активность); д, е – модифицированная фибриновая пластина примесью коллагена и эластина, а, в, д – 3 ч, б, г, е – 24 ч инкубации.

Протеазы комплексного препарата микромицета *A. flavus* O-1 в концентрации 5 мг/мл показали невысокую протеолитическую активность с НРА и высокую казеинолитическую активность (табл. 1).

Выраженная фибринолитическая, а также сопутствующие ей коллагенолитическая и эласто-литическая активности исследуемых протеиназ

показаны на рис. 4, видны четкие зоны лизиса фибриновых пластин и модифицированных пластин со смесью фибриллярных белков. Активаторная к плазминогену активность протеиназ наблюдалась на непрогретых фибриновых пластинах. Кроме того, наблюдали четкую зависимость активности протеиназы от ее концентрации. Как

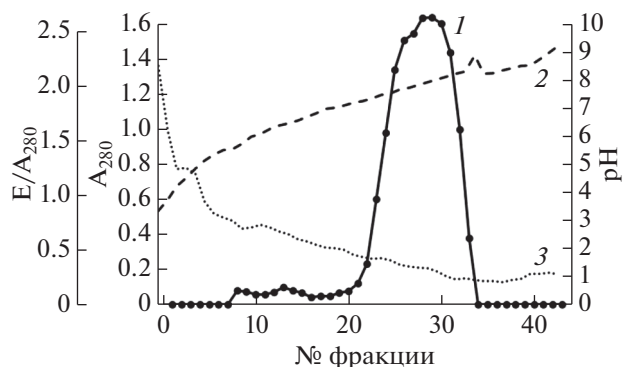
**Таблица 1.** Протеолитическая активность комплексного препарата протеиназ *A. flavus* O-1

| Субстрат            | Единицы измерения    | Активность комплексного препарата | Активность выделенной после ИЭФ протеиназы |
|---------------------|----------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------|
| Азоколлаген         | Е <sub>азк</sub> /мг | 0.199                             | 2.48                                       |
| Азоказеин           | Усл. ед./ мг         | 7.68                              | 69.05                                      |
| НРА                 | Усл.ед./мг           | 0.1                               | 1.61                                       |
| Suc-Ala-Ala-Ala-pNA | Е <sub>pNA</sub> /мг | 2.099                             | 9.48                                       |

**Таблица 2.** Действие комплексного препарата протеиназ *A. flavus* O-1 на фибриновые пластины разного состава

| Вариант фибриновой пластины               | Время инкубации, ч | Активность препарата, усл. ед./мл |         |           |
|-------------------------------------------|--------------------|-----------------------------------|---------|-----------|
|                                           |                    | 2 мг/мл                           | 1 мг/мл | 0.5 мг/мл |
| Фибрин с добавлением плазминогена         | 3                  | 519.48                            | 417.9   | 284.7     |
| Фибрин                                    |                    | 748.41                            | 417.9   | 367.13    |
| Фибрин с добавлением коллагена и эластина |                    | 479.5                             | 384.6   | 333       |
| Фибрин с добавлением плазминогена         | 24                 | 3625.5                            | 2800.5  | 1998      |
| Фибрин                                    |                    | 4375.6                            | 2251.08 | 1995.5    |
| Фибрин с добавлением коллагена и эластина |                    | 4495.5                            | 3476.5  | 2562.4    |





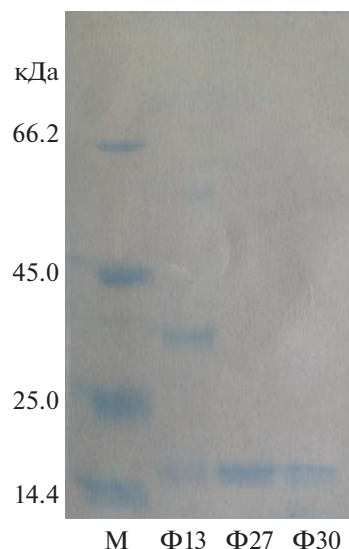
**Рис. 5.** Изоэлектрофокусирование препарата внеклеточных протеиназ микромицета *A. flavus* O-1. 1 – протеолитическая активность, 2 – pH, 3 – белок.

видно из рис. 4, площадь зоны лизиса через 3 ч инкубации возрастала с увеличением концентрации раствора фермента, нанесенного на фибриновые пластины (рис. 4а, 4в, 4д). Эта зависимость сохранялась и через 24 ч инкубации (рис. 4б, 4г, 4е). В табл. 2 представлены значения протеиназы препарата, рассчитанные из величины площадей зон лизиса фибриновых пластин. Наличие на модифицированных пластинах со смесью фибриллярных белков вкраплений в зоне лизиса указывало на неполное расщепление протеазами коллагена и эластина в условиях эксперимента.

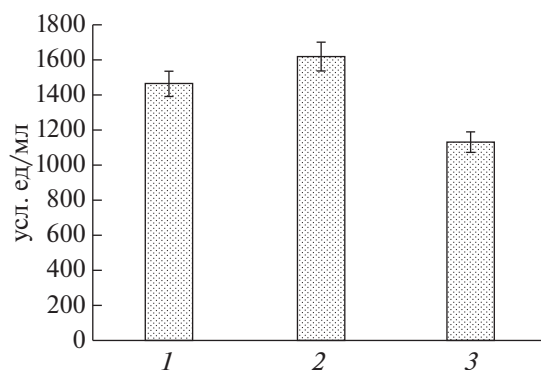
Для дальнейшего исследования состава комплексного препарата белков микромицета *A. flavus* O-1 и их разделения использовали метод изоэлектрофокусирования, который показал присутствие основного активного белка с протеолитической активностью с pI 7.82 (рис. 5).

В результате проведения электрофореза в ПААГ с ДСН была установлена молекулярная масса фермента около 17 кДа (рис. 6).

Изучение активности выделенной протеиназы по отношению к различным белковым субстратам – азоказеину, азоколлагену и НРА показало,



**Рис. 6.** Электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН активных фракций после изоэлектрофокусирования. М – метки, фракции: Ф13 (№ 13), Ф27 (№ 27) и Ф30 (№ 30). (В скобках номера фракций, полученных при изоэлектрофокусировании).



**Рис. 7.** Протеолитическая активность протеиназы *A. flavus* O-1 по отношению к фибриллярным белкам. 1 – фибрин с примесью плазминогена; 2 – фибрин; 3 – фибрин с примесями коллагена и эластина.

**Таблица 3.** Амидолитическая активность протеиназы *A. flavus* O-1

| Хромогенный пептидный субстрат | Расщепляющий фермент            | $E_{pNA}/мл$ |
|--------------------------------|---------------------------------|--------------|
| Suc-Ala-Ala-Ala-pNA            | Эластаза                        | 10.44        |
| Z-Ala-Ala-Leu-pNA              | Субтилизин                      | 0            |
| H-DVal-Leu-Lys-pNA             | Плазмин                         | 37.18        |
| Tos-Gly-Pro-Arg-pNA            | Тромбин                         | 48.14        |
| dIle-Pro-Arg-pNA               | Тканевой активатор плазминогена | 0            |
| pGlu-Gly-Arg-pNA               | Урокиназа                       | 0            |
| z-D-Arg-Gly-Arg-pNA            | Фактор Ха                       | 0            |
| Pyr-Glu-Arg-pNA                | Протеин С                       | 0            |
| Ac-Phe-pNA                     | Химотрипсин                     | 0            |

что протеиназа обладала выраженной казеинолитической активностью, а также гидролизовала субстраты азоколлаген и НРА (табл. 1). Изучение субстратной специфичности фермента с различными хромогенными пептидными субстратами позволило выявить активность эластазы, а также высокие плазминоподобную и тромбиноподобную активности (табл. 3). Наличие плазминоподобной активности могло свидетельствовать о способности фермента к лизису фибрина. Активность по отношению к остальным протестированным субстратам не была выявлена.

Методом фибриновых пластин было показано, что протеиназа обладала способностью к расщеплению фибрина и комплексного субстрата из фибриллярных белков, состоящего из фибрина, коллагена и эластина (рис. 7).

Для определения типа катализа протеиназы был проведен ингибиторный анализ, с использованием ингибиторов на различные классы протеиназ (табл. 4). В реакции с PMSF, ингибитором сериновых протеиназ, при соотношении фермент : ингибитор, равном 1 : 100, наблюдалось почти полное ингибирование активности фермента. Принадлежность изучаемой протеиназы к классу сериновых протеиназ подтверждалось также реакцией с TPSK — ингибитором химотрипсिनотрипсина, при которой происходило ингибирование активности почти в два раза (табл. 4). Кроме того, наблюдалось слабое ингибирование фермента ЭДТА — ингибитором металлопротеиназ.

Поскольку после синтеза в клетке фермент может подвергаться посттрансляционной модификации, например, в том числе присоединяя углеводные фрагменты, было проведено определение их присутствия в составе выделенной протеиназы *A. flavus* O-1. Результаты показали отсутствие углеводных фрагментов в составе протеиназы, то есть фермент не гликозилирован (рис. 8).

Ранее из различных штаммов *A. flavus* были выделены различные протеиназы, обладающие эластинолитической активностью. Так, была выделена протеиназа с молекулярной массой 23 кДа и изоэлектрической точкой 7.6 с оптимумом активности при pH 8.0 и 50°C [10]. Штамм *A. flavus* NRRL 18543 секретирует эластазу с молекулярной массой 35 кДа, которая впоследствии подвергалась автолизу в культуре до более стабильной формы с молекулярной массой 23 кДа. Очищенная протеиназа с массой 23 кДа, по-видимому, была членом семейства металлопротеаз из-за сильного ингибирования хелатирующими агентами ЭДТА и 1,10-фенантролином. Показано, что эта эластаза термостабильна, устойчива к протеолизу и способна гидролизовать широкий спектр белковых субстратов, включая как гидрофобные белки (эластин, запасной белок семян хлопка, коллаген), так и растворимые белки (овальбумин,



Рис. 8. Дот-блоттинг гликопротеинов в молекулах протеиназы *A. flavus* O-1 (Ф30) с ШИК-реактивом, инвертаза (K+, положительный контроль) и БСА (K-, отрицательный контроль).

альбумин бычьей сыворотки) [11]. Поиск основного белка-аллергена *A. flavus* показал, что таковым является сериновая протеиназа с массой 34 кДа, которая имела значительное сходство с эластинолитической протеиназой *A. fumigatus* [13, 14].

Таким образом, по-видимому *A. flavus* способен образовывать несколько протеиназ с различными молекулярными массами.

Дальнейшие исследования показали, что щелочная протеиназа — один из широко распространенных белков экзопроотеома *A. flavus*. Этот фермент принадлежит к семейству сериновых протеиназ с эластинолитической активностью [24]. Оказалось, что данная протеиназа существует в виде 24 различных протеоформ с разной pI и молекулярной массой. На основе спектральных подсчетов было показано, что среди идентифицированных экзоферментов наиболее распространенным бел-

Таблица 4. Ингибиторный анализ протеиназы *A. flavus* O-1

| Ингибитор                 | Соотношение фермент : ингибитор | Остаточная активность, % |
|---------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| Контроль (без ингибитора) | —                               | 100.0                    |
| ЭДТА                      | 1 : 10                          | 69.8                     |
|                           | 1 : 100                         | 86.6                     |
| n-ХМБ                     | 1 : 10                          | 100.0                    |
|                           | 1 : 100                         | 100.0                    |
| TLCK                      | 1 : 10                          | 100.0                    |
|                           | 1 : 100                         | 100.0                    |
| TPCK                      | 1 : 10                          | 55.7                     |
|                           | 1 : 100                         | 60.7                     |
| Соевый ингибитор трипсина | 1 : 10                          | 100.0                    |
|                           | 1 : 100                         | 100.0                    |
| PMSF                      | 1 : 10                          | 48.7                     |
|                           | 1 : 100                         | 2.6                      |

ком является внеклеточная металлопротеиназа, а на втором месте — щелочная протеиназа [9].

В работе было показано, что штамм *A. flavus* O-1 секретирует комплекс по меньшей мере из двух протеолитических ферментов. Препаративным изоэлектрофокусированием был выделен наиболее активный фермент. Им оказалась негликозилированная сериновая протеиназа с молекулярной массой 17 кДа и pI 7.82. Протеиназа обладала широкой субстратной специфичностью и была способна расщеплять такие фибриллярные белки, как коллаген, эластин и фибрин.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. № 1. P. 15–32.
2. Павлюкова Е.Б., Белозерский М.А., Дунаевский Я.Е. // Биохимия. 1998. Т. 63. № 8. С. 1059–1089.
3. Rosenberg L., Krieger Y., Silberstein E., Arnon O., Sinelnikov I.A., Bogdanov-Berezovsky A., Singer A. // J. Burns. 2012. V. 38. № 7. P. 1035–1040.
4. Montoya C.A., Rutherford S.M., Olson T.D., Purba A.S., Drummond L.N., Boland M.J., Moughan P.J. // Br. J. Nutr. 2014. V. 111. № 6. P. 957–967.
5. Kumar C.G., Takagi H. // Biotechnol. Adv. 1999. V. 17. № 7. P. 561–594.
6. Hedayati M.T., Pasqualotto A.C., Warn P.A., Bowyer P., Denning D.W. // Microbiology. 2007. V. 153. № 6. P. 1677–1692.
7. Okumura Y., Ogawa K., Nikai T. // J. Med. Microbiol. 2004. V. 53. № 5. P. 351–354.
8. Ключевская В.В., Егоров Н.С. // Микробиология. 1983. Т. 52. № 3. С. 396–403.
9. Selvam R.M., Nithya R., Devi P.N., Shree R.S., Nila M.V., Demonte N.L., Thangavel C., Maheshwari J.J., Lalitha P., Prajna N.V., Dharmalingam K. // J. Proteomics. 2015. V. 115. P. 23–35.
10. Rhodes J.C., Amlung T.W., Miller M.S. // Infect. Immun. 1990. V. 58. № 8. P. 2529–2534.
11. Mellon J.E., Cotty P.J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996. V. 46. P. 138–142.
12. Ramesh M.V., Sirakova T., Kolattukudy P.E. // Infect Immun. 1994. V. 62. № 1. P. 79–85.
13. Yu C.J., Chiou S.H., Lai W.Y., Chiang B.L., Chow L.P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. V. 261. № 3. P. 669–675.
14. Chou H., Lin W.L., Tam M.F., Wang S.R., Han S.H., Shen H.D. Int. Arch. Allergy. Immunol. 1999. V. 119. № 4. P. 282–290.
15. Сухосырова Е.А., Никитина З.К., Яковлева М.Б., Вещикова Е.В., Быков В.А. // Бюлл. эксперим. биол. мед. 2003. Т. 35. № 5. С. 526–530.
16. Gertler A., Trop M. // Eur. J. Biochem. 1971. V. 19. № 1. P. 90–96.
17. Vesterberg O. // Biochem. Biophys. acta. 1972. V. 1. P. 11–19.
18. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
19. Крейер В.Г., Руденская Г.Н., Ландау Н.С., Покровская С.С., Степанов В.М., Егоров Н.С. // Биохимия. 1983. Т. 48. № 8. С. 1365–1373.
20. Anson M.L. // Science. 1935. V. 81. P. 467–470.
21. Осмоловский А.А., Попова Е.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2016. № 1. С. 71–75.
22. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 1. С. 86–92.
23. Шаркова Т.С., Кураков А.В., Осмоловский А.А., Матвеева Э.О., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // Микробиология. 2015. Т. 84. № 3. С. 316–322.
24. Chen Z.-Y., Brown R.L., Cary J.W., Damann K.E., Cleveland T.E. // Toxin Rev. 2009. V. 28. P. 187–197.

### Formation And Properties of Extracellular Proteinase of Micromycete *Aspergillus flavus* O-1, Active Toward Fibrillary Proteins

A. A. Galiakberova<sup>a</sup>, D. M. Bednenko<sup>a</sup>, V. G. Kreyer<sup>a</sup>, A. A. Osmolovskiy<sup>a,\*</sup>, and N. S. Egorov<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Biological Faculty, Moscow State University M.V. Lomonosov, Moscow, 119234 Russia

<sup>b</sup>International Biotechnology Center, Moscow State University. M.V. Lomonosov, Moscow, 119234 Russia

\*e-mail: aosmol@mail.ru

It has been shown that *Aspergillus flavus* O-1 micromycete secretes a complex of at least two proteolytic enzymes. By preparative isoelectric focusing, the most active enzyme was isolated, which turned out to be a non-glycosylated serine proteinase with a molecular weight of 17 kDa and a pI of 7.82. Proteinase had a broad substrate specificity and was able to degrade fibrillar proteins such as collagen, elastin, and fibrin.

**Keywords:** *Aspergillus flavus*, proteinases, serine proteinases, proteolytic activity



## СРАВНИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ L-АСПАРАГИНАЗ ЭКСТРЕМОФИЛОВ

© 2021 г. М. В. Думина<sup>1,\*</sup>, А. А. Жгун<sup>1</sup>, М. В. Покровская<sup>2</sup>,  
С. С. Александрова<sup>2</sup>, Д. Д. Жданов<sup>2</sup>, Н. Н. Соколов<sup>2</sup>, М. А. Эльдаров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН,  
Москва, 117312 Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия

\*e-mail: DuminaMaria@gmail.com

Поступила в редакцию 07.04.2021 г.

После доработки 22.04.2021 г.

Принята к публикации 23.04.2021 г.

В работе исследовали активность новых L-аспарагиназ экстремофильного происхождения: термо-ацидофильной археи *Acidilobus saccharovorans*, термофильной бактерии *Melioribacter roseus* и психрофильного гриба *Sclerotinia borealis*. Активные формы ферментов в рекомбинантных штаммах *Escherichia coli* получали путем экспрессии нативного гена L-аспарагиназы из *M. roseus* (MgA); для генов L-аспарагиназ из *A. saccharovorans* (AsA) и *S. borealis* (SbA) потребовалась оптимизация кодонового состава. Сравнительный анализ специфической активности рекомбинантных L-аспарагиназ при различных температурах и pH показал, что наибольшей способностью к гидролизу L-аспарагина обладала MgA. В ходе изучения влияния температуры и pH на ферментативную активность неочищенного экстракта MgA выявлено, что максимальную активность фермент проявлял при 75°C и pH 9.0. Добавление ионов металлов в концентрации 1.0 mM оказывало различное действие на активность MgA. Катионы  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  полностью ингибировали активность фермента. При добавлении ионов  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  к неочищенному экстракту MgA специфическая активность изменялась в диапазоне 5–28%. Полученные в работе результаты указывают, что L-аспарагиназа из *M. roseus* может быть перспективным объектом для последующего детального изучения энзиматических характеристик и использования в биотехнологической промышленности.

**Ключевые слова:** L-аспарагиназа, экстремофильные микроорганизмы, гетерологическая экспрессия, противоопухолевый препарат

**DOI:** 10.31857/S0555109921050056

L-аспарагиназа (L-АСП, L-аспарагин-амидогидролаза, КФ 3.5.1.1) — первый для клинической онкогематологии бактериальный фермент со специфическим действием на опухолевые клетки. Он остается одним из основных препаратов комбинированной химиотерапии острого лимфобластного лейкоза на протяжении более 40 лет [1, 2]. Помимо биомедицинского применения в настоящее время проводятся исследования по использованию фермента в технологиях пищевых производств для снижения уровня акриламида, потенциально канцерогенного и нейротоксического вещества [3, 4]. Акриламид образуется в пищевых продуктах в процессе взаимодействия L-аспарагина с редуцирующими сахарами в реакции Майяра [5]. Обработка L-АСП выступает од-

ним из способов снижения уровня L-аспарагина, а следовательно, акриламида в пищевых продуктах при сохранении их органолептических характеристик.

Известные и применяемые на данный момент L-АСП не лишены недостатков. Препараты L-АСП в онкогематологии способны вызывать ряд нежелательных эффектов: аллергические реакции, гепатотоксичность, нефротоксичность, тромбозы, осложнения со стороны ЦНС и др. [6, 7]. Нежелательные проявления связывают с низкой субстратной специфичностью фермента — проявлением L-глутаминазой активности [8, 9]. Важной характеристикой является также стабильность применяемых в биомедицине L-АСП [10, 11]. Повышение стабильности фермента спо-

способствует улучшению его фармакокинетических свойств: увеличению продолжительности циркуляции в крови, снижению кратности дозирования и вероятности развития аллергических проявлений.

Применение существующих препаратов L-АСП для предобработки сырья с целью снижения уровня акриламида на пищевых производствах также ограничено, ввиду их недостаточной активности и стабильности при высоких температурах [12].

Известно, что L-АСП широко распространены в природе, характеризуются разнообразием структурно-функциональных и биохимических свойств. Этим объясняется непрерывный поиск новых источников перспективных L-АСП с повышенной специфичностью действия, активностью и стабильностью.

L-АСП выделены и охарактеризованы у множества бактерий, архей, дрожжей, мицелиальных грибов, животных, растений [2, 12]. Среди различных микроорганизмов особый интерес представляют экстремофилы, выступающие естественным источником многих высокостабильных ферментов с широкими перспективами применения в биотехнологии [13, 14]. Поскольку проблема стабильности, активности мезофильных L-АСП является одной из ключевых, усилия в данном исследовании были сфокусированы на поиске новых “экстремофильных” гомологов этих ферментов.

В качестве источников таких L-АСП были выбраны микроорганизмы 3 классов, устойчивые к различным экстремальным условиям внешней среды.

— *Sclerotinia borealis* — психрофильный гриб. Этот аскомицет способен обитать на поверхности почвы под снегом и развиваться при температурах до  $-2...-3^{\circ}\text{C}$ ; оптимальный рост наблюдается при  $-1^{\circ}\text{C}$  [15], он также способен расти в условиях сниженной влажности [16].

— *Acidilobus saccharovorans* — ацидофильная термофильная кренархея, растет в диапазоне температур от  $60$  до  $90^{\circ}\text{C}$ , оптимальный pH  $3.5-4.0$  [17].

— *Melioribacter roseus* — умеренно термофильная, факультативно анаэробная бактерия [18], имеет температурный диапазон роста  $35-60^{\circ}\text{C}$  при оптимальном  $55^{\circ}\text{C}$ .

Психрофильные L-АСП могут быть интересны, поскольку реакции, катализируемые психрофильными ферментами, термодинамически характеризуются низкой энергией активации. При этом активные сайты таких белков, как правило, больше и доступнее для субстрата. В результате их удельная активность может быть в 10 и более раз выше, чем для мезофильных гомологов при температуре  $20-30^{\circ}\text{C}$  [19]. Для исследования выбрали психрофильный гриб *S. borealis*, являющийся эукариотическим микроорганизмом. Полагают, что L-АСП эукариотического происхождения по-

тенциально менее иммуногенны для человека и имеют перспективы для разработки препаратов с улучшенным профилем безопасности [20].

Выбор термофила *M. roseus* и термоацидофила *A. saccharovorans* как источников новых L-АСП продиктован возможностью их использования как в высокотемпературных процессах в пищевой промышленности, так и в биомедицине. Установлено, что повышенная стабильность термофильных L-АСП позволяет им успешно конкурировать с L-АСП мезофильных микроорганизмов, превосходя их по активности, в том числе, в относительно мягких физиологических условиях при  $37^{\circ}\text{C}$  [21].

Цель работы — получение рекомбинантных штаммов *E. coli*, экспрессирующих L-АСП экстремофилов *S. borealis*, *A. saccharovorans*, *M. roseus*, сравнительное исследование специфической активности рекомбинантных L-АСП.

## МЕТОДИКА

**Биоинформационный анализ.** Поиск гомологичных последовательностей L-АСП проводили в среде BLAST с использованием ресурса NCBI (“National Center for Biotechnology Information”, США) [22]. Для филогенетического анализа использовали программу MEGA X (“MEGA software group”, США) [23]. Дизайн экспрессионных конструкций осуществляли в среде Vector NTI v.6.0. (“InforMax”, США) [24]. Оптимизацию кодового состава для экспрессии в клетках *E. coli* генов L-АСП из *A. saccharovorans* и *S. borealis* проводили с помощью программы Twist Codon Optimization tool (“TWIST Bioscience”, США) (<https://www.twistbioscience.com/>).

**Штаммы микроорганизмов.** В работе использовали следующие источники последовательностей экстремофильных L-АСП: *S. borealis* F-4128 (геном штамма депонирован в Genbank под номером K1628577 AYS01000000) [25], *A. saccharovorans* 345-15 (номер доступа в Genbank — NC\_014374) [17], *M. roseus* P3M-2 (номер доступа в Genbank — NC\_018178) [18]. Для создания генно-инженерных конструкций использовали штамм *E. coli* XL1-Blue (“Stratagene”, США). Гетерологическую экспрессию L-АСП экстремофилов проводили в клетках *E. coli* BL21(DE3) (“Novagene”, США).

**Конструирование экспрессионных векторов.** Экспрессионные векторы конструировали на базе коммерческой плазмиды pET-28a(+) (“Novagen”, США). Были разработаны два варианта конструкций: для экспрессии нативных и оптимизированных нуклеотидных последовательностей L-АСП. Все варианты кодирующих последовательностей для клонирования в вектор pET-28a(+) под контроль промотора гена 10 фага T7 были предварительно синтезированы компанией “TWIST Bioscience” (США).

Таблица 1. Штаммы микроорганизмов, полученные в работе

| Обозначение штамма | Характеристика экспрессионного штамма            |                                                                                                                                         | Номер доступа GenBank   |
|--------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
|                    | штамм <i>E. coli</i> /экспрессионная конструкция | экспрессируемый ген L-АСП, его тип                                                                                                      |                         |
| Ec0                | BL21(DE3)/pET28a(+)                              | —                                                                                                                                       | —                       |
| Mr1                | BL21(DE3)/pET28a(+)_ <i>mrA</i>                  | <i>mrA</i> , дикий тип из <i>M. roseus</i> P3M-2                                                                                        | MROS_RS06765 [18]       |
| As1                | BL21(DE3)/pET28a(+)_ <i>asA</i>                  | <i>asA</i> , дикий тип из <i>A. saccharovorans</i> 345-15                                                                               | ASAC_RS04025 [17]       |
| Sb1                | BL21(DE3)/pET28a(+)_ <i>sbA</i>                  | <i>sbA</i> , сплайсированная последовательность гена дикого типа из <i>S. borealis</i> F-4128                                           | SBOR_3103 [25]          |
| As2                | BL21(DE3)/pET28a(+)_ <i>asA<sub>mod</sub></i>    | <i>asA<sub>mod</sub></i> , синтетический аналог <i>asA</i> , получен после оптимизации кодового состава для экспрессии в <i>E. coli</i> | MW699185, данная работа |
| Sb2                | BL21(DE3)/pET28a(+)_ <i>sbA<sub>mod</sub></i>    | <i>sbA<sub>mod</sub></i> , синтетический аналог <i>sbA</i> , получен после оптимизации кодового состава для экспрессии в <i>E. coli</i> | MW699184, данная работа |

Первую серию векторов получили после клонирования нативных кодирующих последовательностей L-АСП экстремофилов, содержащих дополнительные сайты рестрикции на 5'- и 3'-концах. Для этого последовательности, содержащие ген MROS\_RS06765 (из *M. roseus* P3M), ген ASAC\_RS04025 (из *A. saccharovorans* 345-15) и сплайсированный вариант гена для SBOR\_3103 (из *S. borealis* F-4128) гидролизовали по сайтам *NheI*/*HindIII* и встраивали в гидролизованный по сайтам *NheI*/*HindIII* вектор pET-28a(+). В результате получали конструкции pET28a(+)\_*mrA*, pET28a(+)\_*asA* и pET28a(+)\_*sbA*. Для получения рекомбинантных L-АСП из археи *A. saccharovorans* 345-15 и гриба *S. borealis* F-4128 дополнительно сконструировали векторы, несущие последовательности с оптимизированным для экспрессии в *E. coli* кодовым составом. Последовательности гидролизовали по сайтам *NheI*/*HindIII* и встраивали в гидролизованный по сайтам *NheI*/*HindIII* вектор pET-28a(+). В результате получили конструкции pET28a(+)\_*asA<sub>mod</sub>* и pET28a(+)\_*sbA<sub>mod</sub>*.

**Получение рекомбинантных штаммов.** Для гетерологической экспрессии L-АСП экстремофилов созданные конструкции трансформировали в клетки *E. coli* BL21(DE3). В результате получили рекомбинантные штаммы Mr1, As1, Sb1, As2, Sb2 (табл. 1). Штамм Ec0 (табл. 1), полученный при трансформации *E. coli* BL21(DE3) исходной плазмидой pET28a(+), использовали в качестве контроля во всех экспериментах.

**Культивирование штаммов.** Штаммы *E. coli* BL21(DE3), экспрессирующие L-АСП экстремофилов, и штамм Ec0 культивировали согласно

условиям, описанным ранее [26], в LB среде с добавлением 0.05 мг/мл канамицина при 37°C. Штаммы Sb1, As1, As2 и Sb2 дополнительно выращивали при 24°C. Индуктор (лактозу или ИПТГ) добавляли в среду при OD<sub>600</sub> = 0.5, 1.0 либо 1.9 до конечной концентрации 0.02, 0.1 либо 0.2%. Клеточную биомассу собирали через 17–20 ч после индукции.

**Определение ферментативной активности L-аспарагиназы.** После культивирования клетки собирали центрифугированием (4000 g, 15 мин), ресуспендировали в буферах с различными значениями pH: А (0.1 мМ Na-ацетатный, pH 5.2), Б (0.1 мМ Na-фосфатный, pH 7.3), В (0.1 мМ боратный, pH 9.6). Далее клетки разрушали ультразвуком в условиях, описанных ранее [26]. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 12000 g, 15 мин при 4°C. Активность L-АСП определяли в супернатанте (неочищенном экстракте) по количеству образовавшегося аммиака методом прямой несселеризации [29, 30]. Реакции проводили в буферах А, Б и В при температурах 24, 37 и 94°C. За 1 единицу активности L-аспарагиназы (1 МЕ — международная единица) принимали количество фермента, катализирующее высвобождение 1 мкмоль аммиака за 1 мин в условиях эксперимента, активность выражали в МЕ/мл.

**Влияние на ферментативную активность температуры и pH.** Специфическую активность неочищенного экстракта L-АСП определяли в инкубационной смеси в 0.05 М трис-HCl буфере, pH 7.8, в интервале температур 37–80°C. Влияние pH на активность фермента изучали при температуре, соответствующей максимальной активности не-

очищенного фермента, с L-аспарагином в качестве субстрата в следующих буферных системах: 0.1 М Na-фосфатной, pH 7.1–8.0; 0.05 М трис-HCl, pH 7.8–9.0; 0.25 М боратный, pH 9.0–9.5. Относительную активность выражали в % от максимального значения, установленного в эксперименте.

**Определение влияния ионов металлов.** Активность L-АСП в неочищенном экстракте определяли при добавлении ионов металлов ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ), а также ЭДТА. Все вещества ( $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$  и ЭДТА) добавляли в концентрации 1.0 мМ. Ферментативную активность определяли при значениях температуры и pH, соответствующих максимальной активности неочищенного фермента (75°C, pH 9.0), при добавлении L-аспарагина и соответствующих ионов металлов в трех повторностях. Полученные значения выражали в % от активности фермента без добавления катионов металлов, которую принимали за 100%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Идентификация и анализ последовательностей экстремофильных L-АСП.** В качестве источников новых перспективных L-АСП были выбраны экстремофилы с ранее аннотированными геномными последовательностями: психрофильный мицелиальный гриб *S. borealis* F-4128 [25], ацидофильная термофильная кренархея *A. saccharovorans* 345-15 [17], а также термофильная бактерия *M. roseus* РЗМ-2 [18]. Данные микроорганизмы, являясь представителями трех доменов, адаптированы к росту при различных экстремальных факторах среды. Филогенетический анализ на основе белковых последовательностей показал, что L-АСП психрофильного гриба *S. borealis* F-4128 (SbA) кластеризуется с L-АСП грибного происхождения, относящимся к *Botrytis* sp., *Molinilia* sp. и *Aspergillus* sp. Уровень идентичности данных L-АСП составляет 91–78% (рис. 1, табл. 2). Ближайшими гомологами L-АСП *A. saccharovorans* 345-15 (AsA) являются L-АСП *Acidilobus* sp. Уровень их гомологии варьирует в диапазоне 78–64% (рис. 1, табл. 2). Для L-АСП термофильной бактерии *M. roseus* (MrA) показано промежуточное положение между L-АСП *Acidilobus* sp. и представителями группы *Bacteroidetes/Chlorobi*, к которой относится данный микроорганизм (рис. 1, табл. 2).

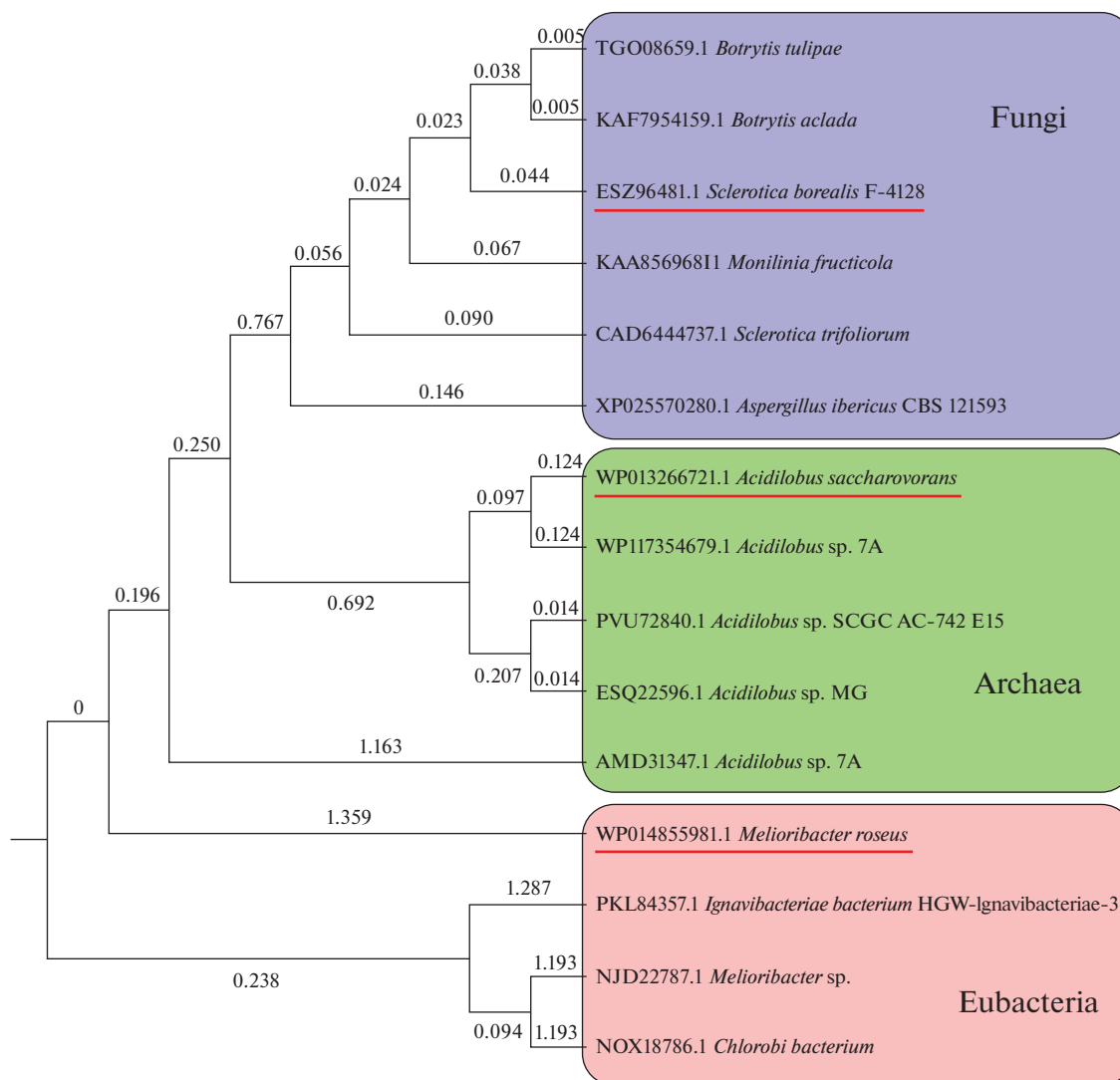
Сравнение SbA, AsA и MrA с подробно изученными L-АСП экстремофильного и мезофильного происхождения показало низкий уровень их гомологии, который не превышал 27% (табл. 2). Согласно данным анализа, наиболее близкими идентифицируемыми гомологами для изучаемых в работе SbA, AsA и MrA могут быть ранее неохарактеризованные L-АСП, основны-

ми источниками которых являются некультивируемые штаммы микроорганизмов (табл. 2). L-АСП *A. saccharovorans* 345-15 по классификации CDD относится к неохарактеризованному подсемейству L-аспарагиназа 2-подобных ферментов археобактерий.

**Клонирование и экспрессия генов экстремофильных L-АСП.** Гетерологическую экспрессию изучаемых экстремофильных L-АСП проводили в клетках мезофильной бактерии *E. coli* BL21(DE3) под контролем промотора гена 10 фага T7 в составе вектора pET-28a(+). На первом этапе создали конструкции для экспрессии нативных генов L-АСП. При культивировании рекомбинантных штаммов в стандартных условиях (индукция 0.2%-ой лактозой при  $\text{OD}_{600} = 1.0$ ) активность L-АСП обнаружили только для штамма Mr1. У штаммов As1 и Sb1 L-АСП активность полностью отсутствовала. Поскольку оптимизация условий экспрессии для этих штаммов (по температуре культивирования, оптической плотности клеток при добавлении индуктора, концентрации и типу индуктора) не позволила получить активные формы ферментов, провели оптимизацию кодонового состава кодирующих их последовательностей для экспрессии в клетках *E. coli*.

В ходе частичной замены редких для данного микроорганизма минорных кодонов на синонимичные мажорные кодоны получили синтетические варианты генов, кодирующих AsA и SbA аналогичного аминокислотного состава. Оптимизированные последовательности для L-АСП из психрофильного гриба *S. borealis* F-4128 и термоацидофильной кренархеи *A. saccharovorans* 345-15, депонированные в Genbank под номерами доступа MW699184 и MW699185 соответственно, синтезировали и использовали для создания генно-инженерных конструкций на базе вектора pET-28a(+) для экспрессии в клетках *E. coli* BL21(DE3) (табл. 1). Полученные таким образом рекомбинантные штаммы As2 и Sb2, экспрессирующие модифицированные *asA<sub>mod</sub>* и *sbA<sub>mod</sub>* соответственно, проявляли L-аспарагиназную активность. В оптимизированных условиях культивирования штаммов As2 и Sb2 проводили при температуре 24°C, в качестве индуктора добавляли лактозу при  $\text{OD}_{600} = 0.5$  до конечной концентрации 0.2%.

Оптимизация нуклеотидной последовательности позволила провести гетерологическую экспрессию неизученной ранее психрофильной L-АСП грибов и полиэкстремофильной L-АСП архей, относящейся к неохарактеризованному подсемейству L-аспарагиназа 2-подобных ферментов археобактерий. Ранее предпринимались попытки гомологичной экспрессии L-АСП психрофилов и ацидофилов, которые сопровождались необходимостью многофакторной оптимизации условий культивирования продуцентов и высокой вари-



**Рис. 1.** Филогенетическая дендрограмма последовательностей L-АСП микроорганизмов. Дендрограмма построена по методу попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA), подчеркнуты исследуемые в работе последовательности.

бельностью ферментативной активности экспрессируемых таким образом L-АСП [19, 20, 35, 36].

Следует отметить, что источниками белков экстремофильного происхождения часто являются микроорганизмы, некультивируемые либо требующие особых условий культивирования, экспрессии целевого белка, что существенно осложняло возможность как их изучения, так и возможного биотехнологического получения. В частности, для роста изучаемого психрофильного гриба *S. borealis* необходимы пониженные температуры [15]. Для культивирования полиэкстремофильной кренархеи *A. saccharovorans* и термофильной бактерии *M. roseus* требуется повышенная температура и создание анаэробных условий [18, 27].

Для характеристики L-АСП таких бактерий, архей или грибов могут быть использованы рекомбинантные штаммы на базе *E. coli*. В ходе ра-

боты по экспрессии природных кодирующих последовательностей активность проявлял фермент из экстремофильной бактерии *M. roseus* РЗМ-2. Для L-АСП архейного и грибного происхождения и экспрессии в клетках *E. coli* потребовалась предварительная оптимизация кодового состава. Рекомбинантные штаммы As2 и Sb2, экспрессирующие синтетические варианты нуклеотидных последовательностей L-АСП *asa<sub>mod</sub>* и *sbA<sub>mod</sub>*, а также Mг1 с экспрессией нативной последовательности *mrA* использовали для последующей характеристики ферментативной активности этих белков.

**Ферментативная активность неочищенных экстрактов L-АСП экстремофилов.** Активность гетерологично экспрессируемых L-АСП экстремофилов оценивали методом прямой несслеризации при различных экспериментальных условиях — температуре и pH (рис. 2). Наиболее высокую L-АСП

Таблица 2. Сравнение аминокислотных последовательностей L-АСП

| Микроорганизм-источник L-АСП                   | Номер доступа последовательности в GenBank | Идентичность, % | Комментарии                                                                       |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Гомологи L-АСП <i>S. borealis</i> F-4128       |                                            |                 |                                                                                   |
| <b><i>S. borealis</i> F-4128</b>               | <b>ESZ96481.1</b>                          | <b>100.00</b>   | <b>SbA, изучаемая L-АСП</b>                                                       |
| <i>Botrytis tulipae</i>                        | TGO08659.1                                 | 91.78           | Гипотетический белок, предсказанный по гомологии                                  |
| <i>Botrytis aclada</i>                         | KAF7954159.1                               | 91.51           |                                                                                   |
| <i>Botryotinia squamosa</i>                    | KAF7869258.1                               | 90.98           |                                                                                   |
| <i>Monilinia fructicola</i>                    | KAA8569682.1                               | 85.75           |                                                                                   |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980 UF-70     | APA11519.1                                 | 83.64           |                                                                                   |
| <i>Sclerotinia trifoliorum</i>                 | CAD6444737.1                               | 83.64           |                                                                                   |
| <i>Aspergillus ibericus</i> CBS 121593         | XP_025570260.1                             | 77.99           | Охарактеризованная периплазматическая L-АСП II типа экстремофильной археи [29]    |
| <i>Pyrococcus yayanosii</i> CH1                | AEH25396.1                                 | 27.21           |                                                                                   |
| <i>Thermococcus kodakarensis</i>               | WP_011250607.1                             | 25.17           |                                                                                   |
| <i>E. coli</i>                                 | WP_167585435.1                             | 24.25           | Охарактеризованная периплазматическая L-АСП II типа мезофильной бактерии [31, 32] |
| Гомологи L-АСП <i>A. saccharovorans</i> 345-15 |                                            |                 |                                                                                   |
| <b><i>A. saccharovorans</i> 345-15</b>         | <b>WP_013266721.1</b>                      | <b>100.00</b>   | <b>AsA, изучаемая L-АСП</b>                                                       |
| <i>Acidilobus</i> sp. 7A                       | WP_117354679.1                             | 78.25           | Неохарактеризованное субсемейство L-АСП 2 типа архейного происхождения            |
| <i>Acidilobus</i> sp. SCGC AC-742_E15          | PVU72840.1                                 | 65.31           |                                                                                   |
| <i>Acidilobus</i> sp. MG                       | ESQ22596.1                                 | 63.58           | Гипотетический белок из некультивируемого вида, предсказанный по гомологии        |
| Гомологи L-АСП <i>M. roseus</i> P3M-2          |                                            |                 |                                                                                   |
| <b><i>M. roseus</i> P3M-2</b>                  | <b>WP_014855981.1</b>                      | <b>100.00</b>   | <b>MrA, изучаемая L-АСП</b>                                                       |
| <i>Ignavibacteria bacterium</i>                | KAF0152192.1                               | 70.16           | Гипотетический белок, предсказанный по гомологии                                  |
| <i>Melioribacter</i> sp.                       | NJD22787.1                                 | 65.56           |                                                                                   |
| <i>Chlorobibacterium</i>                       | NOX18786.1                                 | 62.34           |                                                                                   |

активность среди изученных гомологов показал фермент умеренно термофильной бактерии *M. roseus* P3M-2. Максимальное значение активности фермента 9.6 МЕ/мл было при 37°C и pH 9.6. Повышение температуры до 94°C, а также снижение pH приводили к резкому падению активности L-АСП (рис. 2а).

Активность SbA была значительно ниже и составляла 1.7 – 6.6% (0.2–0.6 МЕ/мл) от максимальной активности, полученной для MrA в этой серии экспериментов (рис. 2б). При этом наилучшие показатели активности L-АСП из *S. borealis* F-4128 наблюдали при 24°C и щелоч-

ных pH (pH 9.6). Эти результаты согласовывались с ранее полученными результатами оценки активности L-АСП психрофильных мицелиальных грибов, изолированных на острове Кинг-Джордж (Антарктика) [33]. При культивировании 42 представителей мицелиальных грибов, относящихся к родам *Geomyces*, *Pseudogymnoascus*, *Cosmospora*, *Hypocrea*, *Cadophora*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Pseudeurotium*, *Oidiodendron* и *Acremonium*, их активность варьировала в диапазоне 0.2–1.45 МЕ/мл [33].

Активность L-АСП AsA составила 4.5–26.7% (0.4–2.6 МЕ/мл) от максимальной для MrA

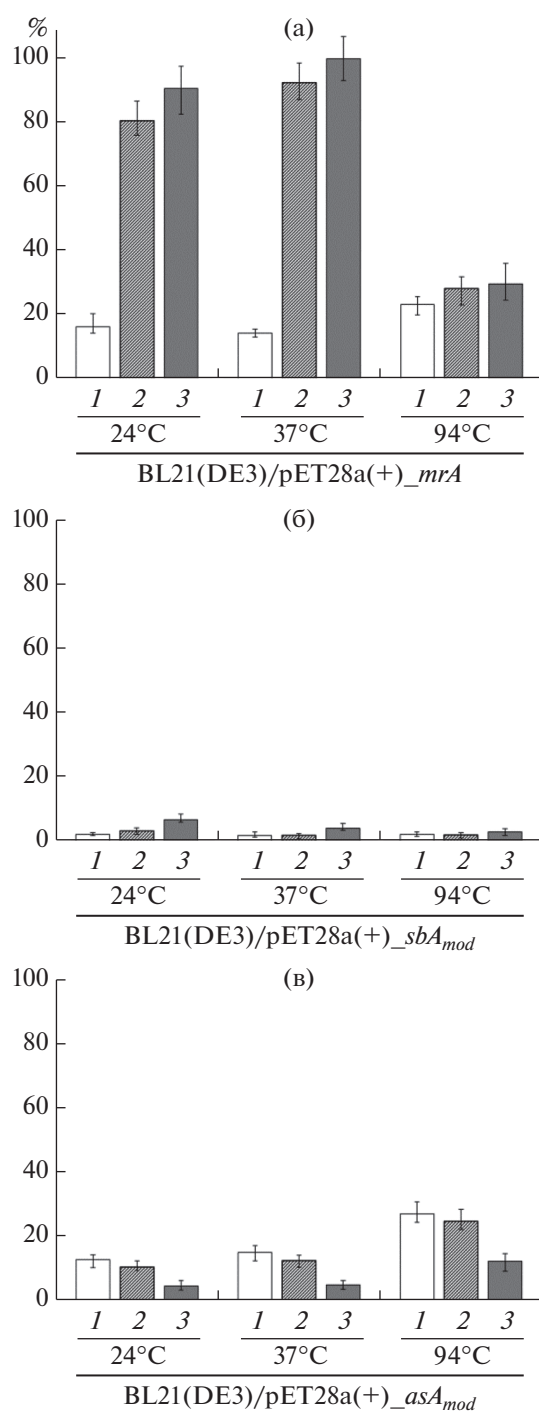
(рис. 2в). AsA демонстрировала максимальную активность при 94°C и pH 5.2, что соответствовало условиям обитания этой полиэкстремофильной кренархеи при повышенных температурах и кислых pH. Среди ацидофильных микроорганизмов, у которых была обнаружена активность L-АСП, описан аскомицет *Aspergillus terreus*, который используется в биотехнологической промышленности для получения вторичных метаболитов [35–37]. При культивировании *A. terreus* в оптимизированных условиях (35°C, pH 6.0) активность L-АСП составила 4.81 МЕ/мг [34].

Проведенные эксперименты в различных условиях показали, что L-АСП активность MrA превосходила таковую SbA и AsA в 5–50 раз. Таким образом, MrA рассматривалась как наиболее перспективная и была выбрана для последующего изучения.

**Влияние температуры на ферментативную активность MrA.** Изучение влияния температуры на активность неочищенного экстракта L-АСП MrA проводили в диапазоне значений 37–80°C. Максимальная активность рекомбинантного фермента MrA (190–205 МЕ/мл) проявлялась при 75°C (рис. 3а). При этом более 75% от максимального уровня L-АСП активности MrA наблюдали в интервале температур 60–75°C (рис. 3а). При температуре ниже 50°C, а также свыше 78°C происходило резкое снижение активности фермента (рис. 3а).

В ходе предварительного скрининга в физиологических условиях при 37°C была установлена активность MrA 9.6 МЕ/мл (pH 9.6). Дополнительные исследования на неочищенном экстракте показали, что активность препарата при 37°C составила 4.8% от максимальной при 75°C и pH 7.8. Ранее для термофильной L-АСП *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, проявляющей максимальную L-АСП активность при 85°C, pH 9.5, в физиологических условиях (при 37°C) также фиксировали падение активности фермента до уровня 4% от максимальной [21].

**Влияние pH на ферментативную активность MrA.** Зависимость активности MrA от pH среды изучали в диапазоне значений 7.1–9.5. Максимальная активность фермента проявлялась при pH 9.0. При этом более 75% активности сохранялось в интервале значений pH 7.5–9.5 (рис. 3б). Повышение ферментативной активности при сдвиге в область слабощелочных pH, установленное для MrA, показано также для других L-АСП. Высокая каталитическая активность в диапазоне pH 7.0–9.0 при pH-оптимуме большинства из них 8.0–8.5 наблюдалась у *Thermococcus zilligii*, *Thermococcus gammatolerans*, *Pyrococcus yayanosii*, *Pyrococcus furiosus* [38]. Среди L-АСП термофильных бактерий pH-оптимум 8.0–9.0 установлен для *Streptomyces thermoluteus* subsp. *fuscus* NBRC 14270 [39].



**Рис. 2.** Относительная активность рекомбинантных L-АСП экстремофилов (%) после экспрессии в штаммах Mr1 (а), Sb2 (б) и As2 (в) при 24, 37 и 94°C и pH 5.2 (1), 7.3 (2) и 9.6 (3).

Оптимальные значения pH среды для многих L-АСП мезофильных штаммов аналогичны: оптимум pH 8.0–9.0 характерен для L-АСП *E. coli*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas stutzeri*, *Erwinia carotovora* [38, 40].



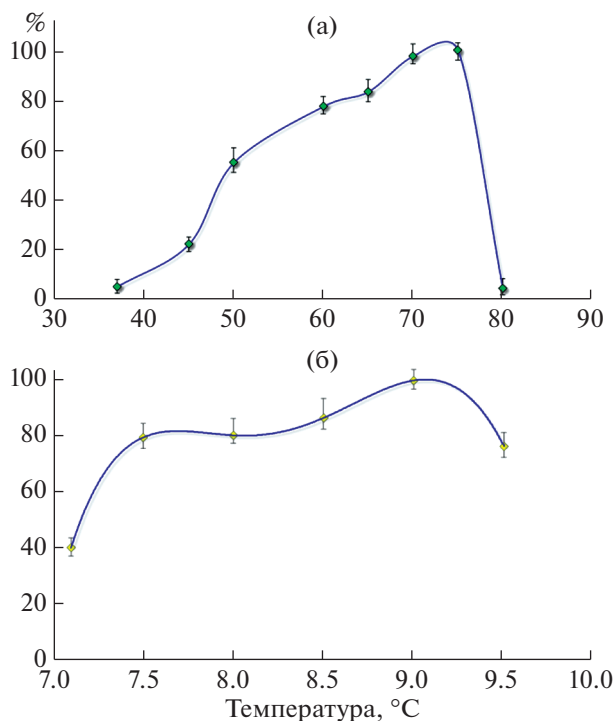


Рис. 3. Зависимость активности L-АСП *M. roseus* P3M-2 (%) от температуры (а) и pH (б).

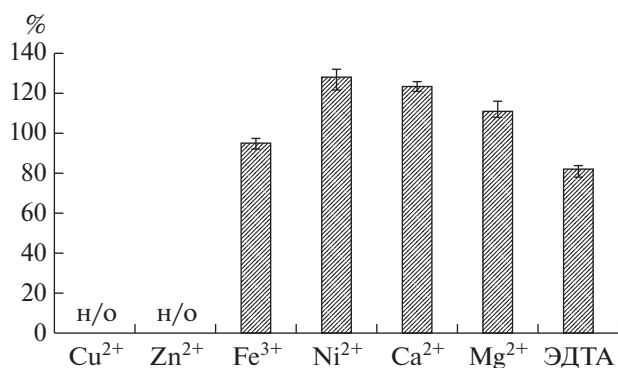


Рис. 4. Влияние ионов металлов и ЭДТА (%) на активность L-АСП *M. roseus* P3M-2. Все соединения добавляли в концентрации 1 мМ, за 100% принимали уровень активности, соответствующий активности L-АСП без добавок, н/о — неопределяемые значения.

Среди экстремофилов максимальная активность при более щелочной реакции среды зафиксирована только для L-АСП *Thermus thermophilus* [41] и *Archaeoglobus fulgidus* [42] — pH 9.2, а также *Thermus aquaticus* T351 — pH 9.5 [43].

**Влияние ионов металлов на ферментативную активность МгА.** Ионы металлов могут оказывать существенное влияние на активность L-АСП. Изучение влияния ионов металлов на функциональные свойства L-АСП экстремофильных микроорганиз-

мов представляет особый интерес, поскольку они могут выступать не только в качестве кофакторов, повышая каталитическую активность, но также способны стабилизировать структуру белка посредством формирования ионных связей.

Показано, что ионы Cu<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup> в концентрации 1.0 мМ способны полностью ингибировать активность в неочищенном экстракте МгА (рис. 4). Снижение активности МгА было установлено также в присутствии 1.0 мМ ЭДТА — 18%, Fe<sup>3+</sup> — 5% (рис. 4). В то же время присутствие ионов Ni<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> в концентрации 1.0 мМ приводило к увеличению активности МгА на 28, 23 и 11% соответственно (рис. 4).

Полученные в работе результаты согласовывались с ранее опубликованными результатами исследований по влиянию ионов металлов на ферментативную активность L-АСП. Так, среди мезофильных гомологов фермента в присутствии Ni<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> отмечали рост активности коммерческой L-АСП из *E. coli*, добавление Mg<sup>2+</sup> увеличивало активность фермента на 330.6% [44]. В то же время для L-АСП *Erwinia carotovora* наблюдали снижение активности в присутствии дивалентных ионов 1.0 мМ Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup>, а также 0.5 мМ Fe<sup>3+</sup> и Zn<sup>2+</sup>, причем добавление 1.0 мМ Cu<sup>2+</sup>, как и для МгА, приводило к полному ингибированию фермента [45].

Для экстремофильных L-АСП также показано изменение активности в присутствии ионов металлов. Так, повышение активности L-АСП *Thermococcus zilligii* на 15–20% вызывало добавление 1 мМ Mg<sup>2+</sup> и Mn<sup>2+</sup>, ионы Zn<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> и Cu<sup>2+</sup> не оказывали существенного влияния на активность фермента. Полученные результаты сопоставимы с результатами изучения L-АСП *Thermococcus gammatolerans* EJ3 за исключением ионов Zn<sup>2+</sup>, которые приводили к снижению активности фермента [46, 47].

Ранее установлено, что ионы Mg<sup>2+</sup> в концентрациях 1 либо 10 мМ способствовали повышению активности L-АСП *T. kodakaraensis* на 138 и 127% соответственно, Co<sup>2+</sup> и Ni<sup>2+</sup> (10 мМ) — полностью ингибировали фермент; Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> и ЭДТА снижали активность до 80, 15 и 90% от исходной соответственно [48].

Таким образом, выявлено, что ионы металлов могут оказывать влияние на активность МгА, аналогично ранее изученным L-АСП мезофильных и экстремофильных штаммов. Активирующий эффект обнаружен при добавлении 1.0 мМ Ni<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>. В работах [49, 50] было показано, что Ca<sup>2+</sup>, а также Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, связываясь с молекулой белка, играют важную роль в стабилизации структуры, предотвращая денатурацию при высоких температурах.

Экстремофилы, устойчивые к различным факторам внешней среды, являются естественным источником ферментов, которые могут быть использованы в биотехнологии. L-АСП экстремофильных штаммов характеризуются высокой энзиматической активностью и стабильностью в широком диапазоне условий реакции, что определяет перспективы их применения в биомедицине, пищевых технологиях, создании биосенсоров [47, 48, 51].

В настоящей работе представлены результаты гетерологической экспрессии ранее неохарактеризованных L-АСП экстремофилов: психрофильного гриба *S. borealis*, термоацидофильной кренархеи *A. saccharovorans* и термофильной бактерии *M. roseus*. Для экспрессии L-АСП грибного и архейного происхождения в реципиентном штамме *E. coli* потребовалась оптимизация кодонового состава их нуклеотидных последовательностей.

Показано, что полученные рекомбинантные L-АСП различны по активности, характеру влияния на нее температуры и pH. В предварительном скрининге на неочищенных экстрактах максимальные значения специфической активности для MrA составили 9.6 МЕ/мл при 37°C и pH 9.6; AsA — 2.6 МЕ/мл при 94°C и pH 5.2, для SbA — 0.6 МЕ/мл при 24°C и pH 9.6. Несмотря на низкую активность AsA из ацидофильной археи и SbA и психрофильного гриба, близкие значения ранее были получены для L-АСП ацидофила *A. terreus*, (4.81 МЕ/мг) [34] и других психрофильных грибов (0.2–1.45 МЕ/мл) [33].

Для L-АСП неочищенного экстракта MrA, проявляющей наибольшую активность, было изучено влияние температуры, pH, а также влияние ионов металлов. Установлено, что максимальная активность MrA проявлялась при 75°C и слабощелочном pH — 9.0. Ионы металлов по-разному влияли на активность фермента: 1 mM Cu<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup> приводили к полному ингибированию, ионы Fe<sup>3+</sup> снижали активность на 5%, а Ni<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> повышали активность на 28, 23 и 11% соответственно.

Полученные в работе результаты создают предпосылки для дальнейшего изучения свойств и кинетических характеристик очищенных препаратов L-АСП этих экстремофилов.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ 19-04-01173 и в рамках «Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.)».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Solomon B., Parihar N., Ayodele L., Hughes M. // J. Blood Disord. Transfus. 2017. V. 8. P. 24.
2. Brumano L.P., da Silva F.V.S., Costa-Silva T.A. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2018. V. 6. P. 1–22.
3. Baskar G., Subanjalin J. S., Aiswarya R. // Int. J. Mod. Sci. Technol. 2016. V. 6. № 1. P. 224–229.
4. Aiswarya R., Baskar G. // Int. J. Food Sci. Technol. 2018. V. 53. P. 491–498.
5. Baskar G., Aiswarya R. // J. Science of Food and Agriculture. 2018. V. 98. P. 4385–4394.
6. El-Naggar N.E.A., El-Ewasy S.M., El-Shweihy N.M. // Int. J. Pharmacol. 2014. V. 10. P. 182–199.
7. Duval M., Suciu S., Ferster A. // Blood. 2002. V. 99. P. 2734–2739.
8. Matsumoto Y., Nomura K., Kanda-Akano Y. // Leuk. Lymphoma. 2003. V. 44. P. 879–882.
9. Соколов Н.Н., Эльдаров М.А., Покровская М.В., Александрова С.С., Абакумова О.Ю., Подобед О.В., Мелик-Нубаров Н.С., Кудряшова Е.В., Гришин Д.В., Арчаков А.И. // Биомедицинская химия. 2015. V. 61. № 3. P. 312–324.
10. Nunes J.C.F., Cristóvão R.O., Freire M.G. // Molecules (Basel, Switzerland). 2020. V. 25. № 24. P. 5827.
11. Varshosaz J., Anvari N. // IET Nanobiotechnology. 2018. V. 12. № 4. P. 466–472.
12. Krishnapura P.R., Belur P.D., Subramanya S. // Crit. Rev. Microbiol. 2016. V. 42. № 5. P. 470–737.
13. Sarmiento F., Peralta R., Blamey J.M. // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2015. V. 3. P. 148.
14. Van den Burg B. // Curr/Opin/Microbiol/. 2003. V. 6. № 3. P. 213–218.
15. Hoshino T., Xiao N., Tkachenko O.B. // Mycoscience. 2009. V. 50. № 1. P. 26–38.
16. Hoshino T., Terami F., Tkachenko O.B., Tojo M., Matsumoto N. // Mycoscience. 2010. V. 51. № 2. P. 98–103.
17. Mardanov A.V., Svetlitchnyi V.A., Beletsky A.V. // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 16. P. 5652–5657.
18. Podosokorskaya O.A., Kadnikov V.V., Gavrilo S.N. // Environ. Microbiol. 2013. V. 15. № 6. P. 1759–1771.
19. Tiwari A.K., Rao J.V., Doriya K., Kumar D.S., Qureshi A., Ashok A. // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 1423.
20. Moguel I.S., Yamakawa C.K., Pessoa A., Mussatto S.I. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. V. 8. P. 576511.
21. Chohan S.M., Rashid N. // J. Biosci. Bioeng. 2013. V. 116. P. 438–443.
22. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A. // Nucleic Acids Research. 1997. V. 25. № 17. P. 3389–3402.
23. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549.
24. Lu G., Moriyama E.N. // Softw. Rev. 2004. V. 5. № 4. P. 378–388.
25. Mardanov A.V., Beletsky A.V., Kadnikov V.V., Ignatov A.N., Ravin N.V. // Genome Announc. 2014. V. 2. № 1. P. e01175–13.
26. Pokrovskaya M.V., Aleksandrova S.S., Pokrovsky V.S., Veselovsky A.V., Grishin D.V., Abakumova O.Y., Podobed O.V., Mishin A.A., Zhdanov D.D., Sokolov N.N. // Mol. Biotechnol. 2015. V. 57. № 3. P. 192–208.
27. Wriston J.C., Yellin T.O. // Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology. 2006. V. 39. P. 185–248.
28. Wade H.E., Robinson H.K., Phillips B.W. // J. Gen. Microbiol. 1971. V. 69. № 3. P. 299–312.

29. Li A.N., Ding A.Y., Chen J., Liu S.A., Zhang M., Li D.C. // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 7915.
30. Guo J., Coker A.R., Wood S.P. // Acta Cryst. 2017. V. 73. P. 889–895.
31. Safary A., Moniri R., Hamzeh-Mivehroud M., Dastmalchi. S. // BioImpacts. 2019. V. 9. P. 15–23.
32. Kelo E., Noronkoski T., Stoineva I.B., Petkov D.D., Mononen I. // FEBS Lett. 2002. V. 528. P. 130–132.
33. Duarte A.W.F., Barato M.B., Nobre F.S. // Polar Biol. 2018. V. 41. № 12. P. 2511–2521.
34. Farag A.M., Hassan S.W., Beltagy E.A., El-Shenawy M.A. // Egypt. J. Aquat. Res. 2015. V. 41. № 4. P. 295–302.
35. Zhgun A.A., Nuraeva G.K., Dumina M.V., Voinova T.M., Dzhevakhhiya V.V., Eldarov M.A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. № 3. P. 243–254.
36. Gunny A.A.N., Arbain D., Jamal P., Gumba R.E. // Saudi J. Biol. Sci. 2015. V. 22. № 4. P. 476–483.
37. Zhgun A.A., Dumina M.V., Voinova T.M., Dzhevakhhiya V.V., Eldarov M.A. // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. № 2. P. 188–197.
38. Dumina M.V., Eldarov M.A., Zdanov D.D., Sokolov N.N. // Biomeditsinskaya Khimiya. 2020. V. 66. № 2. P. 105–123.
39. Hatanaka T., Usuki H., Arima J. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. V. 163. № 7. P. 836–844.
40. Borisova A.A., Eldarov M.A., Zhgun A.A., Alexandrova S.S., Omelyanuk N.M., Sokov B.N., Berezov T.T., Sokolov N.N. // Biomeditsinskaya Khimiya. 2003. V. 49. № 5. P. 505–507.
41. Pritsa A.A., Kyriakidis D.A. // Mol. Cell. Biochem. 2001. V. 216. № 1–2. P. 93–101.
42. Li J., Wang J., Bachas L.G. // Anal. Chem. 2002. V. 74. № 14. P. 3336–3341.
43. Curran M.P., Daniel R.M., Guy G.R., Morgan H.W. // Arch. Biochem. Biophys. 1985. V. 241. № 2. P. 571–576.
44. Han S., Jung J., Park W. // J. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 24. № 8. P. 1091–1104.
45. Warangkar S.C., Khobragade C.N. // Enzyme Res. 2010. V. 2010. P. 1–10.
46. Zuo S., Zhang T., Jiang B., Mu W. // Extremophiles. 2015. V. 19. № 4. P. 841–851.
47. Zuo S., Xue D., Zhang T., Jiang B., Mu W. // J. Mol. Catal. B Enzym. 2014. V. 109. № 14. P. 122–129.
48. Hong S.J., Lee Y.H., Khan A.R. // J. Basic Microbiol. 2014. V. 163. № 7. P. 826–834.
49. Li A.N., Ding A.Y., Chen J., Liu S.A., Zhang M., Li D.C. // J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 17. № 4. P. 324–331.
50. De Azeredo L.A.I., Freire D.M.G., Soares R.M.A., Leite S.G.F., Coelho R.R.R. // Enzyme Microb. Technol. 2004. V. 34. № 3–4. P. 354–358.
51. Chohan S.M., Rashid N., Sajed M. // Folia Microbiologica. 2019. V. 64. № 2. P. 313–320.

## Comparison of Enzymatic Activity of Novel Recombinant L-Asparaginases of Extremophiles

M. V. Dumina<sup>a,\*</sup>, A. A. Zhgun<sup>a</sup>, M. V. Pokrovskaya<sup>b</sup>, S. S. Aleksandrova<sup>b</sup>,  
D. D. Zhdanov<sup>b</sup>, N. N. Sokolov<sup>b</sup>, and M. A. El'darov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, 117312 Russia

<sup>b</sup>Institute of Biomedical Chemistry, Moscow 119121 Russia

\*e-mail: DuminaMaria@gmail.com

In this study we have performed heterologous expression of novel uncharacterized extremophilic L-asparaginases from psychrophilic fungi *Sclerotinia borealis*, thermoacidophilic crenarchaea *Acidilobus saccharovorans* and thermophilic bacteria *Melioribacter roseus*. Active enzymes were produced by expression of native L-asparaginase gene from *M. roseus* (Mr) and synthetic genes coding fungal *S. borealis* (SbA) and archeal *A. saccharovorans* (AsA) L-asparaginases after codon optimization in *Escherichia coli* cells. In the study maximum specific activity at different temperatures and pH was observed for MrA. The activity of crude extract MrA was maximum at 75°C and pH 9.0. We have explored that various metal ions 1 mM have different effect on enzyme activity. Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions completely abolished enzyme activity. The range of crude extract MrA specific activity changes in the presence of Fe<sup>3+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and Mg<sup>2+</sup> was estimated to be 5–28%. According to our findings L-asparaginase *M. roseus* may be perspective for further investigation of enzymatic properties and biotechnology application.

**Keywords:** L-asparaginase, extremophilic microorganism, heterologous expression, anticancer drug

УДК 577.15

## ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ: ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛИТИЧЕСКИХ ПОЛИСАХАРИДМОНООКСИГЕНАЗ И ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ЦЕЛЛЮЛАЗ

© 2021 г. М. В. Семёнова<sup>1</sup>, А. В. Гусаков<sup>2, \*</sup>, В. Д. Телицин<sup>2</sup>, А. П. Сеницын<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр

“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

\*e-mail: avgusakov@enzyme.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 17.03.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 23.04.2021 г.

Исследованы закономерности кинетического взаимодействия литических полисахаридмоноокси-геназ (ЛПМО) из *Thielavia terrestris* (ТtЛПМО), *Penicillium verruculosum* (PvЛПМО) и *Trichoderma reesei* (TrЛПМО) с очищенными целлюлогидролазами (ЦБГ I и ЦБГ II), а также эндоглюканазой II (ЭГ II) *P. verruculosum* при ферментативной деструкции микрокристаллической (МКЦ) и аморфной целлюлозы. ТtЛПМО относится к ЛПМО С1-типа, тогда как PvЛПМО и TrЛПМО являются ЛПМО смешанного С1/С4-типа, согласно общепринятой классификации данного класса оксидаз. При действии любой из трех ЛПМО совместно с ЦБГ II или ЭГ II на МКЦ или аморфную целлюлозу ферменты проявляли синергизм, результатом которого было увеличение выхода восстанавливающих сахаров (ВС), выраженное в наибольшей степени в начальный период реакции. При использовании смесей PvЛПМО и TrЛПМО с ЦБГ I и МКЦ в качестве субстрата также наблюдался синергизм, тогда как ТtЛПМО, напротив, ингибировала образование ВС из целлюлозы с ЦБГ I. Наблюдаемый синергизм и антагонизм между ЛПМО и ЦБГ II/ЦБГ I можно объяснить в рамках простой кинетической схемы, когда первый фермент образует дополнительные концы молекул полисахарида, служащие субстратом либо ингибитором для второго.

**Ключевые слова:** биodeградация целлюлозы, литическая полисахаридмонооксигеназа, целлюлогидролаза, эндоглюканаза, синергизм, антагонизм

**DOI:** 10.31857/S0555109921050147

Закономерности биodeградации природных полисахаридов и, в частности, целлюлозы, как наиболее прочного и устойчивого к действию грибных и бактериальных ферментов компонента клеточной стенки растений, остаются темой интенсивных исследований в лабораториях разных стран и до сих пор преподносят сюрпризы для ученых, работающих в этой области. С момента открытия и начала широкого изучения ферментов — целлюлаз в середине прошлого века и вплоть до 2010–2011 гг. в научной литературе существовала общепринятая точка зрения, что ферментативную деструкцию целлюлозы катализируют целлюлазы, относящиеся к классу гидролаз, а именно эндо-1,4-β-глюканазы (ЭГ, КФ 3.2.1.4), экзо-целлюлогидролазы (ЦБГ, КФ 3.2.1.91 и 3.2.1.176) и β-глюкозидазы (БГ, КФ 3.2.1.21) [1, 2], причем последние, строго говоря, не относятся к собственно целлюлазам, поскольку не способны расщеплять полимерный субстрат, а осуществляют гидролиз целлюлозы и

других олигосахаридов, образующихся под действием ЦБГ и ЭГ.

В результате открытия около 10 лет назад литических полисахаридмонооксигеназ (ЛПМО), катализирующих окислительную деструкцию хитина, целлюлозы и других полисахаридов [3–5], а также благодаря накопленным знаниям в области исследования ферментов, принимающих участие в биodeградации лигнина — другого важного компонента растений [6], стало ясно, что круг ферментов, благодаря которым в природе осуществляется эффективная биodeградация этих биополимеров, далеко не ограничивается гидролазами. Поэтому в 2013 г. в наиболее известную в мире базу данных CAZy (Carbohydrate-Active enZymes) по ферментам, активным по отношению к углеводам, были введены семейства так называемых вспомогательных активностей (Auxiliary Activities, AA) [7]. Большинство ЛПМО, для которых основным субстратом является целлюлоза, отно-

сятся к семейству AA9, тогда как ЛПМО “хитиназного” типа преимущественно входят в семейство AA10. При этом следует отметить, что многие из рассматриваемых ферментов не проявляют строгой субстратной специфичности. Например, некоторые ЛПМО семейства AA10 активны не только по отношению к хитину, но и к целлюлозе, тогда как ряд ЛПМО семейства AA9 способны расщеплять и гемицеллюлозы — ксилан, ксило-глюкан и др. [8–10].

Что касается собственно реакций, катализируемых ЛПМО “целлюлазного” типа, то все эти ферменты расщепляют полимерную цепь целлюлозы с окислением либо по C1 (КФ 1.14.99.54), либо по C4 атому гликозидного кольца (КФ 1.14.99.56) с образованием соответственно альдоновой кислоты (ее лактона) или 4-кетоальдозы [5, 11]. Довольно многочисленная третья группа ЛПМО смешанного типа генерирует продукты, окисленные как в положении C1, так и в положении C4 [4, 12, 13].

Несмотря на то, что имеется множество публикаций, демонстрирующих синергизм между ЛПМО и целлюлазным комплексом гидролаз в целом, включающим несколько различных ЭГ и ЦБГ [14–22], данных, описывающих взаимодействие ЛПМО с индивидуальными (очищенными) ЭГ и ЦБГ значительно меньше, и иногда они противоречивы [23–28].

Цель работы — исследование закономерностей кинетического взаимодействия трех грибных ЛПМО, различающихся по типу действия на полимерный субстрат, с индивидуальными ЦБГ I, ЦБГ II и ЭГ II из *Penicillium verruculosum* при деградации микрокристаллической и аморфной целлюлозы. Две из трех ЛПМО (из *Trichoderma reesei* и *P. verruculosum*) относятся к ферментам смешанного (C1/C4) типа с точки зрения образуемых окисленных продуктов реакции [29, 30], тогда как третий фермент (из *Thielavia terrestris*) является ЛПМО C1-типа [20].

## МЕТОДИКА

**Ферменты.** Выделение и очистку рекомбинантных ЛПМО из *T. terrestris* (TtLPMO, код GenBank AEO71030), *T. reesei* (TrLPMO, CAA71999) и *P. verruculosum* (PvLPMO, полноразмерная форма фермента, QBL14594) проводили, как описано ранее [19, 30]. Нативные очищенные ЦБГ I, ЦБГ II и ЭГ II *P. verruculosum* также были получены ранее [31, 32]. Рекомбинантную очищенную БГ из *Aspergillus niger* [33] использовали в качестве вспомогательного фермента в смесях, содержащих ЦБГ I или ЦБГ II.

**Гидролиз целлюлозы смесями очищенных целлюлаз и ЛПМО.** Обработку ферментами микрокристаллической целлюлозы (МКЦ, ООО “МК-

Центр”, Россия) и аморфной целлюлозы, полученной из МКЦ регенерацией из раствора фосфорной кислоты по методу Вуда [34], проводили в пробирках объемом 1.5 мл в течение 24–48 ч при 40°C и pH 5.0, как подробно описано в предыдущей работе [19]. В качестве донора электронов для ЛПМО во всех случаях использовали 5 мМ аскорбиновую кислоту.

При составлении смесей на основе целлюбио-гидролаз использовали композицию ЦБГ I или ЦБГ II *P. verruculosum* с БГ *A. niger* в соотношении 9 : 1 по концентрации белка для того, чтобы конвертировать в глюкозу образующуюся при гидролизе МКЦ целлюбиозу, являющуюся продуктом-ингибитором для ЦБГ. При исследовании взаимодействия между указанными целлюлазами и ЛПМО часть смеси ЦБГ/БГ эквивалентно замещали на 5, 10, 15, 20 или 25% ЛПМО по концентрации белка, поддерживая его общую дозировку на уровне 1 мг/г субстрата. Исходная концентрация МКЦ в реакционной смеси составляла 100 мг/мл. Отбор проб реакционной смеси (по 50 мкл) осуществляли после 1, 3, 6, 24 и 48 ч, после чего пробы центрифугировали, и в супернатанте определяли концентрацию восстанавливающих сахаров (ВС) методом Шомоди–Нельсона [35]. Поскольку находящаяся в реакционной смеси аскорбиновая кислота также давала ответ на используемые для анализа ВС реагенты, в качестве контроля (фона) использовали те же разведения исходной 5 мМ аскорбиновой кислоты, что и в соответствующих пробах, вычитая затем полученные фоновые значения оптической плотности из значений для проб на ВС. Стоит отметить, что заметный фон наблюдался только для начального периода ферментативной реакции (при малых разведениях проб).

В случае смесей на основе ЭГ II *P. verruculosum* и различных ЛПМО в качестве субстрата использовали аморфную целлюлозу (20 мг/мл). Эксперименты проводили, как описано выше для гидролиза МКЦ смесями на основе ЦБГ и ЛПМО, при той же общей концентрации белка (1 мг/г субстрата), однако пробы на ВС отбирали через 30 мин, 1, 3 и 24 ч.

Во всех случаях концентрацию белка определяли, используя модифицированный метод Лоури [36]. Каждый из экспериментов по гидролизу целлюлозных субстратов в отсутствие или в присутствии ЛПМО проводили в трех повторностях.

Коэффициент синергизма  $K_s$  между целлюлазами и ЛПМО рассчитывали по формуле:

$$K_s = [BC]_{1+2} / (X \times [BC]_1 + (1 - X) \times [BC]_2),$$

где  $[BC]_{1+2}$  — концентрация ВС, полученных за определенное время реакции под действием смеси ферментов при дозировке 1 мг/г субстрата;  $[BC]_1$  — концентрация ВС, полученных за то же

время реакции под действием ЭГ II или смеси ЦБГ/БГ (в отсутствие ЛПМО) при дозировке 1 мг/г субстрата;  $[BC]_2$  — концентрация ВС, полученных за то же время реакции под действием конкретной ЛПМО (в отсутствие целлюлаз) при дозировке 1 мг/г субстрата; X — массовая доля ЭГ II или смеси ЦБГ/БГ в реакционной смеси, варьируемая в диапазоне от 1 до 0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Синергизм и антагонизм между ЦБГ и ЛПМО.

Для исследования закономерностей взаимодействия между целлюобиогидролазами *P. verruculosum* и ЛПМО, различающимися по типу действия (C1 или C1/C4) на полимерный субстрат, проводили обработку МКЦ индивидуальными ЦБГ I или ЦБГ II (в присутствии небольшого количества БГ для снятия ингибирующего действия продукта реакции на ЦБГ), их смесями с ЛПМО, варьируя процентное содержание последних от 5 до 25% с шагом 5%, а также собственно ЛПМО (в отсутствие ЦБГ/БГ).

На рис. 1а, 1б показана концентрация полученных ВС для указанных смесей на основе ЦБГ I через 1 и 24 ч гидролиза МКЦ. Через 1 ч реакции для большинства смесей, содержащих ЛПМО из *T. reesei* и *P. verruculosum* (обозначенных как TrLPMO и PvLPMO, соответственно), относящихся к ферментам смешанного C1/C4-типа, наблюдали заметное увеличение концентрации образующихся сахаров по сравнению с таковой для ЦБГ I/БГ в отсутствие ЛПМО, несмотря на пониженное содержание ЦБГ I в смесях, что свидетельствует о синергизме между ферментами; наиболее заметный эффект проявлялся при содержании ЛПМО 10–15%. Коэффициент синергизма ( $K_s$ ) достигал в максимальном случае значений 1.35–1.36 (рис. 2а, 2б). Однако в случае использования ЛПМО C1-типа из *T. terrestris* (TtLPMO), напротив, наблюдали проявление антагонизма между ферментами (рис. 1а, 2в), который усиливался при увеличении содержания TtLPMO в реакционной смеси (при этом  $K_s$  принимал значения меньше 0). При длительном времени гидролиза (24 ч) эффект увеличения концентрации ВС для смесей, содержащих TrLPMO и PvLPMO, становился менее заметным (рис. 1б), при этом также уменьшался и коэффициент синергизма по сравнению с начальным периодом проведения ферментативной реакции (рис. 2а, 2б). Что касается антагонизма между ЦБГ I и TtLPMO, то его степень была максимальной через 6 ч гидролиза МКЦ, уменьшаясь при большем времени реакции (24 ч). Стоит отметить, что сами по себе PvLPMO и TtLPMO в отсутствие целлюлаз образовывали незначительное количество растворимых ВС (0.2–0.3 мг/мл) даже через 24 ч реакции за счет разрывов полимерной цепи целлюлозы при ее окислении по C4 атому ангид-

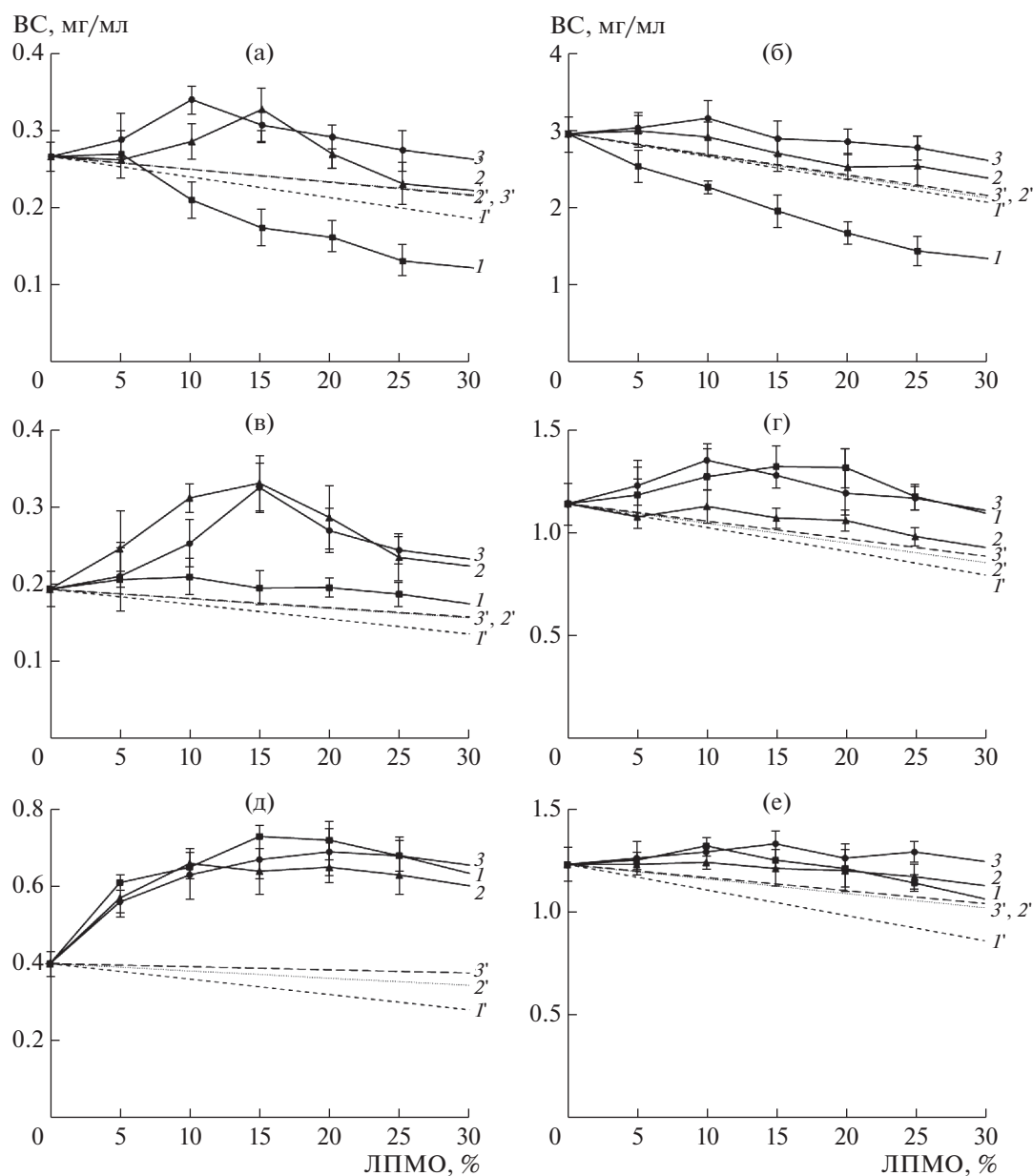
роглюкозного остатка, тогда как в случае TtLPMO, где окислению подвергался исключительно C1 атом с образованием альдоновой кислоты, накопления детектируемых количеств ВС не наблюдали.

Подобные же эксперименты по обработке МКЦ смесями ЦБГ II/БГ с различными ЛПМО показали, что во всех случаях, в том числе и при использовании TtLPMO, наблюдался синергизм между ферментами (рис. 1в, 1г), причем степень синергизма была в целом существенно выше, чем в случае смесей на основе ЦБГ I/БГ. Коэффициент синергизма достигал в максимальном случае значений 1.67–1.89 (рис. 2г, 2д, 2е). Если в начальный период реакции (1 ч) наибольший синергизм и выход ВС обеспечивали TrLPMO и PvLPMO при содержании 15% в качестве вспомогательных ферментов (рис. 1в), то при длительном гидролизе (24 ч) эффективность применения TtLPMO при ее содержании в смеси 15–20% была сравнима с таковой для TrLPMO, однако используемой при меньшем соотношении (10%) с ЦБГ I/БГ (рис. 1 г).

**Синергизм между ЭГ II и ЛПМО.** Поскольку ЭГ II *P. verruculosum*, как и другие эндоглюканазы, не способна эффективно гидролизовать кристаллические формы целлюлозы, включая МКЦ [31], эксперименты со смесями ЭГ II и ЛПМО проводили, используя в качестве субстрата аморфную целлюлозу, при том же соотношении ферментов и субстрата (1 мг/г субстрата). Положительный эффект на выход ВС от замены части ЭГ II на любую из трех использованных ЛПМО в начальный период реакции (рис. 1д) оказался даже несколько выше, чем случае действия ЦБГ I или ЦБГ II на МКЦ. В зависимости от вида ЛПМО и времени реакции наибольший выход ВС наблюдали при содержании ЛПМО в смеси от 10 до 20% (рис. 1д, 1е), при этом коэффициент синергизма достигал в максимальном случае значений 1.78–2.27 (рис. 2ж, 2з, 2и). Как и в случае с ЦБГ, максимальный синергетический эффект проявлялся на начальной стадии процесса гидролиза целлюлозы.

Таким образом, эксперименты по обработке целлюлозных субстратов смесями индивидуальных целлюлаз (ЦБГ I/БГ, ЦБГ II/БГ, ЭГ II) и ЛПМО, различающихся по типу действия на полимерный субстрат, показали, что с точки зрения выхода образующихся ВС ферменты могут проявлять как синергизм, так и антагонизм.

В случае смесей на основе целлюобиогидролаз результаты вполне объяснимы, учитывая специфику действия данных ферментов. ЦБГ I *P. verruculosum*, относящаяся к семейству 7 гликозидгидролаз, последовательно отщепляет остатки целлюбиозы с восстанавливающего конца полимерной цепи целлюлозы по так называемому процессивному механизму [1, 31]. Когда в смеси находилась TtLPMO C1-типа, при разрыве молекулы полиса-

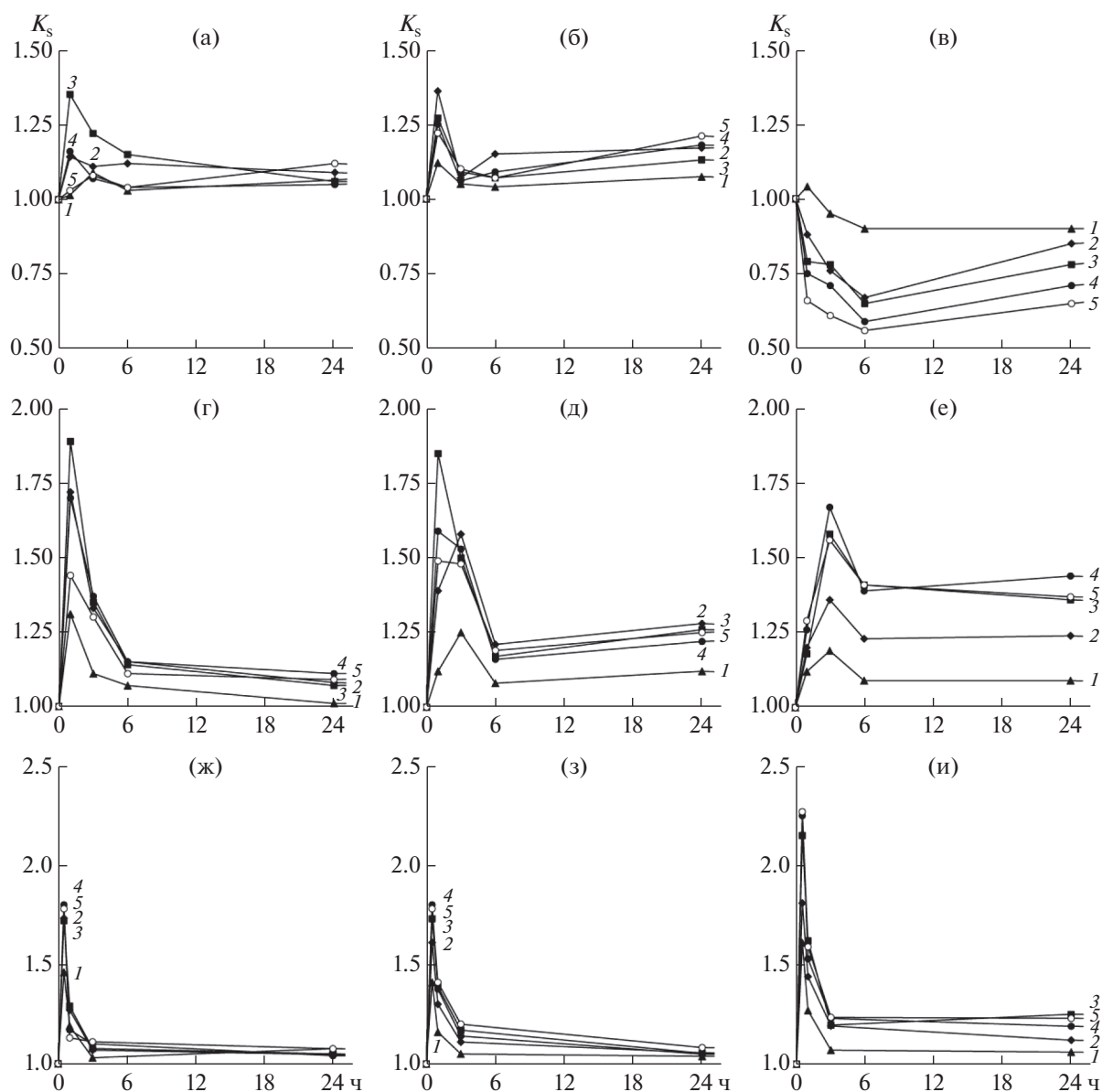


**Рис. 1.** Выход ВС при действии на МКЦ (а-г) и аморфную целлюлозу (д, е) смесей различных ЛПМО и целлюлаз: ЦБГ I/БГ и ЛПМО через 1 (а) и 24 (б) ч; ЦБГ II/БГ и ЛПМО на МКЦ через 1 (в) и 24 (г) ч; ЭГ II и ЛПМО через 30 мин (д) и 3 ч (е) реакции. 1 – TtLPMO; 2 – PvLPMO; 3 – TtLPMO. 1', 2', 3' (штриховые линии) – соответствуют теоретически возможным концентрациям ВС, которые могли бы быть получены при отсутствии взаимодействия между ферментами, как арифметическая сумма действия индивидуальных компонентов смеси при данном соотношении компонентов.

харида вместо дополнительного восстанавливающего конца (ВС) – субстрата для ЦБГ I – образовывался исключительно остаток альдоновой кислоты, который существует в равновесии с соответствующим лактоном [37]. Вероятно, этот остаток выступал в качестве ингибитора ЦБГ I, когда фермент мог связываться с данным участком полимерного субстрата, однако не был способен осуществлять расщепление соответствующей гликозидной связи, что привело к кажущемуся кинетическому антагонизму с TtLPMO, выражающемуся в уменьшении

выхода ВС по сравнению с теоретически возможным при отсутствии взаимодействия между ферментами, показанным пунктирной линией на рис. 1а и 1б. Действительно, недавно было обнаружено, что целлобионовая кислота (целлобинолактон), один из растворимых продуктов катализа ЛПМО С1-типа, является конкурентным ингибитором ЦБГ I, хотя и более слабым, чем целлобиоза – основной продукт действия самой ЦБГ I [38]. Учитывая, что при атаке на нерастворимую целлюлозу ЛПМО окисляют внутренние





**Рис. 2.** Зависимости коэффициента синергизма ( $K_s$ ) от времени реакции для смесей различных ЛПМО и целлюлазы: а, б, в – смеси ЦБГ I/БГ с PvLPMO (а), TrLPMO (б), TtLPMO (в); г, д, е – смеси ЦБГ II/БГ с PvLPMO (г), TrLPMO (д), TtLPMO (е); ж, з, и – смеси ЭГ II с PvLPMO (ж), TrLPMO (з), TtLPMO (и). Содержание ЛПМО в смесях (%): 1 – 5, 2 – 10, 3 – 15, 4 – 20, 5 – 25.

связи в полимере, в результате образуются в основном новые окисленные концы полисахарида, не выходящие в раствор, тогда как окисленные растворимые олигосахариды, включая целлобионовую кислоту (целлобионolakтон), являются минорными продуктами, особенно в начальный период ферментативной реакции. Маловероятно, что наблюдаемый значительный антагонизм между ЦБГ I и TtLPMO (рис. 1а) был вызван ингибированием ЦБГ I именно целлобионовой кислотой (не исключая частичного ингибирования ею), и скорее новые окисленные концы целлюлозы, остающиеся в составе нерастворимого суб-

страта в форме лактона или альдоновой кислоты, оказывали ингибирующее действие на ЦБГ I. В случае же использования в смеси TrLPMO или PvLPMO, относящихся к смешанному C1/C4-типу, при окислительной деструкции полимерной цепи целлюлозы образовывались как дополнительные восстанавливающие концы для связывания и катализа ЦБГ I по процессивному механизму, так и “концы-ингибиторы” этого фермента. По-видимому, вклад первых из указанных продуктов действия ЛПМО, стимулирующих образование ВС при катализе ЦБГ I, был более существенным, чем вторых (ингибирующих), в ре-

зультате чего наблюдался умеренный синергизм между ЦБГ I и TrLPMO (либо PvLPMO).

Когда же в смеси ферментов находилась ЦБГ II *P. verruculosum* из семейства 6 гликозидгидролаз, действующая на целлюлозу подобно ЦБГ I, однако с невозстанавливающего конца ее молекулы, то во всех случаях использованных ЛПМО образовывались либо дополнительные интактные невозстанавливающие концы полисахарида, являющиеся субстратом для ЦБГ II (при использовании TtLPMO C1-типа), либо частично, наряду с интактными концами, окисленные по C4 атому гликозидного кольца 4-кетоальдозы (в случае TrLPMO или PvLPMO), которые, вероятно, не являлись ингибиторами ЦБГ II, поскольку во всех смесях, содержащих указанную целлюлазу и любую из ЛПМО наблюдали значительное проявление синергизма (рис. 1в, 1г).

В целом, механизм кинетического синергизма между ЛПМО и ЦБГ сходен с таковым для пары ЭГ – ЦБГ, когда действие первого из ферментов увеличивает концентрацию субстрата (концов полимерной цепи) для второго фермента [1].

Что касается смесей, содержащих ЭГ II и ЛПМО, то во всех случаях при их действии на аморфную целлюлозу также проявлялся эффект синергизма между ферментами, особенно в начальный период ферментативной реакции (рис. 1д), который был выражен даже в несколько большей степени, чем для смесей ЦБГ II/БГ с ЛПМО (рис. 1в). Это результат оказался довольно неожиданным, поскольку в данном случае в качестве субстрата использовали аморфную целлюлозу, обладающую высокой реакционной способностью по отношению к практически любым целлюлазам, включая эндоглюканазы. Считается, что, помимо образования новых концов полисахарида в результате действия ЛПМО на МКЦ и другие кристаллические формы целлюлозы, данные ферменты способны нарушать упорядоченную структуру субстрата, приводя к ее аморфизации и увеличению удельной площади поверхности [23, 39, 40]. Однако, в случае действия ЭГ II на аморфную целлюлозу ферменту не нужны ни новые дополнительные концы молекул целлюлозы, поскольку эндоглюканазы расщепляют внутренние гликозидные связи в полисахаридах, ни, вероятно, дополнительные нарушения его надмолекулярной структуры, поскольку аморфная целлюлоза, как уже отмечалось выше, исходно является высокореакционным субстратом для целлюлаз. Для выявления причин, по которым наблюдался значительный синергизм между ЭГ II и ЛПМО, требуются дополнительные исследования.

При действии на МКЦ смесей на основе ЦБГ I или ЦБГ II в начальный период реакции наибольшую эффективность демонстрировали TrLPMO и PvLPMO (рис. 1а, 1в), тогда как при длительном

времени вторая из использованных ЛПМО стала заметно уступать первой (рис. 1б, 1г). По-видимому, это было связано с более низкой стабильностью PvLPMO, при этом потеря активности фермента могла происходить как вследствие термодинамической инактивации (PvLPMO действительно обладает более низкой термостабильностью, чем TrLPMO и TtLPMO [30]), так и в результате влияния на белок пероксида водорода, являющегося побочным продуктом катализа ЛПМО [41].

Анализ литературных данных показывает, что, как и в наших экспериментах, различные ЛПМО при взаимодействии с эндоглюканазами увеличивают выход сахаров при гидролизе различных форм целлюлозы [24, 26, 27, 29]. Так, похожие величины синергизма были получены при совместном действии TrLPMO и бактериальной ЭГ семейства 5 гликозидгидролаз (в соотношении 1 : 5) на предобработанные остатки сои ( $K_s$  варьировал 1.07 до 1.27 в зависимости от времени реакции: 8–72 ч) [29], а также при действии комбинации ферментов из *Myceliophthora thermophila* (MtEG5A и MtLPMO9) в соотношении 10 : 1 и 10 : 2 на аморфную целлюлозу ( $K_s$  варьировал от 1.2 до 1.6 при времени реакции 30–60 мин) [24].

ЛПМО, как C1-, так и смешанного C1/C4-типа, как правило, проявляли синергизм также и с целлюлогидролазами 6 семейства гликозидгидролаз (ЦБГ II) при действии на аморфную и кристаллическую целлюлозу [25–28]. При этом отмечалось, что степень синергизма выше для аморфной целлюлозы, достигая в начальный период реакции значений 1.9–2.6 для смесей ЦБГ II *T. reesei* с ЛПМО из *Lentinus similis*, *Thermoascus aurantiacus* и *T. terrestris*, тогда как в случае МКЦ  $K_s$  варьировал в диапазоне 1.3–2.0 для тех же ферментов [28], что хорошо согласуется с данными, полученными в настоящей работе.

Что же касается литературных данных относительно взаимодействия ЛПМО разного типа с целлюлогидролазами 7 семейства (ЦБГ I), то они довольно противоречивы, причем расхождения, как правило, касаются ЛПМО C1-типа. Так, в работе [25] было показано, что при совместном действии MtLPMO9L C1-типа из *M. thermophila* и ЦБГ I в соотношении 1 : 10 или 1 : 1 на аморфную целлюлозу наблюдался умеренный синергизм, тогда как в случае использования МКЦ в качестве субстрата ферменты проявляли антагонизм. Напротив, ЛПМО из *Neurospora crassa*, обладающая сходным (C1) механизмом катализа, оказывала ингибирующее действие на ЦБГ I *T. reesei* при гидролизе целлюлозы, содержащей в значительном количестве аморфные зоны, однако проявляла заметный синергизм с ЦБГ I при действии на МКЦ и нанокристаллическую целлюлозу [23]. Авторы указанной работы [23] объясняли наблюдаемые эффекты различиями в морфологии целлюлозных

субстратов. Как и в настоящей работе, TtLPMO C1-типа ингибировала действие ЦБГ I (однако, из другого источника — *T. reesei*) независимо от типа субстрата — аморфной целлюлозы или МКЦ, тогда как ЛПМО смешанного типа из *L. similis* и *T. aurantiacus* проявляли синергизм с ЦБГ I [28].

В заключение необходимо отметить, что полученные в данной работе результаты будут полезными при разработке современных ферментных препаратов на основе целлюлаз и вспомогательных ферментов, обладающих повышенной осаживающей способностью в процессах биоконверсии возобновляемого лигноцеллюлозного сырья.

Работа выполнена в рамках НИР “Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружающей среды”, номер государственной регистрации АААА-А21-121011290089-4.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. // Microbiol. Molec. Biol. Rev. 2002. V. 66. № 3. P. 506–577.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>
2. Tiwari R., Nain L., Labrou N.E., Shukla P. // Crit. Rev. Microbiol. 2018. V. 44. № 2. P. 244–257.  
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1337713>
3. Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Horn S.J., Liu Z., Zgai H., Sørlie M., Eijsink V.G.H. // Science. 2010. V. 330. P. 219–222.  
<https://doi.org/10.1126/science.1192231>
4. Quinlan R.J., Sweeney M.D., Leggio L.L., Otten H., Poulsen J.-C.N., Johansen K.S., Krogh K.B.R.M., Jørgensen C.I., Tovborg M., Anthonsen A., Tryfona T., Walter C.P., Dupree P., Xu F., Davies G.J., Walton P.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. № 37. P. 15079–15084.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1105776108>
5. Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Westereng B., Eijsink V.G.H. // Biotechnol. Biofuels. 2012. V. 5. Article № 45.  
<https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-45>
6. Pollegioni L., Tonin F., Rosini E. // FEBS J. 2015. V. 282. № 7. P. 1190–1213.  
<https://doi.org/10.1111/febs.13224>
7. Levasseur A., Drula E., Lombard V., Coutinho P.M., Henrissat B. // Biotechnol. Biofuels. 2013. V. 6. Article № 41.  
<https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41>
8. Agger J.W., Isaksen T., Várnai A., Vidal-Melgosa S., Wilts W.G.T., Ludwig R., Horn S.J., Eijsink V.G.H., Westereng B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 17. P. 6287–6292.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1323629111>
9. Frommshagen M., Sforza S., Westphal A.H., Visser J., Hinz S.W.A., Koetsier M.J., van Berkel W.J.H., Gruppen H., Kabel M.A. // Biotechnol. Biofuels. 2015. V. 8. Article № 101.  
<https://doi.org/10.1186/s13068-015-0284-1>
10. Jensen M.S., Klinkenberg G., Bissaro B., Chylenski P., Vaaje-Kolstad G., Kvitvang H.F., Nærdal G.K., Sletta H., Forsberg Z., Eijsink V.G.H. // J. Biol. Chem. 2019. V. 294. № 50. P. 19349–19364.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010056>
11. Phillips C.M., Beeson W.T., Cate J.H., Marletta M.A. // ACS Chem. Biol. 2011. V. 6. № 12. P. 1399–1406.  
<https://doi.org/10.1021/cb200351y>
12. Li X., Beeson W.T., Phillips C.M., Marletta M.A., Cate J.H.D. // Structure. 2012. V. 20. № 6. P. 1051–1061.  
<https://doi.org/10.1016/j.str.2012.04.002>
13. Hemsworth G.R., Davies G.J., Walton P.H. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2013. V. 23. № 5. P. 660–668.  
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.05.006>
14. Müller G., Várnai A., Johansen K.S., Eijsink V.G.H., Horn S.J. // Biotechnol. Biofuels. 2015. V. 8. Article № 187.  
<https://doi.org/10.1186/s13068-015-0376-y>
15. Kim I.J., Nam K.H., Yun E.J., Kim S., Youn H.J., Lee H.J., Choi I.-G., Kim K.H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 8537–8547.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6592-3>
16. Sun F.F., Hong J., Hu J., Saddler J.N., Fang X., Zhang Z., Shen S. // Enzyme Microb. Technol. 2015. V. 79–80. P. 42–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.020>
17. Ghatge S.S., Telke A.A., Waghmode T.R., Lee Y., Lee K.-W., Oh D.-B., Shin H.-D., Kim S.-W. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 3041–3055.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6116-6>
18. Hu J., Chandra R., Arantes V., Gurlay K., van Dyk J.S., Saddler J. // Biores. Technol. 2015. V. 186. P. 149–153.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.055>
19. Булахов А.Г., Гусаков А.В., Чекушина А.В., Самрутдинов А.Д., Кошелев А.В., Матвеев В.Ю., Сидицкий А.П. // Биохимия. 2016. Т. 81. № 5. С. 701–709.
20. Kim I.J., Seo N., An H.J., Kim J.-H., Harris P.V., Kim K.H. // Biotechnol. Biofuels. 2017. V. 10. Article № 46.  
<https://doi.org/10.1186/s13068-017-0721-4>
21. Long L., Yang H., Ren H., Liu R., Sun F.F., Xiao Z., Hu J., Xu Z. // ACS Sustainable Chem. Eng. 2020. V. 8. № 32. P. 11986–11993.  
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c02564>
22. Guo X., Sang J., Chai C., An Y., Wei Z., Zhang H., Ma L., Dai Y., Lu F., Liu F. // Biochem. Eng. J. 2020. V. 162. Article № 107712.  
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107712>
23. Eibinger M., Ganner T., Bubner P., Rosker S., Kracher D., Haltrich D., Ludwig R., Plank H., Nidetzky B. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 52. P. 35929–35938.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.602227>

24. Karnaouri A., Muraleedharan M.N., Dimarogona M., Topakas E., Rova U., Sandren M., Christakopoulos P. // *Biotechnol. Biofuels*. 2017. V. 10. Article № 126. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0813-1>
25. Zhou H., Li T., Yu Z., Ju J., Zhang H., Tan H., Li K., Yin H. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 139. P. 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.004>
26. Garrido M.M., Landoni M., Sabbadin F., Valacco M.P., Couto A., Bruce N.C., Wirth S.A., Campos, E. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. V. 104. P. 9631–9643. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10911-6>
27. Keller M.B., Badino S.F., Blossom B.M., McBrayer B., Borch K., Westh P. // *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2020. V. 8. № 37. P. 14117–14126. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c04779>
28. Tokin R., Ipsen J.O., Westh P., Johansen K.S. // *Biotechnol. Lett.* 2020. V. 42. P. 1975–1984. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02922-0>
29. Pierce B.C., Agger J.W., Wichmann J., Meyer A.S. // *Enzyme Microb. Technol.* 2017. V. 98. P. 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.12.007>
30. Semenova M.V., Gusakov A.V., Telitsin V.D., Rozhkova A.M., Kondratyeva E.G., Sinitsyn A.P. // *Biochim. Biophys. Acta – Proteins and Proteomics*. 2020. V. 1868. № 1. Article № 140297. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140297>
31. Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravitnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P. // *Biotechnol. J.* 2010. V. 5. № 8. P. 871–880. <https://doi.org/10.1002/biot.201000050>
32. Dotsenko A.S., Rozhkova A.M., Gusakov A.V. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2015. V. 70. № 6. P. 283–286. <https://doi.org/10.3103/S0027131415060024>
33. Korotkova O.G., Semenova M.V., Morozova V.V., Zorov I.N., Sokolova L.M., Bubnova T.M., Okunev O.N., Sinitsyn A.P. // *Biochemistry (Moscow)*. 2009. V. 74. № 5. P. 569–577. <https://doi.org/10.1134/S0006297909050137>
34. Wood T.M. // *Methods Enzymol.* 1988. V. 160. P. 19–25. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)60103-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)60103-0)
35. Nelson N. // *J. Biol. Chem.* 1944. V. 153. P. 375–380.
36. Peterson G.L. // *Anal. Biochem.* 1979. V. 100. № 2. P. 201–220. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90222-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90222-7)
37. Westereng B., Agger J.W., Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Aachmann F.L., Stenstrom Y.H., Eijsink V.G.H. // *J. Chromatogr. A*. 2013. V. 1271. № 1. P. 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.048>
38. Hildebrand A., Addison J.B., Kasugo T., Fan Z. // *Biochem. Eng. J.* 2016. V. 109. P. 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.024>
39. Villares A., Moreau C., Bennati-Granier C., Garajova S., Foucat L., Falourd X., Saake B., Berrin J.-G., Cathala B. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. Article № 40262. <https://doi.org/10.1038/srep40262>
40. Song B., Li B., Wang X., Shen W., Park S., Collings C., Feng A., Smith S.J., Walton J.D., Ding S.-Y. // *Biotechnol. Biofuels*. 2018. V. 11. Article № 41. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1023-1>
41. Forsberg Z., Sørle M., Petrović D., Courtade G., Aachmann F.L., Vaaje-Kolstad G., Bissaro B., Røhr A.K., Eijsink V.G.H. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2019. V. 59. P. 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.02.015>

## Enzymatic Destruction of Cellulose: Peculiarities of the Kinetic Interaction of Lytic Polysaccharide Monooxygenases and Individual Cellulases

M. V. Semenova<sup>a</sup>, A. V. Gusakov<sup>b,\*</sup>, V. D. Telitsin<sup>b</sup>, and A. P. Sinitsyn<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>b</sup>Lomonosov Moscow State University, Chemical Faculty, Moscow, 119991 Russia

\*e-mail: avgusakov@enzyme.chem.msu.ru

The peculiarities of the kinetic interaction of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMO) from *Thielavia terrestris* (TtLPMO), *Penicillium verruculosum* (PvLPMO) and *Trichoderma reesei* (TrLPMO) with purified cellobiohydrolases (CBH I and CBH II), as well as with endoglucanase II (EG II) of *P. verruculosum* during the destruction of microcrystalline (Avicel) and amorphous cellulose were studied. TtLPMO belongs to the C1-type of LPMO, while PvLPMO and TrLPMO are of the mixed C1/C4-type, according to the generally accepted classification of this class of oxidases. Under the action of any of the three LPMOs together with CBH II or EG II on Avicel or amorphous cellulose, respectively, the enzymes displayed synergism, which was manifested in an increase in the yield of reducing sugars. The synergism was expressed to the greatest extent in the initial period of the reaction. The mixtures of PvLPMO and TrLPMO with CBH I also demonstrated synergy on Avicel as a substrate, while TtLPMO, on the contrary, had an inhibitory effect on CBH I. The observed synergism and antagonism between LPMO and CBH II/CBH I can be explained in terms of a simple kinetic scheme, when the first enzyme forms additional ends of polysaccharide molecules that serve as a substrate or inhibitor for the second enzyme.

**Keywords:** cellulose biodegradation, lytic polysaccharide monooxygenase, cellobiohydrolase, endoglucanase, synergism, antagonism

УДК 577.152.321:577.114.4

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИИ ХИТОЗАНА МИКРОБНЫМИ ХИТИНАЗАМИ И ХИТОЗАНАЗАМИ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ОБРАЗУЕМЫХ ХИТООЛИГОМЕРОВ

© 2021 г. В. Р. Сафина<sup>1</sup>, А. И. Мелентьев<sup>1</sup>, Н. Ф. Галимзянова<sup>1</sup>, Е. А. Гильванова<sup>1</sup>, Л. Ю. Кузьмина<sup>1</sup>, С. А. Лопатин<sup>2</sup>, В. П. Варламов<sup>2</sup>, Андр. Х. Баймиев<sup>3</sup>, Г. Э. Актуганов<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, 450054 Россия

<sup>2</sup>Институт биоинженерии ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 117312 Россия

<sup>3</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, 450054 Россия

\*e-mail: gleakt@anrb.ru

Поступила в редакцию 17.03.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 23.04.2021 г.

Изучены особенности ферментативной деструкции хитозана со степенью деацетилирования (СД) 85 и 50% препаратами микробных хитиназ и хитозаназ по показателям глубины гидролиза, молекулярно-массового распределения (ММР) и антимикробной активности образуемых продуктов реакции. Ферментный комплекс штамма *Bacillus thuringiensis* В-387, характеризующегося высоким уровнем продукции хитозаназ (>4.5 ед/мл), осуществлял деструкцию полимера до низкомолекулярных хитоолигосахаридов ( $M_w \leq 2$  кДа) при низком выходе (~5%) олигохитозанов ( $M_w$  2–16 кДа). Препараты штаммов *Bacillus atrophaeus* IB-33-1 и *Cohnella* sp. IB-P192, характеризующиеся активностью преимущественно хитиназы (0.3–0.5 ед./мл), показали наиболее низкие скорость и глубину гидролиза хитозана с СД 85%. Подбор соотношения фермент : субстрат в интервале 2–5 ед./г (по хитозану) позволил снизить глубину гидролиза исходного полимера и повысить выход олигохитозанов с  $M_w \sim 15$ –17 кДа до 30% при деполимеризации хитозана (СД 85%) ферментным комплексом *B. thuringiensis* В-387. При гидролизе хитозана различной степени деацетилирования (СД 85% и 50%) ферментными комплексами с высокой активностью хитозаназы бактерицидный и фунгицидный эффект образуемых олигомеров снижался, как правило, более заметно, чем при использовании хитиназы. Однако в некоторых случаях имело место как неспецифическое, так и специфическое усиление антимикробного действия продуктов ферментализации по сравнению с исходным полимером, что определялось индивидуальной чувствительностью штаммов бактерий и микромицетов.

**Ключевые слова:** ферментативная деполимеризация хитозана, биоактивные хитоолигосахариды, хитинолитические ферменты, хитозаназы, антимикробная активность

DOI: 10.31857/S0555109921050135

Хитозан — уникальный по физико-химическим свойствам и разнообразию биологической активности аминополисахарид, получаемый щелочным деацетилированием хитина из панциря морских ракообразных [1]. Объемы промышленно производимого хитозана существенно превышают известные в настоящее время потенциально значимые естественные источники этого биополимера, относящиеся в основном к грибам класса *Zygomycetes*, например, *Absidia caerulea* [2, 3]. Неотъемлемыми биологическими свойствами хитозана являются антибактериальная и фунгицидная активности, обусловленные, в известной степени, его поликатионной природой [1, 4, 5]. Вне зависимости от источника хитозана, его антимикробная активность в значительной мере определяется такими характеристиками как мо-

лекулярная масса ( $M_w$ ) и степень деацетилирования (СД) [4, 6, 7]. Олигомеры хитозана, включая хитоолигосахариды (ХОС) со степенью полимеризации  $n = 4$ –10 и низкомолекулярный хитозан с  $M_w \sim 4$ –20 кДа, представляют собой более функциональные соединения по сравнению с исходным полимером в силу их растворимости в воде при нейтральных значениях pH и низкой вязкости [8–10]. По различным данным, наиболее высокой бактерицидной и фунгицидной активностью обладают хитоолигомеры с  $M_w \sim 5$ –10 кДа, тогда как другие виды биологической/физиологической активности значительно варьируют по своему уровню среди олигомеров с  $M_w \sim 1.5$ –20 кДа и более [6, 9, 11–13]. Особенности структуры исходного полимера и способ его деструкции могут

оказывать существенное влияние на спектр образующихся олигомеров и их биологическую активность [14]. Преимущества ферментативной деструкции хитозана заключаются в безопасности этого процесса для окружающей среды (по сравнению с химическими методами) и отсутствии побочных продуктов, а также возможности контроля протекающей реакции и глубины гидролиза субстрата [10, 15, 16]. Хитозан может быть гидролизован различными гидролазами, в том числе некоторыми целлюлазами, протеазами, пектиназами и др. [15]. Однако, в отличие от неспецифических ферментов, ограниченная деструкция полимера хитозаназами (КФ 3.2.1.132) может протекать при существенно меньшем соотношении фермент-субстрат и требует меньшего времени инкубации. Сравнительная оценка потенциала микробных хитозаназ и хитиназ представляет значительный интерес с точки зрения образования и выхода водорастворимых хитоолигомеров.

Цель настоящей работы – сравнительное изучение эффективности ферментативного гидролиза хитозана до олигомеров, обладающих антимикробной активностью, под действием хитиназ и хитозаназ бактериального и грибного происхождения, различающихся по специфичности и каталитическим свойствам.

## МЕТОДИКА

Основными объектами исследования являлись штаммы хитинолитических бактерий и микровицетов из коллекции Уфимского института биологии (УИБ УФИЦ РАН) и Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ), в том числе, *Bacillus atrophaeus* IB-33-1, *B. licheniformis* IB-A41.4.2, *B. licheniformis* IB-P141 B21-1, *B. mannanilyticus* IB-OR17 B1 (штамм депонирован в ВКМ под номером B-2715D), *B. thuringiensis* var. *dendrolimus* ВКМ B-387, *Cohnella* sp. IB-P192, *Paenibacillus ehimensis* IB-739 (депонирован в ВКМ под номером B-2680D), *P. illinoisensis* IB-1087, а также хитозанолитический штамм *Penicillium* sp. IB-37-2A (депонирован в ВКМ под номером F-4780). Культуры поддерживали на агаризованных средах, описанных в работе [17], а также на агаризованной среде LB и картофельно-глюкозном агаре (КГА). В качестве тест-объектов для оценки антибактериальной и фунгицидной активности хитозана и его олигомеров использовали коллекционные и собственные (коллекции УИБ и ИБГ УФИЦ РАН) штаммы условно патогенных бактерий *Bacillus cereus* ВКМ B-688, *Enterobacter cloacae* IB-344 CPA, *Escherichia coli* IBG-9 и *Pseudomonas aeruginosa* IB-39D, а также фитопатогенных микровицетов *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker ИБ Г-12, *Fusarium culmorum* (Wm.G.Sm.) Sacc. ВКМ F-844, *F. oxysporum* (Schlecht.) Snyder et Hans. ВКМ F-137 и *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn ВКМ F-895.

В работе использовали хитозан с СД ~ 85% (ЗАО “Биопрогресс”, Россия), а также частично N-ацетилованный хитозан (СД ~ 50%), любезно предоставленный лабораторией инженерии биополимеров (Институт биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН).

Хитозан (СД 85%) растворяли в 100 мл 0.2 М уксусной кислоты (х. ч.) при 40°C и постоянном перемешивании. Полученный раствор затем титровали 0.2 М NaOH до pH 6.0, после чего доводили до объема 200 мл деионизированной водой и хранили при 5°C. В дальнейшей работе приготовленный раствор хитозана разбавляли деионизированной водой до необходимых концентраций. Аналогичным способом готовили раствор хитозана (СД 50%).

Активность хитозаназы и хитиназы препаратов, а также содержание в них белка определяли, как описано ранее в работе [18].

Деполимеризацию хитозана СД 85 и 50% ферментными препаратами оценивали по снижению кинематической вязкости его растворов, которую измеряли с помощью капиллярного стеклянного вискозиметра ВПЖ-4 (“Экохим”, Россия) с диаметром капилляра 0.82 мм. Концентрацию субстрата подбирали в интервале 1–1.35% в соответствии с рекомендациями по рабочему диапазону времени истечения. В расходный резервуар вискозиметра вносили около 6 мл раствора хитозана, к которому добавляли от 0.01 до 0.1 мл раствора ферментного препарата. Реакционную смесь тщательно перемешивали и инкубировали при 50°C в течение 60 мин. Вязкость раствора субстрата измеряли через 2, 5, 10, 20, 40 и 60 мин от начала реакции. Кинематическую вязкость реакционной смеси рассчитывали по формуле:

$$V = g/9.807TK,$$

где  $g$  – ускорение свободного падения в месте измерения,  $T$  – время истечения,  $K$  – постоянная вискозиметра, равная 0.03 мм<sup>2</sup>/с<sup>2</sup> для вискозиметра ВПЖ-4.

Степень гидролиза хитозана с СД 85% оценивали после 1 ч обработки при 50°C ферментными препаратами штаммов *B. atrophaeus* IB-33-1, *B. thuringiensis* B-387, *Cohnella* sp. IB-P192, *P. ehimensis* IB-739 и *Penicillium* sp. IB-37-2A. Остаточное содержание хитозана определяли следующим образом. Частично гидролизованный полисахарид осаждали добавлением в реакционную смесь 0.5 М NaOH в соотношении 1 : 3 (об./об.), центрифугировали, промывали деионизированной водой и высушивали при 45°C до постоянного веса и взвешивали на аналитических весах Leki B2104 (Финляндия) с погрешностью  $\pm 0.1$  мг. Глубину гидролиза субстрата определяли по формуле  $[(C_0 - C_1)/C_1] \times 100$  (%), где  $C_0$  – начальная, а  $C_1$  – остаточная концентрация хитозана (мг/мл) в ре-

акционной смеси после инкубации в присутствии ферментных препаратов.

Средневесовую ( $M_w$ ), среднечисловую ( $M_n$ ) молекулярную массу, а также индекс полидисперсности ( $M_w/M_n$ ) образцов низкомолекулярного хитозана определяли с помощью высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографии (HP-SEC) на жидкостном хроматографе S-2100 ("Sykam", Германия). Ферментные препараты добавляли к 2%-ному раствору хитозана (СД 85%) в 50 мМ Na-ацетатном буфере (рН 6.0) в различных объемных соотношениях и инкубировали в течение 60 мин при 50°C. Образовавшиеся олигохитозаны осаждали добавлением 2.0 М раствора NaOH (1 : 1, об./об.), центрифугировали, промывали деионизированной водой до нейтральной реакции и перерастворяли в 50 мМ Na-ацетатном буфере (рН 6.0). Полученные растворы лиофильно высушивали на установке Иней 6 (ИБП РАН, Пушкино, Россия) и после повторного растворения в деионизированной воде фракционировали на колонке PolySep-GFC-P 4000 ("Phenomenex", США) 7.8 × 300 мм с предколонкой 5.0 × 2 мм. В качестве элюента использовали 50 мМ уксусную кислоту – 150 мМ ацетат натрия, рН 5.0, при скорости потока 0.5 мл/мин, температуре 30°C и давлении 2 МПа. Колонку калибровали декстрановыми стандартами с молекулярной массой 1.08, 4.44, 9.89, 43.5, 66.7, 123.6 и 196.3 кДа ("Sigma", США). Анализ хроматограмм проводили с помощью программы Chrom&Spec v. 1.6 ("Ampersand", Россия).

Анализ антибактериальной и фунгицидной активности ферментативных гидролизатов образцов хитозана со СД 85 и 50% проводили в стандартных 96-луночных полистирольных культуральных планшетах ("Corning", США). Образцы хитозана после ферментализации подвергали термообработке в водной бане (10 мин при 100°C) для инактивации ферментов и затем стерилизовали пропусканием через бактериальные шприцевые фильтры с размером пор 0.20 мкм ("GVS", США) или 0.45 мкм ("Sartorius", Германия). Тест-штаммы бактерий предварительно выращивали в течение ночи в бульоне LB при 220 об./мин и 36.5°C для *Бацилл* и 30°C – для других бактерий.

Инокуляты готовили разведением свежей культуры бактерий в стерильной среде LB до значений оптической плотности 0.05–0.10 ед. и вносили в лунки в объеме 0.1 мл. К инокулятам добавляли стерильные растворы ферментативных гидролизатов хитозана в различном соотношении и доводили общий объем среды до 0.2 мл. Смеси инкубировали от 24 до 48 ч при 30°C, после чего измеряли их оптическую плотность при 600 нм на планшетном спектрофотометре EnSpier ("Perkin-Elmer", США). В качестве контроля использовали образцы питательной среды, не содержащей

олигомеров хитозана, а также среду с хитозаном без ферментативной обработки. Степень ингибирования (СИ, %) тест-штаммов бактерий рассчитывали с помощью стандартной формулы  $СИ = ((ОП_k - ОП_z) / ОП_k) \times 100$ , где  $ОП_k$  и  $ОП_z$  – оптическая плотность среды в контрольных и экспериментальных вариантах соответственно. Минимальную ингибирующую концентрацию (мкг/мл) рассчитывали по количеству хитозана и хитоолигосахаридов, вызывающее снижение оптической плотности тест-культур не менее, чем на 50%. Значения представляли как средние трех независимых экспериментов.

Фунгицидную активность хитоолигосахаридов оценивали аналогичным способом, используя в качестве питательной среды картофельно-глюкозный бульон. Инокуляты готовили на основе свежей (5–6 сут) культуры микромицетов; в качестве посевного материала использовали суспензию спор концентрацией около  $10^5$  спор/мл питательной среды. Среднее количество грибных спор/конидий в инокуляте рассчитывали с помощью камеры Горяева. После засева планшеты инкубировали при 28°C в течение 3–4 сут.

Фунгицидную активность некоторых гидролизатов хитозана количественно определяли также по подавлению радиального роста колоний фитопатогенного гриба *B. sorokiniana* IB Г-12 при культивировании на КГА. Предварительный гидролиз 1%-ных растворов хитозана (СД 85% и СД 50%, рН 6.0) проводили в течение 1 ч при 50°C концентрированными ферментными препаратами штаммов *B. atrophaeus* IB-33-1 (ХОС 1), *B. thuringiensis* B-387 (ХОС 2) и *Penicillium* sp. IB-37-2A (ХОС 3) в соотношении от 1 : 60 до 1 : 120 (о/о). Затем реакцию смесь инкубировали 10 мин при 100°C, остужали, центрифугировали и пропускали через бактериальные фильтры с размером пор 0.20 мкм ("GVS", США). Полученные растворы вносили в расплавленный и охлажденный перед застыванием КГА в соотношениях 1 : 15 и 1 : 30 (об./об.), после чего агар разливали по 15 мл в чашки Петри. В застывшем КГА вырезали лунки диаметром 9 мм, в которые вставляли агаровые блоки того же диаметра стерильно вырезанные из свежей (5–7 сут) культуры тест-гриба. Чашки инкубировали в течение 7 сут при 28°C, после чего измеряли диаметр выросших колоний гриба. Размер колоний, выросших на КГА в отсутствие гидролизатов хитозана, принимали в качестве негативного контроля. В качестве положительного контроля принимали размеры колоний, выросших в присутствии исходных растворов 1%-ного (в/о) хитозана (СД 85% и СД 50%), внесенных в среду в том же объемном отношении (1 : 30), что и полученные из них гидролизаты. Степень подавления роста гриба рассчитывали в % по стандартной формуле (см. выше), используя в качестве пе-



ременных значения площади ( $\text{мм}^2$ ) колоний гриба в контрольном и опытном вариантах. Значения представляли как средние арифметические данных трех независимых экспериментов, со стандартным отклонением в качестве доверительного интервала.

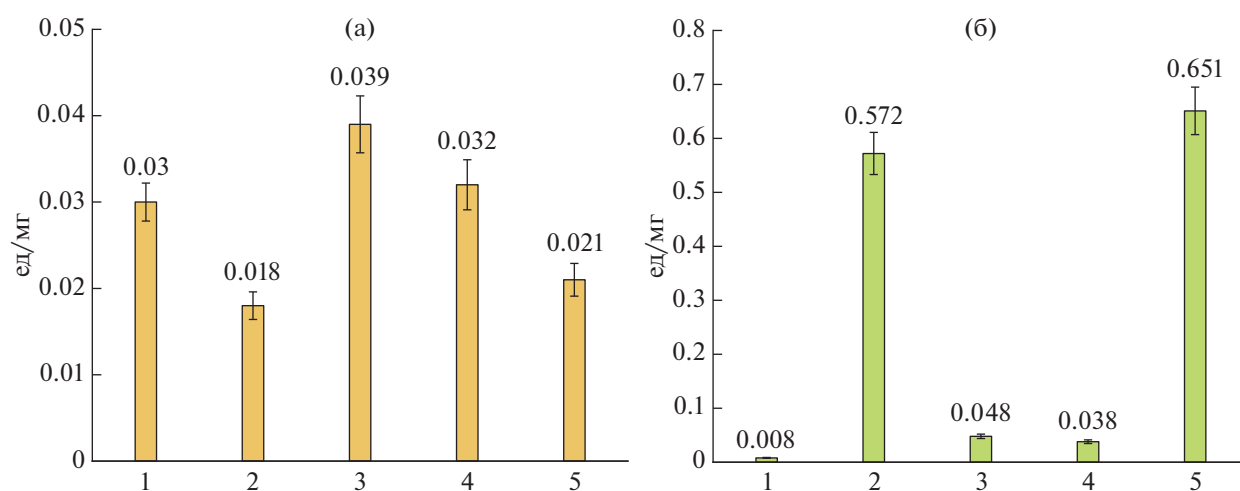
Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы OriginPro 2018 (версия b9.5.0.193), “OriginLab Corp.”). Коэффициенты корреляции по Пирсону и линейную регрессию оценивали, используя пакет анализа MS Office Excel 2007 (12.0.6611.1000).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Понятие “эффективности” гидролиза хитозана ферментными препаратами может интерпретироваться по-разному в зависимости от целей, однако ключевым критерием при этом является соблюдение баланса между достигаемым повышением растворимости продуктов частичной деструкции полимера в водных растворах и их биологической, в данном контексте, антимикробной активностью. Важным фактором, оказывающим влияние на эффективность процесса деполимеризации, является степень деацетилирования исходного полимера. Как известно, некоторые бактериальные экзохитиназы семейства GH18, в отличие от эндохитиназ GH19, эффективно расщепляют хитозан со степенью деацетилирования (СД) 35–50% [16, 19]. По мере увеличения СД до 68–87% размер молекул олигомерных продуктов ферментализации возрастает, при этом хитиназы, такие как ChiB, сохраняют эффективность в отношении хитозана [16]. Поскольку последовательности, кодирующие консервативные участки каталитических доменов хитиназ ChiA и ChiB, широко распространены среди почвенных бактерий, на предварительном этапе работы нами была оценена активность гидролиза хитозана (в отношении хитозана со СД 85%) комплексом ферментов бактерий порядка *Bacillales* – продуцентов внеклеточных хитиназ. Тестировали девять коллекционных штаммов различной таксономической принадлежности. Для сравнения в работе использовали также штамм микромицета *Penicillium* sp. IB-37-2A [20]. Сравнительный групповой анализ показал отсутствие прямой корреляции ( $R_{x,y} = -0.39$ ) и плохую взаимосвязь ( $r^2 < 0.5$ ) между значениями хитиназной и хитозаназной активности у исследуемых штаммов (табл. 1). Данный факт свидетельствует о том, что при групповой характеристике бактерий уровень их хитинолитической активности не может адекватно характеризовать их способность к гидролизу хитозана. Основную роль в гидролизе высокодеацетилированного хитозана могут играть хитозаназы (КФ 3.2.1.132), распространенные у бацилл и актинобактерий [21], однако на уровне отдельных штаммов хитозанолитическая актив-

ность может складываться из эффекта разных групп ферментов, в том числе, неспецифических. Объективным показателем способности хитинолитических штаммов к продукции хитозаназ, по-видимому, может служить значение индекса ( $I_{\text{ChoA}}$ ) соотношения хитозаназной и хитиназной активности у изучаемой культуры (табл. 1). Так, при  $I_{\text{ChoA}} \geq 1$  можно говорить о хорошей способности бактериальных штаммов к продукции хитозаназ, тогда как значения  $I_{\text{ChoA}} \sim 1.1\text{--}1.9$  могут косвенно свидетельствовать о синтезе неспецифических гидролаз, участвующих в деградации хитозана.

Для сравнительной оценки деполимеризации хитозана под действием различных ферментных систем, нами были отобраны штаммы, способные к одновременной продукции хитиназ и хитозаназ, с высоким и умеренным индексом хитозаназной активности – *B. thuringiensis* B-387, *Penicillium* sp. IB-37-2A и *P. ehimensis* IB-739, а также культуры, синтезирующие преимущественно хитиназы – *B. atrophaeus* IB-33-1, *Cohnella* sp. IB-P192. Из перечисленных культур штамм *P. ehimensis* IB-739 рассматривался ранее как потенциальный продуцент ферментного комплекса для получения низкомолекулярного хитозана [22]. Другими исследователями показана возможность применения хитозаназы штамма *P. ehimensis* B-23118 для деструкции хитозана до функциональных хитоолигосахаридов со степенью полимеризации от 2 до 6 [23]. Количественный анализ удельной ферментативной активности отобранных штаммов на основе оценки скорости накопления восстанавливающих сахаров, образуемых при гидролизе коллоидного хитина и растворимого хитозана со СД 85%, показал довольно сходный интервал значений продукции хитиназ, при наличии резко выделяющейся хитозаназной активности у штаммов *B. thuringiensis* B-387 и *Penicillium* sp. IB-37-2 (рис. 1). Уровень деструкции хитозана СД 85% ферментными комплексами исследуемых штаммов по данным вискозиметрического анализа в целом коррелировал с показателями динамики освобождения продуктов гидролиза, за исключением штамма *Penicillium* sp. IB-37-2A, который при более высокой “сахаробразующей” активности, чем у ферментного комплекса *P. ehimensis* IB-739, характеризовался сравнительно медленной динамикой снижения вязкости субстрата (рис. 2а). Проявление такой диспропорции типично для действия ферментов экзо-типа, которым является хитозаназа *Penicillium* sp. IB-37-2A [20]. Следует отметить сходный характер воздействия на хитозан с СД  $\sim 50\%$ , все ферментные препараты быстрее снижали вязкость его раствора по сравнению с хитозаном СД 85% (рис. 2б), что может быть связано с повышением активности хитиназ в отношении N-ацетилированных остатков.



**Рис. 1.** Удельная хитиназная (а) и хитозаназная (б) активности (ед./мг белка) штаммов хитинолитических бактерий (1–4) и *Penicillium* sp. IB-37-2A (5) при глубинном культивировании в среде с 0.5% коллоидного хитина (штаммы 1, 3–5) и среде LB (штамм 2). 1 – *B. atrophaeus* IB-33-1; 2 – *B. thuringiensis* B-387; 3 – *Cohnella* sp. IB-P192; 4 – *P. ehimensis* IB-739.

**Таблица 1.** Средняя продуктивность и индекс хитозаназной активности штаммов бактерий и микромицетов, способных к гидролизу хитина и хитозана

| №                                                                                         | Штамм                                 | Средняя продуктивность штамма<br>(ферментативная активность в СН КЖ),<br>ед./мл |                            | $I_{\text{ChoA}}^1$     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------|
|                                                                                           |                                       | хитиназа                                                                        | хитозаназ <sup>2</sup>     |                         |
| 1                                                                                         | <i>Bacillus atrophaeus</i> IB-33-1    | 0.407 ± 0.027                                                                   | 0.107 ± 0.014              | 0.26                    |
| 2                                                                                         | <i>B. licheniformis</i> IB-A41.4.2    | 0.220 ± 0.024                                                                   | 0.281 ± 0.024              | 1.28                    |
| 3                                                                                         | <i>B. licheniformis</i> IB-P141 B21-1 | 0.265 ± 0.027                                                                   | 0.285 ± 0.027              | 1.08                    |
| 4                                                                                         | <i>B. mannanilyticus</i> IB-OR17 B1   | 0.318 ± 0.047                                                                   | 0.038 ± 0.005              | 0.12                    |
| 5                                                                                         | <i>B. thuringiensis</i> BKM B-387     | 0.457 ± 0.038 <sup>3</sup>                                                      | 4.609 ± 0.125 <sup>4</sup> | 10.09 (32) <sup>5</sup> |
| 6                                                                                         | <i>Cohnella</i> sp. IB-P192           | 0.240 ± 0.017                                                                   | 0.303 ± 0.010              | 1.26                    |
| 7                                                                                         | <i>Paenibacillus ehimensis</i> IB-739 | 0.217 ± 0.016                                                                   | 0.328 ± 0.020              | 1.51                    |
| 8                                                                                         | <i>P. illinoisensis</i> IB-1087       | 0.366 ± 0.024                                                                   | 0.528 ± 0.032              | 1.44                    |
| 9                                                                                         | <i>Penicillium</i> sp. IB-37-2A       | 0.095 ± 0.007                                                                   | 2.486 ± 0.644              | 26.17                   |
| Коэффициент корреляции по Пирсону<br>между показателями активности                        |                                       | 0.32332                                                                         |                            | –                       |
| Коэффициент корреляции обеих активностей по<br>Пирсону (с показателем $I_{\text{ChiA}}$ ) |                                       | –0.38531                                                                        | 0.6558                     |                         |
| Коэффициент детерминации $r^2$<br>У-пересечение                                           |                                       | 0.148467<br>10.046                                                              | 0.430109<br>0.8960         |                         |

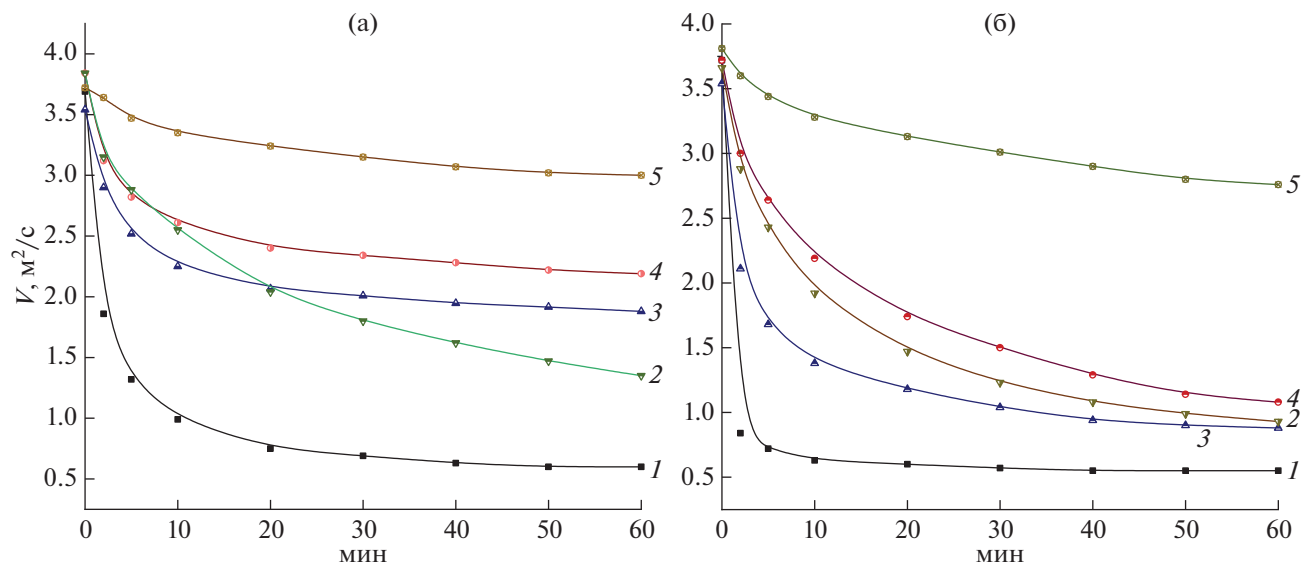
<sup>1</sup> $I_{\text{ChoA}}$  – относительный индекс хитозанолитической активности;

<sup>2</sup> оценка по скорости гидролиза растворимого/коллоидного хитозана с СД 85%;

<sup>3</sup> индукция 0.25–1.0%-ным коллоидным хитином;

<sup>4</sup> базовый уровень конститутивного синтеза в среде LB;

<sup>5</sup> значение в скобках указано для соотношения уровня хитозаназной активности, индуцируемой в тех же условиях, что и аналогичная хитиназная активность.



**Рис. 2.** Динамика снижения кинематической вязкости ( $V$ ) 1.3%-ных растворов хитозана с СД 85% (а) и 50% (б) под действием препаратов КЖ штаммов: 1 – *B. thuringiensis* В-387 (ед./мг); 2 – *P. ehimensis* IB-739 (ед./мг); 3 – *Cohnella* sp. IB-P192 (ед./мг); 4 – *Penicillium* sp. IB-37-2A (ед./мг); 5 – *B. atrophaeus* IB-33-1 (ед./мг). Объемное соотношение (об./об.) растворов фермента и субстрата – 1 : 60, 50°C, 50 мМ Na-ацетатный буфер, pH 6.0.

Глубина конверсии хитозана СД 85% до низкомолекулярных водорастворимых хитоолигосахаридов напрямую определялась уровнем хитиназной активности ферментных препаратов ( $R_{x,y} = 0.83$ ;  $r^2 \sim 0.68$ ), тогда как значения их хитиназной активности не оказывали существенного влия-

ния на степень гидролиза данного полисахарида ( $R_{x,y} = -0.04$ ;  $r^2 \sim 0.001$ ) (табл. 2). Из табл. 3 видно, что при одинаковых объемных соотношениях (1 : 60) ферментных препаратов и раствора субстрата, показатели их индивидуального фермент-субстратного соотношения по хитозаназе могли

**Таблица 2.** Степень деструкции высокомолекулярного хитозана (СД 85%) и выход частично гидролизованых олигохитозанов при действии концентрированных ферментных препаратов различных штаммов (50°C, pH 5.5)

| Фермент-субстратное соотношение, ед./г хитозана |          |            | Концентрация<br>микробного белка в<br>реакционной смеси,<br>мг/мл | Степень<br>конверсии<br>хитозана за 1 ч, % * | Средний выход<br>олигомерных<br>продуктов, %** |
|-------------------------------------------------|----------|------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| об./об.                                         | хитиназа | хитозаназа |                                                                   |                                              |                                                |
| Штамм <i>B. atrophaeus</i> IB-33-1              |          |            |                                                                   |                                              |                                                |
| 1 : 120                                         | 3.2      | 0.5        | 0.44 ± 0.05                                                       | 9.1 ± 1.1                                    | 91                                             |
| 1 : 60                                          | 6.4      | 1.1        | 0.89 ± 0.10                                                       | 16.3 ± 1.5                                   | 84                                             |
| Штамм <i>B. thuringiensis</i> В-387             |          |            |                                                                   |                                              |                                                |
| 1 : 240                                         | 0.3      | 10.2       | 0.06 ± 0.005                                                      | 95.3 ± 3.2                                   | 5                                              |
| 1 : 120                                         | 0.6      | 20.3       | 0.12 ± 0.010                                                      | 97.3 ± 2.8                                   | 3                                              |
| 1 : 60                                          | 1.2      | 40.5       | 0.25 ± 0.018                                                      | 97.6 ± 1.7                                   | 2                                              |
| Штамм <i>Cohnella</i> sp. IB-P192               |          |            |                                                                   |                                              |                                                |
| 1 : 60                                          | 1.6      | 0.2        | 0.28 ± 0.025                                                      | 22 ± 2.1                                     | 78                                             |
| Штамм <i>P. ehimensis</i> IB-739                |          |            |                                                                   |                                              |                                                |
| 1 : 60                                          | 2.5      | 3          | 0.34 ± 0.027                                                      | 31.2 ± 2.8                                   | 68                                             |
| Штамм <i>Penicillium</i> sp. IB-37-2A           |          |            |                                                                   |                                              |                                                |
| 1 : 120                                         | 1.7      | 19         | 0.11 ± 0.014                                                      | 37.2 ± 2.9                                   | 63                                             |
| 1 : 60                                          | 3.5      | 38         | 0.21 ± 0.016                                                      | 51.2 ± 4.4                                   | 49                                             |

\* Содержание продуктов глубокого гидролиза, не осаждаемых 0.5 М NaOH (низкомолекулярные хитоолигосахариды);

\*\* Доля (по сухому веществу) частично гидролизованного олигомерного хитозана, осаждаемого 0.5 М NaOH.

**Таблица 3.** Молекулярно-массовые характеристики и относительный выход олигохитозанов, образуемых под действием ферментных комплексов исследуемых штаммов после 1 ч гидролиза хитозана (20 мг/мл, СД ~ 85%) при различной температуре и соотношении фермент : субстрат

| Фермент-субстратное соотношение, ед./г хитозана |          |            | M <sub>n</sub> <sup>1</sup> , кДа | M <sub>w</sub> <sup>2</sup> , кДа | M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub> <sup>3</sup> | Выход, % |
|-------------------------------------------------|----------|------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------|----------|
| об./об.                                         | хитиназа | хитозаназа |                                   |                                   |                                             |          |
| Штамм <i>B. thuringiensis</i> B-387             |          |            |                                   |                                   |                                             |          |
| 1 : 600 <sup>4</sup>                            | 0.02     | 0.5        | 22.7                              | 46.2                              | 2.03                                        | 44.2     |
| 1 : 120 <sup>6</sup>                            | 0.1      | 2.3        | 9.2                               | 14.8                              | 1.62                                        | 29.2     |
| 1 : 60 <sup>4</sup>                             | 0.2      | 4.6        | 10.7                              | 16.7                              | 1.55                                        | 30.0     |
| Штамм <i>Cohnella</i> sp. IB-P192               |          |            |                                   |                                   |                                             |          |
| 1 : 60 <sup>4</sup>                             | 1.3      | 0.2        | 30.5                              | 70.6                              | 2.32                                        | 58.3     |
| Штамм <i>P. ehimensis</i> IB-739                |          |            |                                   |                                   |                                             |          |
| 1 : 600 <sup>4</sup>                            | 0.2      | 0.2        | 35.9                              | 90.1                              | 2.51                                        | 70       |
| 1 : 120 <sup>4</sup>                            | 1        | 1.2        | 25.8                              | 67.8                              | 2.63                                        | 45.8     |
| 1 : 60 <sup>4</sup>                             | 1.9      | 2.3        | 15.2                              | 27.1                              | 1.79                                        | 55.0     |
| Штамм <i>Penicillium</i> sp. IB-37-2A           |          |            |                                   |                                   |                                             |          |
| 1 : 240 <sup>4</sup>                            | 0.03     | 0.8        | 57.8                              | 127.9                             | 2.21                                        | 50.0     |
| 1 : 60 <sup>5</sup>                             | 0.1      | 3.1        | 41.2                              | 97.1                              | 2.36                                        | 61.7     |

<sup>1</sup> Среднечисловая молекулярная масса; <sup>2</sup> средневесовая молекулярная масса; <sup>3</sup> индекс полидисперсности; <sup>4–6</sup> температура инкубации 50, 60 и 70°C соответственно.

различаться в 40 и более раз. Ферментный препарат *B. thuringiensis* B-387 осуществлял наиболее глубокий гидролиз хитозана СД 85% (95–97%) в течение 1 ч инкубации (50°C) при минимальной степени загрязнения реакционной смеси микробным белком (табл. 2). Высокую степень конверсии полимера (80–85%) показывал также ферментный комплекс *Penicillium* sp. IB-37-2A после 4-часовой обработки (данные не показаны). Как известно, продукты глубокого гидролиза хитозана, включая мономер и димер, не проявляют антибактериальной активности, а хитоолигосахариды со степенью полимеризации  $n = 3–6$  показывают существенно меньший антимикробный эффект по сравнению с низкомолекулярным хитозаном [24]. С точки зрения выхода низкомолекулярного хитозана, эффективность конверсии исходного полисахарида показывала обратную зависимость от уровня хитиназной активности проверенных ферментных препаратов). Так, олигохитозан, осаждаемый 0.5 М раствором NaOH, практически отсутствовал при гидролизе хитозана (СД 85%) высокоактивным ферментным комплексом *B. thuringiensis* B-387 (табл. 2) в течение 1 ч (табл. 2).

Молекулярная масса ( $M_w$ ) олигомерного хитозана является важным показателем эффективности ограниченного ферментативного гидролиза, определяющего ключевые функциональные характеристики продуктов реакции, такие как растворимость и антибактериальная и фунгицидная активность. Следует отметить, что по этому кри-

терию, комплексы гидролаз большинства исследуемых штаммов, при низком соотношении фермент : субстрат, показывали относительно слабую степень конверсии исходного полимера, образуя продукты в интервале молекулярных масс 67–128 кДа и индексов полидисперсности 2.2–2.6 (по данным ВЭЖХ, табл. 3). Олигомерные продукты гидролиза хитозана (СД 85%) ферментным комплексом штамма *B. atrophaeus* IB-33-1 не были нами исследованы в силу того, что он показывал наименьшую хитозан-деградирующую активность среди всех исследуемых культур. Высокоактивный комплекс *B. thuringiensis* B-387 при использовании более низких рабочих концентраций хитозаназы (2–5 ед./г субстрата) демонстрировал максимальную эффективность среди всех штаммов по показателям средневесовой молекулярной массы образуемых олигомеров ( $M_w \sim 15–17$  кДа) при сравнительно невысоком выходе ~ 30% (табл. 3). Олигохитозаны с  $M_w$  5–15 кДа являются наиболее функциональными водорастворимыми олигомерами хитозана в аспекте проявления антимикробной активности [1, 6, 12]. Всесторонний анализ влияния ключевых параметров ферментативной реакции (фермент-субстратное соотношение, температура, время, pH, ионная сила и т.д.) на показатели молекулярно-массового распределения продуктов гидролиза хитозана позволит в дальнейшем более детально оценить потенциал ферментных препаратов исследуемых штаммов при получении функцио-

**Таблица 4.** Минимальная ингибирующая концентрация хитозана (СД 85%) и олигомерных продуктов его гидролиза ферментными комплексами исследуемых штаммов (1 ч, 50°C)

| Штамм-продуцент<br>(соотношение фермент : субстрат)                                  | МИК, мкг/мл                     |                                  |                                         |                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|
|                                                                                      | <i>Bacillus cereus</i><br>B-688 | <i>Escherichia coli</i><br>IBG-9 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>IB-39D | <i>Enterobacter cloacae</i><br>IB-34 4CPA |
| Хитозан СД 85%                                                                       | 225 ± 35                        | 45 ± 7                           | 1250 ± 71                               | 40 ± 7                                    |
| Ферментативные гидролизаты 1%-ного хитозана (СД 85%)                                 |                                 |                                  |                                         |                                           |
| <i>B. atrophaeus</i> IB-33-1 (1 : 60)                                                | 425 ± 35                        | 28 ± 4                           | 900 ± 141                               | НД*                                       |
| <i>B. thuringiensis</i> B-387 (1 : 240)                                              | 475 ± 35                        | 28 ± 4                           | 1250 ± 71                               | НД*                                       |
| <i>Cohnella</i> sp. IB-P192 (1 : 60)                                                 | 550 ± 71                        | НД <sup>1</sup>                  | 900 ± 141                               | НД*                                       |
| <i>P. ehimensis</i> IB-739 (1 : 60)                                                  | 900 ± 141                       | 23 ± 4                           | 425 ± 35                                | 28 ± 4                                    |
| <i>Penicillium</i> sp. IB-37-2A (1 : 120)                                            | 325 ± 35                        | 28 ± 4                           | 1000 ± 71                               | НД*                                       |
| Коэффициент корреляции между значениями МИК и глубиной гидролиза хитозана, $r_{x,y}$ | 0.34                            | 0.27                             | 0.61                                    | —                                         |

\*Нет достоверных данных.

нальных хитоолигомеров с  $M_w$  5–15 кДа. Предварительные данные показывают, что увеличение температуры инкубации с 50 до 70°C обеспечивало сходную эффективность конверсии хитозана (по показателям выхода и молекулярно-массового распределения) ферментным комплексом *B. thuringiensis* B-387 в условиях 2-кратного снижения его концентрации (табл. 3).

Проведена сравнительная оценка бактерицидной и фунгицидной активности суммарных гидролизатов 1%-ного хитозана, полученных при действии концентрированных ферментных комплексов (см. табл. 2). Активность олигомерных продуктов гидролиза в отношении штамма *B. cereus* B-688 заметно снижалась по сравнению с исходным полимером (табл. 4), при этом показатели минимальной ингибирующей концентрации суммарных гидролизатов коррелировали с глубиной гидролиза хитозана в незначительной степени ( $r_{x,y} \sim 0.34$ ). Рост остальных штаммов бактерий, напротив, в целом более сильно подавлялся олигомерами, чем хитозаном (табл. 4). Если в отношении *E. coli* гидролизаты, полученные с помощью ферментных препаратов большинства тестируемых штаммов (*B. atrophaeus* IB-33-1, *B. thuringiensis* B-387, *P. ehimensis* IB-739 и *Penicillium* sp. IB-37-2A) показывали примерно одинаковую активность, то против *B. cereus* и *P. aeruginosa* наиболее эффективными были продукты ферментных комплексов *Penicillium* sp. IB-37-2A и *P. ehimensis* IB-739 соответственно (табл. 4). Фунгицидная активность ферментативных гидролизатов хитозана в значительной степени зависела от видовой принадлежности тестируемых штаммов

микромикетов, степени деацетилирования исходного полисахарида и метода оценки. При проведении эксперимента в планшетах, в интервале концентраций 25–150 мкг/мл, олигомерные продукты всех ферментных препаратов демонстрировали примерно одинаковую активность против фитопатогенных грибов *F. culmorum* и *R. solani*, тогда как подавление роста *F. oxysporum* заметно снижалось (на 30–40%) только у гидролизата *B. thuringiensis* B-387, что обусловлено, по-видимому, более глубокой деструкцией хитозана (СД 85%) ферментным комплексом этого штамма (табл. 5). При деполимеризации хитозана (СД 50%) фунгицидная активность уменьшалась у гидролизатов *P. ehimensis* IB-739, *B. thuringiensis* B-387 и *Cohnella* sp. IB-P192, что также может быть связано с более глубоким гидролизом ими N-ацетилованного хитозана за счет совместного действия хитиназ и хитозаназ (табл. 5).

При оценке фунгицидной активности хитозана (СД 85%) и ХОС в агаризованной среде в отношении фитопатогена *B. sorokiniana* резкое снижение степени подавления роста гриба отмечалось у 1-часовых гидролизатов, полученных при действии препаратов с высокой активностью хитозаназ (штаммы *B. thuringiensis* B-387 и *Penicillium* sp. IB-37-2A) (рис. 3). В то же время, деструкция (1 ч) хитозана (СД 50%) комплексом *B. thuringiensis* B-387 с преимущественно эндо-хитозаназной активностью, в отличие от ферментных препаратов *B. atrophaeus* IB-33-1 и *Penicillium* sp. IB-37-2A, приводила к возрастанию фунгицидной активности олигомерных продуктов примерно на 30% по сравнению с исходным полисахаридом (рис. 3).

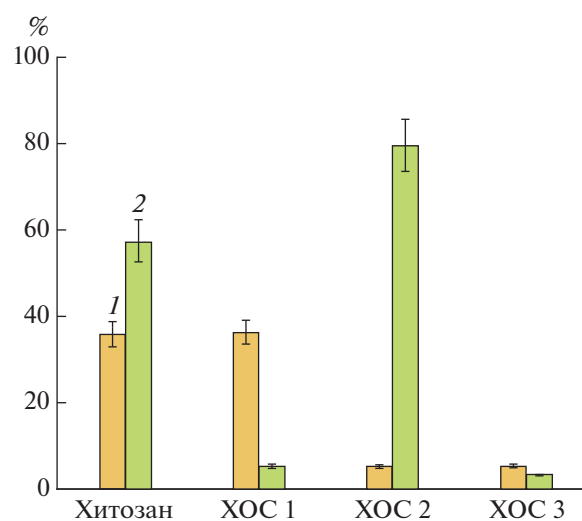
**Таблица 5.** Сравнительная степень подавления роста (72 ч, 28°C) штаммов фитопатогенных микромицетов одинаковыми концентрациями (150 мкг/мл) хитозанов со СД 85 и 50% и продуктов их ферментативного гидролиза (1 ч, 50°C) различными препаратами хитиназ/хитозаназ

| Хитозаны и олигомерные продукты их гидролиза ферментными комплексами | Степень ингибирования роста тест-грибов, % |                                    |                                    |
|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|                                                                      | <i>Fusarium culmorum</i><br>F-844          | <i>Fusarium oxysporum</i><br>F-137 | <i>Rhizoctonia solani</i><br>F-895 |
| Хитозан СД 85%                                                       | 77 ± 6                                     | 79 ± 4                             | 90 ± 5                             |
| Ферментативные гидролизаты 1%-ного хитозана (СД 85%)                 |                                            |                                    |                                    |
| <i>B. atrophaeus</i> IB-33-1 (1 : 60)*                               | 85 ± 4                                     | 80 ± 10                            | 89 ± 4                             |
| <i>B. thuringiensis</i> B-387 (1 : 240)*                             | 81 ± 6                                     | 56 ± 8                             | 87 ± 7                             |
| <i>Cohnella</i> sp. IB-P192 (1 : 60)*                                | 84 ± 6                                     | 70 ± 6                             | 93 ± 2                             |
| <i>P. ehimensis</i> IB-739 (1 : 60)*                                 | 82 ± 6                                     | 76 ± 8                             | 73 ± 7                             |
| <i>Penicillium</i> sp. IB-37-2A (1 : 120)*                           | 87 ± 4                                     | 77 ± 4                             | 91 ± 5                             |
| Хитозан СД 50%                                                       | 61 ± 6                                     | 71 ± 6                             | 82 ± 4                             |
| Ферментативные гидролизаты 1%-ного хитозана (СД 50%)                 |                                            |                                    |                                    |
| <i>B. atrophaeus</i> IB-33-1 (1 : 60)*                               | 81 ± 7                                     | 78 ± 8                             | 90 ± 9                             |
| <i>B. thuringiensis</i> B-387 (1 : 240)*                             | 80 ± 5                                     | 54 ± 7                             | 90 ± 10                            |
| <i>Cohnella</i> sp. IB-P192 (1 : 60)*                                | 88 ± 4                                     | 60 ± 4                             | 93 ± 2                             |
| <i>P. ehimensis</i> IB-739 (1 : 60)*                                 | 76 ± 5                                     | 52 ± 7                             | 91 ± 9                             |
| <i>Penicillium</i> sp. IB-37-2A (1 : 120)*                           | 80 ± 5                                     | 71 ± 6                             | 92 ± 9                             |

\* В скобках дано объемное соотношение растворов ферментного комплекса и субстрата (1% хитозан) в реакционной смеси, при котором был получен каждый гидролизат.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ферментные комплексы высокоактивных культур (*B. thuringiensis* B-387 и *Penicillium* sp. IB-37-2A), продуцирующих хитозаназы, более эффективно гидролизуют хитозан с СД 85 и 50%, по времени и глубине гидролиза, а также высокой растворимости олигомерных продуктов и меньшей степени загрязнения реакционной смеси микробными белками и метаболитами (табл. 2). Вместе с тем, ферментные препараты штаммов, синтезирующих преимущественно хитиназу (*B. atrophaeus* IB-33-1, *Cohnella* sp. IB-P192), либо незначительное количество эндохитозаназ (*P. ehimensis* IB-739), при сходных условиях реакции характеризуются более высокими показателями выхода и значений  $M_w$  олигомерных продуктов. В целом, суммарные смеси хитоолигосахаридов, полученные с помощью последних, демонстрируют более стабильную антибактериальную и фунгицидную активность по сравнению с олигомерами, образующимися под действием высокоактивных деградирующих хитозан комплексов. Глубокий ферментативный гидролиз хитозанов приводит, как правило, к заметному снижению их антимикробной активности. Однако, в отношении некоторых штаммов грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*) ферментативные гидролизаты хитозана показывают более высокую антибактериальную активность по сравнению с исходным хитозаном (СД 85%), что может быть связано с их специфической восприимчивостью к смесям хитоолигомеров.

Отмечено заметное повышение фунгистатической активности по сравнению с исходным хитозаном (СД 50%) смеси его олигомеров, полу-



**Рис. 3.** Степень подавления радиального роста (%) микромицета *Bipolaris sorokiniana* в агаре (КГА, 28°C, 7 сут) в присутствии одинаковых концентраций (275 ± 35 мкг/мл) хитозанов с СД 85% (1) и СД 50% (2) и их гидролизатов, полученных при действии ферментных комплексов *B. atrophaeus* IB-33-1 (ХОС 1), *B. thuringiensis* B-387 (ХОС 2) и *Penicillium* sp. IB-37-2A (ХОС 3).

ченных под действием пяти ферментных препаратов (табл. 5) против некоторых штаммов микромицетов (*Fusarium culmorum*, *Rhizoctonia solani*). В то же время, в отношении гриба *Bipolaris sorokiniana* данный эффект отмечался только у продуктов гидролиза хитозана (СД 50%) ферментным комплексом *B. thuringiensis* В-387, что также может быть обусловлено специфической чувствительностью этого гриба к низкомолекулярным хитоолигосахаридам со значительным содержанием ацетилированных остатков. Оптимизация процесса ферментативной деструкции хитозана по ключевым параметрам (соотношение фермент:субстрат, время, температура и т.п.) позволит более эффективно регулировать получение целевых продуктов, в том числе, повысить выход олигомеров, демонстрирующих оптимальное соотношение таких характеристик, как растворимость и биологическая активность. С практической точки зрения наиболее перспективно применение высокоактивных комплексов хитозанолитических ферментов (например, *B. thuringiensis* В-387), поскольку эффективность гидролиза хитозана должна оцениваться на основе интегрального показателя, включающего не только выход целевых олигомеров и уровень их биологической активности, но и скорость реакции (длительность процесса), расход ферментного препарата, растворимость олигомеров, а также степень загрязнения продуктов микробным белком. С другой стороны, принимая во внимание постоянное расширение сведений о биологической активности хитоолигомеров, можно предположить, что в ближайшем будущем возникнет необходимость комбинированного применения ферментов, различающихся по специфичности и удельной активности, для направленного получения конкретного олигомера (или смеси олигомеров), обладающего определенными функциональными характеристиками.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90119, а также в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9.

При проведении исследований использовали оборудование ЦКП “Агидель” УФИЦ РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякина И.С. // Успехи биологической химии. 2020. Т. 60. С. 317–368.
2. Hamed I., Özogul F., Regenstein J.M. // Trends Food Sci. Technol. 2016. V. 48. P. 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.007>
3. Ghormade M., Pathan E.K., Deshpande M.V. // Int. J. Biol. Macromol. 2017. V. 104(B). P. 1415–1421. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.112>
4. Куликов С.Н., Тюрин Ю.А., Фассахов Р.С., Варламов В.П. // ЖМЭИ. 2009. № 5. С. 91–97.
5. Yilmaz Atay H.Y. Functional Chitosan. / Ed. S. Jana, J. Subrata. Syngapore: Springer Nature, 2019. P. 457–489. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-0263-7\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-15-0263-7_15)
6. Герасименко Д.В., Авдигенко И.Д., Банникова Г.Е., Зуева О.Ю., Варламов В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 3. С. 301–306.
7. Hosseinejad M., Jafari S.M. // Int. J. Biol. Macromol. 2016. V. 85. P. 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.022>
8. Ilyina A.V., Tikhonov V.E., Albulov A.I., Varlamov V.P. // Process Biochem. 2000. V. 35. № 6. P. 563–568. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00104-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00104-1)
9. Liaqat F., Eltem R. // Carbohydr. Polym. 2018. V. 184. № 15. P. 243–259. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.067>
10. Liang S., Sun Y., Dai X. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 8. 2197. P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms19082197>
11. Tokura S., Ueno K., Miyazaki S., Nishi N. // Macromol. Symp. 1997. V. 120. № 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.1002/masy.19971200103>
12. Park Y., Kim M.H., Park S.C., Cheong H., Jang M.K., Nah J.W., Hahm K.S. // J. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 18. № 10. P. 1729–1734.
13. Lin S.-B., Lin Y.-C., Chen H.-H. // Food Chem. 2009. V. 116. № 1. P. 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.002>
14. Sánchez Á., Mengibar M., Rivera-Rodríguez G., Moerschbacher B., Acosta N., Heras A. // Carbohydr. Polym. 2017. V. 157. P. 251–257.
15. Jung W.-J., Park R.-D. // Mar. Drugs. 2014. V. 12. № 11. P. 5328–5356. <https://doi.org/10.3390/md12115328>
16. Aam B., Heggset E., Norberg A., Sørli M., Vårum K., Eijsink V. // Mar. Drugs. 2010. V. 8. № 5. P. 1482–1517. <https://doi.org/10.3390/md8051482>
17. Актуганов Г.Э., Сафина В.Р., Галимзянова Н.Ф., Кузьмина Л.Ю., Гильванова Е.А., Бойко Т.Ф., Мелентьев А.И. // Микробиология. 2018. Т. 87. № 5. С. 599–609. <https://doi.org/10.1134/S0026365618050026>
18. Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Терезулова Г.А., Мелентьев А.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 5. С. 520–526. <https://doi.org/10.7868/S0555109916050020>
19. Sørli M., Horn S.J., Vaaje-Kolstad G., Eijsink V.G.H. // React. Funct. Polym. 2020. V. 148. 104488. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104488>
20. Aktuganov G.E., Galimzianova N.F., Gilvanova E.A., Pudova E.A., Kuzmina L.Yu., Melentiev A.I., Safina V.R. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2019. V. 35. № 2. 18. P. 1–13. <https://doi.org/10.007/s11274-019-2590-4>



21. Viens P., Lacombe-Harvey M.-E., Brzezinski R. // Mar. Drugs. 2015. V. 13. № 11. P. 6566–6587. <https://doi.org/10.3390/md13116566>
22. Ильина А.В., Варламов В.П., Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э. // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. Т. 37. № 2. С. 160–163. <https://doi.org/10.1023/A:1002867412442>
23. Pagnocelli M.G.B., De Araujo N.K., Da Silva N.M.P., De Assis C.F., Rodrigues S., De Macedo G.R. // Bras. Arch. Biol. Technol. 2010. V. 53. № 6. P. 1461–1468. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000600023>
24. Hadwiger L.A., Ogawa T., Kuyama H. // MPMI. 1994. V. 7. № 4. P. 531–533. <https://doi.org/10.1094/mpmi-7-0531>

## Chitosan Depolymerization Efficiency by Microbial Chitinases and Chitosanases in Viewpoint of Antimicrobial Effect Displayed by Generated Chitoooligomers

V. R. Safina<sup>a</sup>, A. I. Melentiev<sup>a</sup>, N. F. Galimzianova<sup>a</sup>, E. A. Gilvanova<sup>a</sup>, L. Yu. Kuzmina<sup>a</sup>, S. A. Lopatin<sup>b</sup>, V. P. Varlamov<sup>b</sup>, Andr. H. Baymiev<sup>c</sup>, and G. E. Aktuganov<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Ufa Institute of Biology of Ufa Federal Research Centre of the RAS, Ufa, 450054 Russia

<sup>b</sup>The Institute of Bioengineering of Federal Research Centre “Fundamentals principles of Biotechnology” of the RAS, Moscow, 117312 Russia

<sup>c</sup>Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Federal Research Centre of the RAS, Ufa, 450054 Russia

\*e-mail: gleakt@anrb.ru

The specific features of chitosan (DD 85%) enzymatic degradation by the microbial chitinases and chitosanases were studied in terms of the conversion degree, molecular weight distribution (MWD) and antimicrobial activity of generated reaction products. The enzyme complex produced by the *B. thuringiensis*, strain B-387, indicating highest chitosanase production ( $>4.5 \text{ U mL}^{-1}$ ), highly extensively degrades the polymer to soluble low-molecular weight chitoooligosaccharides (CHOs,  $M_w \leq 2 \text{ kDa}$ ) along with minor yield ( $\sim 5\%$ ) of alkali-precipitated oligochitosans ( $M_w 2\text{--}16 \text{ kDa}$ ). Hydrolytic complexes produced by the *B. atrophaeus*, strain IB-33-1, and *Cohnella* sp., strain IB-P192, comprising mainly chitinases ( $0.3\text{--}0.5 \text{ U mL}^{-1}$ ), demonstrate the lowest rate and degree of chitosan (DD 85%) hydrolysis. The selection of enzyme : substrate ratio within range of  $2\text{--}5 \text{ U g}^{-1}$  (based on chitosanase activity) under  $50\text{--}70^\circ\text{C}$  indicates optimal values of the reaction rate and MWD of resulting oligomers ( $M_w \sim 15\text{--}17 \text{ kDa}$ , yield 30%) for chitosan (DD 85%) depolymerization by the enzyme complex from *B. thuringiensis* B-387. The selection of the enzyme: substrate ratio in the range of  $2\text{--}5 \text{ units/g}$  (based on chitosanase) made it possible to reduce the hydrolysis depth of the initial polymer and to increase yield of oligochitosans with  $M_w \sim 15\text{--}17 \text{ kDa}$  to 30% for chitosan (DD 85%) depolymerization by the enzyme complex from *B. thuringiensis* B-387. Bactericidal and fungicidal effect of oligomers formed during the destruction of chitosan of varying deacetylation degree (DD 85 and 50%) by the enzyme complexes displaying high chitosanase activity, as a rule, drops more distinctly than when using the chitinases. However, in some cases, there is both nonspecific and specific enhancement of antimicrobial action of hydrolytic products in comparison with the initial polymer, which is determined by individual sensitivity of bacterial and micromycetes strains.

**Keywords:** enzymatic depolymerization of chitosan, bioactive chitoooligosaccharides, chitinolytic enzymes, chitosanase, antimicrobial activity

УДК 54.061;577.19;577.2

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛИПОПЕПТИДОВ ШТАММА *Bacillus subtilis* 26Д

© 2021 г. Е. А. Черепанова<sup>1</sup>, И. В. Галяутдинов<sup>1</sup>, Г. Ф. Бурханова<sup>1</sup>, И. В. Максимов<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, Уфа, 450054 Россия

\*e-mail: igor.mak2011@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.04.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 22.04.2021 г.

Бактерии рода *Bacillus* занимают особое место среди микроорганизмов, стимулирующих рост растений, поскольку способствуют защите растений от патогенов и вредителей. Показано, что защитные свойства бактериям придают вырабатываемые ими биологически активные вещества, секретируемые во внеклеточное пространство. Среди них большой интерес вызывают липопептиды. Из среды культивирования бактерий эндофитного штамма *Bacillus subtilis* 26Д, являющегося основой биопрепарата Фитоспорин-М, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и электрораспылительного масс-спектрометрического детектирования выделена липопептидная фракция, в которой идентифицировано два сурфактина (сурфактин С13 и сурфактин С15). Проведенный анализ генов липопептид-синтезаштамма бактерий *B. subtilis* 26Д выявил наличие гена сурфактин-синтезазы (*Bssfp*), отвечающего за синтез сурфактинов, но генов итурина- (*BsituD*) и фенгицина- (*BsfenD*) синтезаштамма не было обнаружено.

**Ключевые слова:** *Bacillus subtilis* 26Д, липопептиды, сурфактин

**DOI:** 10.31857/S0555109921050032

Бактерии рода *Bacillus* (Cohn) являются одними из самых распространённых микроорганизмов, занимающих разные экологические ниши (вода, воздух, почва, ткани растений, животных и человека). На сегодняшний день наиболее известный и изученный вид этого рода — *Bacillus subtilis* Cohn. Препараты, содержащие в качестве действующего начала различные штаммы этого вида, активно используют в различных отраслях сельского хозяйства (растениеводстве, животноводстве, птицеводстве, рыбоводстве и ветеринарии), а также в медицине в качестве пробиотиков для нормализации микробиома кишечника, укрепления иммунитета и защиты от различных болезнетворных микроорганизмов.

Среди значимых для растениеводства штаммов *B. subtilis* особо следует остановиться на стимулирующих рост растений эндофитных штаммах, способных длительное время обитать в тканях растений, не причиняя им повреждений. Такие штаммы, образуя тесные мутуалистические взаимоотношения со своими хозяевами и антагонистичные к широкому спектру фитопатогенов, можно представить, как уникальный компонент микробиома, позволяющий им, эффективно колонизируя и присутствуя в тканях

растения, конкурировать с патогенами за нишу трофности.

Исследователи обращают внимание на способность эндофитных бактерий регулировать численность патогенной микрофлоры путем синтеза антибиотических веществ и антистрессовых соединений [1, 2]. Среди таких метаболитов бактерий привлекают внимание липопептиды (ЛП), особенностью которых является нерибосомальный синтез с помощью многофункциональных белковых комплексов, называемых нерибосомальными пептидными синтезазами (НРПС) или ЛП-синтезазами [3]. В зависимости от аминокислотной последовательности и состава жирных кислот, ЛП принято подразделять на три основных класса: сурфактины, итурины и фенгицины. Имеются сведения, что внутри данных групп ЛП могут различаться по длине и разветвленности жирнокислотной цепи, обеспечивая разнообразие изоформ [4].

В российском сегменте растениеводства широко применяется коммерческий фунгицидный биопрепарат Фитоспорин-М («Башинком», Россия), содержащий в качестве основы бактерии штамма *B. subtilis* 26Д, обладает как рост-стимулирующими, так и фунгицидными свойствами. Хотя известно, что ЛП-богатая фракция, в том

числе и у штамма *B. subtilis* 26Д, обладает высокой фунгицидной и рострегулирующей активностью, играет определенную роль в процессах защиты растений от различных патогенов [5, 6], до сих пор спектр ЛП у штамма *B. subtilis* 26Д и их физико-химические особенности не исследованы.

Основной целью этой работы является получение липопептид-богатой фракции метаболитов эндофитной бактерий *B. subtilis* 26Д и идентификация основных липопептидов, вырабатываемых этим штаммом.

**Методика.** Объектом исследования являлся штамм эндофитных бактерий *B. subtilis* 26Д (ВНИИСХМ, № 128), входящий в состав препарата Фитоспорин-М (НВП “Башинком”, Россия) и хранящийся в лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН. Для культивирования *B. subtilis* 26Д использовали питательную среду Luria Bertani (LB) [4]. После приготовления питательную среду стерилизовали в автоклаве 2540 ML (“Tuttnauer”, Израиль) 25 мин при давлении 1.5 атм.,  $t = 121^\circ\text{C}$ . Для приготовления суспензии бактерий в стерильных условиях в колбы с питательной средой LB вносили клетки *B. subtilis* 26Д и инкубировали 12 ч на шейкере Orbital Shaker-Incubator ES-20 (“BioSan”, Латвия) при 170 об./мин и  $t = 37^\circ\text{C}$ .

Отбор проб производили каждые 12 ч в течение 7 сут. В пробах гравиметрическим методом оценивались микробная биомасса и концентрация ЛП.

**Получение фракции ЛП из среды культивирования *B. subtilis* 26Д.** Выделение фракции ЛП проводили методом осаждения из культуральной жидкости бактериальной культуры, как описано [7]. Суспензию бактериальных клеток центрифугировали 45 мин при 1600 g на центрифуге Hettich Universal 320R (“Hettich”, Германия), осадок использовали для определения сухой биомассы, а из супернатанта извлекали фракцию, богатую ЛП. Надосадочную жидкость подкисляли 2 М HCl до pH 2.0 (pH-метр, “HANNA Instruments”, Германия) и оставляли на ночь при  $4^\circ\text{C}$ . Сформировавшийся осадок отделяли центрифугированием при 4000 g 30 мин, отмывали дистиллированной водой, подкисленной HCl до pH 2.0 и снова центрифугировали в тех же условиях. Полученный осадок суспензировали в небольшом количестве дистиллированной воды, доводя pH до 7.0 слабым раствором КОН, добавляя этанол до 80%. Через 1.5 ч периодического взбалтывания центрифугированием отделяли осадок, надосадочную жидкость пропускали через фильтр Amicon Ultracel — 3K (“Merck”, Германия). Фракцию, прошедшую через фильтр, с массой менее 3 кДа, собирали и высушивали в вакууме в вакуум-концентраторе Concentrator 5301 (“Eppendorf”, Германия) при  $30^\circ\text{C}$ .

**Гравиметрическая оценка сухой биомассы клеток.** Осадок, полученный после центрифугирования бактериальной суспензии, для удаления солей питательной среды осторожно промывали 2 мл стерилизованной воды MilliQ. Образец снова центрифугировали (1600 g, 15 мин), супернатант удаляли и осадок суспензировали в 1.5 мл стерильной воды и переносили в предварительно взвешенные 1.5 мл пробирки Эппендорфа. Снова центрифугировали при тех же условиях, супернатант отбрасывали, а пробирки сушили при  $30^\circ\text{C}$  на Concentrator 5301 (“Eppendorf”, Германия) до постоянного веса. Для оценки высушенной биомассы пробирки взвешивали на весах CE224-C (“Сартогосм”, Россия) с последующим пересчетом на объем отобранного образца.

**Гравиметрическая оценка концентрации ЛП.** ЛП, синтезируемые бактериями *B. subtilis* 26Д, измеряли в ЛП-богатой фракции. Для этого 1.5 мл пластиковые пробирки взвешивали до внесения в них очищенной ЛП-фракции, растворенной в 80% этанола, и после ее высушивания при  $30^\circ\text{C}$  на Concentrator 5301 (“Eppendorf”, Германия) до постоянного веса. Пробирки взвешивали на весах CE224-C и вес пересчитывали на объем культуральной жидкости, из которого была получена ЛП-фракция.

**Тонкослойную хроматографию (ТСХ)** ЛП-фракции проводили на пластинах с силикагелем Sorbfil (Imid Ltd., Россия) [8]. В качестве подвижной фазы использовали элюент хлороформ:метанол:вода в соотношении 65 : 25 : 4 [9]. Пластины после элюирования проявляли тремя способами: 3%-ным раствором ванилина в этиловом спирте, подкисленным раствором серной кислоты, 0.1%-ным раствором нингидрина и парами йода.

**Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).** ЛП, выделенные из культурального фильтрата бактерий *B. subtilis*, анализировали на хроматографе Agilent 1260 (фирма Agilent Technologies Inc., США) с масс-спектрометрическим детектированием (масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением AmazonX, “Bruker Daltonik GmbH”, Германия). Перед проведением ВЭЖХ высушенную фракцию ЛП растворяли в 20%-ном метаноле. В качестве элюента ЛП в колонке ReproSil-Pur 120 C18-AQ (125 × 4 мм, 5  $\mu\text{m}$ ) (“Dr. Maisch Phases”, Германия) в использовали раствор метанол:вода (70 : 30, об./об.) со скоростью потока 0.5 мл/мин. Объем пробы 20 мкл. Регистрация масс-спектров проводилась в режиме положительных ионов в диапазоне  $m/z$  от 70 до 2700. Напряжение на капилляре распылителя составляло 3500 В. Для управления и сбора данных использовалось программное обеспечение TrapControl 7.0 (“Bruker Daltonik” GmbH, Германия).

**Выделение геномной ДНК из клеток штамма *B. subtilis* 26Д.** Часть бактериальной биомассы с

**Таблица 1.** Нуклеотидные последовательности подобранных праймеров к генам *B. subtilis*, кодирующим липо-пептид-синтетазы

| Название гена | NCBI     | Праймеры       | Последовательность, 5'-3'                           | Размер ампликона, п.н. | Ссылка |
|---------------|----------|----------------|-----------------------------------------------------|------------------------|--------|
| <i>Bssfp</i>  | EU882341 | SfpF<br>SfpR   | atgaagattttacggaattta<br>ttataaaagctcttcgtacg       | 675                    | [10]   |
| <i>BsituD</i> | D21876   | ituDF<br>ituDR | atgaaaattttacggagtatatat<br>ttataacagctcttcatacggtt | 674                    | [11]   |
| <i>BsfenD</i> | AJ011849 | FenDF<br>FenDR | tttggcagcaggagaagttt<br>gctgtccggttctgcttttttc      | 964                    | [10]   |
| <i>BsBac</i>  | NR102783 | BacF<br>BacR   | accagaaagccacggctaacc<br>ggcggaaaccccctaact         | 356                    | [12]   |

агаризованной среды переносили в пластиковые пробирки типа Eppendorf (“SSI”, США) и добавляли 250 мкл лизирующего буфера следующего состава (%): тритон X100 – 1.0, твин 20 – 1.0, смола Chelex 100 (“BioRad”, США) – 1.0, крезоловый красный – 0.005. Содержимое пробирок перемешивали, прогревали в твердотельном термостате Гном (ДНК-Технология, Россия) при температуре 95°C в течении 15 мин, после чего еще раз перемешивали и центрифугировали на препаративной центрифуге типа 5415R (“Eppendorf”, Германия) 3 мин при 12000 g. Для амплификации использовали 2 мкл супернатанта на одну реакцию. Подбор праймеров к ЛП-синтазам осуществлялся на основе литературных данных (табл. 1).

Амплификацию полноразмерных генов *sfp*, *ituD* и *fenD* из генома штамма бактерий *B. subtilis* 26Д проводили в амплификаторе типа ТП4-ПЦР-01-Терцик (“ДНК-Технологии”, Россия) с использованием соответствующих праймеров (табл. 1).

**Выделение тотальной РНК.** Из культуры *B. subtilis* 26Д через 1 и 3 сут роста бактерий была выделена тотальная РНК с использованием реагента “Trizol” согласно протоколу фирмы-поставщика (“Sigma”, Германия). Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли на спектрофотометре Smart

Spec Plus (“Bio-Rad”, США). Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием М-MuLV обратной транскриптазы (“Синтол”, Россия).

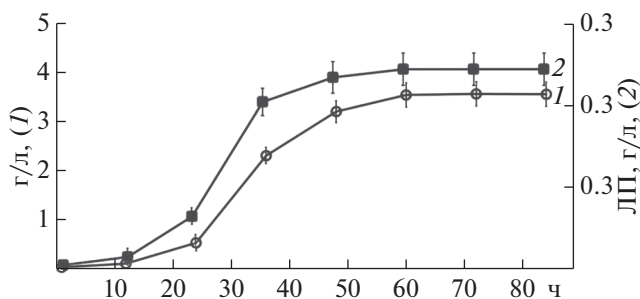
**Анализ экспрессии генов.** Анализ ЛП-синтаз проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе “iCycler CFX Connect Real-Time PCR Detection System” (“BioRad”, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I (“Синтол”, Россия). Изменения в экспрессии интересующего гена определяли на основании вычисления уровня нормализованной экспрессии генов с помощью программного обеспечения поставщика прибора (“BioRad”, США).

Аналитический гель-электрофорез ДНК проводили в 1%-ном агарозном геле. Маркер – Mass-Ruler DNA Loading Dye (“Thermo Scientific”, США).

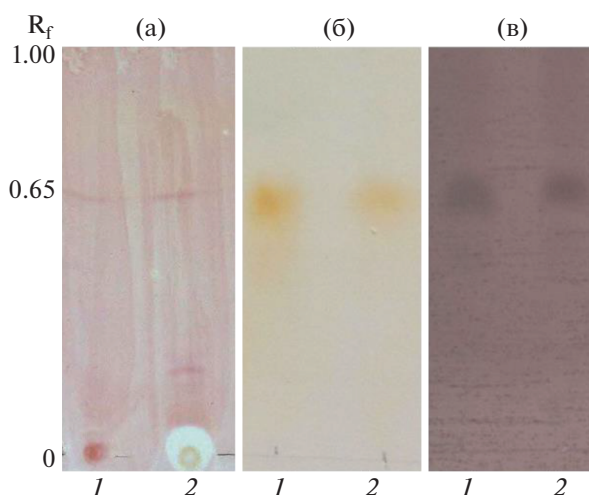
Все эксперименты проведены в 3 биологических и не менее 3 аналитических повторностях. При обработке результатов использовались программы Statistica 12.0 фирмы “Stat Soft”. На рисунках приведены средние значения биологических повторов и их стандартные отклонения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

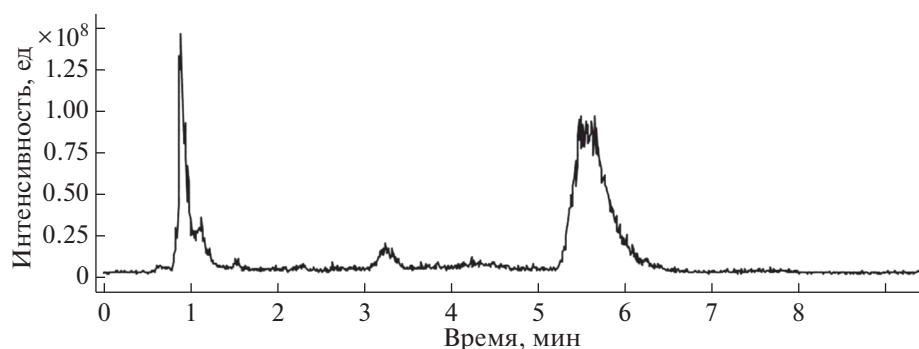
Результаты изучения динамики накопления сухой массы бактерий и ЛП в зависимости от времени культивирования представлены на рис. 1. Как видно, концентрация ЛП достигала максимума через 60 ч культивирования. ТСХ обогащенной ЛП фракции показала, что в культуральном фильтрате штамма *B. subtilis* 26Д присутствовал ЛП с подвижностью  $R_f$  0.65, окрашивающийся при проявлении раствором ванилина, нингидрином и параами йода (рис. 2). ЛП из культурального фильтрата бактерии штамма *B. subtilis* 26Д совпадал по подвижности с коммерческим сурфактином (“Sigma”, США) по значению  $R_f$ . Таким образом, использование ТСХ позволило обнаружить



**Рис. 1.** Динамика накопления сухой массы бактерий (г/л, (1)) и липопептидов (ЛП, г/л, (2)) в зависимости от времени культивирования.



**Рис. 2.** Результаты окрашивания пластинок растворами ванилина (а), ninгидрина (б) и парами йода (в) после ТСХ коммерческого сурфактина (1) и фракции метаболитов *B. subtilis* 26Д (2), богатой липопептидами.



**Рис. 3.** ВЭЖХ–хроматограмма на колонке ReproSil–Pur 120 C18–AQ липопептидной фракции, выделенной из культурального фильтрата *Bacillus subtilis* 26Д.

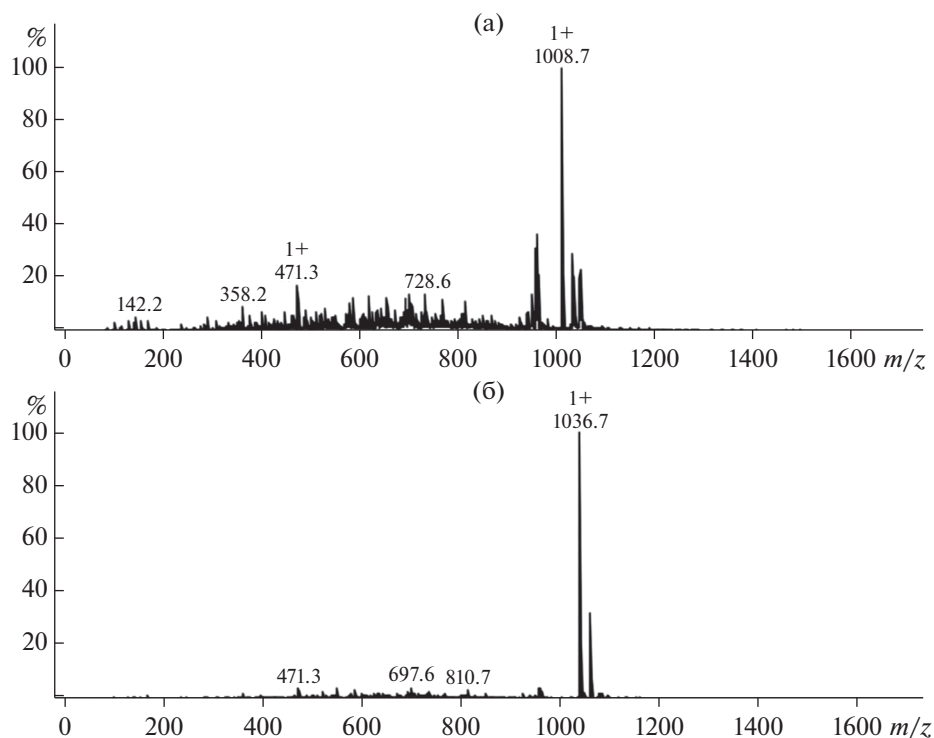
присутствие сурфактина в культуральном фильтрате штамма *B. subtilis* 26Д.

В обогащенной ЛП фракции *B. subtilis* 26Д при проведении ВЭЖХ (рис. 3) с последующим масс-спектрометрическим детектированием идентифицировано два сурфактина с ацильной цепью C13 (3.3 мин) с  $m/z$  1008.7 [M + H] и C15 с  $m/z$  1036.7 [M + H] (5.5 мин) (рис. 4). Наряду с идентифицированными сурфактинами с ацильной цепью C13 и C15, масс-спектрометрический анализ выявил соединения с  $m/z$  268.0, 358.2, 453.2, 471.3, 697.6, 794.2 и 810.7. Соединения с  $m/z$  453.2 и 471.3 близки по молекулярным массам к поликетидам, описанным в литературе [13].

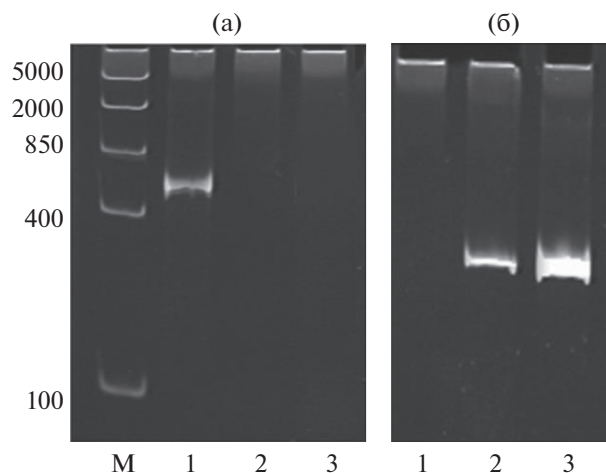
Для определения наличия или отсутствия генов, кодирующих ЛП-синтетазы применяется метод ПЦР с ДНК бактерий. Способность бактерий к синтезу ЛП можно оценить по экспрессии генов ЛП-синтетаз с использованием праймеров, нацеленных на консервативные участки [2, 10, 14]. В

результате ПЦР-анализа в геноме штамма *B. subtilis* 26Д обнаружен ген *Bssf*, кодирующий сурфактин-синтазу (рис. 5а). Праймеры *BsituD* и *BsfenD*, использованные для детекции генов, кодирующих итурин- и фенгицин-синтетазы, соответственно, не формировали транскриптов на базе кДНК штамма *B. subtilis* 26Д. Соответственно, проведенный анализ наличия генов ЛП-синтетаз обнаружил в геноме штамма *B. subtilis* 26Д ген сурфактин-синтазы, отвечающий за синтез сурфактина, и показал отсутствие генов итурин-синтазы и фенгицин-синтазы.

Для определения способности продуцировать сурфактин бактериями *B. subtilis* 26Д изучена экспрессия гена *Bssf* в культуральной среде штамма *B. subtilis* 26Д. Показано (рис. 5б), что на 1 и 3 сут роста бактерий в культуре активно накапливается мРНК *Bssf* *B. subtilis* 26Д. Таким образом, нами показано, что эндофитный штамм бактерии *B. sub-*



**Рис. 4.** Масс-спектр липопептидной фракции, продуцируемой *Bacillus subtilis* 26Д, отвечающий сурфактину С13 (а) и сурфактину С15 (б).



**Рис. 5.** Результаты ПЦР ДНК бактерий *B. subtilis* 26Д с праймерами к генам *BssfP* (1), *BsituD* (2) и *BsfenD* (3) (а) и транскрипционной активности гена *BssfP* (б) через 0 (1), 1 (2) и 3 (3) сут роста бактерий *B. subtilis* 26Д в культуре.

*tilis* 26Д эффективно экспрессирует ген сурфактин-синтетазы в культуре.

В современной литературе встречается много работ, посвященных продукции ЛП различными видами бактерий, в особенности различными штаммами *Bacillus* spp. Для выявления способности бактерий к синтезу ЛП часто идентифицируют

у них гены НРПС [2, 3, 10]. Среди генов, кодирующих НРПС, наиболее изучены семейства синтетаз сурфактина, фенгицина и итурина. Так, у штамма *Bacillus tequilensis* обнаружены гены, ответственные за синтез сурфактина, фенгицина, бациллибацина и бацилина [15]. В геноме штамма *B. velezensis* обнаружены нуклеотидные последовательности, коди-

рующие ЛП: фенгицин-б, итурин, сурфактин-а, бутирозин, плантазолин, киянимицин и др. [16]. В геноме штамма *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* из здоровых тканей винограда *Vitis vinifera* определены гены, кодирующие белки, ответственные за синтез бациллаена, диацидина, микролактина, сурфактина и фенгицина [17]. Проведенный анализ нуклеотидных последовательностей ЛП-синтез штамма *B. subtilis* 26Д показал наличие только гена сурфактин-синтетазы *Bssfp*, отвечающего за синтез сурфактина, но не фенгицина и итурина. Также нами была впервые в клетках *B. subtilis* 26Д показана экспрессия этого гена.

Известно, что бактерии *Bacillus* spp. могут одновременно вырабатывать различные ЛП и их структурные аналоги (изоформы). Семейство сурфактина включает в себе молекулы различной структуры, но все они — гептапептиды, связанные с  $\beta$ -гидроксикислотой, образуют циклическую структуру лактонного кольца [18]. Так, среди метаболитов бактерий *Bacillus clausii* DTM1 обнаруживается до 12 сурфактиновых аналогов, различающихся характером пептидных остатков и/или длиной и разветвлением цепи жирных кислот [19]. Методом ТСХ в культуральном фильтрате штамма *B. subtilis* 26Д обнаружен ЛП с  $R_f$  0.65, совпадающий по подвижности с коммерческим сурфактином. Ранее Ключе с соавт. [9] описали наличие сурфактина с  $R_f$  0.65 у штамма *B. subtilis* ATCC 21332, а Джой с соавт. [20] — с  $R_f$  0.72 и 0.55. у бактерий штамма *Bacillus licheniformis* SB2.

С использованием ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием позволило идентифицировать в ЛП-богатой фракции метаболитов *B. subtilis* 26Д две разновидности сурфактина — с длинами жирнокислотных цепей C13 и C15. Подобные изомеры сурфактина из культурального фильтрата штамма *B. licheniformis* HSN221 ранее были выделены и описаны [21]. Фари с соавт. [22] получили масс-спектры ЛП штамма *Bacillus subtilis* LSFМ-05 с  $m/z$  1022, 1036, 1044 и 1058 с длинами жирнокислотных цепей C13 и C14. Чен с соавт. [16] сообщили о присутствии у *B. licheniformis* MB01 изоформ сурфактина C12, C13, C14 и C15. Сходные с полученными в настоящей работе результатами были опубликованы в Фульпото с соавт. [23], где штамм *B. subtilis* 41651 A1 синтезировал изоформы сурфактина с жирнокислотными цепями C13 и C15.

Бактериальные ЛП имеют широкое практическое применение, которое связано в первую очередь с их биологической и избирательной биоцидной активностями, определяющими специфическими различиями в их действии в зависимости от их природы [24, 25]. Кроме того, интерес у исследователей вызывает синергический защитный эффект ЛП [26, 27]. Обнаружено, что совместно

сурфактин и фенгицин из *B. subtilis* GM5 подавляли развитие гриба *Fusarium oxysporum* [2]. Есть сведения об усилении антифунгальной активности при совместном воздействии фенгицина и микосубтилина [28].

Сурфактины, продуцируемые бактериями рода *Bacillus*, известны не только своей биосурфактантной активностью, а также проявлением гемолитических, противовирусных [29–31] антибактериальных и инсектицидных [19, 25, 32, 33] свойств.

В настоящее время наиболее актуальны исследования, связанные с созданием микроорганизмов с измененным для определенных целей геномом. Штамм, синтезирующий единственный вид ЛП с известным числом конкретных изомеров может быть удобен для создания генно-инженерных конструкций, регуляции синтеза данного ЛП и изменения некоторых его свойств. Так, у некоторых модифицированных сурфактинов наблюдалась пониженная гемолитическая активность, следовательно, они имели более низкую токсичность по отношению к эритроцитам, но при этом не теряли антибактериальную активность [34].

Проведенные исследования показали, что *B. subtilis* 26Д является источником двух изоформ сурфактина и может быть использован для создания генно-инженерных конструкций на основе данного штамма. Разработка методов очистки вторичных метаболитов из культурального фильтрата *B. subtilis* 26Д в дальнейшем может способствовать созданию технологий выделения сурфактинов, которые могут быть востребованы в различных отраслях промышленности — от фармацевтики до производства поверхностно активных сурфактантов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ офи\_м 17-29-08014, по темам государственного задания АААА-А21-121011990120-7 и № АААА-А16-116020350033-8, с использованием оборудования ЦКП “Агидель” и уникальной научной установки “КОДИНК”. Идентификация ЛП проведена в ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pusenkova L.I., Ilyasova E.Yu., Lastochkina O.V., Maksimov I.V., Leonova S.A. // Eurasian Soil Science. 2016. V. 49. № 10. P. 1136–1144. <https://doi.org/10.1134/S1064229316100112>
2. Mardanov A.M., Hadieva G.F., Lutfullin M.T., Khilyas I.V., Minnullina L.F., Gilyazeva A.G., Bogomolnaya L.M., Sharipova M.R. // Agricultural Sci. 2017. V. 8. № 1. P. 1–20. <https://doi.org/10.4236/as.2017.81001>
3. Roongsawang N., Washio K., Morikawa M. // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. P. 141–172. <https://doi.org/10.3390/ijms12010141>



4. *Paraszkiewicz K., Bernat P., Kuśmierska A., Chojniak J., Płaza G.* // J. Environ. Manage. 2018. V. 209. Art. 65. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.033>
5. *Нафикова А.Р., Сурина О.Б., Хайруллин Р.М., Максимов И.В.* // Агрохимия. 2018. № 5. С. 39–44. (rus). <https://doi.org/10.7868/S000218811805006X>
6. *Черепанова Е.А., Благова Д.К., Бурханова Г.Ф., Сарварова Е.С., Максимов И.В.* // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 3. С. 339–346. <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-339-346>
7. *Vater J., Kablitz B., Wilde C., Franke P., Mehta N., Cameotra S.S.* // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 12. P. 6210–6219. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6210-6219.2002>
8. *Alajlani M., Shiekh A., Hasnain S., Brantner A.* // Chromatographia. 2016. V. 79. № 21. P. 1527–1532. <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3164-3>
9. *Kluge B., Vater J., Salnikow J., Eckart K.* // FEBS Lett. 1988. V. 231. P. 107–110. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80712-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80712-9)
10. *Gond S.K., Bergen M.S., Torres M.S., White J.F.Jr.* // Microbiol. Res. 2015. V. 172. № 1. P. 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.11.004>
11. *Zhao X., Zhou Zh., Han Y., Wang Zh., Fan J., Xiao H.* // Microbiol. Res. 2013. V. 168. № 9. P. 598–606. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.03.001>
12. *Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M. et al.* // Nature. 1997. V. 390. № 6657. P. 249–256. <https://doi.org/10.1038/36786>
13. *Wang T., Liang Y., Wu M., Chen Z., Lin J., Yang L.* // Chin. J. Chem. Eng., 2015. V. 23. P. 744–754. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2014.05.020>
14. *Afsharmanesh H., Perez-Garcia A., Zerrouh H., Ahmaddadeh M., Romero D.* // Food Control. 2018. V. 94. № 1. P. 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.002>
15. *Xu W.F., Ren H.S., Ou T., Lei T., Wei J.H., Huang C.S., Li T., Strobel G., Zhou Z.Y., Xie J.* // Microb. Ecol. 2019. V. 77. P. 651–663. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1247-4>
16. *Chen L., Heng J., Qin S., Bian K.* // PLoS One. 2018. V. 13. № 6. Art. e0198560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198560>
17. *Pinto C., Sousa S., Froufe H., Egas C., Clément C., Fontaine F., Gomes A.C.* // Stand. Genomic Sci. 2018. V. 13. Art. 30. <https://doi.org/10.1186/s40793-018-0327-x>
18. *Peypoux F., Bonmatin J.M., Wallach J.* Recent trends in the biochemistry of surfactin. Appl Microbiol Biotechnol. 1999. V. 51. № 5. P. 553–563. <https://doi.org/10.1007/s002530051432>
19. *Guo D.L., Wan B., Xiao S.J., Allen S., Gu Y.C., Ding L.S., Zhou Y.* // Natural Product Com. 2015. V. 10. № 12. P. 2151–2153. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501001235>
20. *Joy S., Rahman P.K., Sharma S.* // Chem Eng J. 2017. V. 317. P. 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.054>
21. *Lee D.W., Kim B.S.* // Plant Pathol J. 2015. V. 31. № 1. P. 1–11. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.08.2014.0074>
22. *Faria A.F., Teodoro-Martinez D.S., de Oliveira Barbosa G.N., Vaz B.G., Silva Í.S., Garcia J.S., Tótola M.R., Eberlin M.N., Grossman M., Alves O.L.* // Process Biochem. 2011. V. 46. P. 1951–1957. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2011.07.001>
23. *Phulpoto I.A., Yu Z., Hu B., Wang Y., Ndayisenga F., Li J., Liang H., Qazi M.A.* // Microb. Cell. Fact. 2020. V. 19. № 1. Art. 145. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01402-4>
24. *Grady E.N., MacDonald J., Ho M.T., Weselowski B., McDowell T., Solomon O., Renaud J., Yuan Z.C.* // BMC Microbiol. 2019. V. 19. № 1. Art. 5. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1380-8>
25. *Maksimov I.V., Blagova D.K., Veselova S.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A., Sarvarova E.R., Rumyantsev S.D., Alekseev V.Yu., Khayrullin R.M.* // Biological Control. 2020. V. 144. Art. 104242. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104242>
26. *Falardeau J., Wise C., Novitsky L., Avis T.J.* // J. Chem. Ecol. 2013. V. 39. P. 869–878. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>
27. *Khong N.G., Randoux B., Tayeh Ch., Coutte F., Bourdon N., Tisserant B., Laruelle F., Jacques P., Reignault P.* // Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 2012. V. 77. № 3. P. 39–51.
28. *Mihalache G., Balaes T., Gostin I., Stefan M., Coutte F., Krier F.* // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2018. V. 25. P. 29784–29793. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9162-7>
29. *Yuan L., Zhang S., Wang Y., Li Y., Wang X., Yang Q.* // J. Virol. 2018. V. 92. № 21. Art. e00809-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00809-18>
30. *Johnson B.A., Hage A., Kalveram B., Mears M., Planete J.A., Rodriguez S.E., Ding Z., Luo X., Bente D., Bradrick S.S., Freiberg A.N., Popov V., Rajsbaum R., Rossi S., Russell W.K., Menachery V.D.* // J. Virol. 2019. V. 93. № 22. Art. e01282-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01282-19>
31. *Ibrahim A., Odon V., Kormelink R.* // Front Plant Sci. 2019. V. 10. Art. 803. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00803>
32. *Rodríguez M., Marín A., Torres M., Béjar V., Campos M., Sampedro I.* // Front Microbiol. 2018. V. 9. Art. 3114. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03114>
33. *Sorokan A., Benkovskaya G., Blagova D., Maksimov I.* // AIP Conference Proceedings. 2063, 2019. Art. 020001. <https://doi.org/10.1063/1.5087308>
34. *Théâtre A., Cano-Prieto C., Bartolini M., Laurin Y., Deleu M., Niehren J., Fida T., Gerbinet S., Alanjary M., Medema M.H., Léonard A., Lins L., Arabolaza A., Gratajo H., Gross H., Jacques P.* // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. Art. 623701. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.623701>

**Isolation and Identification of Lipopeptides of *Bacillus subtilis* 26D****E. A. Cherepanova<sup>a</sup>, I. V. Galyautdinov<sup>a</sup>, G. F. Burkhanova<sup>a</sup>, and I. V. Maksimov<sup>a, \*</sup>**<sup>a</sup>*Institute of Biochemistry and genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*<sup>\*</sup>*e-mail: igor.mak2011@yandex.ru*

Among the wide range of biologically active substances secreted by endophytic bacteria, lipopeptides are of considerable interest. The presence of lipopeptide synthetase genes responsible for their synthesis in bacteria of the endophytic strain *Bacillus subtilis* 26D was analyzed. A lipopeptide-rich fraction was isolated from the culture medium of *B. subtilis* 26D. Analysis of the lipopeptide composition by thin-layer chromatography (TLC) revealed the presence of surfactin in the *B. subtilis* 26D strain, which is confirmed by the presence of the surfactin-synthetase gene in the genome of this bacterial strain. High-performance chromatography (HPLC) with mass spectrometric analysis showed the presence of two varieties of surfactin (C13 and C15).

**Keywords:** *Bacillus subtilis* 26D, lipopeptides, surfactin

УДК 579.222.2:579.222.4:579.258

## НОВЫЕ АССОЦИАЦИИ АЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ, АКТИВНО РАЗЛАГАЮЩИЕ ЛИНДАН

© 2021 г. Э. А. Назарова<sup>1</sup>, Д. О. Егорова<sup>1</sup> \*, Л. Н. Ананьина<sup>1</sup>,  
Е. С. Корсакова<sup>1</sup>, Е. Г. Плотникова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал  
Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук,  
Пермь, 614081 Россия

\*e-mail: daryao@rambler.ru

Поступила в редакцию 25.03.2021 г.

После доработки 14.04.2021 г.

Принята к публикации 23.04.2021 г.

В результате селекции получены ассоциации аэробных бактерий, способные осуществлять разложение хлорорганического пестицида — линдана, в концентрации 0.1 г/л в минеральной среде за 30–180 сут. Установлено, что деградирующие линдан ассоциации L2-6, L3-6, L4-6, L6-6 и L4-10 характеризовались низким уровнем видового разнообразия (индекс Шеннона в пределах 1.88–2.46). В составе ассоциаций выявлены представители классов  $\gamma$ -*Proteobacteria* (рода *Pseudomonas*) и  $\alpha$ -*Proteobacteria* (родов *Novosphingobium*, *Sphingauranticus*, *Sphingomonas*, *Tardibacter*). Показано, что в тотальных ДНК, выделенных из бактериальных ассоциаций шестого пассажа (L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6), присутствовали гены, обладающие 98–100% уровнем сходства с *linABCX*-генами, кодирующими ферменты “верхнего” пути аэробной трансформации линдана. Бактериальная ассоциация L4-10 эффективно разлагала линдан в минеральной среде (100%-ная деструкция 0.1 и 0.3 г/л линдана за 30 и 90 сут соответственно) и в модельных почвенных системах (78.1–90%-ная деструкция 0.5 г/кг линдана за 45 сут). Применение молекулярно-генетических и аналитических методов позволило предположить, что ассоциация L4-10 осуществляла разложение не только линдана, но и образующихся в процессе его метаболизма побочных хлорорганических соединений (1,3,4-трихлорбензол, 2,5-дихлорфенол). Таким образом, полученные в настоящем исследовании бактериальные ассоциации представляют интерес для разработки технологий биоремедиации территорий, загрязненных линданом.

**Ключевые слова:** бактериальные ассоциации, линдан, деструкция, *lin*-гены

**DOI:** 10.31857/S0555109921050111

Хлорорганические пестициды широко использовались в сельском хозяйстве по всему миру на протяжении нескольких десятилетий. Для удовлетворения потребностей сельхозпроизводителей хлорорганические пестициды (ХОП), такие как гексахлоран, альдрин, дихлордифенилтрихлорметилметан, линдан/гексахлорциклогексан (ГХЦГ) и некоторые другие, выпускались в промышленных масштабах. Однако к концу 20 века было установлено, что ХОП оказывают негативное воздействие на все компоненты природы, вследствие их высокой токсичности, устойчивости к физико-химическому и биологическому воздействию и способности накапливаться в пищевых цепях. В 2001 г. мировым сообществом принята Стокгольмская конвенция, согласно которой девять ХОП отнесены к группе стойких органических загрязнителей (СОЗ), запрещены к производству и применению, и подлежат уничтожению. В 2009 г.

список СОЗ по хлорорганическим пестицидам был расширен, в него вошли все изомеры гексахлорциклогексана [1].

Линдан —  $\gamma$ -изомер гексахлорциклогексана (ГХЦГ), применялся как пестицид широкого спектра действия. При его промышленном синтезе получали “технический ГХЦГ”, состоящий из  $\alpha$ -ГХЦГ (55–80% в смеси),  $\beta$ -ГХЦГ (5–14% в смеси),  $\gamma$ -ГХЦГ (8–15% в смеси) и  $\delta$ -ГХЦГ (2–16% в смеси) [2]. Для обработки сельскохозяйственных территорий по всему миру было использовано более 400 тыс. т изомеров ГХЦГ, в том числе —  $\gamma$ -ГХЦГ/линдан [1]. Особые физико-химические свойства изомеров ГХЦГ привели к широкому распространению данных соединений в природе. Однако наиболее загрязненными участками остаются места их производства, системного применения и захоронения. Одним из мест, на территории которого на ряду с другими

соединениями группы СОЗ зафиксировано наличие ГХЦГ является г. Чапаевск (ОАО “СВЗХ”, Россия) [3–5].

Одним из наиболее перспективных методов разложения ГХЦГ является бактериальная деструкция. Выделены и описаны бактериальные сообщества и индивидуальные штаммы, осуществляющие трансформацию изомеров ГХЦГ, в том числе линдана [6–12]. Большинство известных штаммов-деструкторов линдана являются представителями родов *Sphingobium* и *Sphingomonas*. Необходимо отметить, что процесс биоразложения протекает медленно, что обусловлено низкой водорастворимостью, высокой сорбционной активностью, липофильностью и токсичностью  $\gamma$ -ГХЦГ для живых организмов. У всех исследованных аэробных бактерий биохимический путь разложения линдана начинается с реакции гидродеchlorирования и условно разделен на “верхний” и “нижний” (рис. 1). “Верхний” путь включает в себя трансформацию линдана до образования 2,5-дихлоргидрохинона под действием ферментов, кодируемых генами *linABCX*, “нижний” путь – разложение 2,5-дихлоргидрохинона до сукцинил-КоА и ацетил-КоА под действием ферментов, кодируемых генами *linDEFGHJ* [7, 9, 10, 13]. Катаболические гены деградации ГХЦГ практически идентичны у представителей различных родов бактерий, включая грамположительные группы. Рядом исследователей выдвинуто предположение о возможности горизонтального переноса *lin*-генов у бактерий [9, 14]. Несмотря на высокое сходство генов и ферментов деструкции линдана, скорость и эффективность трансформации данного соединения у известных штаммов существенно варьирует. Период деструкции, за который осуществляется разложение более 50% линдана от начальной концентрации (20–100 мг/л), составляет от 5 до 66 сут [15–26].

Известно, что длительное присутствие загрязнителя в почве приводит к изменениям в составе и численности микробиоценоза. Доминирующую позицию занимают бактериальные штаммы, устойчивые к токсическому действию загрязнителя и способные использовать данное соединение как источник углерода и энергии [8, 12, 21, 27]. В связи с этим представляет интерес изучение микробных ассоциаций почв с территорий, длительное время загрязненных линданом и другими изомерами ГХЦГ. В настоящем исследовании почвы были отобраны с территории ОАО “СВЗХ” г. Чапаевска (Россия). На предприятии более 50 лет производили техническую смесь ГХЦГ [5].

Цель работы – получение и изучение структуры новых аэробных бактериальных ассоциаций, осуществляющих разложение линдана, анализ ключевых генов деструкции линдана, представленных в данных ассоциациях, оценка биореме-

диационного потенциала наиболее активной ассоциации в модельных почвенных условиях.

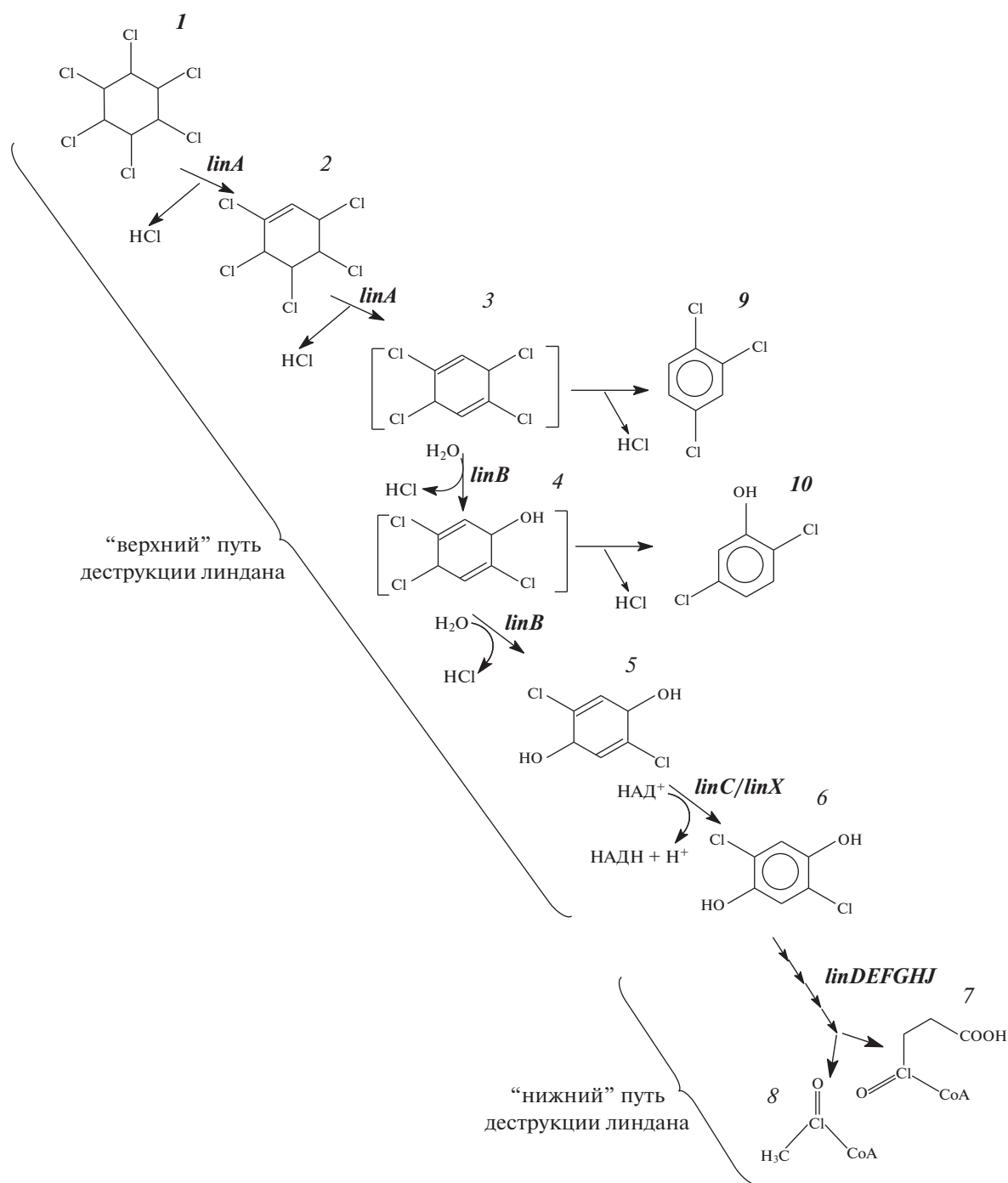
## МЕТОДИКА

Образцы почв были отобраны на шести участках на территории ОАО “Средне-Волжский завод химикатов” (г. Чапаевск, Россия). Отбор осуществляли согласно ГОСТ 17.4.3.01–82 [28]. Для накопительного культивирования использовали усредненную пробу почвы.

**Среды культивирования.** Состав сред, используемых для выращивания бактериальных ассоциаций. Минеральная среда Раймонда (г/л):  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 0.1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0.2;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0.02;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0.02;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  – 1.0;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  – 1.5;  $\text{NaCl}$  – 0.8. pH 7.4 [29]. Минеральная среда К1 (г/л):  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 4.17;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.4;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0.5;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0.01;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.15;  $\text{FeSO}_4$  – 0.018;  $\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  – 0.032; pH 7.3 [30]. Среда Луриа–Бертани (г/л): триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5;  $\text{NaCl}$  – 10; агар – 15 [31].

**Схема селекции ассоциаций, разлагающих линдан.** Селекцию осуществляли методом накопительного культивирования с последовательными пересевами (пассажами). 1 пассаж: образец почвы (1 г) помещали в колбу Эрленмейера объемом 250 мл, содержащую 50 мл минеральной среды Раймонда с 0.8 г/л  $\text{NaCl}$  [29] и 0.3 г/л линдана. Культивирование осуществляли на термостатируемой качалке Environmental Shaker-Incubator ES-20/60 (“BioSan”, Латвия) при 120 об./мин и 28°C в течение 30 сут. Последующие пассажи (2–16): содержимое колбы предыдущего пассажа отделяли от минеральной среды центрифугированием (центрифуга 3К30 “Sartorius”, Германия, 10 мин, 10174 g). Осадок ресуспендировали в 50 мл среды Раймонда и переносили в колбу Эрленмейера объемом 250 мл, содержащую 0.3 г/л линдана. Культивирование проводили как для 1 пассажа.

**Выделение бактериальных ассоциаций.** 10 мл бактериальной суспензии, полученной при накопительном культивировании на этапе 3, 6, 8, 10 и 16 пассажей, отделяли от почвенных частиц фильтрованием через бумажный фильтр (красная лента, “Sartorius”, Германия). Полученную бактериальную суспензию помещали в колбу Эрленмейера объемом 250 мл, содержащую 100 мл минеральной среды К1 [30] и 0.3 г/л линдана, культивировали на термостатируемой качалке Environmental Shaker-Incubator ES-20/60 (“BioSan”, Латвия) со скоростью 120 об./мин и 28°C с последовательными пересевами на среду К1 с линданом в концентрации 0.3 г/л через каждые 7 дней. Бактериальное сообщество считали стабильным, если при 5 последовательных пересевах морфологический состав и соотношение колоний (одинаковых мор-



**Рис. 1.** Аэробный путь бактериального разложения линдана ( $\gamma$ -ГХЦГ) [7, 9, 10, 13]: **1** –  $\gamma$ -ГХЦГ/линдан, **2** –  $\gamma$ -пентахлорциклогексен, **3** – 1,3,4,6-тетрахлоро-1,4-циклогексадиен, **4** – 2,4,5-трихлоро-2,5-циклогексадиен-1-ол, **5** – 2,5-дихлоро-2,5-циклодиен-1,4-диол, **6** – 2,5-дихлоргидрохинон, **7** – сукцинил-КоА, **8** – ацетил-КоА, **9** – 1,2,4-трихлорбензол, **10** – 2,5-дихлорфенол. Жирным шрифтом показаны соединения и гены, детектированные в настоящем исследовании.

фототипов) не изменялись. Контроль морфологии колоний осуществляли при высеве бактериальных ассоциаций на агаризованную среду Луриа-Бертани (LB) [31] с применением классического метода серийных разведений. При этом также проводили подсчет количества колониеобразующих единиц.

**Выделение тотальной ДНК.** Тотальную ДНК бактериальных ассоциаций выделяли общепринятым методом [32]. 2 мл бактериальной культуры осаждали на центрифуге miniSpin ("Eppendorf", Германия) при 11200 g 10 мин. Осадок ресуспендировали в 80 мкл 0.05M NaOH. Лизис проводили путем последовательной четырехкрат-

**Таблица 1.** Кинетические параметры деструкции линдана (0.1 г/л) ассоциациями

| Накопительная культура/Ассоциация* | 90–100%-ная деструкция линдана, сут | Зависимость концентрации линдана от времени деструкции** | $R^{2***}$ | μ, мг/(л × сут) |
|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------|-----------------|
| L2/L2-3                            | 150                                 | $y = -0.6818x + 104.05$                                  | 0.994      | $0.6 \pm 0.2$   |
| L2/L2-6                            | 90                                  | $y = -1.1762x + 103.93$                                  | 0.982      | $1.1 \pm 0.1$   |
| L2/L2-8                            | 120                                 | $y = -0.8089x + 95.644$                                  | 0.996      | $0.8 \pm 0.2$   |
| L3/L3-3                            | 180                                 | $y = -0.567x + 108.26$                                   | 0.979      | $0.5 \pm 0.1$   |
| L3/L3-6                            | 180                                 | $y = -0.6238x + 107.53$                                  | 0.985      | $0.6 \pm 0.1$   |
| L4/L4-3                            | 150                                 | $y = -0.6376x + 96.273$                                  | 0.988      | $0.6 \pm 0.1$   |
| L4/L4-6                            | 90                                  | $y = -1.1738x + 94.964$                                  | 0.966      | $1.2 \pm 0.2$   |
| L4/L4-8                            | 45                                  | $y = -2.2333x + 98.5$                                    | 0.998      | $2.3 \pm 0.3$   |
| L4/L4-10                           | 30                                  | $y = -3.333x + 97.0$                                     | 0.989      | $3.3 \pm 0.1$   |
| L4/L4-10****                       | 90                                  | $y = -3.3333x + 281.43$                                  | 0.974      | $3.2 \pm 0.1$   |
| L4/L4-16                           | 50                                  | $y = -1.667x + 97.0$                                     | 0.989      | $1.7 \pm 0.2$   |
| L6/L6-3                            | 180                                 | $y = -0.5553x + 98.516$                                  | 0.991      | $0.6 \pm 0.1$   |
| L6/L6-6                            | 180                                 | $y = -0.5641x + 102.69$                                  | 0.993      | $0.5 \pm 0.1$   |

\* Вторая цифра в обозначении ассоциации соответствует пассажу в селекцию; \*\*  $y$  – концентрация линдана,  $x$  – время деструкции; \*\*\* коэффициент достоверности аппроксимации; \*\*\*\* концентрация линдана 0.3 г/л.

ной экспозиции с чередованием 15 мин при температуре 95°C и 15 мин при –20°C.

**Анализ методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ).** Для амплификации фрагмента гена 16S рРНК, составляющего 566 п.н. по нумерации *E. coli*, применяли праймеры: 27F, включающий 40 п.н. GC-хвост на 5'-конце, и 518R (табл. 1) [33]. Амплификацию проводили в 50 мкл смеси, содержащей 0.25 мМ дНТФ, 0.3 мМ праймера (каждого), 1.5 мМ  $MgCl_2$ , 1× *Green* буфер для *Dream Taq*-полимеразы (“Thermo Fisher Scientific”, США), 2 ед. акт. *Dream Taq*-полимеразы (“Thermo Fisher Scientific”, США) и 2 мкл ДНК-матрицы в термоциклере My Cycler (“Bio-Rad”, США). Далее проводили электрофорез в 1.5%-ном агарозном геле в 0.5× TBE-буфере при напряжении электрического поля 5.0 В/см в течение 40 мин для подтверждения присутствия продуктов специфической амплификации. ДНК была визуализирована после окрашивания бромистым этидием (0.5 мкг/мл) в проходящем УФ-свете и документирована системой Gel Doc XR (“Bio-Rad”, США).

Для образцов, в которых был получен искомый фрагмент гена 16S рРНК, проводили денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ) в 6%-ном (вес./об.) полиакриламидном геле с линейным денатурирующим химическим градиентом от 30 до 60%, где 100% составляла 7 М мочевины и 40% формамид. Разделение проводили в течение 16 ч при 45 В и 60°C на приборе Dcode™

Universal Mutation System (“Bio-Rad”, США). Гели окрашивали 15 мин в растворе бромистого этидия (0.5 мкг/мл), далее промывали в деионизированной воде в течение 10 мин, визуализировали в проходящем УФ-свете и документировали системой Gel Doc XR (“Bio-Rad”, США).

Анализ ДГГЭ-профилей осуществляли путем детекции полос в геле, используя алгоритм поиска полос пакета программ Quantity One версия 4.6 (“Bio-Rad”, США). Для расчета степеней сходства ДГГЭ-профилей использовали коэффициент Дайса, построение дендрограммы осуществляли с помощью метода UPGMA из пакета программ Quantity One версия 4.6 (“Bio-Rad”, США). Полученные ДГГЭ-профили были проанализированы с помощью индекса Шеннона-Уивера. При этом предполагалось, что одна полоса в геле (операциональная таксономическая единица, ОТЕ) соответствует одному виду, а интенсивность свечения отражает ее численность. При операциях учитывали положение полосы в геле. В анализ включали полосы, имеющие выше 0.2% от суммарной интенсивности полос дорожки.

Для подготовки к секвенированию фрагменты ДНК были элюированы из геля и использованы в качестве матрицы для амплификации с праймерами 27F и 518R. Описание условий секвенирования и анализа нуклеотидных последовательностей приведены ниже.

**Анализ методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).** Для харак-

теристика бактериальной ассоциации L4-10 был использован метод ПЦР-РВ. При амплификации бактериальных генов 16S рРНК с матрицы тотальной ДНК были использованы праймеры Eub338 и Eub518 [34]. ПЦР-РВ проводили в присутствии красителя Sybr Green I в наборе реактивов 2X Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix ("Thermo Scientific", США) на приборе "CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection Systems" ("Bio-Rad Laboratories", США), согласно методике [35]. Для стандартной калибровочной кривой были использованы образцы очищенной геномной ДНК штаммов *Rhodococcus* sp. KT112-7 и KT723 из коллекции Лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии "ИЭГМ УРО РАН".

**Амплификация функциональных генов деструкции линдана.** Функциональные гены деструкции  $\gamma$ -ГХЦГ (*linA*, *linB*, *linC*, *linX*) определяли в тотальной ДНК бактериальных ассоциаций с использованием праймеров [36, 37]. Для подбора последовательностей олигонуклеотидов к консервативным участкам гена *linA* были использованы программы Primer3Plus (<http://primer3plus.com/>) и FastPCR (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>). Амплификацию проводили в конечном объеме 12.5 мкл в десятикратном буфере с добавлением 0.75 мкл 1 М раствора  $MgCl_2$ , бактериальных прямого и обратного праймеров по 0.5 мкл 1 М раствора, 1.25 мкл 2.5 мМ раствора нуклеотидов, 0.3 мкл Taq полимеразы ("Синтол", Россия) и 1 мкл ДНК-матрицы. Температурный профиль амплификации: 95°C – 3 мин, следующие 30 циклов – 95°C – 30 с, 55°C – 1 мин, 72°C – 1 мин [38]. Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в агарозном геле (концентрация агарозы 0.8%) в 1× Трис-боратном буфере ("Thermo scientific", Литва) при напряжении 10 В/см и визуализировали в проходящем УФ-свете с использованием системы GelDoc XRtm ("Bio-Rad Laboratories", США) после окрашивания в растворе бромистого этидия.

**Секвенирование и анализ *lin*-генов и фрагментов генов 16S рРНК.** Определение нуклеотидных последовательностей генов осуществляли с помощью набора реактивов "DYEamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit" на автоматическом секвенаторе "Genetic Analyser 3500XL" ("Applied Biosystems", США) согласно рекомендациям производителя. Поиск гомологичных последовательностей производили по базам данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net>). Для визуализации сходства путем построения эволюционного дерева использовали алгоритм UPGMA (MEGA 10.0). Нуклеотидные последовательности фрагментов *lin*-генов и генов 16S рРНК, полученные в настоящем исследовании, депонированы в международной базе данных GenBank. Номера, присвоенные данным

последовательностям, представлены в разделе "Результаты и обсуждение".

**Деструкция линдана.** Деструкцию линдана изучали при периодическом культивировании и в опытах с отмытыми клетками. Периодическое культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера на 100 мл, содержащих 30 мл среды K1, 0.1 или 0.3 г/л линдана и бактериальную ассоциацию в конечной концентрации  $1.51 \pm 0.02 \times 10^4$  КОЕ/мл. Анализ содержания линдана в среде проводили каждые 15 сут. Линдан экстрагировали хлороформом из всего объема среды в колбе.

В опытах с отмытыми клетками бактериальную культуру с оптической плотностью  $OP_{600} = 1.0$  помещали во флаконы (5 мл) с тефлоновыми крышками и вносили ацетоновый раствор линдана до конечной концентрации 0.3 г/л. Анализ содержания метаболитов осуществляли на 4, 8, 18 и 30 сут культивирования. Культивирование в обоих случаях осуществляли на термостатируемой качалке Environmental Shaker-Incubator ES-20/60 ("BioSan", Латвия) при 120 об./мин и 28°C. Эксперименты проводили в трехкратной повторности для каждого временного отрезка.

**ГХ-МС-анализ линдана и 2,5-дихлорфенола.** Хлороформный экстракт культуральной жидкости предварительно обезвоживали добавлением сульфата натрия и анализировали на газовом хроматографе ("Agilent 6890/5973N", США) с масс-селективным детектором и кварцевой колонкой "RESTEK RTx-5MS" ("Restek", США). В качестве газа-носителя использовали гелий, скорость потока 1 мл/мин. Объем впрыска 1.0 мкл. Режим анализа линдана: температура испарителя 260°C, программирование подъема температуры от 130°C, далее 3-минутная экспозиция с последующим нагревом до 280°C со скоростью 10°C/мин. Общее время анализа 18 мин. Режим анализа 2,5-дихлорфенола: температура испарителя 220°C, начальная температура колонки 60°C (2-минутная экспозиция) с последующим нагреванием при 20°C/мин до 300°C. Общее время анализа 14 мин. Анализ хроматограмм проводили с помощью программы MSD Productivity ChemStation ("Agilent", США). Концентрацию анализируемых веществ рассчитывали по площадям пиков в сравнении с площадью пиков контрольного образца.

**Анализ метаболитов деструкции линдана.** Метаболиты линдана анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на приборе "LC-20A Prominence" ("Shimadzu", Япония) с УФ-детектором (при 205 нм) и колонкой C18 ("Supelco", США) в системе ацетонитрил – 0.1%-ный  $H_3PO_4$  (70 : 30). Стандартами для сравнения являлись 1,2,4-трихлорбензол, 2,5-дихлорфенол, 2,5-дихлоргидрохинон, катехол ("Sigma-Aldrich", США), растворенные в ацетонитриле, а также минеральная среда культивирования, со-



державшая культуру микроорганизма, но без субстрата. Наличие ионов хлора в среде определяли по помутнению среды после реакции ионов хлора с азотнокислым серебром, в культуральной жидкости, освобожденной от клеток [30].

**Модельный эксперимент по биоаугментации ассоциации L4-10 в почву, искусственно загрязненную линданом.** Для модельного эксперимента использовали дерново-подзолистую почву, отобранную на территории заказника “Предуралье” (Пермский край, Россия), не загрязненную химическими органическими соединениями. В эксперименте было заложено четыре линии, в каждой линдан вносили до конечной концентрации 0.5 г/кг сухой почвы: 1) нативная почва (**Пмф**); 2) нативная почва, аугментированная бактериальной ассоциацией L4-10 (конечная концентрация культуры  $3 \times 10^8$  КОЕ/г почвы, **Пмф + L4-10**); 3) стерильная почва (трехкратная стерилизация автоклавированием по 40 мин при 121°C с интервалом 24 ч, **Пст**); 4) стерильная почва с внесенной бактериальной ассоциацией L4-10 (конечная концентрация культуры  $3 \times 10^8$  КОЕ/г почвы, **Пст + L4-10**). Культивирование проводили в термостате ТС-1/80 (“СПУ”, Россия) при 28°C, увлажнение почвы поддерживали внесением минеральной среды К1 до 40% влагоемкости почвы. Продолжительность эксперимента составила 45 сут. Экстракцию проводили хлороформом трехкратно с объединением фракций. ГХ-МС-анализ экстрактов проводили как описано выше. Профиль микробного сообщества получали методом ДГГЭ (как описано выше), ДНК из почвы выделяли с помощью набора FastDNA Spin Kit For Soil (“MP Biomedicals”, США) через 21 и 45 сут культивирования.

**Статистическая обработка данных.** Все эксперименты проведены в трехкратной повторности. Анализ осуществляли с помощью программы STATISTICA 6.0. Для описания результатов исследования применяли стандартные методы параметрической статистики: рассчитывали среднее арифметическое ( $M$ ), стандартное отклонение ( $SD$ ). Сравнение двух групп проводили при помощи двустороннего критерия Стьюдента. Критический уровень значимости принимался в данном исследовании 0.05. Рассчитывали эффективность деструкции линдана ( $I$ ), скорость деструкции ( $\mu$ ) (2), зависимости концентрации линдана от времени инкубации выражали в виде уравнение первого приближения с учетом коэффициента достоверности аппроксимации ( $R^2$ ).

$$D (\%) = 100 - ((C_t \times 100)/C_0), \quad (1)$$

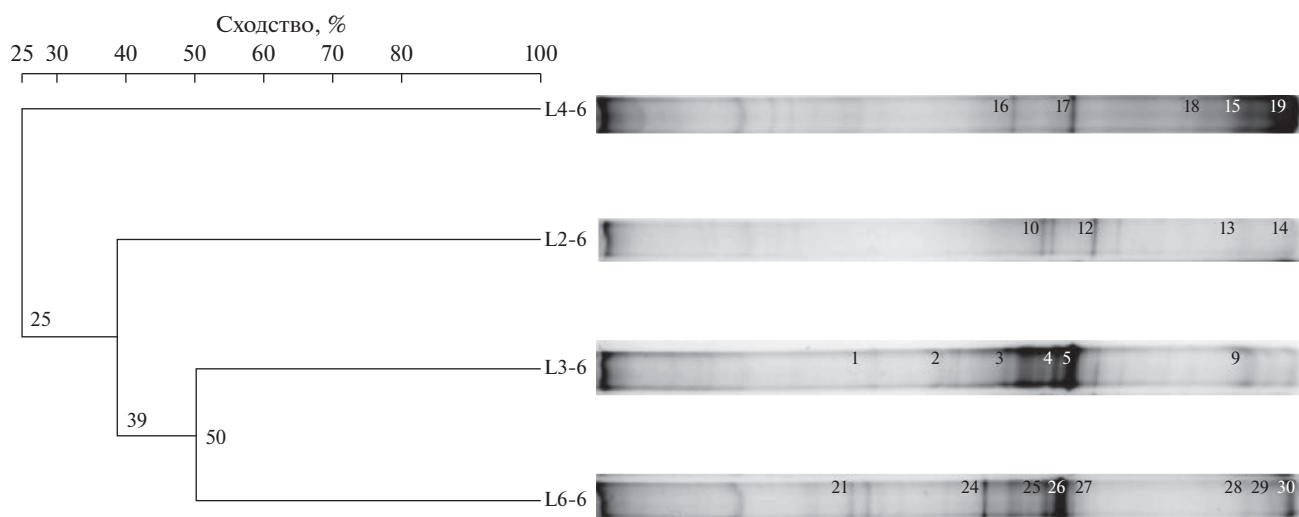
где  $D$  — эффективность деструкции (%);  $C_t$  — концентрация линдана через определенный промежуток времени;  $C_0$  — концентрация линдана в начальный момент времени;

$$\mu = (C_0 - C_t)/(t_i - t_0), \quad (2)$$

где  $C_0$  — концентрация линдана в начальный момент времени, мг/л,  $C_t$  — концентрация линдана в конечный момент времени, мг/л,  $t_i$  — конечный момент времени, сут,  $t_0$  — начальный момент времени, сут.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Селекция аэробных бактериальных сообществ, разлагающих линдан.** Для проведения селекции бактериальных сообществ были использованы шесть почвенных образцов, длительное время загрязненных смесью ГХЦГ и других соединений группы стойких органических загрязнителей. Из четырех образцов были получены накопительные культуры, содержащие в своем составе ассоциации аэробных бактерий, осуществляющих разложение линдана/γ-ГХЦГ (табл. 1). Бактериальные ассоциации, обозначенные L2-3, L3-3, L4-3 и L6-3, которые были выделены с третьего пассажа селекции, характеризовались низкой активностью биodeградации. Период разложения 0.1 г/л линдана составлял 5–6 мес. Скорость деструкции линдана у ассоциаций L3-6 и L6-6, несмотря на более длительный срок селекции (шестой пассаж), не изменилась. Напротив, анализ кинетических параметров деструкции линдана у ассоциаций L2-6 и L4-6 показал, что 90–100%-ное разложение субстрата достигалось в 1.7 раза быстрее (табл. 1). Дальнейшая селекция привела к повышению деградативного потенциала только в случае бактериального сообщества накопительной культуры L4. На этапе 8 пассажа селекции временные интервалы, необходимые для разложения линдана ассоциацией L4-8, сократились в 1.9 – 2.0 раза по сравнению с ассоциацией 6 пассажа селекции (табл. 1). Последующую селекцию проводили, используя накопительную культуру L4. Сравнение биodeградативной активности у ассоциаций 10 и 16 пассажей (L4-10 и L4-16) показало, что наиболее перспективная для дальнейшего изучения бактериальная ассоциация сформировалась на этапе 10 пассажа селекции (табл. 1). Следует отметить, что выделенные в настоящем исследовании бактериальные ассоциации, превосходят по кинетическим параметрам ассоциацию бактерий рода *Streptomyces* [20, 21, 23, 39] и близки по активности биodeградации со штаммами *Bacillus* sp. HP-9, HP-10 и HP-13 [18]. Штаммы-деструкторы *Streptomyces* sp. M7 и *Chromohalobacter* sp. LD2 осуществляли 49–89%ую деструкцию 10–50 мг/л линдана за 4–7 сут, однако не описана их активность при более высоких концентрациях линдана [15, 16]. Полученные результаты позволяют предположить, что селекция в лабораторных условиях в присутствии высоких концентраций линдана, приводила к формированию бактериальных ассоциаций, обладающих высоким линдан-деградирующим



**Рис. 2.** Дендрограмма, построенная методом UPGMA, на основании анализа сходства ДГГЭ-профилей исследуемых ассоциаций. В узлах кластеров приведены значения уровня сходства (%). Цифрами на геле обозначены фрагменты ДНК, для которых установлена нуклеотидная последовательность (табл. 3).

щим потенциалом, на основе почвенных микробных сообществ.

#### Структура ассоциаций, деградирующих линдан.

Для исследования состава полученных стабильных бактериальных ассоциаций 6 пассажа был проведен ДГГЭ-анализ тотальной ДНК (рис. 2). Установлено, что ассоциации L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6 характеризовались уникальным составом с низким уровнем сходства друг с другом (рис. 2). Для анализа видового состава был использован индекс Шеннона-Уивера (табл. 2). Наибольшее значение выявлено в ассоциации L3-6, а наименьшее — в ассоциации L4-6. В целом, значения индекса Шеннона-Уивера у исследуемых ассоциаций находятся в диапазоне, характерном для сообществ с низким разнообразием видового состава. Полученные значения индекса Шеннона-Уивера в 1.5–2.0 раза ниже, чем данный показатель у бактериальных ассоциаций, выделенных из почв и донных отложений Китая и Тайваня, загрязненных пестицидами, в том числе линданом [40, 41].

Известно, что селекция с применением в качестве лимитирующего фактора одного химического соединения приводит к снижению биоразнообразия в бактериальных сообществах [42]. Вероятно, этим может быть обусловлено низкое видовое разнообразие в сформировавшихся при селекции на линдане бактериальных ассоциациях.

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК, полученных при ДГГЭ-анализе ассоциаций L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6 показал, что доминирующее положение занимают представители *Proteobacteria* (табл. 3). Полученный результат согласуется с результатами работы [27], показавшими, что в почвах, загрязненных ГХЦГ, ДДТ и Эндосульфатом, значительная доля микробного сообщества представлена бактериями филума *Proteobacteria*. В ассоциациях L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6 выявлены представители рода *Pseudomonas* (класс  $\gamma$ -*Proteobacteria*) и рода *Tardibacter* (класс  $\alpha$ -*Proteobacteria*) (табл. 3). Штамм *Tardibacter chloracetimidivorans* JJ-A5<sup>T</sup>, наибольшее

**Таблица 2.** Индексы биоразнообразия ассоциаций, полученных после селекции на линдане (6 пассаж), оцененные по ДГГЭ-профилям

| Бактериальная ассоциация | Индекс Шеннона–Уивера (H) | Количество операциональных таксономических единиц (OTE) | Индекс выравненность (E <sub>H</sub> ) |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| L2-6                     | 2.2645                    | 13                                                      | 0.882                                  |
| L3-6                     | 2.466                     | 19                                                      | 0.837                                  |
| L4-6                     | 1.885                     | 11                                                      | 0.786                                  |
| L6-6                     | 2.337                     | 17                                                      | 0.825                                  |

**Таблица 3.** Сравнение фрагментов гена 16S рРНК с гомологичными нуклеотидными последовательностями, представленными в базе EzTaxon (<https://www.ezbiocloud.net>)

| Ассоциация | Номер фрагмента ДНК (ДГГЭ), номер в GenBank | Типовой штамм, номер в GenBank                                                 | Сходство, % | Количество нуклеотидов |
|------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------------|
| L2-6       | 10, MW132971                                | <i>Pseudomonas monteilli</i> NBRC 103158 <sup>T</sup> , (BBIS01000088)         | 100         | 402                    |
|            | 12, MW132972                                | <i>Pseudomonas allopitida</i> Kh7 <sup>T</sup> , (LT718459)                    | 100         | 420                    |
|            | 13, MW132973                                | <i>Tardibacter chloracetimidivorans</i> JJ-A5 <sup>T</sup> , (CP018221)        | 93.2        | 458                    |
|            | 14, MW132974                                | <i>Sphingomonas polyaromaticivorans</i> B2-7 <sup>T</sup> , (EF467848)         | 95.97       | 398                    |
| L3-6       | 1, MW132965                                 | <i>Pseudomonas alkylphenolica</i> KL28 <sup>T</sup> , (CP009048)               | 100         | 419                    |
|            | 2, MW132966                                 | <i>Pseudomonas putida</i> NBRC14164 <sup>T</sup> , (AP013070)                  | 99.77       | 450                    |
|            | 3, MW132967                                 | <i>Pseudomonas sichuanensis</i> WCHPs060039 <sup>T</sup> , (QKVM01000121)      | 100         | 350                    |
|            | 4, MW132968                                 | <i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 23835 <sup>T</sup> , (LT629777)               | 100         | 448                    |
|            | 5, MW132969                                 | <i>Pseudomonas hutmensis</i> xwS2 <sup>T</sup> , (QJRG01000049)                | 99.78       | 432                    |
|            | 9, MW132970                                 | <i>Tardibacter chloracetimidivorans</i> JJ-A5 <sup>T</sup> , (CP018221)        | 99.47       | 392                    |
| L4-6       | 15, MW132975                                | <i>Tardibacter chloracetimidivorans</i> JJ-A5 <sup>T</sup> , (CP018221)        | 99.42       | 349                    |
|            | 16, MW132986                                | <i>Pseudomonas laurylsulfatiphila</i> AP3-16 <sup>T</sup> , (KY462012)         | 99.56       | 432                    |
|            | 17, MW132987                                | <i>Pseudomonas putida</i> NBRC14164 <sup>T</sup> , (AP013070)                  | 99.54       | 465                    |
|            | 18, MW132976                                | <i>Novosphingobium bradum</i> SIM-24 <sup>T</sup> , (LN890294)                 | 92.84       | 464                    |
|            | 19, MW132977                                | <i>Sphingomonas astaxanthinifaciens</i> DSM22298 <sup>T</sup> , (JONN01000001) | 99.5        | 408                    |
| L6-6       | 21, MW132980                                | <i>Pseudomonas laurentiana</i> GLS-010 <sup>T</sup> , (KY471137)               | 99.5        | 493                    |
|            | 24, MW132979                                | <i>Pseudomonas putida</i> NBRC14164 <sup>T</sup> , (AP013070)                  | 99.56       | 457                    |
|            | 25, MW132980                                | <i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 23835 <sup>T</sup> , (LT629777)               | 100         | 449                    |
|            | 26, MW132981                                | <i>Pseudomonas hutmensis</i> xwS2 <sup>T</sup> , (QJRG01000049)                | 100         | 453                    |
|            | 27, MW132982                                | <i>Pseudomonas panipatensis</i> Esp-1 <sup>T</sup> , (jgi.1118294)             | 100         | 484                    |
|            | 28, MW132983                                | <i>Sphingobium auranticus capsulatus</i> YLT33 <sup>T</sup> , (KT321369)       | 98.5        | 411                    |
|            | 29, MW132984                                | <i>Tardibacter chloracetimidivorans</i> JJ-A5 <sup>T</sup> , (CP018221)        | 99.51       | 404                    |
|            | 30, MW132985                                | <i>Sphingomonas polyaromaticivorans</i> B2-7 <sup>T</sup> , (EF467848)         | 99.10       | 410                    |

сходство с которым выявлено у представителей исследуемых ассоциаций, был выделен из сельскохозяйственной почвы в Корею и использовал гербицид алахлор (хлорорганическое соединение) в качестве единственного источника углерода [43]. Как отмечалось ранее, одними из наиболее широко известных представителей бактерий-деструкто-

ров линдана были штаммы родов *Sphingobium* и *Sphingomonas* [6–9]. В составе исследуемых ассоциаций, за исключением ассоциации L3-6, также присутствовали представители рода *Sphingomonas* (класс  $\alpha$ -*Proteobacteria*) (табл. 3). Кроме того, в составе ассоциации L4-6 найдены представители рода *Novosphingobium* (класс  $\alpha$ -*Proteobacteria*), а в со-

**Таблица 4.** Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагментов генов деструкции линдана, амплифицированных с тотальной ДНК бактериальных ассоциаций, с гомологичными последовательностями из базы данных GenBank

| Фрагмент гена  | ДНК-матрица ассоциации (размер анализируемого фрагмента, п.н), номер в GenBank | Наиболее близкие гомологичные последовательности из GenBank, номер в GenBank | Сходство, % | Ссылка  |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------|---------|
| <i>linA</i> *  | L2-6 (382), MW150971                                                           | <i>linA</i> , <i>Sphingobium indicum</i> B90A, (CP013070.1)                  | 99          | [44]    |
|                | L3-6 (397), MW150972                                                           | <i>linA</i> , <i>Sphingobium japonicum</i> UT26S, AP010803.1                 | 98          | [36]    |
|                | L4-6 (389), MW150970                                                           | <i>linA</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> B90, AY150580.3               | 100         | [45]    |
| <i>linA</i> ** | L6-6 (215), MW150973                                                           | <i>linA</i> , uncultured organism, clone mgA6R1, EU863849.1                  | 100         | н.о.*** |
| <i>linB</i>    | L6-6 (437), MW150974                                                           | <i>linB</i> , <i>Sphingobium</i> sp. TKS, CP005087.1                         | 100         | [46]    |
| <i>linC</i>    | L2-6 (384), MW150975                                                           | <i>linC</i> , <i>Sphingobium</i> sp. S8, MN649846.1                          | 99          | н.о.    |
|                | L3-6 (448), MW150976                                                           | <i>linC</i> , <i>Sphingobium</i> sp. MI1205, CP005192.1                      | 100         | [47]    |
|                | L4-6 (304), MW150977                                                           | <i>linC</i> , <i>Sphingobium indicum</i> B90A, CP013071.1                    | 99          | [44]    |
|                | L6-6 (438), MW150978                                                           | <i>linC</i> , <i>Sphingobium</i> sp. TKS, CP005088.1                         | 100         | [46]    |
| <i>linX</i>    | L2-6 (523), MW1509783                                                          | <i>linX</i> , <i>Sphingobium</i> sp. S6, MN649857.1                          | 100         | н.о.    |
|                | L3-6 (621), MW150984                                                           | <i>linX</i> , <i>Sphingomonas</i> sp. MM-1, CP004038.1                       | 98          | [48]    |
|                | L4-6 (665), MW150985                                                           | <i>linX</i> , <i>Sphingobium</i> sp. S8, MN649848.1                          | 99          | н.о.    |
|                | L6-6 (667), MW150986                                                           | <i>linX</i> , <i>Sphingobium</i> sp. TKS, CP005088.1                         | 100         | [46]    |

\* Праймеры, подобранные в настоящем исследовании; \*\* праймеры, представленные в [36], \*\*\* н.о. — не опубликовано, данные GenBank.

ставе ассоциации L6-6 — *Sphingoauranticus* (класс  $\alpha$ -*Proteobacteria*) (табл. 4). Таким образом, ассоциации L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6 характеризовались не только количественными различиями в своем составе, но и качественными.

**Гены деструкции линдана в ассоциациях, выделенных с 6 пассажа селекции.** Для исследования генетических систем разложения линдана в исследуемых бактериальных ассоциациях были использованы олигонуклеотидные праймеры, специфичные к генам *linABCX*, кодирующим ферменты “верхнего” пути деструкции ГХЦГ (рис. 1). С матриц тотальных ДНК ассоциаций L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6 были получены ПЦР-продукты ожидаемого размера (табл. 4). В результате анализа нуклеотидных последовательностей полученных фрагментов ДНК, было установлено, что в ассоциациях присутствуют гены *lin*-оперона, характеризующиеся высоким уровнем сходства с *lin*-генами штаммов-деструкторов линдана (табл. 4). Молекулярно-генетический анализ фрагмента гена, амплифицированного с ДНК ассоциаций L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6 с праймерами, специфичными к гену *linA*, показал высокий процент сходства с генами, кодирующими дегидрохлориназу

известных штаммов-деструкторов линдана родов *Sphingobium* и *Sphingomonas*, а также некультивируемой бактерии, выделенной из почв, загрязненных линданом (табл. 4). Секвенирование фрагментов ДНК, полученных с праймерами, специфичными к гену *linB*, позволило установить нуклеотидную последовательность только для фрагмента с ДНК ассоциации L6-6, которая имела 100%-ное сходство с аналогичным геном деструктора *Sphingobium* sp. TKS (табл. 4). Уровень сходства фрагментов генов, амплифицированных с применением праймеров, специфичных к генам *linC* и *linX*, составил 98–100% с генами дегидрогеназ штаммов рода *Sphingobium*, за исключением фрагмента гена ассоциации L3-6, для которого наиболее близким был ген *linX* штамма *Sphingomonas* sp. MM-1 (табл. 4).

Необходимо отметить, что, несмотря на то, что нуклеотидные последовательности функциональных генов определялись в тотальной ДНК сообщества, результаты секвенирования показали, что в образцах присутствуют однородные матрицы ДНК. Известно, что *lin*-гены “верхнего” пути штаммов-деструкторов линдана *Sphingobium indicum* B90A, *Sphingobium francense* Sp<sup>+</sup> и *Sphingobium japonicum*

Таблица 5. Индексы биоразнообразия исследованных образцов, оцененные по ДГГЭ-профилям

| Модельная почвенная система* | Индекс Шеннона–Уивера (H) | Количество операциональных таксономических единиц (OTE) | Индекс выравненность (E <sub>H</sub> ) |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| L4-10                        | 2.229                     | 17                                                      | 0.786                                  |
| Пмф (0)                      | 2.686                     | 18                                                      | 0.929                                  |
| Пмф (45)                     | 2.181                     | 14                                                      | 0.826                                  |
| Пмф+ L4-10 (21)              | 1.878                     | 7                                                       | 0.965                                  |
| Пмф+ L4-10 (45)              | 1.921                     | 8                                                       | 0.924                                  |
| Пст (0)                      | 1.449                     | 5                                                       | 0.901                                  |
| Пст (45)                     | 0                         | 1                                                       | 0                                      |
| Пст+ L4-10 (21)              | 2.469                     | 13                                                      | 0.962                                  |
| Пст+ L4-10 (45)              | 2.425                     | 14                                                      | 0.919                                  |

\* L4-10 — исследуемая ассоциация, Пмф (0) и Пмф (45) — автохтонная микрофлора нестерильной почвы в начале (0 сут) и конце (45 сут) эксперимента, Пст (0) и Пст (45) — ДНК стерильной почвы в начале (0 сут) и конце (45 сут) эксперимента, Пмф + L4-10 (21) и Пмф + L4-10 (45) — почвенная микрофлора, аугментированная ассоциацией L4-10 на 21 и 45 сут эксперимента, Пст + L4-10 (21) и Пст + L4-10 (45) — стерильная почва, аугментированная ассоциацией L4-10 на 21 и 45 сут эксперимента.

UT26, а также 12 штаммов семейства *Sphingomonadaceae*, изолированных в Германии, имеют высокий уровень сходства. Так, для гена *linA* данный показатель составил 100%, для гена *linB* — 97–98%, для гена *linC* — 99%. Две копии гена *linX* (*linX1* и *linX3*) штамма *S. indicum* B90A на 99% идентичны гену *linX* штамма *S. japonicum* UT26, тогда как ген *linX2* штамма *S. indicum* B90A совпадает с геном *linX* только на 66% [10, 49]. При этом был установлен горизонтальный перенос *lin*-генов в микробном сообществе [10, 49].

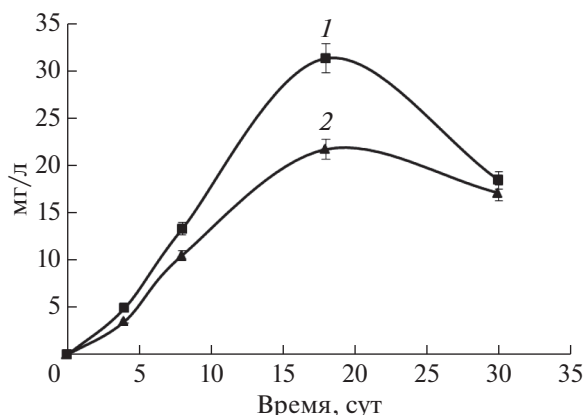
Было показано, что в исследуемых ассоциациях присутствуют представители семейства *Sphingomonadaceae* (табл. 3). Полученные результаты позволили предположить, что в исследуемых ассоциациях присутствуют гены, обуславливающие разложение линдана по “верхнему” пути, характерные для бактерий семейства *Sphingomonadaceae*.

**Характеристика биodeградативного потенциала ассоциации L4-10.** В результате селекции из накопительной культуры L4 на 10 пассаже была получена бактериальная ассоциация L4-10, характеризующаяся более высокими кинетическими параметрами разложения линдана, чем у остальных ассоциаций, полученных в настоящем исследовании (табл. 1). Удельная скорость деструкции составила  $3.3 \pm 0.1$  мг/(л × сут), что превышало скорость разложения линдана известными ассоциациями, в состав которых входили бактерии родов *Streptomyces* и *Paenibacillus*, и водоросль рода *Scenedesmus* [22, 50], а также индивидуальными штаммами родов *Bacillus*, *Sphingobium* и *Streptomyces* [18, 19,

26]. За 30 сут ассоциация L4-10 осуществляла разложение линдана на 99.8% и достигла численности  $1.02 \pm 0.03 \times 10^6$  КОЕ/мл. Методом ПЦР-РВ было обнаружено наличие бактериальных генов 16S рРНК в количестве  $3.29 \times 10^6$  ( $\pm 1.0 \times 10^4$ ) копий гена на 1 мл культуры, что согласовывалось с данными, полученными при подсчете культивируемых бактерий в составе ассоциации. Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии в ассоциации L4-10 некультивируемых форм бактерий. Увеличение численности на два порядка относительно начальной ( $1.51 \pm 0.02 \times 10^4$  КОЕ/мл) позволило предположить, что бактериальная ассоциация не только разлагала линдан, но и использовала его в качестве ростового субстрата.

Следует отметить, что индекс сходства ДГГЭ-профилей (по генам 16S рРНК) ассоциаций L4-10 и L4-6 составил 98.2%, при этом значения индекса Шеннона незначительно различались (табл. 2, 5). Полученные результаты позволили предположить, что в процессе селекции состав основных групп бактерий не изменялся, и в составе ассоциации L4-10 присутствовали бактерии рода *Pseudomonas* (класс  $\gamma$ -*Proteobacteria*) и родов *Novosphingobium*, *Tardibacter* и *Sphingomonas* (класс  $\alpha$ -*Proteobacteria*), однако изменялось их соотношение в сообществе.

В результате ВЭЖХ и ГХ-МС анализа культуральной жидкости показано, что при трансформации линдана ассоциацией L4-10 образуются побочные продукты, характерные для классиче-



**Рис. 3.** Динамика образования и трансформации побочных продуктов биодеструкции линдана в процессе его разложения бактериальной ассоциацией L4-10: 1 — 1,2,4-трихлорбензол, 2 — 2,5-дихлорфенол.

ского “верхнего” пути бактериальной деструкции, 1,2,4-трихлорбензол (**1,2,4-ТХБ**) и 2,5-дихлорфенол (**2,5-ДХФ**) (рис. 1, 3). Динамика изменения концентрации данных соединений в процессе разложения линдана свидетельствовала о возможной их трансформации бактериальными штаммами, входящими в ассоциацию L4-10. В литературе описаны штаммы и бактериальные сообщества почв и донных отложений, способные разлагать 1,2,4-ТХБ или 2,5-ДХФ, но для них не описана активность дегградации линдана [51–53].

При культивировании ассоциации L4-10 в минеральной среде K1, содержащей 0.3 г/л линдана было установлено, что кинетические параметры деструкции соответствуют аналогичным показателям при культивировании данной ассоциации в минеральной среде с 0.1 г/л линдана (табл. 1). Период достижения 100% деструкции 0.3 г/л линдана увеличивался пропорционально содержанию субстрата и составил 90 сут. Таким образом, повышение концентрации линдана в среде культи-

вирования не приводило к ингибированию дегградативной активности исследуемой ассоциации.

**Биоаугментация ассоциации L4-10 в почву, искусственно загрязненную линданом.** Одним из перспективных направлений в биоремедиации загрязненных линданом территорий является реализация метода биоаугментации аэробных бактериальных сообществ, обладающих способностью к деструкции этого токсиканта. В рамках настоящего исследования были созданы модельные почвенные системы, позволяющие оценить перспективность применения бактериальной ассоциации L4-10 в качестве агента биоремедиации.

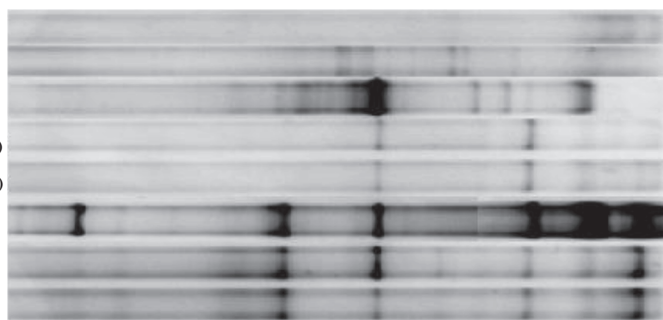
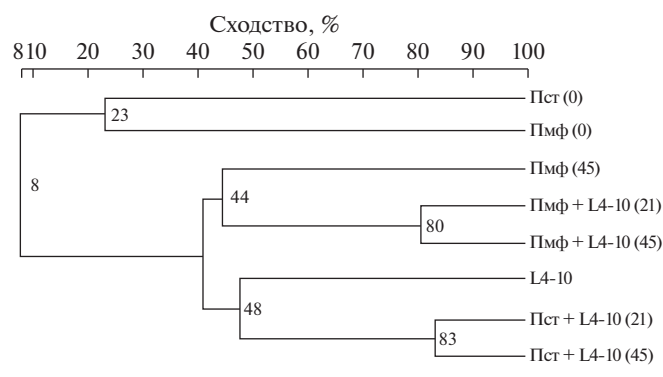
Установлено, что внесение бактериальной ассоциации приводило к существенному повышению эффективности разложения линдана в почве (табл. 6). Наиболее эффективно процесс биодеструкции протекал в стерильной почве, содержащей ассоциацию L4-10. Уровень деструкции достигал 90% за 45 сут. Присутствие почвенной микрофлоры оказывало негативное воздействие на дегградацию линдана ассоциацией L4-10. К концу эксперимента в модельной системе биотрансформация линдана составила 78.1%. Следует отметить, что в модельных системах, не содержащих ассоциацию L4-10, разложение линдана не происходило (система со стерильной почвой), либо протекало медленно (система с нативной почвой) (табл. 6). В литературе описано, что биоаугментация различных линдан-загрязненных почв бактериальными ассоциациями обуславливает разложение линдана на 55–87%, а индивидуальным штаммом-деструктором *Sphingobium* sp. ВНС-А на 67.7–96.3% [13, 20, 23, 54, 55]. Кинетические параметры деструкции в биоаугментированных почвах в 3–5 выше, чем в почвах без внесения бактериальных агентов [11, 23]. В настоящем исследовании установлено, что аналогичные параметры различаются на 2 порядка (табл. 6). Таким образом, внесение ассоциации L4-10 существенно повышало эффективность биоремедиации почвы, загрязненной линданом.

**Таблица 6.** Кинетические параметры деструкции линдана (0.5 г/кг) в почве

| Модельная почвенная система | Убыль линдана через 45 сут, % | Удельная скорость деструкции, мг/(кг × сут) | Зависимость концентрации линдана от времени деструкции* | $R^{2**}$ |
|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------|
| Пст + L4-10                 | 90.0 ± 0.2                    | 10.1 ± 0.2                                  | $y = -9.9112x + 468.05$                                 | 0.948     |
| Пмф + L4-10                 | 78.1 ± 0.1                    | 8.67 ± 0.01                                 | $y = -8.6982x + 511.36$                                 | 0.991     |
| Пмф                         | 0.60 ± 0.05                   | 0.067 ± 0.002                               | $y = -0.0671x + 500.14$                                 | 0.977     |
| Пст                         | 0                             | 0                                           | н/о*                                                    | н/о       |

\*  $y$  — концентрация линдана,  $x$  — время деструкции; \*\* коэффициент достоверности аппроксимации; \*\*\* н/о — не определяется.





**Рис. 4.** Дендрограмма, построенная с применением метода UPGMA, отображающая сходство ДГГЭ-профилей модельных почвенных систем. В узлах кластеров приведены значения уровня сходства (%). Обозначения см. табл. 5.

С использованием метода ПЦР-ДГГЭ были изучены изменения в составе бактериального сообщества в модельных почвенных системах (рис. 4, табл. 5). UPGMA-анализ показал, что образцы формируют два кластера: первый – бактериальные сообщества не загрязнённой почвы, второй – бактериальные сообщества модельных систем, содержащих линдан. Уровень сходства между данными кластерами составил 8%. Внутри второго кластера также можно выделить подразделение на две группы, сходство между которыми составляло 40%: 1) бактериальные сообщества, сформировавшиеся на основе нативного почвенного микробиоценоза и в результате взаимодействия данного микробиоценоза с внесённой ассоциацией L4-10 в процессе ремедиации, 2) бактериальная ассоциация L4-10 и ее адаптация в стерильной линдан-загрязнённой почве. Наиболее сильные изменения в составе ассоциации L4-10 происходили в почве, содержащей микрофлору. Можно предположить, что в данном случае, помимо присутствия в почве более доступных питательных веществ, чем линдан, существенную роль играли конкурентные взаимодействия между биоаугментированными и автохтонными микроорганизмами. Частичное вытеснение внесённых бактериальных штаммов в процессе ремедиации загрязнённых линданом почв было отмечено при биоаугментации штаммов *Sphingobium francense* Sp+ и *Acinetobacter* sp. (pRLG) в нестерильную почву [55].

Внесение линдана отрицательно сказывалось на разнообразии микробного сообщества почвы (табл. 5). К концу эксперимента отмечалось снижение значения индекса Шеннона на 0.5 единицы. Анализ динамики микробного разнообразия в биоаугментированных модельных системах выявил разнонаправленное изменение показателей. В случае применения стерильной почвы отмечалось незначительное повышение разнообразия (на 0.2 единицы), что обусловлено более равно-

мерным распределением численности между бактериальными группами, присутствующими в ассоциации L4-10 (индекс выравненности >0.9). Увеличение микробного разнообразия было отмечено в ряде исследований по биоремедиации почв, загрязнённых линданом, ДДТ, фенантроном и ПХБ [40, 42, 56]. Напротив, в случае биоаугментированных модельных систем, содержащих почвенную микрофлору, отмечено снижение индекса Шеннона на 0.7–0.8 единицы от показателей автохтонного почвенного микробного сообщества, и на 0.3–0.4 единицы от показателей ассоциации L4-10. В работе [41] также отмечена отрицательная динамика (снижение значения индекса Шеннона на 0.1–1.7 единицы, индексов ACE и Chao1 в 1.5–2.0 раза) в разнообразии микробного сообщества линдан-содержащей почвы в процессе биоремедиации. Следует подчеркнуть, что при биоаугментации индивидуальных штаммов-деструкторов, отмечено “плавающее” значение индекса Шеннона для микробного сообщества почв, загрязнённых линданом, в течение 50 дней [55]. По-видимому, в биоаугментированных модельных почвенных системах протекают сложные процессы адаптации внесённых бактериальных ассоциаций.

Таким образом, в результате проведенных исследований, из почв, загрязнённых хлорорганическими соединениями, после селекции с применением линдана получены ассоциации аэробных бактерий, обладающие различной способностью к биodeградации гербицида. Показано, что в их составе представлены бактерии родов *Pseudomonas* (класс  $\gamma$ -Proteobacteria), *Novosphingobium* (класс  $\alpha$ -Proteobacteria), *Sphingoaureticus* (класс  $\alpha$ -Proteobacteria), *Sphingomonas* (класс  $\alpha$ -Proteobacteria), *Tardibacter* (класс  $\alpha$ -Proteobacteria). Установлено, что в тотальных ДНК, выделенных из ассоциаций L2-6, L3-6, L4-6 и L6-6, присутствуют гены, обладающие высоким уровнем сходства (98–100%) с генами *linABCX* “верхнего” пути аэробного разло-



жения линдана. Бактериальная ассоциация L4-10 наиболее эффективно осуществляла биодеструкцию линдана (90–100%-ное разложение за 30 сут), а также образующихся при этом побочных хлорароматических соединений. Показано, что внесение данной ассоциации в загрязненную линданом почву приводило к ее эффективной ремедиации (78.1 – 90%-ная деструкция линдана за 45 сут). Полученные результаты позволили предположить, что бактериальные ассоциации L2-6, L3-6, L4-6, L6-6 и L4-10 можно использовать при разработке биотехнологий, направленных на восстановление почв, загрязненных линданом.

В работе использовали оборудование молекулярно-генетической лаборатории кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета, а также ЦКП “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УрО РАН.

Работа выполнена в рамках НИОКР АААА-А19-119112290009-1 “Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды”

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В настоящем исследовании не использованы в качестве объектов люди или животные.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vijgen J., Abhilash P.C., Li Y.F., Lal R., Forter M., Torres J., Singh N., Yunus M., Tian C., Schäffer A., Webber R. // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2011. V. 18. P. 152–162. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0417-9>
- Vijgen J., de Borst B., Weber R., Stobiecki T., Forter M. // *Environ. Pollut.* 2019. V. 248. P. 696–705. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.029>
- Егорова Д.О., Шестакова Е.А., Первова М.Г., Плотникова Е.Г. // *Вестник Пермского университета.* 2014. № 4. С. 64–72.
- Назаров А.В., Егорова Д.О., Макаренко А.А., Демаков В.А., Плотникова Е.Г. // *Экология человека.* 2016. № 3. С. 3–8.
- Revich B., Aksel E., Ushakova T., Ivanova I., Zhuchenko N., Klyuev N., Brodsky B., Sotskov Y. // *Chemosphere.* 2001. V. 43. № 4–7. P. 951–966.
- Alvarez A., Benimeki C.S., Saez J.M., Fuentes M.S., Cuozzo S.A., Polti M.A., Amoroso M.J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13. № 11. P. 15086–15106.
- Camacho-Pérez B., Ríos-Leal E., Rinderknecht-Seijas N., Poggi-Varaldo M. // *J. Environm. Managem.* 2012. V. 95. P. S306–S318.
- Kumar D., Pannu R. // *Bioresour. Bioprocess.* 2018. V. 5. P. 29. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0213-9>
- Lal R., Pandey G., Sharma P., Kumari K., Malhotra S., Pandey R., Raina V., Kohler H.P., Holliger C., Jackson C., Oakeshott J.G. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010. V. 74. № 1. P. 58–80.
- Nagata Y., Endo R., Ito M., Ohtsubo Y., Tsuda M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. V. 76. P. 741–752. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1066-x>
- Raimondo E.E., Aparicio J.D., Briceño G.E., Fuentes M.S., Benimeli C.S. // *J. Soil Sci. Plant Nutrit.* 2019. V. 19. P. 29–41. <https://doi.org/10.1007/s42729-018-0003-7>
- Sahoo B., Chaudhuri S. // *Environ. Sustainability.* 2019. V. 2. P. 97–106.
- Chuang S., Wang B., Chen K., Jia W., Qiao W., Ling W., Tang X., Jiang J. // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 746. 140992. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140992>
- Pearce S.L., Oakeshott J.G., Pandey G. // *G3. Genes. Genomes. Genetics.* 2015. V. 5. № 6. P. 1081–1094.
- Bajaj S., Sagar S., Khare S., Singh D.K. // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2017. V. 122. P. 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.04.014>
- Benimeli C.S., Castro G.R., Chaile A.P. // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2007. V. 59. № 2. P. 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.07.014>
- Kumar D., Kumar A., Sharma J. // *Bioresour. Bioprocess.* 2016. V. 3. P. 53. <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0130-8>
- Pannu R., Kumar D. // *Biocat. Agricult. Biotech.* 2017. V. 11. P. 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.06.009>
- Pesce S.F., Wunderling D.A. // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2004. V. 54. № 4. P. 255–260.
- Raimondo E.E., Saez J.M., Aparicio J.D., Fuentes M.S., Benimeli C.S. // *Chemosphere.* 2020. V. 238. 124512. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124512>
- Saez J.M., Aparicio J.D., Amoroso M.J., Benimeli C.S. // *Proc. Biochem.* 2015. V. 50. № 11. P. 1923–1933.
- Saez J.M., Benimeli C.S., Amoroso M.J. // *Chemosphere.* 2012. V. 89. № 8. P. 982–987.
- Saez J.M., Bigliardo A.L., Raimondo E.E., Briceño G.E., Polti M.A., Benimeli C.S. // *Ecotoxicol. Environm. Safety.* 2018. V. 156. P. 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.011>
- Saez J.M., García V.C., Benimeli C.S. // *Ecotoxic. Environm. Safety.* 2017. V. 144. P. 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.026>
- Salam J.A., Das N. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 30. P. 1301–1313. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1551-6>
- Zheng G., Selvam A., Wong J.W.C. // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2011. V. 65. № 4. P. 612–618.

27. Regar R.K., Gaur V.K., Bajaj A., Tambat S., Manickam N. // Sci. Total Environ. 2019. V. 681. P. 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.090>
28. Методы почвенной микробиологии и биохимии: Учеб. пособие / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во МГУ, 1991. 304 с.
29. Raymond R.L. // Develop. Indust. Microb. 1961. V. 2. P. 23–32.
30. Zaitsev G.M., Tsoi T.V., Grishenkov V.G., Plotnikova E.G., Boroni A.M. // FEMS Microbiol. Lett. 1991. V. 81. № 2. P. 171–176.
31. Bertani G. // J. Bacteriol. 1951. V. 62. № 3. P. 293–300.
32. Short protocols in molecular biology. 3rd ed. / Eds. F.M. Ausbel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl N.Y.: John Wiley & Sons, 1995. 450 p.
33. Tiirola M.A., Männistö M.K., Puhakka J.A., Kulomaa M.S. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 9. P. 173–180.
34. Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., Jackson R.B. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 7. P. 4117–4120.
35. Jurelevicius D., Alvarez V.M., Peixoto R., Rosado A.S., Seldin L. // Appl. Soil Ecol. 2012. V. 55. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.12.008>
36. Thomas J.-C., Berger F., Jacquier M., Bernillon D., Baud-grasset F., Truffaut N., Norm P., Vogel T.M., Simonet P. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. № 20. P. 6049–6055.
37. Cérémonie H., Boubakri H., Mavingui P., Simonet P., Vogel T.M. // FEMS Microbiol. Lett. 2006. V. 257. № 2. P. 243–252
38. Manickam N., Mau M., Schlömann M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 69. № 2. P. 580–588.
39. Raimondo E.E., Saez J.M., Aparicio J.D., Fuentes M.S., Benimeli C.S. // J. Environ. Menegm. 2020. V. 276. 111309. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111309>
40. Chang S.-C., Wu M.-H., Chen T.-W. // J. Soils Sedim. 2021. V. 21. № 1. P. 469–486. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02789-8>
41. Zhao Y., Zhang Y., Wang J., Hou Q., Liu W., Wu Y., Christie P. // J. Soils Sedim. 2020. V. 20. № 1. P. 2155–2165. <https://doi.org/10.1007/s11368-020-02593-4>
42. Schwarz A., Adetutu E.M., Juhasz A.L., Aburto-Medina A., Ball A.S., Shahsavari E. // Microb. Ecol. 2018. V. 75. № 4. P. 888–902. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1094-8>
43. Lee H., Kim D., Park S. // J. Microbiol. 2018. V. 56. № 5. P. 324–330. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7455-2>
44. Anand S., Sangwan N., Lata P., Kaur J., Dua A., Singh A.K., Verma M., Kaur J., Khurana J.P., Khurana P., Mathur S., Lal R. // J. Bacteriol. 2012. V. 194. № 16. P. 4471–4472.
45. Kumari R., Subudhi S., Suar M., Dhingra G., Raina V., Dogra C., Lal S., van der Meer J.R., Holliger C., Lal R. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 12. P. 6021–6028.
46. Tabata M., Ohhata S., Kawasumi T., Nikawadori Y., Kishida K., Sato T., Ohtsubo Y., Tsuda M., Nagata Y. // Genome Announc. 2016. V. 4. № 2. E00247–16.
47. Tabata M., Ohhata S., Nikawadori Y., Sato T., Kishida K., Ohtsubo Y., Tsuda M., Nagata Y. // Genome Announc. 2016. V. 4. № 2. E00246–16.
48. Tabata M., Ohtsubo Y., Ohhata S., Tsuda M., Nagata Y. // Genome Announc. 2016. V. 1. № 3. E00247–13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00247-13>
49. Lal R., Dogra C., Malhotra S., Sharma P., Pal R. // Trends Biotechnol. 2006. V. 24. № 3. P. 121–130.
50. Kumari M., Ghosh P., Swati, Thakur I.S. // Biores. Technol. Reports. 2020. V. 10. 100415 <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100415>
51. Dong W.H., Zhang P., Lin X.Y., Zhang Y., Tabouré A. // Sci. Total Environm. 2015. V. 505. P. 216 – 222. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.002>
52. Fang L., Qin H., Shi T., Wu X., Li Q.X., Hua R. // J. Hazard. Mater. 2020. V. 388. 121787. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.12178753>
53. Wang F., Grundmann S., Schmid M., Dörfler U., Rohrer S., Munch J.C., Hartmann A., Jiang X., Schroll R. // Chemosphere. 2007. V. 67. № 5. P. 896–902.
54. Abhilash P.C., Srivastava S., Singh N. // Chemosphere. 2011. V. 82. № 1. P. 56–63.
55. Benimeli C.S., Fuentes M.S., Abate C.M., Amoroso M.J. // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2008. V. 61. № 3. P. 233–239.
56. Zhang X., Nesme J., Simonet P., Frostegård Å. // Res. Microbiol. 2012. V. 163. № 3. P. 200–210.
57. Tu Ch., Ma L., Guo P., Song F., Teng Y., Zhang H. // Chemosphere. 2017. V. 189. P. 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.091>

**E. A. Nazarova<sup>a</sup>, D. O. Egorova<sup>a,\*</sup>, L. N. Anan'ina<sup>a</sup>, E. S. Korsakova<sup>a</sup>, and E. G. Plotnikova<sup>a</sup>**

\*e-mail: [daryao@rambler.ru](mailto:daryao@rambler.ru)

ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ том 57 № 5 2021

tatives of the classes  $\gamma$ -*Proteobacteria* (genus *Pseudomonas*) and  $\alpha$ -*Proteobacteria* (genera *Novosphingobium*, *Sphingauranticus*, *Sphingomonas*, *Tardibacter*). It was shown that the total DNA isolated from the bacterial associations of the sixth passage (L2-6, L3-6, L4-6, and L6-6) contained genes with a 98-100% level of similarity with the *linABCX* genes encoding the “upper” pathways for aerobic transformation of lindane. The bacterial association L4-10 effectively decomposed lindane in a mineral medium (100% destruction of 0.1 and 0.3 g/L of lindane for 30 and 90 days, respectively) and in model soil systems (78.1–90% destruction of 0.5 g/kg of lindane for 45 days). The use of molecular genetic and analytical methods made it possible to assume that the L4-10 association decomposed not only lindane, but also by-product chlorine-organic compounds formed during its metabolism (1,3,4-trichlorobenzene, 2,5-dichlorophenol). Thus, the bacterial associations obtained in this study are of interest for the development of bioremediation technologies for areas contaminated with lindane.

**Keywords:** bacterial associations, lindane, destruction, *lin* genes

## МИХАИЛ АНАТОЛЬЕВИЧ ЭЛЬДАРОВ 14.02.1956–8.12.2020

DOI: 10.31857/S0555109921050123



8 декабря 2020 г. безвременно ушел из жизни наш коллега и друг, известный российский ученый, специалист по молекулярной биологии и биотехнологии, ведущий научный сотрудник и руководитель группы генетической инженерии грибов ФИЦ Биотехнологии РАН – Михаил Анатольевич Эльдаров.

Вся жизнь Михаила Анатольевича была посвящена служению науке, несмотря на непростые годы. После окончания кафедры генетики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова в 1985 г. Михаил Анатольевич защитил диссертацию по специальности молекулярная биология по теме “Исследование области начала репликации некоторых экстрахромосомных ДНК эукариот” под руководством академиков РАН А.А. Баева и К.Г. Скрябина. С 1989 г. являлся бессменным руководителем группы генетической инженерии грибов в Центре “Биоинженерия” РАН (с 2015 г. – институт Биоинженерии в составе ФИЦ Биотехнологии РАН).

Михаил Анатольевич был ученым с глубоким и нестандартным мышлением и широким кругом профессиональных интересов: промышленная и медицинская биотехнология, генная инженерия, экспрессия белков, регуляция биосинтеза вто-

ричных метаболитов, вирусология. Он до последних дней активно работал над экспрессией рекомбинантных белков медицинского назначения, в том числе бактериальных L-аспарагиназ и промышленных ферментов для биотрансформации цефалоспориновых антибиотиков и вакцин, изучением роли хересных дрожжей в виноделии. Среди его достижений – разработка штаммов метилотрофных дрожжей, продуцирующих промышленные ферменты и рецепторы, сопряженные с G-белками, ферменты метаболизма фосфатов в клетках дрожжей.

Михаилом Анатольевичем опубликовано свыше 200 научных работ, исследовательских статей и глав в книгах. Он является автором нескольких десятков патентов.

Михаил Анатольевич дважды лауреат президентской стипендии “Выдающийся ученый России” (1994, 1997 гг.), награжден 2 бронзовыми медалями ВДНХ СССР, медалью 850 лет Москвы, дважды лауреат открытых конкурсов Министерства образования и науки Российской Федерации на лучшую научную работу студентов вузов по естественным, техническим и гуманитарным наукам как научный руководитель (дипломы открытых конкурсов за 2005 и 2007 гг.),

обладатель диплома Федерального Института Промышленной Собственности за изобретения, вошедшие в 100 лучших изобретений России по итогам 2012 года.

Михаил Анатольевич являлся руководителем многочисленных проектов и госконтрактов, активно сотрудничал с научными коллективами ИБМХ им. В.Н. Ореховича, ФГБНУ биомедицинской химии, ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, НИЦ ТБП ФМБА, ИБФМ им. Г.К. Скрыбина, ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, МГУ им. М.В. Ломоносова, компаний “Биокад” и др.

Он был не только высокопрофессиональным исследователем, руководителем группы, но также преподавателем и наставником, воспитавшим целое поколение научных кадров. До последних дней

Михаил Анатольевич читал курсы “Современная промышленная биотехнология”, “Биотехнология и геномика дрожжей” на кафедре биотехнологии биологического факультета МГУ.

Талантливый ученый и прекрасный молекулярный биолог, способный блестяще справиться с любой задачей, для своих коллег он был, прежде всего, добрым и мудрым товарищем, надежным другом, готовым поддержать в любой момент.

Уход Михаила Анатольевича — невосполнимая утрата для нас всех. Мы глубоко скорбим и выражаем искренние соболезнования его супруге Щенниковой Анне Владимировне.

*ФИЦ Биотехнологии РАН  
Редколлегия журнала*