

СОДЕРЖАНИЕ

Том 56, номер 4, 2020

Основные биохимические свойства рекомбинантных химозинов (обзор)

С. В. Беленькая, Д. В. Балабова, А. Н. Белов, А. Д. Коваль,
Д. Н. Щербаков, В. В. Ельчанинов 315

Пероксидазы прокариот и их применение в биотехнологии (обзор)

Л. Е. Хмелевцова, И. С. Сазыкин, Т. Н. Ажогина, М. А. Сазыкина 327

Малые РНК *Mycobacterium tuberculosis* в адаптации к стрессовым условиям,
моделирующим инфекцию *in vitro*

А. А. Острик, Е. Г. Салина, Ю. В. Скворцова, А. С. Григоров, О. С. Быченко,
А. С. Капрельяни, Т. Л. Ажикина 336

Влияние биогенных полиаминов на антибиотикочувствительность и поверхностные
свойства клеток *Mycobacterium smegmatis*

Л. Ю. Нестерова, И. В. Цыганов, А. Г. Ткаченко 342

Ферментативный синтез электропроводящего сополимера анилина
и 2-аминофенэтилового спирта с функциональными группами

М. Е. Хлупова, Г. П. Шумакович, И. С. Васильева, Е. А. Зайцева,
О. В. Морозова, А. И. Ярополов 352

НО-синтазная активность в фотоморфогенезе *Neurospora crassa*

С. Ю. Филиппович, М. В. Онуфриев, Д. И. Перегуд, Г. П. Бачурина, М. С. Крицкий 358

Биовыщелачивание сульфидных концентратов с различным содержанием меди
и цинка и оценка качества получаемых осадков

Н. В. Фомченко, М. И. Муравьев 366

Конверсия соевого фитостерина в андроста-4,9(11)-диен-3,17-дион

Т. С. Савинова, Д. В. Довбня, С. М. Хомутов, А. В. Казанцев,
Л. Д. Ху, Н. В. Лукашев, М. В. Донова 373

Участие сероводорода в индуцировании салициловой кислотой антиоксидантной
системы корней проростков пшеницы и их теплоустойчивости

Ю. В. Карпец, М. А. Шкляревский, Е. И. Горелова, Ю. Е. Колупаев 383

Влияние ассоциативных микроорганизмов на рост и устойчивость растений
к ксенобиотикам и фитопатогенам

С. В. Пиголева, Н. С. Захарченко, О. В. Фурс, С. В. Тарлачков, Т. В. Фунтикова,
А. Е. Филонов, А. В. Ариповский, О. В. Дьяченко, Я. И. Бурьянов, Т. В. Шевчук 390

Разработка иммуноферментного анализа для определения соевого сыра
в продуктах питания

Н. И. Смирнова, Е. А. Зверева, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев 401

CONTENTS

Vol. 56, No. 4, 2020

Basic Biochemical Properties of Recombinant Chymosins (Review)

*S. V. Belenkaya, D. V. Balabova, A. N. Belov, A. D. Koval,
D. N. Shcherbakov, and V. V. Elchaninov* 315

Procaryotic Peroxidases and Their Application in Biotechnology (Review)

L. E. Khmelevtsova, I. S. Sazykin, T. N. Azhogina, and M. A. Sazykina 327

Small RNAs of *Mycobacterium tuberculosis* in Adaptation to Host-Like Stress Conditions *in vitro*

*A. A. Ostrik, E. G. Salina, Y. V. Skvortsova, A. S. Grigorov, O. S. Bychenko,
A. S. Kaprelyants, and T. L. Azhikina* 336

Biogenic Polyamines Influence the Antibiotic Susceptibility and Cell Surface Properties of *Mycobacterium smegmatis*

L. Yu. Nesterova, I. V. Tsyganov, and A. G. Tkachenko 342

Enzymatic Synthesis of a Conducting Aniline and 2-Aminophenethyl Alcohol Copolymer with Functional Groups

*M. E. Khlopova, G. P. Shumakovich, I. S. Vasil'eva, E. A. Zaitseva,
O. V. Morozova, and A. I. Yaropolov* 352

NO-Synthase Activity in Photomorphogenesis in *Neurospora crassa*

S. Yu. Filippovich, M. V. Onufriev, D. I. Peregud, G. P. Bachurina, and M. S. Kritsky 358

Bioleaching of Sulfide Concentrate Containing Different Amounts of Copper and Zinc and Evaluation of Bioleach Residue Grade

N. V. Fomchenko and M. I. Muravyov 366

Conversion of Soybean Phytosterol into Androsta-4,9(11)-Diene-3,17-Dione

*T. S. Savinova, D. V. Dovbnya, S. M. Khomutov, A. V. Kazantsev, L. D. Huy,
N. V. Lukashev, and M. V. Donova* 373

Participation of Hydrogen Sulfide in Induction of Antioxidant System in Roots of Wheat Plantlets and Their Heat Resistance by Salicylic Acid

Yu. V. Karpets, M. A. Shkliarevskiy, E. I. Horielova, and Yu. E. Kolupaev 383

Effects of Associative Microorganisms on Plant Growth and Resistance to Xenobiotics and Phytopathogens

*S. V. Pigoleva, N. S. Zakharchenko, O. V. Furs, S. V. Tarlachkov, T. V. Funtikova,
A. E. Filonov, A. V. Aripovskii, O. V. Dyachenko, Y. I. Buryanov, and T. V. Shevchuk* 390

Development of Immunoenzyme Assay for Detection of Soybean Raw Material in Food Products

N. I. Smirnova, E. A. Zvereva, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev 401

УДК 577.21:577.15:637.334.2

ОСНОВНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ ХИМОЗИНОВ (ОБЗОР)

© 2020 г. С. В. Беленькая^{1, 4}, Д. В. Балабова², А. Н. Белов³,
А. Д. Коваль³, Д. Н. Щербаков^{1, 2}, В. В. Ельчанинов^{3, *}

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора,
Кольцово, 630559 Россия

²Алтайский государственный университет, Барнаул, 656049 Россия

³Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия, Барнаул, 656016 Россия

⁴Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: ve3636@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.11.2019 г.

После доработки 16.12.2019 г.

Принята к публикации 25.02.2020 г.

В обзоре обсуждаются основные биохимические свойства известных рекомбинантных химозин, используемых в сыроделии или претендующих на роль технологических коагулянтов молока. Рассмотрены параметры кинетики Михаэлиса-Ментен, молокосвертывающая активность, протеолитическая активность, специфичность и зависимость коагуляционной способности от pH и концентрации ионов кальция.

Ключевые слова: рекомбинантный химозин, кинетика Михаэлиса-Ментен, молокосвертывающая активность, протеолитическая активность, термостабильность, концентрация ионов кальция, pH-оптимум

DOI: 10.31857/S0555109920040030

Сыроделие является одной из древнейших биотехнологий. Коагуляция молока с использованием молокосвертывающих протеаз и последующее преобразование молочного сгустка в различные виды сыров используется человеком на протяжении примерно 8 тысяч лет [1, 2].

Традиционно эталоном молокосвертывающего фермента (**МФ**) для сыроделия считался натуральный коровий химозин (**Хн**) (КФ 3.4.23.4). Начиная с 90 гг. XX века в производстве сыров стал использоваться генно-инженерный Хн коровы (*Bos taurus*) [3]. В 2006 г. был открыт, а позднее внедрен в сыродельную практику рекомбинантный химозин (**рХн**) одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) [4], который по ряду технологических свойств превосходит рХн коровы, что делает его экономически более привлекательным при производстве большой группы сыров. В настоящее время на рынке сыродельных МФ присутствуют два эталонных коагулянта коровьего молока — рХн коровы и рХн одногорбого верблюда. Получение рХн верблюда стимулировало поиск других рХн, которые по совокупности биохимических свойств могут превосходить существующие эталоны.

В современной научной периодике имеются данные о получении и исследовании биохимических свойств рХн коровы [5–14], одногорбого верблюда [4, 12, 15], овцы (*Ovis aries*) [16], козы (*Capra hircus*) [12, 17–20], буйвола (*Bubalus bubalis*) [12, 21, 22], яка (*Bos grunniens*) [23, 24] и альпака (*Vicugna pacos*) [25]. Все эти животные относятся к отряду Парнокопытные (Artiodactyla).

Для синтеза рекомбинантных химозинов могут использоваться системы экспрессии бактерий (*Escherichia coli*), дрожжей (*Pichia (Komagataella) pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Kluyveromyces lactis*), плесневых грибов (*Aspergillus niger*), трансгенных высших млекопитающих и растений [5–28]. В настоящее время в производстве сыров официально применяются два генно-инженерных химозина — рХн коровы и одногорбого верблюда, синтезируемые в системах экспрессии *A. niger* var. *awamori* и *K. lactis* [27, 28].

О перспективах использования нового рХн в сыроделии может свидетельствовать комплекс его биохимических свойств и, прежде всего тех, которые традиционно используются для технологической оценки (характеристики) молокосвертывающих протеиназ, включающий: коагуляционную

или молокосвертывающую активность (**МА**), общую протеолитическую активность (**ПА**) и специфичность, термостабильность (**ТС**), зависимость МА от pH и концентрации ионов кальция.

Парадоксально, но в полном объеме комплекс биохимических свойств, важных с точки зрения технологии сыроделия, исследован только для 2 коммерческих рекомбинантных МФ — рХн коровы и одногорбого верблюда. В то же время остаются неизвестны параметры кинетики Михаэлиса—Ментен для рХн яка, альпака и овцы, отсутствуют данные о зависимости МА рХн козы и буйвола от концентрации ионов кальция и только еще предстоит установить ПА и специфичность рХн яка и зависимость его МА от концентрации хлорида кальция в молоке.

В данном обзоре рассмотрены наиболее важные, с точки зрения сыроделия, биохимические свойства известных рХн.

Отдельно следует отметить работу [29], в которой сообщается о получении в системе *S. cerevisiae* рХн игрунки обыкновенной (*Callithrix jacchus*) и исследовании его субстратной специфичности по отношению к синтетическим пептидам, отличающимся структурой от Хн-чувствительного участка к-казеина (**к-КЗ**) коровы. Однако натуральный Хн игрунки синтезируется в виде пепсиноподобного фермента, обладающего высокой общей ПА [30], что делает его малопривлекательным для использования в сыроделии. В этой связи свойства рХн *S. jacchus* не будут рассматриваться в данном обзоре.

Параметры кинетики Михаэлиса—Ментен. После получения нового рХн в первую очередь оценивается его МА на коровьем молоке, которое является основным сырьем для производства сыров. Параметры кинетики Михаэлиса—Ментен, включающие: константу Михаэлиса (K_m), число оборотов фермента (k_{cat}), каталитическую эффективность или константу специфичности (k_{cat}/K_m), — изучаются намного реже [4, 12, 19, 21, 31, 32], хотя именно они важны для полной биохимической характеристики нового рекомбинантного фермента. В настоящее время кинетические показатели определены для рХн 4 видов животных — коровы, одногорбого верблюда, козы и буйвола (табл. 1).

Отсутствие единой стандартизированной методики определения кинетических свойств химозинов, синтезированных про- и эукариотическими системами экспрессии и применение для этой цели различных хромогенных субстратов дает настолько противоречивые результаты, полученные разными научными группами (порой на одних и тех же рХн и субстратах), что их сравнение становится трудной задачей. Например, константы Михаэлиса, полученные разными исследовательскими группами (с использованием флюоресцентин тиокарбамоил-к-казеина [33]) для препаратов рХн буйвола, синтезированного в *P. pastoris*, раз-

личаются больше, чем в 15 раз [12, 21], а для рХн козы — более чем в 45 раз [12, 19] (табл. 1).

По данным портала BRENDA K_m натуральных Хн и рХн различного генеза варьируют от 0.0018 до 6.5 мМ, k_{cat} — от 0.02 до 2600 s^{-1} , k_{cat}/K_m — от 160 до 7100 $mM^{-1} s^{-1}$ и зависят от структуры используемого субстрата, pH, температуры и некоторых других факторов [https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.23.4]. В то же время результаты исследования [32] указывают на то, что такая важная посттрансляционная модификация, как гликозилирование, незначительно влияет на показатели ферментативной кинетики рХн верблюда и коровы (табл. 1).

Более информативными и поддающимися сравнительному анализу выглядят результаты, полученные на одном и том же субстрате в рамках одного исследования [4, 12, 31, 32]. Но даже в этом случае иногда приходится сталкиваться с труднообъяснимыми противоречиями. Так, согласно данным [4] значение K_m указывает на то, что аффинность рХн верблюда к хромогенному субстрату, имитирующему к-КЗ коровы, примерно вдвое выше по сравнению с коровьим рХн. В то же время рХн верблюда характеризуется гораздо меньшим (в 3.8 раза) значением числа оборотов фермента и меньшей (в 1.8 раза) каталитической эффективностью (табл. 1). Если оценивать способность рХн верблюда гидролизовать к-КЗ коровы исключительно по его кинетическим параметрам, полученным на модельном субстрате, то он значительно менее эффективен рХн коровы. Однако совокупность биохимических свойств [4] и практика использования этих ферментов в сыроделии [34–36] свидетельствует о более высокой технологической эффективности рХн одногорбого верблюда по сравнению с рХн коровы.

При оценке практических перспектив новых рХн необходимо задуматься о значимости результатов, полученных с использованием хромогенных субстратов, имитирующих изолированный водорастворимый к-КЗ.

Согласно поликонденсационной модели [37, 38], в молоке гидрофобный N-концевой участок к-КЗ находится во взаимодействии с α - и β -казеинами и частично погружен в казеиновую мицеллу, а гидрофильный анионный C-терминальный участок экспонирован на поверхности мицеллы, образуя стабилизирующий отрицательно заряженный “волосковый слой”. Химозину гораздо сложнее внедриться в этот слой и связаться с ключевой связью мицеллярного к-КЗ, чем в случае водорастворимого субстрата. Именно поэтому различаются кинетические параметры, полученные на водорастворимых аналогах к-КЗ и препаратах мицеллярного к-КЗ [39, 40].

Наиболее подходящим искусственным субстратом для изучения кинетики Михаэлиса—

Таблица 1. Параметры кинетики Михаэлиса-Ментен рекомбинантных химозинов

Вид Хн	Продуцент	K_m , мМ	k_{cat} , s^{-1}	k_{cat}/K_m , $мМ^{-1} s^{-1}$	Субстрат*	Источник
рХн В коровы	<i>E. coli</i>	0.38	18.9	49.7	1	[31]
рХн В коровы (мутант: + + His-Gly на С-конце)	<i>E. coli</i>	0.67	2.52	3.8	1	[31]
рХн В коровы (мутант: Thr77 → Asp)	<i>E. coli</i>	0.79	16.8	21.3	1	[31]
рХн коровы	<i>A. niger</i>	0.165	44.3	268.0	2	[4]
рХн одногорбого вер- блюда	<i>A. niger</i>	0.077	11.7	152.0	2	[4]
рХн коровы	<i>A. niger</i>	0.134	4.3	32.2	3	[4]
рХн одногорбого вер- блюда	<i>A. niger</i>	0.056	5.1	91.3	3	[4]
рХн коровы (Pfizer)	<i>E. coli</i>	2.280	—	—	4	[34]
рХн буйвола	<i>P. pastoris</i>	0.012	—	—	4	[21]
рХн козы	<i>P. pastoris</i>	0.0178	—	—	4	[19]
рХн буйвола	<i>P. pastoris</i>	0.00076	0.00104	1.37	4	[12]
рХн козы	<i>P. pastoris</i>	0.00039	0.00331	8.49	4	[12]
рХн коровы (ChyMax, Chr. Hansen)	<i>A. niger</i>	0.00819	0.00621	0.76	4	[12]
рХн одногорбого вер- блюда (ChyMax М, Chr. Hansen)	<i>A. niger</i>	0.00060	0.00032	0.53	4	[12]
рХн коровы (ChyMax, Chr. Hansen), негликозилиро- ванный	<i>A. niger</i>	0.038 (рН 6.65) 0.026 (рН 6.00) 0.022 (рН 5.50)	8 (рН 6.65) 28 (рН 6.00) 28 (рН 5.50)	0.2 (рН 6.65) 1.1 (рН 6.00) 1.3 (рН 5.50)	5	[32]
рХн коровы (ChyMax, Chr. Hansen), моногликозили- рованный	<i>A. niger</i>	0.037 (рН 6.65) 0.028 (рН 6.00) 0.026 (рН 5.50)	7 (рН 6.65) 27 (рН 6.00) 28 (рН 5.50)	0.2 (рН 6.65) 1.0 (рН 6.00) 1.1 (рН 5.50)	5	[32]
рХн одногорбого вер- блюда (ChyMax М, Chr. Hansen), негликозилиро- ванный	<i>A. niger</i>	0.018 (рН 6.65) 0.011 (рН 6.00) 0.007 (рН 5.50)	11 (рН 6.65) 53 (рН 6.00) 47 (рН 5.50)	0.6 (рН 6.65) 5.0 (рН 6.00) 6.8 (рН 5.50)	5	[32]
рХн одногорбого вер- блюда (ChyMax М, Chr. Hansen), дигликозилиро- ванный	<i>A. niger</i>	0.020 (рН 6.65) 0.011 (рН 6.00) 0.008 (рН 5.50)	14 (рН 6.65) 65 (рН 6.00) 59 (рН 5.50)	0.7 (рН 6.65) 5.8 (рН 6.00) 7.4 (рН 5.50)	5	[32]

*1 — L-S-F(NO₂)-Nle-A-L-OMe [31]; 2 — H-P-H-P-H-L-S-(p-NO₂)F-M-A-I (имитация κ-КЗ коровы) [4]; 3 — R-P-R-P-R-P-S-(p-NO₂)F-I-A-I (имитация κ-КЗ верблюда) [4]; 4 — флуоресцеин тиокарбамоил-κ-казеин коровы [33]; 5 — Dabcyl-H-P-H-P-H-L-S-F-M-A-I-P-K(5-FAM)-K-K [32].

Ментен химозинов мог бы стать С-терминальный фрагмент κ-КЗ коровы (например, κ f96-169), закрепленный N-концевым участком на поверхности белковых (α-, β-казеиновых) или фосфолипидных мицелл или связанный с искусственной гидрофобной поверхностью.

Молокосвертывающая активность, общая протеолитическая активность и специфичность. Молокосвертывающая активность является главной характеристикой любого нового МФ, поскольку указывает на его способность гидролизовать в молекуле κ-КЗ пептидную связь F105—M106, чув-

ствительную к действию Хн, и вызывать коагуляцию молока.

Специалистам в области сыроделия хорошо известен так называемый “парадокс химозина коровы и молока верблюда”, который заключается в том, что Хн коровы не коагулирует верблюжье молоко (или коагулирует, но очень медленно), что делает невозможным использование коровьего фермента для производства сыров из молока верблюда [13, 27, 41–43]. Для решения этой проблемы и выработки сыров из верблюжьего молока был получен рХн одnogорбого верблюда. При его исследовании обнаружилось, что верблюжий рХн не только эффективно свертывал коровье молоко, но и превосходил рХн коровы по удельной МА и низкому уровню неспецифической ПА [4]. Парадокс “Хн коровы – молоко верблюда” наиболее известный, но не единственный случай “конфликта” гетерологичных химозинов и молока различных видов млекопитающих. Согласно данным литературы, кроме верблюжьего молока, Хн коровы не способен коагулировать молоко лошади (*Equus caballus*) [27] и одного из представителей инфракласса сумчатых млекопитающих – лисьего кузу (*Trichosurus vulpecula*) [44]. Оказалось также, что Хн коровы, по-видимому, намного медленнее свертывает молоко крысы (*Rattus norvegicus*) и кролика (*Oryctolagus cuniculus*), чем молоко коровы (*B. taurus*), козы (*C. hircus*) и северного оленя (*Rangifer tarandus*) [45]. Поэтому изучение любого нового МФ для перспективы использования в сыроделии начинается с определения его МА по отношению именно к коровьему молоку, которое является основным сырьем для производства сыров.

Химозины способны гидролизовать пептидные связи не только в к-КЗ но и в других белках, в частности в α - и β -казеинах. Характеризуя новый рХн и оценивая его пригодность для выработки сыров, наряду с коагуляционной, крайне важно учитывать его протеолитическую активность [4, 46, 47]. В сыроделии различают два типа ПА: специфическую или молокосвертывающую активность, характеризующую способность гидролизовать одну пептидную связь в молекуле к-КЗ (для рХн коровы – это связь F105-M106 в коровьем к-КЗ) и общую ПА, характеризующую способность гидролизовать в α -, β - и к-казеинах молока любые пептидные связи на которые специфически действует фермент [47]. Общую ПА молокосвертывающих ферментов также называют неспецифической ПА.

Высокая общая ПА коагулянта молока считается негативным фактором в сыроделии, поскольку приводит к снижению выхода готовой продукции из-за потерь с сывороткой продуктов протеолиза [48]. Оставшийся в сырном зерне МФ с высокой общей ПА может стать причиной формирования пороков текстуры и вкуса (горечь) в длительно со-

зревающих и хранящихся сырах [49]. Применение МФ с высокой ПА ухудшает технологические характеристики подсырной сыворотки, используемой в качестве сырья при производстве некоторых продуктов. В связи с этим идеальный МФ для сыроделия при максимальной МА должен иметь минимальную общую ПА [47, 50].

Для оценки способности МФ гидролизовать единственную, “ключевую” связь к-КЗ, рассчитывается специфичность его действия, которая определяется как отношение МА и общей ПА (МА/ПА). По мере уменьшения специфичности используемые в сыроделии МФ ранжируются следующим образом: рХн верблюда > рХн коровы, натуральный Хн коровы > говяжий пепсин (КФ 3.4.23.1) > мукопепсины (КФ 3.4.23.23) > эндотиापепсин (КФ 3.4.23.22) [50]. Представленный ряд отражает универсальность МФ, выражающуюся в том, что чем выше его специфичность, тем он универсальнее, и указывает на возрастающую вероятность развития пороков вкуса и консистенции сыров с длительными сроками созревания и хранения при использовании коагулянта с высокой ПА [25].

Данные о МА, общей ПА и специфичности рХн различных видов представлены в табл. 2.

В работе [25] был описан рХн альпака, который по специфичности превосходил рХн коровы, буйвола и козы, но уступал рХн верблюда. Следует отметить, что рекомбинантные химозины верблюда и альпака не являются единственными МФ, превосходящими по специфичности рХн коровы. Показано, что рХн буйвола и козы характеризуются лучшими соотношениями МА/ПА, чем рХн коровы, но общая ПА этих ферментов и коровьего рХн почти совпадают [12]. Противоречие данных о МА, общей ПА и специфичности рХн верблюда и рХн коровы, опубликованных в работах [12] и [4], по-видимому, объясняется использованием различных методических подходов при определении этих параметров. Вместе с тем, информация, приведенная в работе [4], о более высокой специфичности рХн верблюда по сравнению с рХн коровы, подтверждается данными других авторов, изучавших общую ПА этих ферментов непосредственно в сырах [34, 35].

Получению и исследованию рХн яка посвящены работы [23] и [24]. В первой публикации была описана процедура получения рХн яка и оценена только МА полученного препарата, которая составила 14.6 ед. Сокслета/мл [23]. Вторая работа посвящена крупномасштабному получению рХн А яка (*Bos grunniens*). К сожалению, биохимические свойства полученного в работе [24] фермента изучены неполно. Так, не была определена общая ПА, поэтому не было возможности рассчитать специфичность, отсутствовали данные о зависимости МА от концентрации ионов кальция. Тем не менее,

Таблица 2. Молокосвертывающая активность (МА), общая протеолитическая активность (ПА) и специфичность (МА/ПА) рекомбинантных химозинов (по данным [25], с дополнениями)

Вид химозина	МА*, % от МА рХн коровы	ПА, % от ПА рХн коровы	МА/ПА	Система экспрессии	Источник
рХн альпака	102	34	3.0	<i>E. coli</i>	[25]
рХн коровы	100	100	1.0	<i>E. coli</i>	[25]
рХн одногорбого верблюда	170	25	6.8	<i>A. niger</i>	[4]
рХн коровы	100	100	1.0	<i>A. niger</i>	[4]
рХн овцы	≈100**	≈98**	≈1.0	<i>E. coli</i>	[16]
рХн коровы	100	100	1.0	<i>K. lactis</i>	[16]
рХн буйвола	105	96	1.1	<i>P. pastoris</i>	[12]
рХн одногорбого верблюда	99	110	0.9	<i>A. niger</i>	[12]
рХн козы	148	106	1.4	<i>P. pastoris</i>	[12]
рХн коровы	100	100	1.0	<i>A. niger</i>	[12]
рХн яка	214***	—	—	<i>P. pastoris</i>	[24]

* По отношению к молоку коровы.

** Результаты исследования ПА и МА представлены в виде графиков, цифровые данные отсутствуют.

*** Значения МА даны в IMCU/мл.

была выработана опытная партия сыра с применением рХн яка и проведена контрольная выработка с использованием коммерческого рХн коровы (RENMAX 600 IMCU/мл, “Mayasan”, Турция). Выход сыра в контроле составил 12.5%, в опыте — 12.0% [24]. Несколько меньший выход сыра в опытной выработке свидетельствовал о потерях белка с сывороткой, что косвенно указывало на более высокую общую ПА рХн яка по сравнению с контрольным рХн коровы.

В работе [16] сообщалось о получении и частичной характеристике рХн овцы. ПА овечьего рХн изучали по изменению соотношения небелкового и общего азота, определенного методом Кьельдаля. В сырах, выработанных с применением рХн овцы, общая ПА была на 28% ниже, чем в контроле с использованием рХн коровы. В этой работе [16] отсутствовали данные о концентрации или активности рХн овцы и рХн коровы в исследованных сырах. Вместе с тем, в сырном зерне могут оставаться до 30% внесенного МФ в зависимости от типа коагулянта, рН, температуры и содержания влаги [51]. Согласно данным [52] в сырах типа Чеддар (Cheddar) остается 10.0–17.5% рХн коровы. Поэтому не исключено, что различные концентрации продуктов протеолиза в контрольных и опытных сырах были обусловлены различным содержанием рХн овцы и рХн коровы, оставшихся в сыре, а не различной общей ПА используемых коагулянтов. Данные работы [16] о соотношении МА и общей ПА рХн овцы и коровы, полученные в процессе коагуляции молока, указывают на то, что специфичность этих ферментов примерно одинакова.

Таким образом, большинство полученных и охарактеризованных рХн уступают по общей ПА и специфичности двум коммерческим генно-инженерным химозинам (одногорбого верблюда и коровы), а также рекомбинантному Хн альпака.

Термостабильность. Термостабильность можно охарактеризовать как диапазон температур, при которых МФ проявляет высокую (≥80%) МА. Порог термоинактивации — это температура, при которой раствор МФ начинает терять МА. Термостабильность, наряду с МА, общей ПА и специфичностью, является важнейшей биохимической характеристикой МФ. На стадии свертывания молока под воздействием Хн не гидролизуются αs- и β-казеины. Протеолитическая деградация пара-казеина (f E1-F105), а также αs1-, αs2- и β-казеинов, активным ферментом, остающимся в сгустке, начинается позже, в процессе созревания сыра [34, 52]. В результате гидролиза казеинов образуются пептиды и аминокислоты, а также продукты их деградации и биохимической модификации, которые влияют на формирование физико-химических и органолептических показателей сыра. Поэтому данные о ТС коагулянта молока позволяют не только правильно определить сферу применения МФ, но и регулировать степень протеолиза и сроки созревания сыров путем варьирования температуры обработки сырного зерна [25].

Верблюжий рХн имеет более высокий порог термоинактивации, чем рХн коровы, а общая ПА этих ферментов возрастает при повышении температуры [4]. Аналогичные результаты были получены в работе [25] для рХн коровы и альпака, синтезированных в системе *E. coli*. Таким образом, термостабильный МФ может увеличивать

нежелательную ПА после разрезания молочного сгустка на технологических стадиях обработки сырного зерна, связанных с повышением температуры.

Результаты, полученные в работе [4], согласуются с данными других работ, в которых было установлено, что интенсивность протеолиза в сырах типа Reggiano зависит от 2 параметров: ТС используемого коагулянта и температуры второго нагревания [34].

Известно, что в молекуле α s1-казеина химозины атакуют связь F23–F24. В результате образуются два продукта: α s1 (f1-23) и α s1-I (f24-199), которые используют в качестве маркеров общей ПА в сырах. При выработке сыров типа Reggiano с применением рХн коровы было показано, что увеличение температуры обработки сырного зерна с 50 до 56°C приводит к значительному снижению концентрации продуктов протеолиза α s1-казеина, в частности, водонерастворимого (гидрофобного) полипептида α s1-I (f24-199). Происходит это вследствие более полной инактивации МФ при повышении температуры. В сырах с температурой второго нагревания 56°C, выработанных с применением более термостабильного рХн верблюда [4, 12], интенсивность протеолиза была выше, чем при использовании рХн коровы [34]. Данное исследование является примером того, что МФ (в данном случае – рХн верблюда), имеющий уровень общего протеолиза вчетверо меньший, чем рХн коровы, но превосходящий его по ТС, может проявлять более высокую неспецифическую ПА в созревающих и хранящихся сырах.

В сыроделии МФ с различной ТС используют дифференцировано. Термолабильные ферменты применяют при выработке полутвердых, твердых и сверхтвердых сыров с высокой температурой второго нагревания (52–58°C) и длительными сроками созревания и хранения. После второго нагревания термолабильный МФ инактивируется и не вносит вклад в процессы вторичного протеолиза, который в этом случае зависит только от активности протеолитических ферментов заквасочной микрофлоры. Термостабильные МФ целесообразно использовать для производства мягких сыров с короткими сроками созревания и хранения или при выработке сыров без созревания [25].

Данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют, что рХн одних и тех же видов, полученные при помощи разных систем экспрессии, могут различаться по ТС. В частности, пороги полной температурной инактивации для рХн верблюда, синтезированного в системах высших плесневых грибов (*A. niger*) [4] и дрожжей (*P. pastoris*) [15], различаются на 10°C. По данным работы [12] верблюжий рХн, полученный в системе *A. niger*, сохранял $\approx 35\%$ от исходной МА даже после инкубации при 70°C.

В работе [12] показано, что генно-инженерный Хн буйвола, продуцированный *P. pastoris*, при 60°C полностью инактивируется, а согласно исследованиям [22] рХн буйвола, полученный в той же системе экспрессии, при 60°C сохранял 37% МА. Наблюдаемые вариации могут объясняться различными условиями определения ТС, включающими значения МА исследуемых ферментов, величины рН, концентрации ионов Ca^{2+} , белковые добавки и продолжительность прогревания. По-видимому, при постановке функционального теста оптимальная длительность прогревания раствора исследуемого рХн должна быть равна 30 мин, поскольку имитирует среднюю продолжительность стадии второго нагревания и последующей обработки сырного зерна.

Наиболее достоверный результат определения ТС и порога термоинактивации дает метод дифференциальной сканирующей калориметрии, позволяющий с высокой точностью регистрировать процесс тепловой денатурации (плавления) белков и определять температуру перехода (T_m) между нативной и полностью денатурированной структурой фермента. Такие данные приведены в работе [13] для 2 коммерческих коагулянтов молока – рХн коровы и одnogорбого верблюда, синтезированных в *A. niger*. В этой работе также изучено влияние степени гликозилирования рекомбинантных Хн на ТС. Из промышленных препаратов рХн одnogорбого верблюда были выделены варианты фермента с различным количеством углеводных остатков и определены их температуры плавления. Агликозилированный верблюжий рХн характеризовался самыми низкими T_m в диапазоне 59.05–59.35°C. Моногликозилированный (N100) белок проявлял повышенную устойчивость при нагревании – его T_m увеличивалась до 61.25°C. Дигликозилированная по остаткам N100 и N291 форма рХн верблюда характеризовалась промежуточными точками плавления в диапазоне 59.85–60.45°C [13].

В общем массиве данных отдельно стоит работа [14], в которой ТС рХн коровы оценивали не по остаточной МА, а по реологическому параметру – модулю упругости (G') молочного сгустка.

Можно предположить, что высокая термостабильность рХн коровы и альпака, наблюдаемая в работе [25], связана с особенностями их синтеза в системе *E. coli*. Известно, что у про- и эукариотов фолдинг и посттрансляционный процессинг синтезируемых *de novo* рекомбинантных белков протекает по-разному [53–55]. Этим могут быть обусловлены наблюдаемые различия в ТС между коммерческим рХн коровы, полученным в эукариотической системе (*A. niger*), и рХн коровы и альпака, продуцируемыми прокариотической системой (*E. coli*). С одной стороны, высокая ТС существенно ограничивает сферу промышленного

Таблица 3. Термостабильность рекомбинантных химозинов различного генеза (по данным [25], с дополнениями)

Вид химозина, продуцент	Диапазон ТС, °C	Комментарии
рХн коровы, <i>A. niger</i> ¹	5–52.5	Полная инактивация при >55°C
рХн одногорбого верблюда, <i>A. niger</i> ¹	5–55.0	Полная инактивация при 60°C
рХн одногорбого верблюда, <i>P. pastoris</i> ²	45–50	Полная инактивация при 70°C
рХн овцы, <i>E. coli</i> ³	≈25–50*	При 40°C ≈ 100%, при 50°C ≈ 30% МА
рХн козы, <i>P. pastoris</i> ⁴	≈35–45*	При 50°C ≈ 45% МА, при 70°C ≈ 10% МА
рХн буйвола, <i>P. pastoris</i> ⁴	≈30–37*	При 50°C ≈ 20% МА, при 60°C ≈ 0% МА
рХн одногорбого верблюда, <i>A. niger</i> ⁴	≈25–40*	При 50°C ≈ 45% МА, при 70°C ≈ 35% МА
рХн коровы <i>A. niger</i> ⁴	≈35–40*	При 50°C ≈ 20% МА, при 65°C ≈ 0% МА
рХн коровы, <i>E. coli</i> ⁵	35–50	При 60°C – 23% от исходной МА
рХн альпака, <i>E. coli</i> ⁵⁾	35–55	При 55°C – 164% МА, при 60°C – 144% МА
Коммерческий рХн коровы (ChyMax, “Chr. Hansen”), <i>A. niger</i> ⁵	35–40	При 45°C ≈ 56% МА, при 55°C – <1% МА
рХн яка, <i>P. pastoris</i> ⁶	30–40	Полная инактивация при 70°C
Коммерческий рХн коровы (ChyMax, “Chr.Hansen”), <i>A. niger</i> ⁷⁾	57.65	Указан порог (°C) тепловой денатурации.
Коммерческий рХн одногорбого верблюда (ChyMax М, “Chr.Hansen”), <i>A. niger</i> ⁷	60.65	Указан порог (°C) тепловой денатурации.
рХн козы, <i>P. pastoris</i> ⁸⁾	≈30–40*	Полная инактивация при 70°C
рХн коровы, <i>P. pastoris</i> ⁹	30–40	Параметр – модуль упругости (G'). При 30°C – 68.7 Па, при 40°C – 77.1 Па, при 50°C – 50.7 Па
рХн буйвола, <i>P. pastoris</i> ¹⁰	30–42	При 35–38°C – 100% МА, при 60°C – 37% МА
рХн коровы, <i>P. pastoris</i> ¹¹	25–37°C	При 37°C – 100% МА, при 42°C – 25% МА

¹ [4], время прогревания – 12.5 ч, в присутствии бычьего сывороточного альбумина; ² [15], время прогревания – 10 мин; ³ [16], время прогревания не указано; ⁴ [12], время прогревания – 60 мин; ⁵ [25], время прогревания – 30 мин; ⁶ [24] время прогревания – 60 мин; ⁷ [13], калориметрия, температура фазового перехода нативный – денатурированный фермент (Tm); ⁸ [19], время прогревания – 60 мин; ⁹ [14], время прогревания – 30 мин, измеряемый параметр – модуль упругости (G'); ¹⁰ [22], время прогревания – 60 мин; ¹¹ [9], время прогревания – не указано; *результаты исследования представлены в виде графиков, цифровых данных нет.

применения рХн альпака и предполагает его использование только при производстве сыров с короткими сроками созревания и хранения. С другой стороны, не исключено, что очень низкая общая ПА рХн альпака способна, хотя бы частично, нивелировать негативный эффект его высокого порога термоинактивации. Для ответа на вопрос, какова сфера применения рХн альпака, превосходящего по уровню общей ПА эталонный коммерческий рХн коровы почти в 3 раза, но имеющего более широкий диапазон термостабильности, – необходимо апробировать фермент при выработке сыра [25].

Исключительно термолабильный рХн В коровы был получен в экспрессионной системе *P. (Komagataella) pastoris* (штамм GS115) [9]. По данным, приведенным в этой работе, полученный рХн имел очень низкий порог термоинактивации, равный примерно 37°C.

Таким образом, ТС известных рекомбинантных химозинов может варьировать в зависимости от метода и условий определения этого технологического параметра, вида источника гена и системы экспрессии, в которой получен МФ. Все, полученные в настоящее время генно-инженерные химозины, охарактеризованы по ТС.

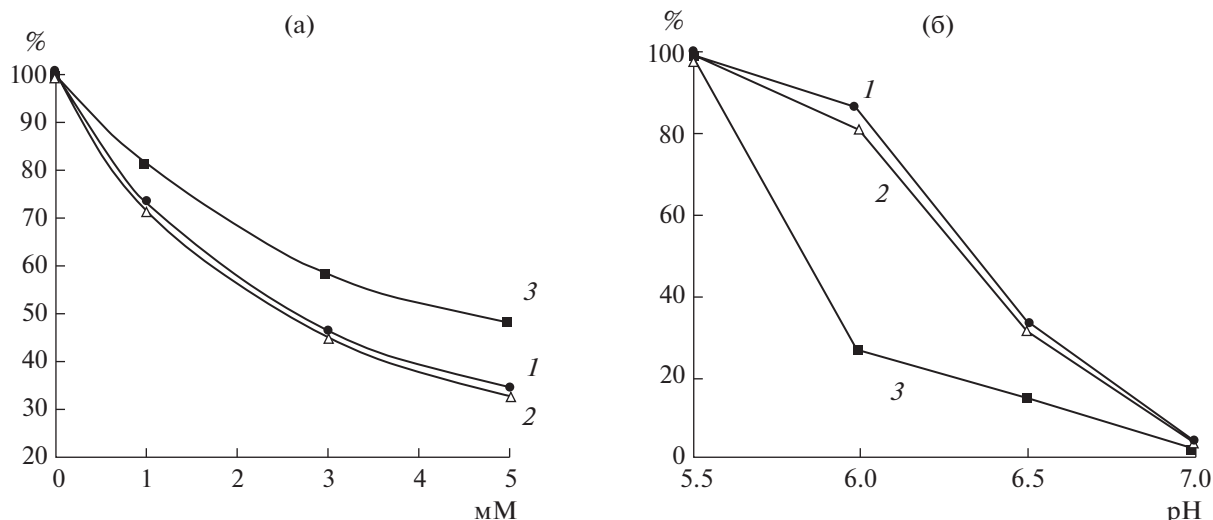


Рис. 1. Зависимость молокосвертывающей активности (%) коммерческого рХн коровы (продуцент — *A. niger*, 1), рХн коровы (продуцент — *E. coli*, 2) и рХн альпака (продуцент — *E. coli*, 3) от концентрации хлорида кальция (мМ, а) и рН молочного субстрата (б) [25].

Зависимость молокосвертывающей активности от концентрации ионов кальция. Ионы кальция ускоряют сычужное свертывание молока. Свежевыдоенное коровье молоко содержит ≈ 30 мМ кальция, при этом его большая часть ($\sim 68\%$) связана с казеиновыми мицеллами в виде коллоидного или аморфного моногидрофосфата (CaHPO_4), а в ионизированной форме находится примерно 1 мМ [56].

При промышленном производстве большинства видов сыров молоко проходит стадию пастеризации (например, при $71\text{--}76^\circ\text{C}$ с выдержкой 20–25 с). С повышением температуры растворимость кальциевых солей фосфорной кислоты падает, поэтому при пастеризации молока часть присутствующих в нем ионов кальция необратимо осажается в виде нерастворимого фосфата кальция. Это приводит к снижению концентрации Ca^{2+} и увеличению продолжительности свертывания молока под действием МФ. Для компенсации этого феномена после пастеризации в молоко вносится 0.1–0.5 г/л ($\approx 1\text{--}5$ мМ) CaCl_2 . Внесение хлорида кальция улучшает коагуляционную способность пастеризованного молока по двум причинам. Во-первых, Ca^{2+} частично экранирует отрицательный заряд поверхности казеиновых мицелл и пептидная связь F105–M106 в молекуле к-КЗ, расположенная в “волосковом” слое, становится более доступной для гидролиза МФ. Во-вторых, Ca^{2+} участвует в образовании ионных “мостиков” между дестабилизированными мицеллами, что ускоряет их агрегацию и формирование молочного сгустка [57]. Внесение дополнительного количества хлорида кальция в молоко также применяется в практике сыроделия с це-

лью улучшения коагуляционных и технологических свойств сычужно-вялого сыра [58].

Однако увеличение концентрации хлорида кальция на 1–5 мМ вызывает не только повышение МА, но и общей ПА фермента, особенно на стадии коагуляции. По данным [15] ферментативная активность рХн одногорбого верблюда возрастает в диапазоне 0–20 мМ CaCl_2 примерно в 5 раз, а максимальная свертывающая активность наблюдается при его концентрации 20–40 мМ. В связи с этим при использовании МФ, высокочувствительного к концентрации Ca^{2+} , всегда следует учитывать опасность увеличения общей ПА и ее негативные последствия. Поэтому при производстве сыров из пастеризованного молока стремятся использовать минимально необходимые дозы CaCl_2 . Чувствительность МФ к содержанию Ca^{2+} , эквивалентная или меньшая, чем чувствительность эталонного фермента (Хн коровы), является положительным фактором, так как позволяет варьировать количество вносимого хлорида кальция, не беспокоясь о значительных изменениях МА и ПА.

Коагуляционная активность рХн альпака по сравнению с коммерческим рХн коровы менее чувствительна к повышению концентрации Ca^{2+} в молочном субстрате (рис. 1а). При увеличении концентрации CaCl_2 от 1 до 5 мМ свертывающая активность рХн альпака возрастала на 19–52%. В этом же диапазоне концентраций хлорида кальция увеличение МА коммерческого рХн коровы составляло 27–66%. В присутствии 3 мМ CaCl_2 (концентрация, наиболее часто используемая в сыроделии) коагуляционная активность рХн аль-

Таблица 4. Оптимумы pH действия рекомбинантных химозинов различной видовой принадлежности (по данным [25], с дополнениями)

Вид химозина, <i>продуцент</i>	pH-оптимум	Субстрат	Источник
pXн буйвола, <i>P. pastoris</i>	≈4.6	Обезжиренное молоко (26%)	[21]
pXн козы, <i>P. pastoris</i>	5.5	Обезжиренное молоко (26%)	[19]
pXн одногорбого верблюда, <i>P. pastoris</i>	5.0	Обезжиренное молоко (26%)	[15]
pXн коровы, <i>P. pastoris</i>	5.0	Цельное молоко коровы	[14]
pXн альпака, <i>E. coli</i>	≤5.5	Обезжиренное молоко (10%)	[25]
pXн овцы, <i>E. coli</i>	≤6.0	Обезжиренное молоко (11%)	[16]
pXн яка, <i>P. pastoris</i>	6.0	Обезжиренное молоко (26%)	[24]
pXн коровы, <i>A. niger</i>	4.9	Синтетический аналог к-КЗ	[4]
pXн одногорбого верблюда, <i>A. niger</i>	5.1	Синтетический аналог к-КЗ	[4]
pXн коровы, <i>P. pastoris</i>	5.5	Обезжиренное молоко (26%)	[9]
pXн буйвола, <i>P. pastoris</i>	5.5	Восстановленное обезжиренное молоко коровы	[22]

пака увеличивалась на 42%, а активность коммерческого pXн коровы — на 54% [25].

По данным [16] pXн овцы проявлял умеренную чувствительность к концентрации Ca^{2+} , близкую к чувствительности pXн коровы.

При концентрации CaCl_2 в молоке коровы в диапазоне 0–2 мМ и pH 6.6 коагуляционная активность pXн верблюда была на 10% выше, чем активность pXн коровы [4].

Таким образом, из 7-ми рекомбинантных Xн, полученных в настоящее время, зависимость МА от концентрации хлорида кальция установлена для 4-х (коровы, одногорбого верблюда, овцы и альпака). Зависимость МА pXн одногорбого верблюда, овцы и альпака от концентрации CaCl_2 сопоставима с pXн коровы и удовлетворяет требованиям сыроделия.

Зависимость молокосвертывающей активности от pH субстрата. Технология производства большинства сыров предусматривает подготовку молока перед внесением в него МФ. В исходное цельное молоко, имеющее pH ≈ 6.7, добавляют концентрат молочнокислых бактерий и инкубируют полученную смесь в течение 30–40 мин при 32–35°C. Развивающаяся микрофлора закваски начинает потреблять лактозу с образованием лактата, что приводит к снижению pH молока. Как правило, для получения сгустка МФ вносится в молочную смесь при pH 6.5–6.6. В связи с этим одним из основных требований к МФ является способность эффективно коагулировать молоко при слабокислом pH [25].

Даже незначительные колебания pH приводят к существенному изменению баланса сил, стабилизирующих мицеллы казеина, что отражается на технологических свойствах молока, в частности, на

времени его сычужного свертывания. При увеличении концентрации H^+ продолжительность коагуляции зависит не только от нарастающей активности молокосвертывающих ферментов, оптимумы ферментативной активности которых соответствуют кислому pH (табл. 4), но и от электростатических и гидрофобных параметров мицелл казеина.

Подкисление молока приводит к уменьшению отрицательного заряда казеинов вследствие приближения pH к значениям pI казеинов. Снижение суммарного отрицательного заряда уменьшает силы электростатического отталкивания между мицеллами и одновременно усиливает казеин-казеиновые гидрофобные взаимодействия, что ускоряет образование молочного сгустка [50, 57].

При увеличении pH и его удалении от pI казеинов увеличиваются их суммарные отрицательные заряды. В результате, силы межмицеллярного электростатического отталкивания нарастают, что препятствует сближению казеиновых мицелл и замедляет образование сгустка при ферментативной коагуляции молока. Поэтому при увеличении pH молочной смеси в диапазоне 5.0–7.0 продолжительность сычужного свертывания должна увеличиваться [57].

Зависимость МА коммерческого pXн коровы и экспериментальных pXн коровы и альпака от pH молочного субстрата (рис. 16) изучена в работе [25]. При pH 6.0 коммерческий (полученный из *A. niger*) и экспериментальный (полученный из *E. coli*) pXн коровы демонстрировали высокую коагуляционную активность, равную 82–86% от максимальной. По мере приближения к нейтральным значениям pH МА всех ферментов начинала быстро снижаться. Так, при pH 7.0 коагуляционная активность коровых pXн снижалась более

чем на 96% от исходных значений (при pH 5.5). Эти результаты согласуются с данными работ [4] и [12], в которых наблюдалась аналогичная зависимость МА рХн коровы от pH субстрата. При повышении pH динамика снижения МА рХн альпака (синтезированного в системе *E. coli*) отличалась от поведения коровых рХн. При pH 6.0 МА рХн альпака составляла $\approx 27\%$ и была на 55–59% меньше МА коровых рХн. После резкого падения МА при pH 6.0 снижение активности замедлялось и при pH 6.5 разница в скорости свертывания молока между коагулянтами альпака и коровы не превышала 19%. При pH 7.0 все три фермента почти полностью утрачивали МА (рис. 16).

По динамике изменения МА в зависимости от pH субстрата рХн альпака очень похож на рХн верблюда, претендующего в настоящее время на роль заменителя рХн коровы. По данным [15] коагуляционная активность рХн верблюда, полученного в *P. pastoris*, при pH 6.0 и 6.5 составляла ≈ 18 и $\approx 16\%$ от максимальных значений, наблюдавшихся при pH 5.0 соответственно.

Аналогичную зависимость МА от pH демонстрировал и рХн овцы, полученный в экспрессионной системе *E. coli*. В диапазоне pH 6.0–6.4 фермент проявлял высокую МА, которая постепенно снижалась при увеличении pH с 6.4 до 6.8. При pH субстрата, равном 6.8, рХн овцы утрачивал $\approx 90\%$ исходной максимальной МА [16].

Максимальная МА рХн буйвола при свертывании восстановленного обезжиренного молока коровы наблюдалась при pH 5.5, а при подщелачивании субстрата до pH 6.5 коагуляционная активность снижалась на 34% [22]. По данным [21] pH-оптимум рХн буйвола составлял ≈ 4.6 , в диапазоне pH 5.5–6.5 фермент сохранял $\approx 90\%$ МА, а при pH > 7.0 быстро утрачивал свертывающую активность и при pH 7.5 проявлял не более 5% МА.

Обращают на себя внимание зависимости МА от pH рХн яка и козы, которые были синтезированы в системе *P. pastoris*. В отличие от большинства рХн парнокопытных, рХн яка демонстрировал высокую (более 80%) коагуляционную активность в диапазоне pH, равном 5.5–7.0, и начинал терять способность свертывать молоко коровы при pH > 7.0 . Но даже при pH 7.5 рХн яка сохранял около 40% от максимального значения МА, наблюдавшегося при pH 6.0 [24]. Зависимость МА от pH субстрата, схожую с рХн яка, проявлял и рХн козы (также полученный в системе *P. pastoris*), который характеризовался МА близкой к $\approx 100\%$ в диапазоне pH 3.5–5.5 и плавным ее снижением до $\approx 50\%$ при pH 8.0–9.0 [12].

Можно предположить, что расход рекомбинантных Хн козы и яка при свертывании молочной смеси с pH около 6.5 будет ниже, чем для большинства генно-инженерных Хн, быстро теряющих МА при pH ≥ 6.5 . В связи с этим наиболее

перспективными по характеру зависимости МА от pH являются химозины, медленно инактивирующиеся при удалении от pH-оптимума в щелочную область и способные проявлять в диапазоне pH 6.5–7.0 высокую коагуляционную активность. Пример рХн козы и яка не исключает, что в дальнейшем такие коагулянты будут найдены.

Таким образом, в настоящее время получены генно-инженерные химозины 7-ми видов млекопитающих, относящихся к отряду Парнокопытные. Комплекс основных биохимических характеристик, имеющих технологическое значение, изучен только для рХн коровы и однокорбного верблюда, широко применяемых в промышленном производстве сыров. Рекомбинантные химозины 5 оставшихся видов охарактеризованы неполно. Несмотря на наличие у рХн козы, овцы, буйвола, яка и альпака отдельных параметров, привлекаемых для сыроделия, все они уступают рХн коровы и верблюда по совокупности биохимических свойств.

Раздел обзора, посвященный параметрам кинетики Михаэлиса-Ментен, выполнен при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 19-44-220010 p_a). Разделы обзора, посвященные протеолитической активности, термостабильности, зависимости коагуляционной активности от концентрации хлорида кальция и pH, выполнены в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (номер темы FZMW-2020-0002, “Разработка продуцентов рекомбинантных ферментов для сыроделия”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Salque M., Bogucki P.I., Pyzel J., Sobkowiak-Tabaka I., Grygiel R., Szmyt M., Evershed R.P. // *Nature*. 2013. V. 493. № 7433. P. 522–525.
2. Evershed R.P., Payne S., Sherratt A.G., Copley M.S., Coolidge J., Urem-Kotsu D., Kotsakis K., Özdoğan M., Özdoğan A.E., Nieuwenhuys O., Akkermans P.M.M.G., Bailey D., Andeescu R.-R., Campbell S., Farid S., Hodder I., Yalman N., Özbaşaran M., Bıçakcı E., Garfinkel Y., Levy T., Burton M.M. // *Nature*. 2008. V. 455. № 7212. P. 528–531.
3. Flamm, E.L. // *Nat. Biotechnol.* 1991. V. 9. № 4. P. 349–351.
4. Kappeler S.R., van den Brink H.(J.)M., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhon Z., Hansen E.B., Johansen E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 2. № 342. P. 647–654.
5. Uchiyama H., Uozumi T., Beppu T., Arima K. // *Agric. Biol. Chem.* 1980. V. 44. № 6. P. 1373–1381.
6. Emtage J.S., Angal S., Doel M.T., Harris T.J.R., Jenkins B., Lilley G., Lowe P.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1983. V. 80. № 12. P. 3671–3675.
7. Cullen D., Gary G.L., Wilson L.J., Hayenga K.J., Lamsa M.H., Rey M.W., Norton S., Berka R.M. // *Nat. Bio/Technol.* 1987. V. 5. P. 369–376.

8. Nosedá D.G., Recúpero M., Blasco M., Ortiz G.E., Galvagno M.A. // *Protein Expr. Purif.* 2013. V. 92. P. 235–244.
9. Nosedá D.G., Blasco M., Recúpero M., Galvagno M.A. // *Protein Expr. Purif.* 2014. V. 104. P. 85–91.
10. Nosedá D.G., Recúpero M., Blasco M., Bozzo J., Galvagno M.A. // *Protein Expr. Purif.* 2016. V. 123. P. 112–121.
11. Старовойтова В.В., Величко Т.И., Баратова Л.А., Филиппова И.Ю., Лавренова Г.И. // *Биохимия*. 2006. Т. 71. № 3. С. 402–407.
12. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. // *J. Dairy Sci.* 2012. V. 95. № 2. P. 609–613.
13. Jensen J.L., Mølgaard A., Poulsen J.-C.N., Harboe M.K., Simonsen J.B., Lorentzen A.M., Hjerno K., van den Brink J.M., Qvist K.B., Larsen S. // *Acta Crystallgr. D. Biol. Crystallogr.* 2013. V. 69. № 5. P. 901–913.
14. Espinoza-Molina J.A., Acosta-Muñiz C.H., Sepulveda D.R., Zamudio-Flores P.B., Rios-Velasco C. // *Mol. Biotechnol.* 2016. V. 58. № 10. P. 657–664.
15. Wang N., Wang K.Y., Li G., Guo W., Liu D. // *Protein Expr. Purif.* 2015. V. 111. P. 75–81.
16. Rogelj I., Perko B., Francky A., Penca V., Purgenčar J. // *J. Dairy Sci.* 2001. V. 84. № 5. P. 1020–1026.
17. Vega-Hernandes M.C., Gomes-Coello A., Villar J., Claverie-Martin F. // *J. Biotechnol.* 2004. V. 114. № 1–2. P. 69–79.
18. Kumar A., Sharma J., Grover S., Mohanty A.K., Batish V.K. // *Food Biotechnol.* 2007. V. 21. № 1. P. 57–69.
19. Tyagi A., Kumar A., Yadav A.K., Saklani A.C., Grover S., Batish V.K. // *LWT-Food Sci. Technol.* 2016. V. 69. P. 217–224.
20. Liu W.-G., Wang Y.-P., Zhang Z.-J., Wang M., Lv Q.-X., Liu H.-W., Lu M. // *Protein Expr. Purif.* 2017. V. 135. P. 78–82.
21. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. № 22. P. 10606–10610.
22. Tyagi A., Kumar A., Mohanty A.K., Kaushik J.K., Grover S., Batish V.K. // *LWT-Food Sci. Technol.* 2017. V. 84. P. 733–739.
23. Luo F., Jiang W.H., Yang Y.X., Li J., Jiang M.F. // *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2016. V. 29. № 9. P. 1363–1370.
24. Ersöz F., İnan M. // *Protein Expr. Purif.* 2019. V. 154. P. 126–133.
25. Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Kriger A.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2018. V. 54. № 6. P. 569–576.
26. Wei Z.-Y., Zhang Y.-Y., Wang Y.-P., Fan M.-X., Zhong X.-F., Xu N., Lin F., Xing S.-C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. № 5. P. 624–632.
27. Uniacke-Lowe T., Fox P.F. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Oxford, UK: Elsevier, Academic Press, 2017. P. 69–113.
28. Roller S., Praaning-Van Dalen D., Andreoli P. *Food Industry and the Environment: Practical Issues and Cost Implications*. Boston, MA (US): Springer, 1994. P. 64–65.
29. Kageyama T. // *Biochemistry*. 2004. V. 43. № 48. P. 15122–15130.
30. Kageyama T. // *J. Biochem.* 2000. V. 127. № 5. P. 761–770.
31. Chitpintyol S., Goode D., Crabtree M.J.C. // *Food Chem.* 1998. V. 62. № 2. P. 133–139.
32. Jensen J.L., Jacobsen J., Moss M.L., Rasmussen F., Qvist K.B., Larsen S., van den Brink J.M. // *J. Dairy Sci.* 2015. V. 98. № 5. P. 2853–2860.
33. Ageitos J.M., Vallejo J.A., Poza M., Villa T.G. // *J. Dairy Sci.* 2006. V. 89. № 10. P. 3770–3777.
34. Costabel L.M., Bergamini C.V., Pozza L., Cuffia F., Candioti M.C., Hynes E. // *J. Dairy Res.* 2015. V. 82. № 3. P. 375–384.
35. Bansal N., Drake M.A., Piraino P., Broe M.L., Harboe M., Fox P.F. // *McSweeney P.H.L.* // *Int. Dairy J.* 2009. V. 19. № 9. P. 510–517.
36. Børsting M.W., Qvist K.B., Rasmussen M., Vindeløv J., Vogensen F.K., Ardö Y. // *Dairy Sci. Technol.* 2012. V. 92. № 5. P. 593–612.
37. Horne D.S. // *Int. Dairy J.* 1998. V. 8. № 3. P. 171–177.
38. Horne D.S. // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2002. V. 7. P. 456–461.
39. Hyslop D.B. *Advanced Dairy Chemistry*. N.Y.: Kluwer Academic/Plenum Publ., 2003. P. 839–878.
40. van Hooydonk A.C.M., Walstra P. // *Neth. Milk Dairy J.* 1987. V. 41. P. 19–47.
41. Farah Z., Bachmann M.R. // *Milchwissenschaft*. 1987. V. 42. № 11. P. 689–692.
42. Wangoh J., Farah Z., Puhani Z. // *Milchwissenschaft*. 1993. V. 48. № 6. P. 322–325.
43. Boudjenah-Haroun S., Laleye C.L., Moulti-Mati F., Si A.S., Mahboub N., Siboukeur O.E., Mati A. // *Emir. J. Food Agric.* 2011. V. 23. № 4. P. 301–310.
44. Stasiuk S.J., Summers E.L., Demmer J. // *Reprod. Fertil. Dev.* 2000. V. 12. № 4. P. 215–222.
45. Kotts C., Jenness R. // *J. Dairy Sci.* 1976. V. 59. № 5. P. 816–822.
46. Белов А.Н., Коваль А.Д., Авданина Е.А., Ельчанинов В.В. // *Сыроделие и маслоделие*. 2009. № 1. С. 22–24.
47. Мурунова Г.В., Свириденко Ю.Я. // *Сыроделие и маслоделие*. 2006. № 5. С. 2–5.
48. Emmons D.B., Beckett D.C., Binns M. // *J. Dairy Sci.* 1990. V. 73. № 8. P. 2007–2015.
49. Singh T.K., Drake M.A., Cadwallader K.R. // *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*. 2003. V. 2. № 4. P. 139–162.
50. Harboe M., Broe M.L., Qvist K.B. *Technology of Cheese-making*. N.Y.: J. Wiley & Sons, 2010. P. 98–129.
51. Upadhyay V.K., McSweeney P.L.H., Magboul A.A.A., Fox P.F. *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. L.: Elsevier Acad. Press, 2004. P. 391–433.
52. Bansal N., Fox P., McSweeney P.H.L. // *J. Dairy Res.* 2009. V. 76. № 3. P. 290–293.
53. Daly R., Hearn M.T.W. // *J. Mol. Recognit.* 2005. V. 18. № 2. P. 119–138.
54. Narhi L.O., Arakawa T., Strickland T.W. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 34. P. 23022–23026.
55. Macauley-Patrick S., Fazenda M.L. // *Yeast*. 2005. V. 22. № 4. P. 249–270.

56. Cross K.J., Huq L., Palamara J.P., Perich J.W., Reynolds E.C. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 15. P. 15362–15369.
57. Lucey J.A. // J. Dairy Sci. 2002. V. 85. № 2. P. 281–294.
58. Майоров А.А., Мироненко И.М., Байбикова А.А. // Сыроделие и маслоделие. 2011. № 2. С. 19–23.

Basic Biochemical Properties of Recombinant Chymosins (Review)

S. V. Belenkaya^{a,d}, D. V. Balabova^b, A. N. Belov^c, A. D. Koval^c,
D. N. Shcherbakov^{a,b}, and V. V. Elchaninov^{c,*}

^aState Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” Rospotrebnadzora, Koltsovo, 630559 Russia

^bAltai State University, Barnaul, 656049 Russia

^cFederal Altay Scientific Centre of Agrobiotechnologies, Siberian Institute of Cheese Making, Barnaul, 656016 Russia

^dNovosibirsk state University, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: ve3636@yandex.ru

The work is devoted to the review of the main biochemical properties of known types of recombinant chymosins used in cheese making or claiming to be technological coagulants of milk. The parameters of Michaelis-Menten kinetics, milk-clotting activity, proteolytic activity, specificity, dependence of coagulation ability on pH and concentration of calcium ions are considered.

Keywords: recombinant chymosin, Michaelis-Menten kinetics, milk-clotting activity, proteolytic activity, thermal stability, calcium ion concentration, pH-optimum

УДК 579.222

ПЕРОКСИДАЗЫ ПРОКАРИОТ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ (ОБЗОР)

© 2020 г. Л. Е. Хмелевцова¹, *, И. С. Сазыкин¹, Т. Н. Ажогина¹, М. А. Сазыкина¹

¹Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского,
Ростов-на-Дону, 344090 Россия
*e-mail: lehmelevcova@sfedu.ru

Поступила в редакцию 07.10.2019 г.
После доработки 06.12.2019 г.
Принята к публикации 23.12.2019 г.

В обзоре рассмотрены работы, посвященные разнообразию структуры и функций прокариотических пероксидаз. Описаны такие наиболее значимые группы пероксидаз, встречающиеся у бактерий, как каталазы (Kat), каталазы-пероксидазы (CP), дигемовые цитохром-с пероксидазы (DiHcсP) и краситель-обесцвечивающие пероксидазы (DuP). Приведены данные об их применении в биотехнологии. Обсуждается их участие в биодegradации трудно утилизируемых субстратов микроорганизмами и возможность использования в биоремедиации.

Ключевые слова: пероксидазы, прокариоты, лигнин, углеводороды, биоремедиация

DOI: 10.31857/S0555109920030058

Пероксидазы катализируют восстановление пероксида водорода и окисляют различные субстраты. Эта биохимическая функция обуславливает их участие во многих таких важных биологических процессах, как защитные механизмы, иммунный ответ и патогенез. Эти белки присутствуют во всех царствах жизни и являются членами мультигенных семейств (насчитывают от двух до более ста изоформ) (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>).

Согласно классификации ферментов пероксидазы относят к подклассу КФ.1.11.1.x (донор:Н₂O₂ оксидоредуктазы), в которую входят 15 различных пероксидаз с КФ 1.11.1.1 по 1.11.1.16 (за исключением КФ 1.11.1.4, которая в данный момент не рассматривается как пероксидаза). Из-за присутствия в их структуре двойных доменов некоторые пероксидазы отнесены к номерам КФ 1.13.11.44, КФ 1.14.99.1 и КФ 1.6.3.1, а также КФ 4.1.1.44.

Пероксидазы могут быть гем-содержащими или не содержать гем. Согласно филогенетическим деревьям, пероксидазы разделяют на 13 основных групп, которые, в свою очередь, подразделяются на более чем 60 классов (рис. 1) (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/infos/documentation>).

Среди гем-содержащих пероксидаз выделяют два крупных суперсемейства: первое из них встречается в основном у бактерий, грибов и растений (не животные пероксидазы) [1], а второе — главным образом у животных, грибов и бактерий (пероксидазы животных; пероксидазы-циклооксигеназы) [2, 3]. Члены первого суперсемейства пе-

роксидаз были идентифицированы у большинства живых организмов за исключением животных. Суперсемейство включает три независимых класса структурно родственных пероксидаз (классы I, II и III), из которых у прокариот присутствуют только каталазы-пероксидазы (CP), принадлежащие к классу I. Все они обладают гемовым фрагментом (феррипротопорфирином IX), в качестве проксимального лиганда консервативным гистидином, а в качестве дистальных лигандов консервативными остатками аргинина и гистидина. Через общий пероксидантный цикл гемсодержащие пероксидазы используют в качестве акцептора Н₂O₂, а в качестве доноров — различные субстраты, которые будут превращаться в радикалы. В этом цикле в гемовой группе пероксидазы Fe^{III} превращается в Fe^{IV} [4].

Второе суперсемейство (пероксидазы-циклооксигеназы) включает 11 групп пероксидаз, из которых у прокариот описаны бактериальные пероксицины (Pxc) и короткие пероксидокерины (PxDo) из семейства пероксинектинов (Pxt). Семейство пероксицины, по-видимому, содержит самых старых представителей суперсемейства. Бактериальные ферменты состоят либо только из домена пероксидазы (короткие пероксицины), либо из нескольких доменов (длинные пероксицины). Физиологическая роль как пероксицинов, так и пероксидокеринов, пока неизвестна [5].

Помимо вышеописанных ферментов к гем-содержащим пероксидазам относят 4 суперсемей-

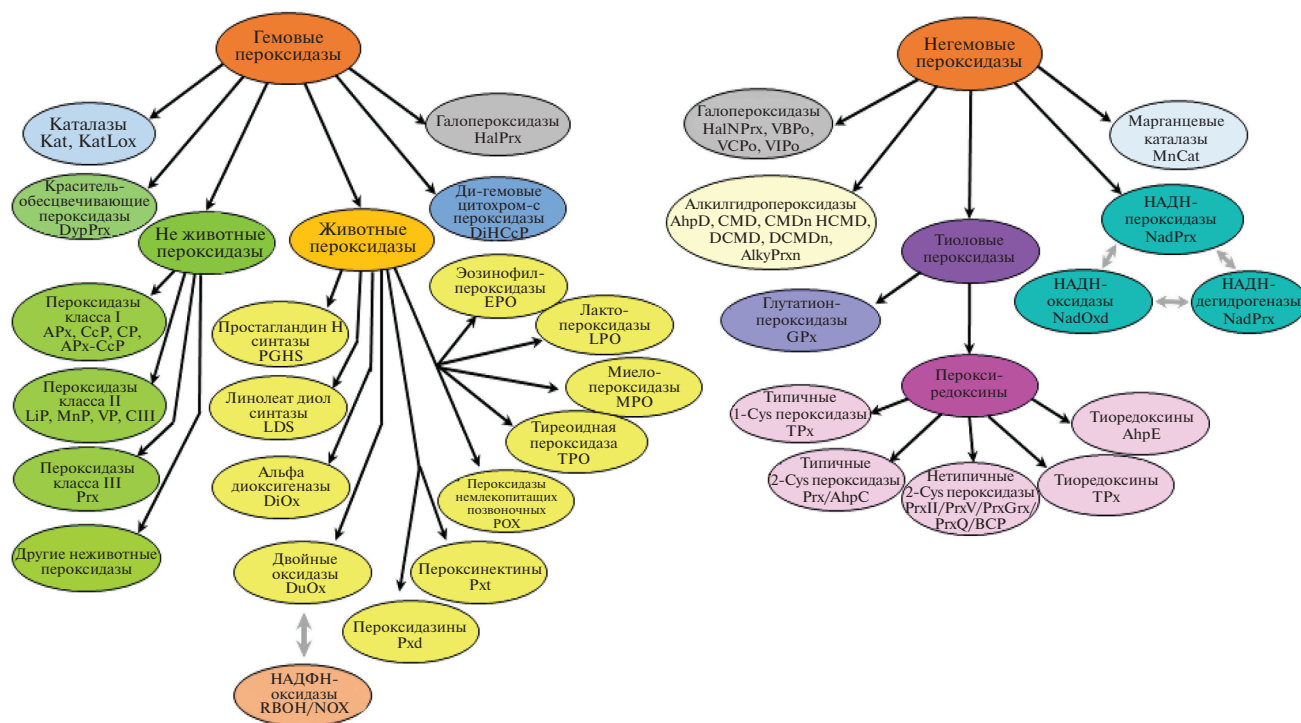


Рис. 1. Филогенетические взаимоотношения различных групп пероксидаз (база данных Peroxibase).

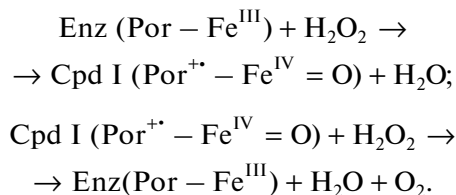
ства каталаз (**Kat**), включающих ди-гемовые пероксидазы (семейство ди-гемовых цитохром-с пероксидаз (**DiHCCP**), белки утилизации метил-амин (**MauG**), другие пероксидазы (**DiHPOX**) и краситель-обесцвечивающие пероксидазы (dye-decolorizing peroxidases, **DyPs**). Практически все из них представлены у прокариот.

Негемовые пероксидазы подразделяются на 5 групп: семейство алкилпероксидаз (включает 9 подсемейств), суперсемейство галопероксидаз (включает 2 семейства), семейство марганцевых каталаз (**MnCat**), семейство НАДН-пероксидаз (**NadPrx**) и суперсемейство тиоловых пероксидаз, подразделяющееся на семейства глутатион-пероксидаз и перокси-редоксинов. Все группы негемовых пероксидаз описаны у прокариот.

Более подробно будут рассмотрены некоторые основные группы пероксидаз, встречающиеся у прокариотических организмов.

Каталазы. Каталаза или гидропероксидаза II (**Kat** или **HPH**) является гемсодержащим ферментом, способным дисмутировать H_2O_2 . Это ключевой фермент, защищающий все типы организмов от активных форм кислорода. Контролируется как часть регулона *sS* у бактерий. Помимо перекиси водорода и алифатических перекисей эта каталаза может окислять определенные 2-электронные акцепторы. Фермент катализирует распад H_2O_2 по двухстадийному механизму.

Одна молекула пероксида водорода окисляет гем (**Por-Fe^{III}**), а вторая молекула пероксида водорода используется в качестве восстановителя соединения I ($Por^{+•} - Fe^{IV} = O$) для регенерации исходного состояния фермента:



Выделяют монофункциональные гем-каталазы (типичные или классические каталазы), каталазы-пероксидазы (атипичные), негемовые каталазы (псевдокаталазы) и минорные каталазы (на рис. 1 они разнесены в разные группы, но в этой части будет целесообразно рассмотреть их совместно).

Монофункциональные гем-каталазы являются исходным классом каталаз, встречающихся повсеместно у животных, растений и микроорганизмов. Структура каталаз варьируется в зависимости от количества и идентичности доменов у разных видов организмов. Обычно каталазы существуют в виде тетрамера, который имеет форму гантили и состоит из четырех одинаковых субъединиц. Молекулярная масса монофункциональных каталаз составляет 200–340 кДа, они содержат простетическую гемовую группу в каталити-

ческом центре [6]. Ферменты разделены на три клады, которые, как полагают, образовались в результате дупликации соответствующих генов [7].

Негемовые каталазы являются минорным семейством бактериальных белков, у которых вместо гемовой группы присутствует димарганцевый активный сайт. Их также называют марганцевыми каталазами или псевдокаталазами. Эти ферменты имеют молекулярную массу в диапазоне 170–210 кДа. Структура марганцевой каталазы *Lactobacillus plantarum* в гомогексамерной форме содержит субъединицы размером около 30 кДа [8]. В димарганцевом активном сайте этого фермента каждый ион марганца координирован с тремя молекулами глутамата и одной молекулой гистидина (вместо классической координации Glu_4His_2), что имеет значение при катализе разложения H_2O_2 . Псевдокаталазы дифференцированы в пять различных клад, что произошло, вероятно, благодаря латеральному переносу генов между различными бактериальными таксонами [9].

Минорные каталазы включают хлоропероксидазы, бромпероксидазы [10] и каталазы-фенолоксидазы [11]. Хлоропероксидаза встречается в виде мономера с молекулярной массой 42 кДа и одной гем-б-группой. Общая структура и активный сайт этого фермента отличаются от других каталаз и пероксидаз наличием цистеина в проксимальной части, выступающего в качестве пятого лиганда для гемового железа. Другим значительным отличием является наличие глутаминовой кислоты в виде единичного каталитического остатка на дистальной стороне гема, а не гистидина с аспарагином или аргинином как у других каталаз. Каталаза-фенолоксидаза представляет собой тетрамерный гемовый белок с молекулярной массой 320 кДа. Этот фермент обладает уникальной способностью окислять ряд фенольных соединений в отсутствие пероксида водорода [12].

Каталазы-пероксидазы. Данные ферменты (КФ 1.11.1.6; $\text{H}_2\text{O}_2\text{:H}_2\text{O}_2$ оксидоредуктазы или KatG) обнаружены у эубактерий, архей и низших эукариот (грибов и простейших). В настоящее время база PeroxiBase содержит данные об аминокислотных последовательностях 544 каталаз-пероксидаз, идентифицированных у таксономических групп *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidetes/Chlorobi*, *Betaproteobacteria*, *Chlamydiae/Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Firmicutes* и *Gammaaproteobacteria*.

Они являются мультифункциональными ферментами и, как правило, обладают двойной каталитической активностью, действуя как в качестве каталазы, так и в качестве пероксидазы. У бактерий они входят в состав регулона OxyR, который реагирует на активные формы кислорода. Впервые фермент, обладающий как каталазной, так и классической пероксидазной активностью, был

выделен у *E. coli* в 1979 г. Первоначально он был описан как каталаза с пероксидазной активностью широкого спектра, что позволило его называть “каталаза-пероксидаза” [13]. Позже по мере изучения нуклеотидной последовательности гена *katG*, кодирующего этот фермент, было показано его сходство с растительными пероксидазами [14], и в конечном итоге он был классифицирован как член семейства пероксидаз класса I, наряду с цитохром-с пероксидазой (**CcP**) и аскорбат-пероксидазой (**APx**) [15]. Однако в то время как классические пероксидазы обычно являются мономерами, KatG существуют в виде гомодимеров или гомотетрамеров субъединиц размером 80 кДа, каждая из которых состоит из двух доменов [16]. Хотя и из этого правила также есть исключения. Так, в работе [17] описана каталаза-пероксидаза KatG *B. pumilis*, которая стереоселективно превращает б-лактамы в их (R)-сульфоксиды. Она является мономером и содержит одну гемовую группу, в то время как KatG других бактерий являются димерами или тетрамерами и имеют низкое содержание гема (один на димер или два на тетрамер). N-концевая аминокислотная последовательность KatG *B. pumilis* не показала значительного сходства ни с одной из известных каталаз-пероксидаз KatG, присутствующих в базе данных [17].

Каталитическая реакция каталазы-пероксидазы протекает в две стадии, как и у каталазы. СР может использовать органические доноры электронов для восстановления соединения I с помощью двух одноэлектронных переносов до состояния покоя. Каталазная активность СР порой даже выше, чем у типичных каталаз, несмотря на то, что KatG не имеют с ними структурного сходства. Катализ осуществляется с помощью активного сайта, который обладает сильным сходством с сайтом типичной пероксидазы (например, цитохром-с пероксидазы). Для этого используются два взаимозависимых кофактора: гем и совершенно уникальный ковалентный аддукт Met-Tyr-Trp (**MYW**). Гемовая группа расположена в N-концевом домене, в котором предположительно и осуществляется катализ. Было высказано предположение, что его формирование произошло в результате дупликации гена. Гем необходим для создания кофактора MYW, который позволяет СР использовать гемовые промежуточные соединения для создания уникального механизма окисления H_2O_2 [18]. Несмотря на отличия KatG от каталаз и пероксидаз их общие структурные элементы представляют собой узкие каналы доступа к активным сайтам. Это оказалось благоприятным для каталитического окисления H_2O_2 , поскольку другие гораздо более крупные доноры электронов лишены доступа к краю гема.

В работе Пассарди с соавт. [4] проведен масштабный филогенетический анализ последова-

тельностью различных пероксидаз и предложена гипотеза о прокариотическом происхождении суперсемейства растительных/грибковых/бактериальных пероксидаз, присутствующих ныне у эукариот. Предполагается, что у бактерий и археобактерий неоднородное распределение каталаз-пероксидаз может быть связано с латеральным переносом генов. Последовательности генов каталаз-пероксидаз в эукариотических организмах не содержат интронов, и сходны между собой более чем на 70%. Это подтверждает гипотезу о том, что аминокислотные последовательности каталаз-пероксидаз грибов сформированы путем переноса бактериальных генов.

Изучение KatG имеет важное прикладное значение. Было обнаружено, что устойчивость к противотуберкулезному препарату изониазиду у *Mycobacterium tuberculosis* ассоциирована с мутациями в гене *katG* [19]. Изониазид используется для лечения туберкулеза с 1952 г., однако механизм его действия был выяснен только в 1990 гг. Каталаза-пероксидаза KatG активирует про-изониазид по реакции, которая включает замену гидразидной части молекулы НАД-фрагментом. Получающаяся в результате активированная форма изониазида, изоникотиноил-НАД, связывается с эноил-АСР-редуктазой InhA, которая ингибирует биосинтез миколовой кислоты и, следовательно, рост *M. tuberculosis* [20]. Мутантный фермент KatG проявляет меньшую копланментарность и снижает взаимодействие с изониазидом. Белково-лекарственный комплекс дестабилизируется таким образом [21].

Известно, что каталазная и пероксидазная функции фермента каталазы-пероксидазы необходимы для защиты бактерии от H_2O_2 и молекулярного кислорода, которые используются макрофагами во время фагоцитоза. KatG катаболизирует пероксиды, вырабатываемые НАДФН-оксидазой во время механизма защиты хозяина. Но предполагают, что в отсутствие этого внешнего давления KatG не имеет особого биологического смысла [22], и в большинстве случаев наличие мутаций в гене *katG* не обязательно приводит к образованию неполноценной бактериальной популяции [23]. Удивительно, что, несмотря на большое количество реакций, катализируемых этим ферментом, фактическая его роль *in vivo*, кроме удаления H_2O_2 , не ясна, и субстрат *in vivo* для реакции пероксидазы остается неустановленным [16]. В работе [4] сообщается, что пероксидазы отсутствуют у большого количества бактерий, и возможно, они не настолько важны для их выживания, так как во многих бактериальных родах некоторые виды обладают СР, а другие — нет. Было даже отмечено, что в пределах одного вида некоторые штаммы содержат СР, а другие не содержат. В отсутствие пероксидаз другие белки (супероксиддисмутаза, каталаза и

хлоропероксидаза, обнаруживаемые у бактерий, не содержащих СР) должны справляться с детоксификацией АФК [4].

Ди-гемовые цитохром-с пероксидазы (DiHCCP). Эти пероксидазы обнаружены у широкого спектра видов бактерий и у дрожжей, у которых они участвуют в детоксикации H_2O_2 путем двухэлектронного восстановления до воды и кислорода без выделения активных форм кислорода.

В качестве окисляемого субстрата эти ферменты, как и другие цитохром-с пероксидазы, используют гем с-типа. Фермент сформирован двумя доменами, каждый из которых содержит одну гемовую группу с-типа, а на границе раздела доменов расположен сайт связывания кальция. При этом обе гемовые группы ковалентно связаны с полипептидной цепью белка тиоэфирными связями с остатками цистеинов связывающего мотива Cys—X₁—X₂—Cys—His [24]. Вследствие присутствия двух окислительно-восстановительных центров восстановление H_2O_2 не требует стабилизации промежуточного радикала или образования оксоферрильного π -катионного радикала (соединение I). Молекулярная масса DiHCCP варьирует от 35 до 40 кДа. Ди-гемовые цитохром-с пероксидазы были описаны у таких микроорганизмов, как *Methylococcus capsulatus*, *Nitrosomonas europaea*, *Paracoccus pantotrophus*, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* и *Rhodobacter capsulatus* [25].

Было обнаружено, что экспрессия бактериальной цитохром-с пероксидазы усиливается в условиях гипоксии [26]. H_2O_2 является продуктом дисмутации супероксида, активной формой кислорода, образующейся в условиях гипоксии в результате ограничения потока электронов в цепи переноса электронов. Это приводит к увеличению уровня восстановления пула кофермента Q и реакции семихинона с кислородом с образованием супероксида [27].

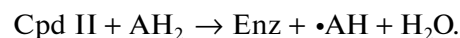
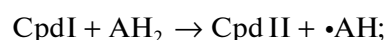
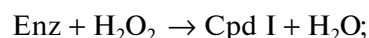
В работе Нобрега с соавт. [28] описан фермент YhjA *E. coli*, имеющий хинол-пероксидазную активность, первичная структура которого наиболее близка к классическим DiHCCP. Однако помимо двух С-концевых доменов, гомологичных обычным DiHCCP, он содержит дополнительный N-концевой домен, содержащий также гем с-типа, то есть обладает в общей сложности тремя гемовыми группами. В отличие от растворимых классических DiHCCP фермент является мембрано-связанным. Можно предположить, что YhjA в клетке *E. coli* представляет собой один из компонентов антиоксидантной защиты клетки при переходе от анаэробных к аэробным условиям вследствие способности использовать пул хинола, снижая таким образом уровень его автоокисления. Гомологи YhjA присутствуют и в клетках патогенных бактерий из родов *Salmonella* и *Shigella*. Предполагают, что они участвуют в механизмах инфи-

цирования эпителиального слоя, поскольку в слизистой оболочке несколько более высокая концентрация кислорода, что приводит к индукции ключевых факторов вирулентности. В условиях инфекции у патогенных штаммов *E. coli* YhjA также может играть ключевую роль в подготовке к клеточной инвазии.

Краситель-обесцвечивающие пероксидазы (dye-decolorizing peroxidases, DyPs). Обесцвечивающие красители пероксидазы представляют собой семейство бактериальных и грибных пероксидаз, которые впервые были идентифицированы в 1999 г. у гриба *Bjerkandera adusta* (ранее *Geotrichum candidum*) [29]. Свое название эта группа пероксидаз получила после обнаружения их способности эффективно катализировать обесцвечивание широкого спектра промышленных красителей, в частности производных антрахинона, которые являются плохими субстратами для других пероксидаз [30]. Их характеристики, включая аминокислотную последовательность, третичную структуру, структуру каталитического центра, субстратную специфичность и оптимальный pH действия, отличаются от характеристик хорошо известных гемовых пероксидаз млекопитающих и растений [31]. Исследование структуры DyP выявило наличие двухдоменной ферредоксиноподобной складки $\alpha + \beta$, которая отличается от всех α -спиральных складок других суперсемейств пероксидаз. В качестве каталитического аминокислотного остатка для реакции DyP с H_2O_2 в отличие от других гемовых пероксидаз, содержащих гистидин, используется остаток аспарагиновой кислоты [32].

В 2006 г. аминокислотные последовательности, схожие с последовательностью DyP, были идентифицированы также у бактерий [33], что дало повод классифицировать их как новое семейство, названное пероксидазами DyP-типа. В настоящее время база PeroxiBase содержит информацию о 237 последовательностях этих пероксидаз. На основании данных об аминокислотных последовательностях и структуре они разделены на четыре филогенетически различных класса или типа DyP: A – D. Классы A – C содержат преимущественно последовательности бактериальных ферментов, в то время как класс D представлен в основном грибными DyP. Белки класса A и B имеют более низкую каталитическую активность, чем белки класса D [34]. Гены, кодирующие белки, принадлежащие к классу A и B, почти всегда обнаруживаются в бактериях. Аминокислотные последовательности белков класса A короче, чем у белков класса D, и длиннее, чем у белков класса B. Белки класса A (YcdB у *E. coli*, YwbN и BsDyP у *B. subtilis*, FepB у *S. aureus*, TfuDyP у *Thermobifida fusca*, DyPA у *R. jostii* RHA1) отличаются наличием специфической N-концевой последовательности Tat (twin arginine translocation).

Предполагают, что пероксидный цикл DyP, по существу, такой же, как у хорошо охарактеризованных классических пероксидаз [32]:



Все классы DyP обладают пероксидазной активностью. Помимо стандартных пероксидазных субстратов они способны окислять и ряд других соединений, 2,2'-азиобис[3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты]-диаммониевая соль (ABTS), 2,6-диметоксифенол, синтетические красители (например Azure B и Reactive Blue 5), нефенольные метоксилированные ароматические соединения (например, вератриловый спирт), b-каротин, лигнин и Mn^{2+} . В связи с этим DyP являются перспективным классом бактериальных пероксидаз для применения в области биотехнологии.

Дегградация лигнина бактериальными пероксидазами. Большое количество исследований сосредоточено на изучении свойства DyP окислять лигнин, который относится к сложным ароматическим полимерам и, наряду с целлюлозой и гемицеллюлозой, представляет собой основной компонент клеточных стенок растений. Лигноцеллюлозная биомасса может эффективно использоваться благодаря огромному количеству и возобновляемости. Полагают, что в природе биодегградация лигнина протекает в две стадии, включающие деполимеризацию нативного лигнина и минерализацию образующихся гетерогенных ароматических соединений, при этом первую стадию осуществляют грибы, а вторую – бактерии [35]. Одними из основных де-структоров лигнина в природе являются базидиомycеты, например *Phanerochaete chrysosporium* и *Ceriporiopsis subvermispora*. Изучение дегградации лигнина в основном было сосредоточено на изучении грибов, продуцирующих внеклеточные пероксидазы, которые могут атаковать лигнин. Гриб белой гнили *P. chrysosporium* продуцирует гемсодержащую лигнин-пероксидазу (LiP), способную катализировать расщепление модельных соединений лигнина, и гем-зависимую марганец-пероксидазу (MnP), которая катализирует быстрое окисление Mn^{II} до Mn^{III} . Затем Mn^{III} способен окислять ряд модельных соединений лигнина. *P. chrysosporium* и ряд других грибов также продуцируют внеклеточные медьзависимые ферменты, лакказы, которые способны окислять модельные соединения лигнина, используя окислительно-восстановительный потенциал. Однако несмотря на изучение в течение 25 лет грибных ферментов, разрушающих лигнин, это не привело к их широкому коммерческому использованию для его дегградации [36].

До недавнего времени, несмотря на сообщения о том, что некоторые бактерии, например, *Streptomyces viridosporus*, могут разрушать лигнин [37], его ферментативная деградация бактериями была плохо изучена [38]. В 2011 г. в работе Ахмада с соавт. [36] было показано существование пероксидаз DyP-типа DypA и DypB у актинобактерии *Rhodococcus jostii* RHA1. DypB была определена у *R. jostii* RHA1 как новая марганец-зависимая пероксидаза, которая играет важную роль в деградации лигнина. Это была первая кинетически охарактеризованная рекомбинантная бактериальная лигнин-пероксидаза.

Позже появились сведения и о других бактериях, способных окислять лигнин. Соответствующие пероксидазы были выделены и описаны. В работе [39] сообщается об идентификации у *Amycolatopsis* sp. 75iv2 многофункциональной DyP2, которая обладала способностью к окислению модельных соединений лигнина и проявляла гораздо более высокую активность окисления Mn^{II} , чем другие бактериальные DyP.

Пероксидазы DyP-типа (TfuDyP) *T. fusca*, умеренной термофильной бактерии, проявляют краситель-обесцвечивающую активность, а также способны окислять такие субстраты, как гваякол, 2,6-диметоксифенол и вератриловый спирт. TfuDyP может катализировать энантиоселективное сульфоксидирование, то есть такой тип реакции, о котором ранее не сообщалось для пероксидаз DyP-типа [40]. Две новые бактериальные пероксидазы DyP-типа из *B. subtilis* и *Pseudomonas putida* MET94 были охарактеризованы кинетически и спектральными методами. Была идентифицирована пероксидаза Dyp1B *P. fluorescens* Pf-5, которая окисляла фенольные субстраты и полимерный лигнин (в частности, лигноцеллюлозу соломы пшеницы) в присутствии Mn^{II} [38]. Предполагается, что в качестве биокатализаторов для превращения лигнина в возобновляемые химические вещества бактериальные пероксидазы DyP-типа обладают большим потенциалом, который можно использовать, в частности, в целлюлозно-бумажном производстве и при производстве биотоплива [31].

В ходе микробиологической деградации лигнина обычно требуется длительное культивирование (от 10 до 100 сут) для того, чтобы достичь высокой степени его разложения. В связи с этим при разработке биотехнологий, направленных на использование лигнолитических ферментов, используются методы направленной эволюции белков. Например, в работе [41] этот метод применили для повышения эффективности бактериальной PpDyP у *P. putida* MET94 при действии на фенольные соединения. Так, с помощью подверженной ошибкам ПЦР с последующим высокопроизводительным скринингом использовали три

раунда случайного мутагенеза гена *ppDyP*. Полученный рекомбинантный фермент демонстрировал каталитическую эффективность по отношению к 2,6-диметоксифенолу (DMP), повышенную в 100 раз, что было на уровне действия грибных лигнин-пероксидаз. Он был также эффективен по отношению к ряду фенольных соединений синрингильного типа, гваякола, ароматических аминов и крафт-лигнина [41].

Применение бактериальных пероксидаз для биоремедиации и деградации трудноутилизуемых соединений. В последние годы особое внимание уделялось разработке эффективных методов очистки окружающей среды от различных поллютантов. Одним из перспективных способов является ферментативная биodeградация с помощью микробных ферментов, в частности пероксидаз [42]. Пероксидаза относится к универсальным окислительным ферментам, которые могут генерировать свободные радикалы и катализировать разрушение углерод-углеродных связей в сложных органических соединениях. Биоразлагаемые интермедиаты могут затем быть использованы микроорганизмами в качестве источника углерода и энергии, что приводит к их дальнейшей деградации и, наконец, минерализации [43]. Сообщается об успешном опыте деградации различных углеводородов и ксенобиотиков в биореакторе при помощи бактериальных пероксидаз. В работе [44] описано полное разложение фенола пероксидазой в циклическом биореакторе. Для этого в биореактор добавляли H_2O_2 с целью стимулирования производства внеклеточных пероксидаз микроорганизмами *in situ*. По такому же принципу в различного типа биореакторах осуществлялась деградация и других соединений, таких как бисфенол А [45], пары толуола [46], ацетаминофен [47] и углеводороды нефти [43].

В работе Бхарагава с соавт. [48] показано, что бактерия *Aeromonas hydrophila* способна деградировать краситель кристаллический фиолетовый вследствие продукции лигнинолитических ферментов — лигнин-пероксидазы и лакказы. *A. hydrophila* деградировала 99% красителя до фенола, 2,6-бис (1,1-диметилэтила), 2', 6'-дигидроксиацетофенона и бензола в течение 8 ч. Было показано также снижение токсичности кристаллического фиолетового. В связи с этим данный микроорганизм рассматривается как перспективный для использования в промышленности с целью эффективной очистки текстильных сточных вод.

В работе Кумар с соавт. [49] была изучена деградация меланоидинов бактериальным консорциумом, продуцирующим марганец-пероксидазу и лакказу. Меланоидины представляют собой сложные темно-окрашенные, аминокарбонильные полимерные соединения с высокой молекулярной массой, образующиеся в ходе реакции Май-

яра в ряде промышленных процессов [50, 51]. Они содержатся в отходах ликероводочных заводов, работающих на основе мелассы. Вследствие сложной химической структуры деградация этих соединений представляет проблему для промышленности, поэтому внимание исследователей привлекают биологические методы очистки. В условиях лабораторных экспериментов хорошие результаты были получены для различных грибов, продуцирующих лигнолитические ферменты. Показана их способность метаболизировать меланоидины в качестве единственного источника углерода и азота [52, 53]. Но промышленное применение грибов имеет свои ограничения из-за их медленного роста, образования огромного количества спор и низкого значения pH (3.0–5.0) среды, в которой происходит деградация [54]. В связи с этим перспективным методом является использование бактериальных штаммов, продуцирующих лигнолитические ферменты (марганец-пероксидазу и лакказы) для очистки сточных вод, загрязненных меланоидинами.

Еще одним важным применением бактериальных пероксидаз является деградация пластика. Известно, что биоразложение пластика крайне затруднено из-за отсутствия гидролизующих функциональных групп в его основных цепях [55, 56]. В окружающей среде первоначальное разрушение пластика достигается путем сочетанного воздействия биотических и абиотических факторов, а затем уже он становится более доступным для микробной деградации. Было показано, что ферменты, способные разрушать лигнин (лакказа, марганец-пероксидаза и лигнин-пероксидаза), могут также участвовать в деградации пластика, в частности, полиэтилена [56]. В работе [57] сообщается о штамме *B. cereus*, разлагающем полиэтилен, облученный ультрафиолетом, своими внеклеточными лакказами и марганец-пероксидазами.

Одним из перспективных классов прокариотических пероксидаз, использующихся в биоремедиации (а также пищевой промышленности, медицине и фармацевтике) являются каталазы [58–60]. С целью экологической очистки окружающей среды используется микробиологическая биоремедиация, основанная на применении бактерий для разрушения поллютантов [61]. С помощью аэробной биоремедиации могут быть эффективно элиминированы, например, нефтяные углеводороды и некоторые кислородные оксиды топлива (например, метил-трет-бутиловый эфир (МТБЕ) [62, 63]. Бактериальные каталазы, разлагая пероксид водорода на кислород и воду, способствуют поступлению необходимого для окисления поллютантов кислорода, повышая эффективность ремедиации.

В работе Гоголевой с соавт. [64] была показана прямая зависимость между снижением каталаз-

ной активности углеводородокисляющих микроорганизмов *Gordonia terrae*, *Rhodococcus rubroperitinctus* и *R. erythropolis* и интенсивностью деструкции нефтепродуктов. При выращивании этих бактерий в минеральной среде с дизельным топливом в качестве единственного источника углерода было отмечено накопление пероксидов в среде культивирования. Было также обнаружено, что у активных нефтедеструкторов в ходе деградации дизельного топлива увеличивалась численность бактерий и снижалась их каталазная активность, в то время как у штамма, не использующего углеводород, численность бактерий и активность каталазы практически не менялись в ходе эксперимента. На основании этого был сделан вывод о возможности оценки интенсивности процесса нефтедеструкции по снижению уровня каталазной активности. Сходные результаты получены в работах [65, 66]. Было исследовано изменение активности каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) в ходе инкубации нефтеокисляющих микроорганизмов с нефтью и индивидуальными углеводородами в качестве единственного источника углерода и энергии. Показана высокая активность каталазы при росте культуры на богатой среде, и снижение ее при культивировании микроорганизмов в средах с углеводородами. При этом уровень СОД, напротив, возрастал при культивировании с углеводородами.

В ряде работ [67–70] описано использование каталазной активности почв в качестве индикатора деградации углеводородов в ходе биоремедиации. Было показано, что каталазная активность почв снижается сразу после внесения нефтепродуктов, однако затем возрастает при разложении углеводородов. Предполагают, что каталазная активность может быть полезным биомаркером для индикации начала процесса биodeградации и по ее снижению можно делать вывод о снижении скорости биodeградации. Однако необходимо отметить, что каталазная активность почв обеспечивается не только активностью ферментов аэробных микроорганизмов, но и каталаза-миметическим действием содержащихся в почве таких компонентов, как органические соединения, глинистые минералы и металлы переменной валентности [71]. Вопрос индикаторного значения и механизмов участия каталазы в процессе бактериальной биodeградации углеводородов требует более тщательного изучения.

Таким образом, пероксидазы представляют собой многообразную группу ферментов. Появившись на заре эволюции живых организмов, они выполняют важнейшую функцию – детоксикацию активных форм кислорода, защищая клетки от повреждений. Дальнейшая дивергенция пероксидаз привела к появлению многочисленных классов этих ферментов, обладающих не только пероксидазной, но и каталазной, цикло-

оксигеназной, хлорит-дисмутазной и пероксигеназной активностью. Следует отметить, что, будучи ферментами, направленными на элиминацию активных форм кислорода, пероксидазы способны их производить при осуществлении каталитического цикла. Это является не только побочным эффектом, но и дает бактериям преимущества в виде способности неспецифически окислять различные субстраты, повышая их биодоступность и расширяя спектр возможных экологических ниш. Это свойство нашло широкое применение в биотехнологии и промышленности как экологически безопасная и эффективная альтернатива химическим методам очистки окружающей среды от загрязнителей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проект № 6.2379.2017/ПЧ) и Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 17-04-00787 А).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Passardi F., Theiler G., Zamocky M., Cosio C., Rouhier N., Teixeira F., Margis-Pinheiro M., Ioannidis V., Penel C., Falquet L., Dunand C. // *Phytochemistry*. 2007. V. 68. № 12. P. 1605–1611.
2. Daiyasu H., Toh H. // *J. Mol. Evol.* 2000. V. 51. № 5. P. 433–445.
3. Furtmuller P.G., Zederbauer M., Jantschko W., Helm J., Bogner M., Jakopitsch C., Obinger C. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2006. V. 445. № 2. P. 199–213.
4. Passardi F., Bakalovic N., Teixeira F.K., Margis-Pinheiro M., Penel C., Dunand C. // *Genomics*. 2007. V. 89. № 5. P. 567–579.
5. Nicolussi A., Auer M., Sevcnikar B., Paumann-Page M., Pfanzagl V., Zámocký M., Hofbauer S., Furtmüller P.G., Obinger C. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2018. V. 643. P. 14–23.
6. Lee D.H., Oh D.C., Oh Y.S., Malinverni J.C., Kukor J.J., Kahang H.Y. // *J. Microbial. Biotechnol.* 2007. V. 17. № 9. P. 1460–1468.
7. Klotz M.G., Klassen G.R., Loewen P.C. // *Mol. Biol. Evol.* 1997. V. 14. № 9. P. 951–958.
8. Barynin V.V., Whittaker M.M., Antonyuk S.V., Lamzin V.S., Harrison P.M., Artymiuk P.J., Whittaker J.W. // *Structure*. 2001. V. 9. № 8. P. 725–738.
9. Zamocky M., Furtmuller P.G., Obinger C. // *Antioxid. Redox. Signal.* 2008. V. 10. № 9. P. 1527–1548.
10. Nicholls P., Fita I., Loewen P.C. // *Adv. Inorg. Chem.* 2001. V. 51. P. 51–106.
11. Vetrano A.M., Heck D.E., Mariano T.M., Mishin V., Laskin D.L., Laskin J.D. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 42. P. 35372–35381.
12. Kocabas D.S., Bakir U., Phillips S.E., McPherson M.J., Ogel Z.B. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 79. № 3. P. 407–415.
13. Claiborne A., Fridovich I. // *J. Biol. Chem.* 1979. V. 254. № 10. P. 4245–4252.
14. Triggs-Raine B.L., Doble B.W., Mulvey M. R., Sorby P.A., Loewen P.C. // *J. Bacteriol.* 1988. V. 170. № 9. P. 4415–4419.
15. Welinder K.G., Mauro J.M., Nørskov-Lauritsen L. // *Biochem. Soc. Trans.* 1992. V. 20. № 2. P. 337–340.
16. Singh R., Wiseman B., Deemagarn T., Jha V., Switala J., Loewen P.C. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2008. V. 471. № 2. P. 207–214.
17. Sangar S., Pal M., Moon L.S., Jolly R.S. // *Bioresour. Technology*. 2012. V. 115. P. 102–110.
18. Njuma O.J., Ndontsa E.N., Goodwin D.C. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2014. V. 544. P. 27–39.
19. Zhang Y., Heym B., Allen B., Young D., Cole S. // *Nature*. 1992. V. 358. № 6387. P. 591–593.
20. Lei B., Wei C.-J., Tu S.-C. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 4. P. 2520–2526.
21. Singh A., Singh A., Grover S., Pandey B., Kumari A., Grover A. // *Gene*. 2018. V. 641. P. 226–234.
22. Singh R., Wiseman B., Deemagarn T., Donald L.J., Duckworth H.W., Carpena X., Fita I., Loewen P.C. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 41. P. 43098–43106.
23. Pym A.S., Saint-Joanis B., Cole S.T. // *Infect. Immun.* 2002. V. 70. № 9. P. 4955–4960.
24. Fulop V., Ridout C.J., Greenwood C., Hajdu J. // *Structure*. 1995. V. 3. № 11. P. 1225–1233.
25. Hoffmann M., Seidel J., Einsle O. // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 393. № 4. P. 951–965.
26. Otten M.F., Stork D. M., Reijnders W.N., Westerhoff H.V., van Spanning R.J. // *Eur. J. Biochem.* 2001. V. 268. № 8. P. 2486–2497.
27. Pettigrew G.W., Echalié A., Pauleta S.R. // *J. Inorg. Biochem.* 2006. V. 100. № 4. P. 551–567.
28. Nóbrega C.S., Devreese B., Pauleta S.R. // *BBA. Bioenergetics*. 2018. V. 1859. № 6. P. 411–422.
29. Kim S.J., Shoda M. // *Biotechnol. Bioeng.* 1999. V. 62. № 1. P. 114–119.
30. Yoshida T., Sugano Y. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2015. V. 574. P. 49–55.
31. Rahman Pour R., Ehibhationmhan A., Huang Y., Ashley B., Rashid G.M., Mendel-Williams S., Bugg T.D.H. // *Enzyme Microb. Technol.* 2019. V. 123. P. 21–29.
32. Singh R., Eltis L.D. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2015. V. 574. P. 56–65.
33. Sturm A., Schierhorn A., Lindenstrauss U., Lilie H., Bruser T. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 20. P. 13972–13978.
34. van Bloois E., Torres D.E. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 86. № 5. P. 1419–1430.
35. Kamimura N., Sakamoto S., Mitsuda N., Masai E., Kajita S. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2019. V. 56. P. 179–186.
36. Ahmad M., Roberts J.N., Hardiman E.M., Singh R., Eltis L.D., Bugg T.D. // *Biochemistry*. 2011. V. 50. № 23. P. 5096–5107.
37. Ramachandra M., Crawford D.L., Hertel G. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1988. V. 54. № 12. P. 3057–3063.
38. Rahman Pour R., Bugg T.D.H. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2015. V. 574. P. 93–98.
39. Brown M.E., Barros T., Chang M.C.Y. // *ACS Chem. Biol.* 2012. V. 7. № 12. P. 2074–2081.

40. Lončar N., Colpa D.I., Fraaije M.W. // *Tetrahedron*. 2016. V. 72. № 46. P. 7276–7281.
41. Brissos V., Tavares D., Sousa A.C., Robalo M.P., Martins L.O. // *ACS Catal*. 2017. V. 7. № 5. P. 3454–3465.
42. Karigar C.S., Rao S.S. // *Enzym. Res.* 2011. Article ID 805187. P. 11.
<https://doi.org/10.4061/2011/805187>
43. Moussavi G., Shekoohiyan S., Naddafi K. // *Chem. Eng. J.* 2017. V. 308. P. 1081–1089.
44. Pourakbar M., Moussavi G., Yaghmaeian K. // *RSC Adv*. 2018. V. 8. P. 6293–6305.
45. Moussavi G., Haddad F.A. // *Chemosphere*. 2019. V. 222. P. 549–555.
46. Aghayani E., Moussavi G., Naddafi K. // *J. Hazard. Mater.* 2019. V. 361. P. 259–266.
47. Baratpour P., Moussavi G. // *Chemosphere*. 2018. V. 210. P. 1115–1123.
48. Bharagava R.N., Mani S., Mulla S.I., Saratale G.D. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. V. 156. P. 166–175.
49. Kumar V., Chandra R. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 34. № 32.
<https://doi.org/10.1007/s11274-018-2416-9>
50. Bharagava R.N., Chandra R. // *Biodegradation*. 2010. V. 21. P. 703–711.
51. Echavarria A.P., Pagán J., Ibarz A. // *Food Sci. Technol. Int.* 2014. V. 20. № 2. P. 119–126.
52. Miyata N., Mori T., Iwahori K., Fujita M. // *J. Biosci. Bioeng.* 2000. V. 89. № 2. P. 145–150.
53. González T., Terrón M.C., Yagüe S., Junca H., Carbajo J.M., Zapico E.J., Silva R., Arana-Cuenca A., Téllez A., González A.E. // *Res. Microbiol.* 2008. V. 159. № 2. P. 103–109.
54. Arimi M.M., Zhang Y., Götz G., Kiriamiti K., Geißen S.U. // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2014. V. 87. P. 34–43.
55. Restrepo-Florez J.-M., Bassi A., Thompson M.R. // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 2014. V. 88. P. 83–90.
56. Krueger M.C., Harms H., Schlosser D. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. V. 99. № 21. P. 8857–8874.
57. Sowmya H.V., Ramalingappa M.K., Thippeswamy B. // *Adv. Polym. Sci. Technol. Int. J.* 2014. V. 4. № 2. P. 28–32.
58. Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F. // *Biotechnol. Tech.* 1999. V. 13. № 12. P. 859–863.
59. Majtan V., Hostacka A., Majtanova L., Trupl J. // *Folia Microbiol.* 2002. V. 47. № 4. P. 445–449.
60. van der Maarel M.J.E.C., van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H., Dijkhuizen L. // *J. Biotechnol.* 2002. V. 94. № 2. P. 137–155.
61. Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F. // *Chemosphere*. 2000. V. 40. № 4. P. 339–346.
62. Yerushalmi L., Manuel M.F., Guiot S.R. // *Biodegradation*. 1999. V. 10. P. 341–352.
63. Sutton N.B., Grotenhuis J.T.C., Langenhoff A.A.M., Rijnaarts H.H.M. // *J. Soils Sediments*. 2011. V. 11. P. 129–140.
64. Гоголева О.А., Немцева Н.В., Бухарин О.В. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2012. Т. 48. № 6. С. 612–617.
65. Sazykin I., Sazykina M., Khmelevtsova L., Khammami M., Karchava S., Kudeevskaya E. // *Ann. Microbiol.* 2016.
<https://doi.org/10.1007/s13213-015-1188-9>
66. Sazykin I.S., Sazykina M.A., Khmelevtsova L.E., Seliverstova E.Yu., Karchava Sh. K., Zhuravleva M.V. // *Arch. Microbiol.* 2018. V. 200. № 7. P. 1057–1065.
67. Achuba F.I., Peretiemo-Clarke B.O. // *Int. Agrophys.* 2008. V. 22. № 1. P. 1–4.
68. Leilei Z., Mingxin H., Suiyi Z. // *Afr. J. Microbiol. Res.* 2012. V. 6. № 6. P. 1213–1220.
69. Achuba F.I., Okoh P.N. // *Open J. Soil Sci.* 2014. V. 4. P. 399–406.
70. Ogbolosingha A.J., Essien E.B., Ohiri R.C. // *J. Environ. Earth Sci.* 2015. V. 5. № 14. P. 128–142.
71. Petigara B.R., Blough N.V., Mignerey A.C. // *Environ. Sci. Technol.* 2002. V. 36. № 4. P. 639–645.

Procarotic Peroxidases and Their Application in Biotechnology (Review)

L. E. Khmelevtsova^{a,*}, I. S. Sazykin^a, T. N. Azhogina^a, and M. A. Sazykina^a

^a*Southern Federal University, Ivanovsky Academy of biology and biotechnology, Rostov-on-Don, 344090 Russia*

**e-mail: lehmelevcova@srfedu.ru*

In the review the publications devoted to a variety of structures and functions of procarotic peroxidases are discussed. The most significant groups of peroxidases found in bacteria, such as catalases (Kat), catalases peroxidases (CP), di-heme cytochrome-c peroxidases (DiHCcP), dye-decolorizing peroxidases (DyP) are described. The data on their use in biotechnology are presented. Their participation in biodegradation of recalcitrant substrates by microorganisms and the possibility of their use in bioremediation are discussed.

Keywords: peroxidases, procaryotes, lignin, hydrocarbons, bioremediation

УДК 577.29

МАЛЫЕ РНК *Mycobacterium tuberculosis* В АДАПТАЦИИ К СТРЕССОВЫМ УСЛОВИЯМ, МОДЕЛИРУЮЩИМ ИНФЕКЦИЮ *in vitro*

© 2020 г. А. А. Острик^{1, *}, Е. Г. Салина¹, Ю. В. Скворцова², А. С. Григоров²,
О. С. Быченко², А. С. Капрельянц¹, Т. Л. Ажикина²

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

²Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

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

Поступила в редакцию 03.02.2020 г.

После доработки 17.02.2020 г.

Принята к публикации 25.02.2020 г.

Ранее была выявлена роль малых некодирующих РНК в регуляции метаболизма *Mycobacterium tuberculosis*. В работе показано, что выживаемость *M. tuberculosis* в условиях, имитирующих попадание бактерии в организм человека при инфекции, зависела от уровня экспрессии малых РНК. Получены штаммы *M. tuberculosis*, гиперэкспрессирующие малые РНК MTS1338 и MTS0997, изучена их выживаемость в стрессовых условиях *in vitro* и в макрофагах человека. Гиперэкспрессия малой некодирующей РНК MTS1338 повышала устойчивость бактерий к стрессовому воздействию пероксида водорода, оксида азота, кислой среды и длительного ограничения питательных веществ на разных стадиях роста культуры и способствовала сохранению жизнеспособности бактерий в макрофагах. Гиперэкспрессия малой некодирующей РНК MTS0997 не оказывала существенного влияния на способность клеток переживать стрессовые условия.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, малые некодирующие РНК, инфекция макрофагов

DOI: 10.31857/S0555109920040121

Малые РНК выполняют роль транскрипционных регуляторов у бактерий, позволяя клеткам быстро реагировать на изменяющиеся условия среды [1, 2]. Многие малые РНК обнаружены у патогенных видов бактерий, и показана их роль в развитии заболеваний [3]. Туберкулез является чрезвычайно распространенной инфекцией и занимает 9 место среди причин смертности населения в мире [4]. В России в 2018 г. диагностировано более 60 тысяч новых случаев активной формы туберкулеза [https://rospotrebnadzor.ru]. Возбудитель инфекции *Mycobacterium tuberculosis* может длительно сохраняться в организме, обуславливая латентную инфекцию, которая способна переходить в активную форму под влиянием снижения иммунного статуса [5]. Механизмы, позволяющие микобактериям избегать факторов иммунной защиты организма хозяина, длительно сохранять жизнеспособность в условиях стрессового воздействия при внутриклеточном персистировании и переходить из покоящегося состояния в активное, обуславливают успешность *M. tuberculosis* как возбудителя инфекции и являются предметом тщательного изучения. Считается, что малые РНК играют важную роль в приспособлении ми-

кобактерий к паразитическому образу жизни [6]. В настоящее время у *M. tuberculosis* с помощью биоинформационного анализа транскриптомных профилей предсказано несколько сотен малых РНК, часть из которых подтверждена экспериментально [3, 7]. Механизм регуляторного действия, однако, установлен лишь для нескольких из них.

Впервые функция малой РНК в *M. tuberculosis* была установлена для малой РНК mcr7 [8]. Она является одним из транскрипционных регуляторов в двухкомпонентной системе PhoPR, которая играет важную роль в проявлении вирулентных свойств микобактерий. Mcr7 изменяет трансляцию мРНК гена *tatC*, тем самым влияя на активность белка Tat (Twin Arginine Translocation protein), в результате чего нарушается секреция иммунодоминантного комплекса Ag85 и бета-лактамазы BlaC. В условиях дефицита железа и, в меньшей степени, при повреждении мембран и при окислительном стрессе, в клетке возрастает концентрация малой РНК MrsI (ncRv11846, *mycobacterial regulatory sRNA in iron*) [9]. Посредством прямого связывания с мРНК она регулирует экспрессию железо-связывающих белков, подготавливая бакте-

рию к существованию внутри клетки хозяина. 6С — еще одна малая РНК, для которой недавно доказан механизм действия, имеет сайт связывания с мРНК гена *panD*, кодирующего аспартатдекарбоксилазу, и с мРНК гена *dnaB*, кодирующего репликативную ДНК-хелиазу [10]. В результате взаимодействия репрессируется трансляция кодируемых белков, что приводит к замедлению роста бактерий.

Особое внимание привлекают малые РНК, индуцируемые во время инфекции. Изучение их функции может приблизить нас к пониманию механизмов патогенеза туберкулеза. К таким малым РНК относятся MTS0997 (MTB000063, *mcr11*) и MTS1338 (MTB000077, *DrrS*), которые и стали предметом исследования в работе [1, 11]. Эти малые РНК присутствуют только у патогенных видов микобактерий (*M. tuberculosis* complex), имеют стабильную вторичную структуру и высоко консервативны. Впервые они были обнаружены при анализе тотального транскриптома *M. tuberculosis* методом RNA-seq и подтверждены Нозерн-блоттингом [12].

Изучение этих малых РНК выявило некоторые закономерности их транскрипции, посттранскрипционных модификаций и деградации, но механизм их действия и роль в патогенезе инфекции до сих пор не известны. MTS0997 и MTS1338 накапливаются в клетках в стационарной фазе роста, а в моделях инфекции мышей, восприимчивых к туберкулезу, уровни транскрипции данных малых РНК возрастают многократно и сравнимы с уровнем 16S рРНК [12]. Это позволяет предположить, что они регулируют ответ на стрессовое воздействие, которое микобактерии испытывают после фагоцитоза в организме хозяина.

Экспрессия малой РНК MTS0997 зависит от фазы роста микобактерий, а также от условий: уровень повышается при голодании и снижается при выращивании в кислой среде [13]. РНК MTS0997 функционально связана со смежными генами — *Rv1264* и *Rv1265*. *Rv1265* кодирует ДНК-, АТФ-связывающий белок (*AbmR*), увеличивающий экспрессию *Mcr11* в стационарной фазе роста [14]. Предполагаемые мишени MTS0997 — мРНК генов *Rv3282*, *fadA3* и *lipB*, вовлеченных в липидный метаболизм [15]. При выращивании *M. tuberculosis* и *M. bovis* в среде без источников жирных кислот штаммы с делецией малой РНК MTS0997 отставали в росте. РНК MTS1338 является очень стабильным транскриптом, время полужизни которого составляет 6 ч [16], ее экспрессия функционально связана с регулоном *DosR*, активирующемся при стрессовом воздействии оксида азота, свободных радикалов кислорода и гипоксии. Было показано, что малые РНК MTS0997 и MTS1338 высокоэкспрессированы в покоящихся “некультивируемых” клетках *M. tuberculosis in vitro*, гиперэкспрессия этих ма-

лых РНК в клетках приводит к замедлению их роста в стандартных условиях *in vitro* [17].

Полученные данные указывают на возможную роль малых РНК MTS0997 и MTS1338 во взаимодействии “патоген-хозяин”, в первую очередь при адаптации микроорганизмов к персистированию внутри макроорганизма. Попадая в организм человека, микобактерии фагоцитируются макрофагами, где они способны сохранять жизнеспособность на протяжении длительного времени, несмотря на агрессивную внутриклеточную среду: продукцию NO, окислительный стресс, низкие значения pH (до 5.5), а также недостаток питательных веществ.

Цель работы — изучение влияния гиперэкспрессии малых РНК MTS1338 и MTS0997 на выживаемость *M. tuberculosis* в условиях стресса.

МЕТОДИКА

Культивирование бактерий. Бактерии *M. tuberculosis* штамм H37Rv (“ЦНИИ Туберкулеза”, Россия) выращивали в жидкой среде Сотона (г/л дистиллированной воды: L-аспарагин — 4, KH_2PO_4 — 0.5, MgSO_4 — 1.4, железо лимоннокислое аммиачное — 0.05, натрий лимоннокислый трехзамещенный — 2, ZnSO_4 — 0.1, глицерин — 60 мл, pH 7.2) в присутствии ростовой добавки альбумин-декстроза-каталаза (АДК, “HiMedia”, Индия), 0.05% твина-80 при 37°C. Культивирование проводили при перемешивании (200 об./мин) в течение 7 сут до достижения логарифмической фазы роста (оптическая плотность $\text{ОП}_{600} = 1-1.5$) или в течение 15–16 сут до достижения стационарной фазы роста ($\text{ОП}_{600} > 10$). Для штаммов, содержащих плазмиду, в среду вносили канамицин до конечной концентрации 50 мкг/мл. Исходная концентрация бактерий определялась посевом культуры на чашки с плотной питательной средой Миддлбура 7H11 с ростовой добавкой АДК.

Гиперэкспрессия малых РНК. Штамм *M. tuberculosis* H37Rv трансформировали посредством электропорации плазмидой pMV-261, содержащей вставку с геном малой РНК MTS0997 (0997over) или малой РНК MTS1338 (1338 over), под микобактериальным промотором *gtnB*. Плазмиды были получены как описано ранее [17]. Гиперэкспрессия была подтверждена методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Для выделения РНК клетки бактерий быстро охлаждали на льду, центрифугировали, тотальную РНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции, как описано ранее [18]. Клетки разрушали с помощью кремний-циркониевых бус на дезинтеграторе BeadBeater (“BioSpec Products”, США). После выделения РНК образцы обрабатывали ДНКазой I Turbo DNase (“Life Technologies”, США) для удаления примеси геномной ДНК. Для син-

теза комплементарной ДНК (кДНК) использовали 1 мкг тотальной РНК, гексануклеотидные праймеры Random(dN)₆ и обратную транскриптазу SuperScript III (“Life Technologies”, США) в соответствии с протоколом изготовителя. Количественную ПЦР проводили с использованием смеси реагентов qPCRmix-HS SYBR (“Evrogen” Россия) и амплификатора LightCycler 480 (“Roche”, Швейцария). Условия амплификации: 20 с при 95°C, 20 с при 61°C, 30 с при 72°C, 40 циклов. Все опыты были сделаны в трех повторностях. Данные ПЦР в реальном времени обсчитывали с помощью программ LightCycler480, LC480 Conversion, LinReg-PCR и Microsoft Excel. Уровень экспрессии генов малых РНК нормировали по референсному гену 16S рРНК.

Праймеры для ОТ-ПЦР:

qPCR_MTS1338_for GGGGAAACCCGGT-GATCTG; qPCR_MTS1338_rev GGTAGGT-CAAACCGGGTGTACAT; qPCR_MTS0997_for GAAGCAGGCCCGGTTAGTGA; qPCR_MTS0997_rev GGCAGACCCGGCGTGACT; 16S_MTB_for TACGTAGGGTGCAGCGCTTG; 16S_MTB_rev CCCGCACGCTCACAGTTAAG.

Стрессовое воздействие. Воздействие стресса изучали, используя штамм *M. tuberculosis* H37Rv трансформированный плазмидой pMV-261, содержащей вставку с геном малой РНК MTS0997 (0997over) или малой РНК MTS1338 (1338over), в качестве контроля использовали штамм *M. tuberculosis* H37Rv трансформированный плазмидой pMV-261 без вставки. Клетки *M. tuberculosis*, собранные в логарифмической фазе роста (7 сут культивирования), отмывали 10 мМ фосфатно-солевым буферным раствором pH 7.4 (ФСБР) и разводили в свежей среде Сотона с ростовой добавкой АДК до оптической плотности (ОП₆₀₀) 0.2, после чего добавляли H₂O₂ в концентрации 5 мМ для создания условий окислительного стресса, донор оксида азота — диэтилентриамин-NO (ДЕТА-NO) (“Sigma”, США) в конечной концентрации 500 мкМ для создания нитрозативного стресса. Для создания кислотного стресса клетки разводили в свежей среде Сотона с ростовой добавкой АДК и pH 5.8 до оптической плотности 0.2 (ОП₆₀₀).

Клетки культуры осаждали при 4000 g и отмывали ФСБР, а затем разводили до оптической плотности 0.2 (ОП₆₀₀) в собственном супернатанте с добавлением стрессовых агентов: H₂O₂ (10 мМ) или ДЕТА-NO (500 мкМ). Для кислотного стресса отмывые культуры разводили в свежей среде Сотона с ростовой добавкой АДК и 0.05% твина-80, с pH 5.8. Бактерии инкубировали со стрессовыми агентами в течение 48 ч при 37°C и перемешивании (200 об./мин). Для создания условий ограничения питательных веществ бактерии помещали в ФСБР на 28 сут при 37°C в статическом режиме.

Стрессовое воздействие оценивали по изменению уровня метаболической активности клеток, которую, в свою очередь, оценивали по уровню включения радиоактивно меченого урацила. Для этого 2 мкл 5,6,-[³H]-урацила (2 мкКи) добавляли к 1 мл культуры и инкубировали 20 ч при 37°C и перемешивании. Затем 200 мкл культуры помещали в 7%-ный раствор уксусной кислоты на 15 мин при 0°C, после чего осаждали фильтрованием на стекловолоконном микрофилтре (“Whatman”, США). Осажденные клетки промывали 3 мл 7%-ной уксусной кислоты и 3 мл 96%-ного этанола. Фильтр помещали в сцинтилляционную жидкость Ultima Gold (“PerkinElmer”, США), подсчет импульсов осуществляли с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика LS analyser (“Beckman Instruments Inc.”, США). Выживаемость бактерий оценивали по изменению КОЕ при посеве на плотную питательную среду в сравнении с контрольным образцом без стрессового воздействия. Каждый опыт был сделан в трех повторностях.

Инфекция макрофагов. Культуру клеток моноцитов человека THP-1 (ATCC #TIB-202). Клеточная линия была предоставлена Копниным П.Б. (НИИ Канцерогенеза “Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России, лаборатория цитогенетики) высевали в 24-луночные планшеты (“Costar”, США) и дифференцировали в присутствии 100 нг/мл фобол-12-меристат-13-ацетата (ФМА, “Sigma-Aldrich”, США) в течение 48 ч в среде RPMI-1640 (“Gibco BRL”, США), с 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС) (“Gibco BRL”, США) при 5%-ном CO₂, 37°C. Бактерии выращивали до логарифмической фазы роста (ОП₆₀₀ = 0.5–1) в питательной среде Миддлбрука 7H9 с ростовой добавкой АДК, содержащей канамицин (50 мкг/мл) и твин-80 (0.05%). Клетки отделяли центрифугированием при 4000 g и отмывали ФСБР, затем ресуспендировали в среде RPMI-1640 и проводили инфицирование при 37°C в течение 4 ч. Заражение проводили в лунках 24-луночного планшета (500 мкл), используя различную концентрацию бактерий (МОИ 2.0 и 0.5 — множественность инфицирования макрофагов: микобактерии 1 : 2 и 1 : 0.5). После фагоцитирования макрофаги отмывали от непоглощенных микобактерий ФСБР 5 раз, далее через 4, 24, 48, и 72 ч от начала инфекции проводили лизис макрофагов 0.05%-ным раствором ДДС-Na 30 мин при 37°C и высевали микобактерии на плотную среду Миддлбрука с АДК для подсчета КОЕ. Бактерии выращивали при 37°C в течение 20–22 сут. Каждый опыт был сделан в трех повторностях.

Статистическую обработку данных проводили с помощью непарного t теста Стьюдента. За статистически достоверные принимались значения с $p < 0.05$.

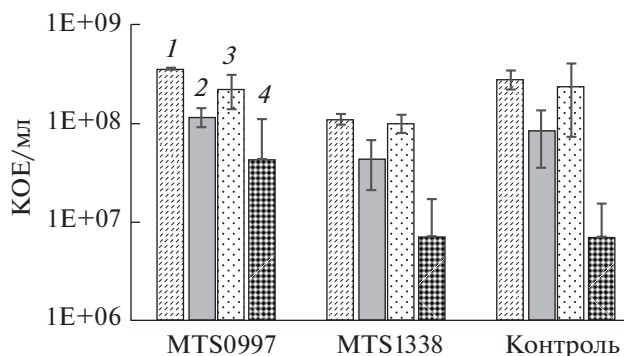


Рис. 1. Выживаемость клеток *M. tuberculosis* логарифмической фазы роста штаммов 099 over, 1338 over и контрольного 48 ч без стрессового воздействия (1), в кислой среде (2), в присутствии H_2O_2 (3) и через 28 сут голодания в фосфатно-солевом буферном растворе (4).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В цитоплазме макрофагов в организме хозяина микобактерии подвергаются целому ряду стрессовых воздействий: кислая среда, перекисное окисление, присутствие оксида азота NO и нехватка питательных веществ. Изучено влияние этих стрессовых факторов на клетки *M. tuberculosis*, гиперэкспрессирующие малые РНК MTS0997 и MTS1338, в логарифмической и в стационарной фазе роста *in vitro*. Для экспрессии экзогенных копий малых РНК использовали модифицированный плазмидный вектор pMV261, содержащий ген исследуемой малой РНК под контролем промотора гена *gtnB*, который обеспечивает высокий уровень транскрипции [17]. Клетки *M. tuberculosis* трансформировали этим вектором, в качестве контроля использовали плазмиду без вставки (пустой вектор). Для подтверждения гиперэкспрессии малых РНК в полученных штаммах проводили количественную ОТ-ПЦР, которая показала, что количество транскриптов MTS0997 в логарифмической фазе роста культуры увеличивалось в 5–6 раз, MTS1338 — в 8–10.

Стрессовое воздействие на клетки, собранные в логарифмической фазе роста, оценивали путем посева на плотную питательную среду и подсчета КОЕ, сравнивая с величинами КОЕ контрольного образца клеток, не подвергавшегося стрессовому воздействию (рис. 1), а также по изменению метаболической активности клеток, регистрируемой по уровню включения радиоактивно меченного 3H -урацила (рис. 2). Для штаммов, не подвергавшихся стрессовым воздействиям, уровень включения урацила был принят за 100%.

Сравнение величин КОЕ обнаружило, что низкие значения pH среды и длительное голодание в ФСБР негативно влияли на выживаемость бактерий. При сравнении КОЕ клеток, подвергшихся стрессовому воздействию, с контрольным образ-

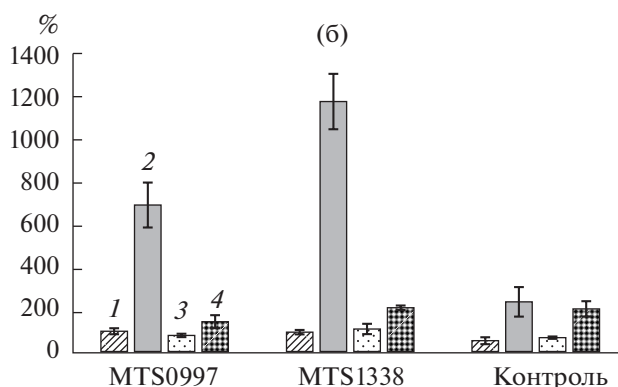
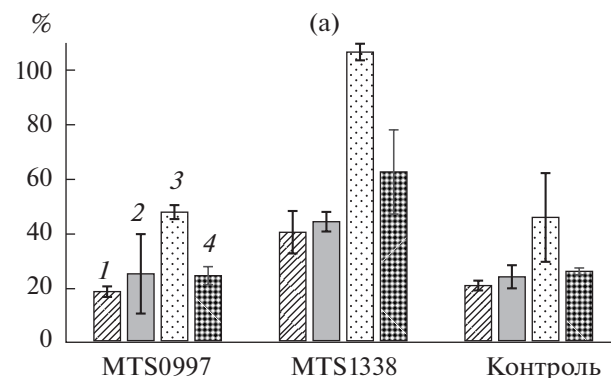


Рис. 2. Уровни включения 3H -урацила в клетки *M. tuberculosis* 0997 over, 1338 over и контрольного штамма (в % к штамму без воздействия) через 48 ч после воздействия NO (1), кислой среды (2), H_2O_2 (3) и через 28 сут голодания в фосфатно-солевом буферном растворе (4) для клеток в логарифмической (а) и стационарной (б) фазы роста.

цом, можно заметить, что относительное снижение выживаемости было минимальным у штамма с гиперэкспрессией MTS1338 (рис. 1). Следует отметить, что пероксид водорода не оказывал существенного действия на выживаемость клеток контрольного штамма и штаммов с гиперэкспрессией MTS0997 и MTS1338, однако изменял уровень включения радиоактивно меченного 3H -урацила (рис. 2а).

Все три штамма демонстрировали снижение уровня включения 3H -урацила в присутствии H_2O_2 , однако штамм с гиперэкспрессией MTS1338 был наименее подвержен окислительному стрессу — уровень включения 3H -урацила был сравним с таковым в отсутствии стресса. Наиболее выраженное воздействие на все исследуемые штаммы *M. tuberculosis* оказывал оксид азота(II). Штамм с гиперэкспрессией малой РНК MTS1338 был более устойчив к NO, чем контрольный штамм, статистически достоверных различий между штаммом, гиперэкспрессирующим MTS0997, и контрольным штаммом не было выявлено. При инкубировании

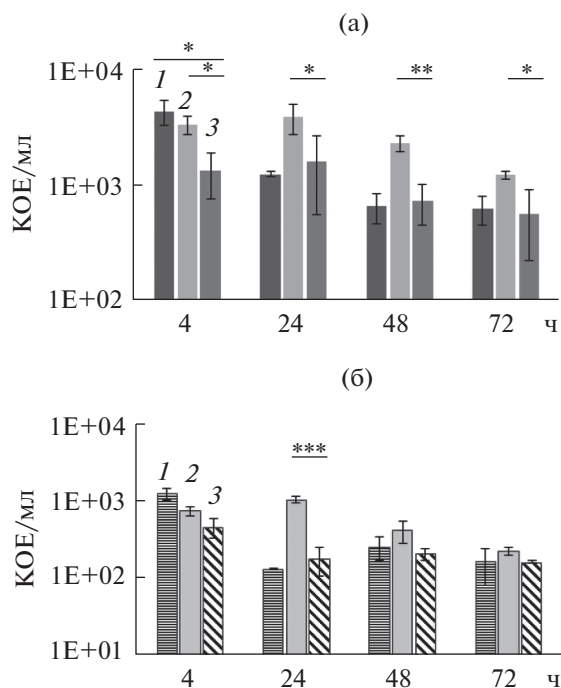


Рис. 3. Выживаемость *M. tuberculosis* штаммов 0997over (1), 1338over (2) и контрольного штамма (3) внутри макрофагов при MOI = 2 (а) и MOI = 0.5 (б); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

бактерий в кислой среде выживаемость *M. tuberculosis* падала, что подтверждалось снижением уровня включения урацила. В условиях длительного голодания штамм с гиперэкспрессией малой РНК MTS1338 также демонстрировал значительную устойчивость.

При оценке изменения метаболической активности клеток стационарной фазы роста было обнаружено, что все исследуемые штаммы микобактерий были более устойчивы к воздействию стрессовых факторов по сравнению с клетками в логарифмической фазе роста (рис. 2б). Следует отметить, что культивирование в среде с низким значением pH приводило к значительной активации клеток и их делению. Вероятно, это связано с выделением микобактериями ионов аммония в результате работы таких ферментов, как аспарагиназа (Rv1538c), моноаминоксидаза (Rv3170) или деаминаза (Rv0828c) [19], что приводило к защелачиванию среды и формированию благоприятных для роста условий. При этом метаболическая активность штаммов с гиперэкспрессией малых РНК спустя 48 ч была значительно выше исходных значений (до воздействия стресса), что более выражено для гиперэкспрессии MTS1338.

Ранее было показано, что экспрессия малой РНК MTS0997 снижается в кислой среде и при воздействии оксида азота, и повышается при голодании [13], при этом накопление малой РНК не

изменялось в условиях гипоксии [20]. Таким образом, дифференциальная экспрессия малой РНК MTS0997 в условиях стресса указывала на возможное ее участие в процессах адаптации. Показано, что индуцированное увеличение синтеза РНК MTS0997 в клетке существенно не отражалось на ее выживаемости в этих условиях. Напротив, гиперэкспрессия MTS1338 приводила к повышению устойчивости бактерии к стрессу, что подтвердили данные о ее роли в патогенезе *M. tuberculosis* [12, 21].

При экспериментальном заражении мышей *M. tuberculosis* в бактериальном транскриптоме накапливаются малые РНК MTS1338 и MTS0997 в высоких концентрациях, сравнимых с рибосомными РНК [12, 21]. Кроме того, экспрессия MTS1338 повышается в макрофагах, активированных γ -интерфероном [11].

Чтобы оценить вклад малых РНК в способность микобактерий приспосабливаться к внутриклеточному существованию, проводили инфекцию макрофагов человека штаммами *M. tuberculosis* H37Rv, гиперэкспрессирующими малые РНК MTS1338 и MTS0997. Культуры клеток THP-1, дифференцированную в макрофаги, инфицировали бактериями с MOI 2.0 и 0.5 и определяли выживаемость бактерий в разное время по высеву на твердую среду. Гиперэкспрессия MTS1338 положительно влияла на выживаемость микобактерий внутри макрофагов во всех временных точках, наиболее ярко эффект проявился при MOI 2.0. Для штамма, гиперэкспрессирующего MTS0997, не было выявлено достоверной разницы выживаемости бактерий при инфекции.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод, что существует связь малой РНК MTS1338 с адаптацией микобактерии к персистенции внутри макрофагов во время инфекции *M. tuberculosis*. Механизм действия данной малой РНК может быть выяснен с помощью дальнейшего изучения профилей транскрипции *M. tuberculosis* под действием стрессовых факторов, аналогичным тем, которые бактерии испытывают в среде макроорганизма.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 18-15-00332).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ажикина Т.Л., Игнатов Д.В., Салина Е.Г., Фурсов М.В., Капельяни А. С. // Успехи биологической химии. 2015. Т. 55. С. 3–32.
2. Gottesman S., Storz G. // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 2011. V. 71. P. 1–16.
3. Haning K., Cho S.H., Contreras L.M., Murphy E.R. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2014. V. 4. P. 1–11.
4. World Health Organization. Geneva: Global Tuberculosis Report, 2019. 283 p. ISBN 978-92-4-156571-4.

5. Dye C. // Lancet. 2006. V. 367. № 9514. P. 938–940.
6. Schwenk S., Arnvig K.B. // Pathog. Dis. 2018. V. 76. № 4. P. 1–12.
7. Namouchi A., Gómez-Muñoz M., Frye S.A., Moen L.V., Rognes T., Tønjum T., Balasingham S.V. // BMC Genomics. 2016. V. 17. № 1. P. 1–13.
8. Solans L., Gonzalo-Asensio J., Sala C., Benjak A., Uplekar S., Rougemont J., Guilhot C., Malaga W., Marti'n C., Cole S.T. // PLoS Pathog. 2014. V. 10. № 5. P. 1–17.
9. Gerrick E.R., Barbier T., Chase M.R., Xu R., François J., Lin V.H., Szucs M.J., Rock J.M., Ahmad R., Tjaden B., Livny J., Fortune S.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2018. V. 115. № 25. P. 6464–6469.
10. Mai J., Rao C., Watt J., Sun X., Lin Z., Zhang L., Liu J. // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47. № 8. P. 4292–4307.
11. Salina E.G., Grigorov A., Skvortsova Y., Majorov K., Bychenko O., Ostriak A., Logunova N., Ignatov D., Kaprelyants A., Apt A., Azhikina T. // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2019. V. 9. № 405. P. 1–11.
12. Arnvig K.B., Comas I., Thomson N.R., Houghton J., Boshoff H.I., Croucher N.J., Rose G., Perkins T., Parkhill J., Dougan G., Young D.B. // PLoS Pathog. 2011. V. 7. № 11. P. 1–16.
13. Pelly S., Bishai W.R., Lamichhane G. // Gene. 2012. V. 500. № 1. P. 85–92.
14. Girardin R.C., Bai G., He J., Sui H., McDonough K.A. // Mol. Microbiol. 2018. V. 110. № 5. P. 811–830.
15. Girardin R.C., McDonough K.A. // Mol. Microbiol. 2019. V. 111. № 5. P. 1–17.
16. Moores A., Riesco A.B., Schwenk S., Arnvig K.B. // PLoS One. 2017 V. 12. № 3. P. 1–27.
17. Ignatov D.V., Salina E.G., Fursov M.V., Skvortsov T.A., Azhikina T.L., Kaprelyants A.S. // BMC Genomics. 2015. V. 16. № 1. P. 1–13.
18. Rustad T.R., Roberts D.M., Liao R.P., Sherman D.R. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 465. P. 13–21.
19. Shleeve M.O., Kudykina Y.K., Vostroknutova G.N., Suzina N.E., Mulyukin A.L., Kaprelyants A.S. // Tuberculosis. 2011. V. 91. № 2. P. 146–154.
20. DiChiara J.M., Contreras-Martinez L.M., Livny J., Smith D., McDonough K.A., Belfort M. // Nucleic Acids Res. 2010. V. 38. № 12. P. 4067–4078.
21. Игнатов Д.В., Логунова Н.Н., Ажикина Т.Л. // Биоорг. химия. 2014. Т. 40. № 2. С. 253–256.

Small RNAs of *Mycobacterium tuberculosis* in Adaptation to Host-Like Stress Conditions *in vitro*

A. A. Ostriak^{a,*}, E. G. Salina^a, Y. V. Skvortsova^b, A. S. Grigorov^b,
O. S. Bychenko^b, A. S. Kaprelyants^a, and T. L. Azhikina^b

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

^bShemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

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

Regulatory mechanisms of pathogenic bacteria contribute to their survival under stress conditions in the host environment, which allows them to avoid the immune system of the macroorganism. Previously small non-coding RNAs were found to regulate some metabolic processes of *Mycobacterium tuberculosis*. Here we revealed that viability of *M. tuberculosis* in host-like conditions depends on the small RNAs expression level. Strains overexpressing small RNAs MTS1338 and MTS0997 in *M. tuberculosis* were produced and their survival under stressful conditions *in vitro* and in infected human macrophages were studied. We found that overexpression of the small non-coding RNA MTS1338 increased bacterial resistance to stressful effects of hydrogen peroxide, nitric oxide, acidic environment and long-term lack of nutrients at different growth phases, and contributed viability of bacteria in infected macrophages. Overexpression of small non-coding RNA MTS0997 did not significantly affect cell viability under stress conditions. Thus, the two small RNAs studied play different roles in the adaptation of mycobacteria to intracellular stresses during infection.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, small non-coding RNAs, macrophage infection

УДК 579.22

ВЛИЯНИЕ БИОГЕННЫХ ПОЛИАМИНОВ НА АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И ПОВЕРХНОСТНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК *Mycobacterium smegmatis*

© 2020 г. Л. Ю. Нестерова^{1, 2, *}, И. В. Цыганов^{1, 2}, А. Г. Ткаченко^{1, 2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермский федеральный исследовательский центр
Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, 614081 Россия

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990 Россия

*e-mail: larisa.nesterova@bk.ru

Поступила в редакцию 09.12.2019 г.

После доработки 20.02.2020 г.

Принята к публикации 25.02.2020 г.

Биогенные полиамины оказывают влияние на свойства поверхности клеток *Mycobacterium smegmatis*. Присутствие в среде культивирования спермидина и спермина значительно изменяет способность к скольжению и заряд клеточной поверхности, однако не влияет на степень ее гидрофобности/гидрофильности. В присутствии полиаминов усиливается агрегация клеток и способность к формированию биопленок. В то же время, полиамины снижают чувствительность к антибиотикам как планктонных форм микобактерий, так и биопленок, что может быть обусловлено действием этих соединений на поверхностные структуры клеток. Впервые показано, что спермин усиливает действие рифампицина, что может представлять интерес с точки зрения терапии заболеваний, вызванных микобактериями.

Ключевые слова: биогенные полиамины, антибиотикочувствительность, скольжение, биопленкообразование, *Mycobacterium smegmatis*

DOI: 10.31857/S055510992004011X

Одной из наиболее актуальных проблем медицины и микробиологии в течение многих лет остается лечение туберкулезной инфекции. Это заболевание входит в десятку ведущих причин смертности. По данным ВОЗ в настоящее время около четверти населения земного шара инфицированы *Mycobacterium tuberculosis* [1]. Несмотря на то, что частота патологических процессов, вызванных нетуберкулезными микобактериями, относительно невелика по сравнению с возбудителем туберкулеза, в последние два десятилетия неуклонно растет заболеваемость микобактериозами [2]. Особую тревогу вызывает снижение чувствительности к антибактериальным препаратам как у штаммов *M. tuberculosis*, так и среди других бактерий [1].

Пониженная чувствительность к антибактериальным препаратам в большинстве случаев возникает в результате появления специфических мутаций либо приобретения бактериями детерминант резистентности в процессе горизонтального переноса генов. Однако причиной снижения эффективности антибактериальных препаратов, наряду с генетически закрепленной антибиотикорезистентностью, является физиологическая толерантность,

которая формируется в ответ на специфические факторы внутренней и внешней среды и, в ряде случаев, создает условия для отбора высокорезистентных форм [3, 4]. Ранее показано, что одним из факторов, которые участвуют в формировании физиологической толерантности у бактерий, являются биогенные полиамины [5] — эволюционно древние соединения, которые обнаруживаются в клетках представителей всех таксонов живых организмов.

Полиамины относятся к группе алифатических углеводородов, имеют в составе амино- и иминогруппы и различаются длиной углеродной цепи. В биологических объектах наиболее часто обнаруживаются диамины — путресцин, кадаверин; триамины — спермидин, норспермидин, и тетраамины — агматин и спермин [6]. В клетках эукариотических организмов синтезируются в основном спермин и спермидин, а также в небольших количествах путресцин. Бактерии в значительном количестве продуцируют путресцин, кадаверин и в меньшем — спермидин. Некоторые из них способны синтезировать спермин и другие полиамины [6, 7]. Поликатионная

природа этих соединений определяет возможность их присутствия в клетках как в свободном, так и в связанном с полианионными структурами состоянии. Это же свойство обуславливает участие полиаминов во многих процессах, обеспечивающих жизнедеятельность микроорганизмов. Известно, что полиамины способны оказывать влияние на транспортные процессы, изменяя проницаемость пориновых каналов [8], регулировать процессы репликации [9], транскрипции, трансляции и деградации белков [10, 11], а также модулировать генную экспрессию, в том числе, при адаптации к различным стрессовым факторам [12, 13] и формировании персистерного состояния у бактерий [5].

В литературе приводятся данные о влиянии биогенных полиаминов на чувствительность к антибиотикам некоторых грамотрицательных микроорганизмов [14]. Синтез полиаминов и накопление их в клетках в больших количествах характерны именно для этой группы бактерий. Однако гены синтеза этих соединений обнаружены и у некоторых грамположительных микроорганизмов, например, у лактобактерий [14], а также у микобактерий [15]. Кроме того, благодаря развитым системам транспорта, полиамины, присутствующие в тканях хозяина, становятся доступными для бактерий-симбионтов и паразитов животных и человека [16]. Однако в литературе практически не встречаются данные о накоплении полиаминов в клетках микобактерий, несмотря на наличие у них соответствующих ферментов [15, 17]. Вместе с тем, известно, что полиамины, благодаря присутствию в их структуре положительно заряженных аминогрупп, способны взаимодействовать с отрицательно заряженными компонентами клетки, в том числе, с фосфолипидами мембраны и отдельными структурами клеточной стенки [18]. При наличии полиаминов во внешней среде это может воздействовать на свойства поверхностных структур клетки и изменять их функциональную активность. Подобные изменения могут оказывать влияние на способность к адгезии и другие свойства, обуславливающие патогенность и колонизирующую способность бактерий, а также вносить вклад в изменение их чувствительности к антибиотикам.

Цель работы — изучение влияния биогенных полиаминов на чувствительность к антибактериальным препаратам и поверхностные свойства клеток микобактерий.

МЕТОДИКА

Микроорганизмы и условия культивирования. В качестве объекта исследования использован штамм *Mycobacterium smegmatis* mc² 155. Согласно недавно

опубликованным результатам пересмотра систематики рода *Mycobacterium* [19], *M. smegmatis* присвоено новое видовое название *Mycolicibacterium smegmatis*. Этот объект остается удобной моделью для исследования, поскольку является быстрорастущим и по многим свойствам сходен с патогенными формами микобактерий.

Культуру, хранившуюся на чашках Петри с агаризованной средой Luria-Bertani (LB) (“Sigma”, США), высевали на пробирку с 5 мл жидкой среды Middlebrook 7H9 (“Difco”, Франция), содержащей глицерин, 50 мкг/мл ампициллина (“Applichem”, Германия) и 0.05% Твин 80 (“Pan-teas”, Испания). Затем пересевали на пробирку со свежей средой и после 22–24 ч культивирования в термостатируемом шейкере (“GFL 1092”, Германия) при 37°C и 200 об./мин полученную культуру использовали в качестве инокулята. Для изучения влияния полиаминов в среду культивирования добавляли гидрохлориды путресцина, кадаверина, спермидина и спермина (“Sigma”, Швейцария) в концентрациях, указанных в подписях к рисункам.

Биопленкообразование. Для определения влияния полиаминов на биопленкообразование культуру *M. smegmatis*, выращенную в течение 24 ч, центрифугировали, удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали в свежей среде Middlebrook 7H9 без добавления Твина 80, доводя до оптической плотности (ОП₆₀₀) 0.1. Затем суспензию клеток разводили еще в 5 раз и вносили по 100 мкл в лунки полистиролового 96-луночного плоскодонного планшета (“Минимед”, Россия), куда предварительно вносили по 100 мкл раствора полиаминов в питательной среде с таким расчетом, чтобы конечная концентрация составляла 0.5, 1.0 и 2.0 мМ и культивировали в термостате при 37°C без встряхивания 72 ч. Для изучения придонных биопленок планктонную культуру удаляли, 3-кратно промывали лунки дистиллированной водой, биопленки подсушивали и окрашивали в течение 10 мин 0.1%-ным раствором генцианвиолета (“Вектон”, Россия). После 5-кратного промывания водой и полного высыхания краситель экстрагировали из биопленок 200 мкл 96%-ного этанола в течение 1 ч. Интенсивность биопленкообразования оценивали путем измерения оптической плотности окрашенного экстракта при длине волны 570 нм [20]. Расчет удельного биопленкообразования (Specific biofilm formation, SBF) проводили по методике [21] с использованием формулы: $SBF = (ОП_{570} - ОП_K) / ОП_{625}$, где ОП₅₇₀ и ОП_K — оптическая плотность экстрагированного красителя в опытной и контрольной лунке (570 нм) соответственно; ОП₆₂₅ — оптическая плотность

культуры (625 нм), выращенной в условиях, аналогичных биопленкам с добавлением Твин 80. Для количественной оценки поверхностных биопленок планктонную культуру осторожно удаляли таким образом, чтобы поверхностные пленки оставались в лунках планшета. Пленки высушивали, окрашивали генцианвиолетом, как описано выше, и вычисляли общее удельное биопленкообразование, из которого вычитали значения удельного придонного биопленкообразования.

Скольжение. Скользящие колонии выращивали в стеклянных чашках Петри (90 мм). В жидкую среду Middlebrook 7H9 добавляли агарозу (“Хеликон”, Россия) в концентрации 0.3%. Полиамины вносили в остывшую до температуры 50°C питательную среду, которую затем разливали по чашкам и подсушивали в течение 40 мин. Культуру *M. smegmatis* выращивали на питательной среде Middlebrook 7H9 до ОП₆₀₀ 1.0, разводили до ОП₆₀₀ 0.4 и наносили на агар в центр чашки Петри каплей (2 мкл) и оставляли в термостате при 37°C на 48 ч.

Для определения плотности скользящих колоний их выращивали на пластиковых чашках Петри (40 мм). Измерение площади колонии проводили после фотографирования камерой Olympus C-3040 ZOOM (Япония) по количеству пикселей, сопоставляя с размером чашки. Затем колонию вырезали вместе с полужидким агаром и помещали в микропробирку, куда вносили физиологический раствор с добавлением Твина 80 (0.05%) до конечного объема 1.0 мл и стеклянные бусы (2 мм, “Hofmann Glastechnik”, Германия). Микропробирку встряхивали на вортексе YellowLine TTS2 (“IKA-Works Inc”, США) при 1400 об./мин. 1 ч. После этого производили подсчет клеток в камере Горяева в 60 малых квадратах по диагонали. При необходимости культуру дополнительно разводили. Число клеток на мм² колонии рассчитывали по формуле: $N = ((m \times 4000d/q) \times 1000)/s$, где N — число клеток на мм² площади скользящей колонии; m — сумма посчитанных клеток; d — степень разведения; q — число малых квадратов сетки камеры Горяева, в которых считали клетки; s — площадь колонии (мм²), 4000 — коэффициент для пересчета на 1 мкл; 1000 — коэффициент для пересчета на 1 мл.

Антибиотикочувствительность. Минимальную ингибиторную концентрацию (minimal inhibitory concentration, МІС) антибиотиков определяли модифицированным методом серийных разведений (шаг между концентрациями 1.5) в 96-луночных полистироловых планшетах на среде Middlebrook 7H9 с добавлением Твина 80 (0.05%). Культуру *M. smegmatis* выращивали на питательной среде Middlebrook 7H9 до ОП₆₀₀ 1.0, разводили до

ОП₆₀₀ 0.1 и разводили еще в 5 раз питательной средой, что соответствует 6×10^5 КОЕ/мл. В лунки планшета, содержащие 100 мкл питательной среды с антибиотиком и полиаминами (конечная концентрация 2 мМ), вносили 100 мкл инокулята. Культивировали 72 ч в термошейкере Biosan PST-60HL (Латвия) при 37°C и 300 об./мин. За величину МІС принимали минимальную концентрацию антибиотика, подавляющую видимый рост микроорганизмов. Для определения минимальной бактерицидной концентрации для планктонных клеток (minimal bactericidal concentration, МВС) делали высевы из лунок планшетов, засеянных для определения МІС, на агаризованную питательную среду LB каплями по 5 мкл. МВС рассчитывали как минимальную концентрацию антибиотика, при которой количество колоний в высеве было менее 5 (количество КОЕ/мл менее 1×10^3). Минимальную бактерицидную концентрацию для клеток в составе биопленки (Minimal biofilm eradication concentration, МВЕС) определяли по методу, описанному в работе [22] с использованием технологии Calgary Biofilm Device.

Степень гидрофобности поверхности бактериальных клеток оценивали по адгезии к гексадекану с использованием МАТН-теста [23]. Клетки после культивирования с полиаминами отмывали в физрастворе, центрифугировали и ресуспендировали в РUM буфере [24] до ОП₆₀₀ 0.6. К 3 мл культуры добавляли 0.3 мл гексадекана, интенсивно встряхивали на вортексе V1 (“Biosan”, Латвия) 90 с, отстаивали 20 мин и измеряли ОП₆₀₀ водной фазы. Расчет значений гидрофобности клеточной поверхности производили в процентах относительно контроля (культура без внесения гексадекана).

Дзета-потенциал. О поверхностном заряде бактериальных клеток судили по величине дзета-потенциала (ζ), который определяли с помощью анализатора размера частиц Zetasizer nano ZS (“Malvern Instruments”, Великобритания) [25]. Клетки выращивали на LB бульоне до ОП₆₀₀ 1.0, затем отмывали от среды и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (KH₂PO₄ — 1.7 мМ; Na₂HPO₄ — 5.2 мМ; NaCl — 150 мМ; pH 7.0), добавляли полиамины и инкубировали необходимое количество времени. Непосредственно перед измерением клетки отделяли центрифугированием, ресуспендировали в 0.01 М калий-фосфатном буфере, pH 7.0, и измеряли дзета-потенциал в клеточной суспензии ОП₆₀₀ 0.3.

Агрегация бактерий. Для характеристики размера агрегатов определяли площадь проекции агрегата на плоскость. Культуру, выращенную на среде Middlebrook 7H9 без добавления Твина 80,

фотографировали с помощью камеры МС 6.3 (“ЛОМО”, Россия) под микроскопом МИКМЕД 6 (“ЛОМО”, Россия) в камере Горяева. Затем сопоставляли площадь малого квадрата камеры (2500 мкм²) с числом пикселей, соответствующих этой площади на фото. Далее определяли размер агрегата в пикселях, затем вычисляли площадь его проекции на плоскость в мкм². В каждой пробе оценивали размер не менее 30 агрегатов.

Статистическая обработка результатов. Обработку результатов проводили с использованием пакета стандартных программ Statistica 6.0 (“Stat-Soft, Inc.”). Критерии оценки статистической значимости и вид представленных данных указаны в подписях к рисункам.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние полиаминов на чувствительность *M. smegmatis* к антибиотикам. В качестве показателей, характеризующих чувствительность микобактерий к антибактериальным препаратам, оценивали минимальную ингибиторную концентрацию МІС, а также минимальную бактерицидную концентрацию как для планктонных клеток МВС, так и для клеток в составе биопленки МВЕС. Параметр МВЕС был впервые предложен для определения Цери с соавт. [26]. Одновременное определение этого показателя, МІС и МВС позволяет дифференцировать эффект антибиотиков на планктонные клетки и бактерии в составе биопленки, а соотношение этих показателей характеризует эффективность антибиотиков по отношению к этим двум типам клеток [27].

Показано, что в большинстве случаев присутствие в среде полиаминов уменьшало чувствительность микобактерий к антибиотикам. При этом значение МІС возрастало в 1.5–2.5 раза, а показатель МВС – до 4 раз (табл. 1). Наибольшее действие оказывали полиамины спермидин и спермин, что согласуется с данными, полученными ранее на *E. coli* [13].

Присутствие в среде биогенных полиаминов при воздействии антибиотиков повышало жизнеспособность не только планктонных клеток микобактерий, но и клеток в составе уже сформированной биопленки, о чем свидетельствует возрастание МВЕС (табл. 1). Несмотря на то, что антибиотикочувствительность биопленок исходно была значительно ниже, чем планктонных клеток, присутствие полиаминов способствовало еще большему ее снижению.

Исключение составляли результаты, полученные при исследовании чувствительности *M. smegmatis* к рифампицину в присутствии спермина. В

Таблица 1. Влияние полиаминов на чувствительность *M. smegmatis* к антибиотикам**

Полиамин, 2 мМ	МІС, мкг/мл			
	ИЗН	ЛФЦ	РИФ	СТР
Контроль	4.58	0.11	1.22	0.07
Путресцин	6.09	0.11	2.44	0.09
Кадаверин	4.58	0.11	1.83	0.14
Спермидин	9.14	0.17	1.83	0.19
Спермин	9.14	0.22	0.46	0.09
МВС, мкг/мл				
Контроль	9.16	0.15	19.53	0.14
Путресцин	9.16	0.30	29.30	0.19
Кадаверин	9.16	0.23	19.53	0.28
Спермидин	9.16	0.30	19.53	0.28
Спермин	12.19	0.46	7.32	0.19
МВЕС, мкг/мл				
Контроль		9.77	1250	0.7
Путресцин		19.53	2500	1.4
Кадаверин		39.06	2500	0.7
Спермидин		39.06	1250	1.4
Спермин		39.06	620	1.4

* Приведены значения моды (3–8 измерений); ** ЛФЦ – левофлоксацин, ИЗН – изониазид, РИФ – рифампицин, СТР – стрептомицин.

этом случае антибиотикочувствительность возрастала, о чем свидетельствует 3-кратное снижение значений МІС и МВС при 2-кратном уменьшении МВЕС.

Среди возможных механизмов влияния полиаминов на чувствительность бактерий к антибактериальным препаратам в литературе описаны такие, как стабилизация структуры нуклеиновых кислот, снижение окислительного повреждения макромолекул, а также формирование персистерного состояния [13, 5]. Однако эти данные касаются грамотрицательных микроорганизмов, которые продуцируют и накапливают значительное количество полиаминов в клетках и культуральной среде. В то же время, отсутствуют данные о накоплении этих соединений в значимых количествах клетками микобактерий. Однако при их присутствии в окружающей среде, полиамины могли бы активно взаимодействовать с отрицательно заряженными внешними структурами микобактериальных клеток, что, как известно, может привести к снижению их антибиотикочувствительности, за счет ограничения транспорта антибиотиков в клетку [28].

Влияние полиаминов на свойства клеточной поверхности микобактерий. В качестве параметров, характеризующих поверхностные свойства мико-

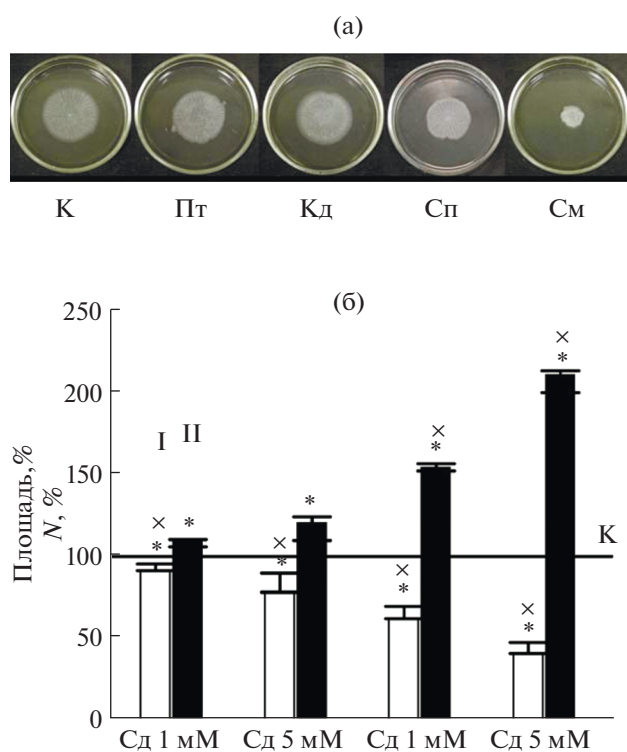


Рис 1. Влияние полиаминов на площадь и плотность скользящих колоний *M. smegmatis*: а – скользящие колонии при добавлении в среду 5 мМ полиаминов, б – изменение размера и плотности скользящих колоний в присутствии Сд и См. N – число клеток на мм² колонии; К – контроль; Пт – путресцин; Кд – кадаверин; Сд – спермидин; См – спермин. I – площадь колоний; II – число клеток на мм² колонии. I и II рассчитаны в % относительно контроля. На графиках приведены значения медианы и 1, 3 квартилей. * Статистически значимое отличие от контроля (с использованием критерия Манна–Уитни, $p \leq 0.05$). x Статистически значимое отличие между разными концентрациями одного полиамина (с использованием критерия Манна–Уитни, $p \leq 0.05$).

бактериальных клеток, оценивалась их способность к скольжению, а также степень гидрофобности/гидрофильности и дзета-потенциал клеточной поверхности.

Клетки микобактерий не имеют жгутиков, вследствие чего им недоступны плавание или роение, более того, долгое время считалось, что они вообще не способны к передвижению. Однако, сравнительно недавно показано, что микобактерии способны перемещаться по поверхностям полужидких сред посредством скольжения [29]. Из всех описанных для микроорганизмов видов перемещения, этот является наименее изученным. Скольжение представляет собой способ перемещения микроорганизмов по влажным поверхностям, который осуществляется за счет действия экспансивной силы, возникающей при давлении друг на друга делящихся клеток.

Путресцин, кадаверин, спермидин и спермин в использованных в данной работе концентрациях не оказывали значимого влияния на ростовые характеристики *M. smegmatis* (данные не показаны), однако, присутствие полиаминов в среде приводило к ограничению скользящей подвижности клеток и, как следствие, к сокращению размеров скользящих колоний микобактерий (рис. 1). При этом статистически значимые изменения вызывали только спермидин и спермин. Величина их отрицательного эффекта на скольжение возрастала с увеличением концентрации (табл. 2). При этом колония, выросшая на среде с добавкой 5 мМ спермина, имела значительно меньший диаметр по сравнению с контрольной, и составляющие ее клетки практически не распространялись по поверхности в виде монослоя, а располагались в несколько слоев, что характеризовалось увеличением количества

Таблица 2. Влияние полиаминов на скольжение микобактерий*

Диаметр колоний, мм				
контроль	50.25 (45.5; 55.7)			
добавка полиаминов, мМ	Путресцин	Кадаверин	Спермидин	Спермин
0.1	47.5 (37.7; 53.5)	54.5 (51.0; 58.2)	44.5 (37.0; 46.2)	39.0 (34.5; 42.0)**
1.0	45.0 (38.2; 49.5)	48.3 (42.0; 51.0)	42.5 (42.5; 45.1)**	35.8 (34.0; 37.5)**
5.0	46.5 (43.0; 48.0)	43.0 (38.7; 52.5)	40.0 (36; 42.5)**	23.0 (19.7; 31.5)** ^x

* Указаны значения медианы, в скобках значения 1 и 3 квартилей.

** Статистически значимое отличие от контроля (с использованием критерия Манна–Уитни, ($p \leq 0.05$)). ^x Статистически значимое отличие от варианта с 1 мМ соответствующего полиамина (критерий Манна–Уитни, ($p \leq 0.05$)).

Таблица 3. Влияние полиаминов на заряд и гидрофобность клеточной поверхности*

Концентрация полиаминов, 2 мМ	Дзетапотенциал (mV)		Степень гидрофобности, %
	30 мин	180 мин	
Контроль	–24.80 (22.60; 25.70)	–28.30 (24.40; 28.75)	81.59 (77.95; 85.25)
Путресцин	–23.10 (22.80; 23.50)	–24.70 (23.37; 25.75)	81.78 (73.69; 89.94)
Кадаверин	–23.45 (22.25; 25.22)	–24.95 (24.32; 25.50)	82.32 (76.16; 88.31)
Спермидин	–15.15 (13.10; 16.60)**	–8.99 (8.24; 9.45)**x	84.65 (80.98; 88.53)
Спермин	–10.95 (8.50; 13.50)**	–6.05(5.52; 6.52)**x	84.58 (79.59; 89.59)

* В таблице указаны значения медианы, в скобках значения 1 и 3 квартилей.

** Статистически значимое отличие от контроля. ^x Статистически значимое отличие от варианта с экспозицией 30 мин (критерий Манна–Уитни, $p \leq 0.05$).

клеток на единицу площади колонии (рис. 1). Подобный эффект полиаминов может положительно сказаться на выживаемости клеток в колонии в присутствии антибактериального препарата, поскольку верхние слои клеток будут менее доступны для воздействия антибиотика.

Согласно модели скользящего движения микобактерий, описанной в работе [30], гликопептидолипиды (GPL), присутствующие во внешних слоях клеточной стенки, благодаря их ацильным концам создают гидрофобную среду на поверхности клеток, которая уменьшает трение о гидрофильную поверхность. Таким образом, можно предположить, что полиамины оказывают влияние на скольжение микобактерий взаимодействуя с GPL, тем самым изменяя степень гидрофобности клеточной поверхности. Однако нам не удалось обнаружить значимых изменений показателя, характеризующего гидрофобность/гидрофильность клеточной поверхности *M. smegmatis*, в присутствии полиаминов (табл. 3). В то же время в присутствии биогенных полиаминов значительно изменялся заряд клеточной поверхности, который возникает при ионизации заряженных компонентов клеточной оболочки в водной среде. Об изменении поверхностного заряда свидетельствовало изменение электрокинетического потенциала (дзета-потенциала) клеток. Наибольшее действие на этот параметр оказывали спермидин и спермин. При этом величина эффекта зависела от времени экспозиции клеток в среде, содержащей полиамины (табл. 3).

Влияние полиаминов на агрегацию микобактерий и их способность к формированию биопленок. Изменение поверхностных свойств, как правило, приводит к изменению взаимодействий между клетками и клеток с поверхностью. Для оценки этих изменений исследована степень агрегации

микобактерий, а также их способность к формированию биопленок в присутствии биогенных полиаминов.

Показано, что при добавке в среду каждого из четырех исследуемых полиаминов увеличивался размер агрегатов, сформированных клетками *M. smegmatis* при выращивании в среде без добавки поверхностно-активных веществ (Твин 80). Наибольший эффект, как и в других случаях, оказывали спермидин и спермин (рис. 2).

Известно, что микобактерии, как и большинство других бактерий, способны формировать биопленки [31]. При этом поверхностные биоплен-

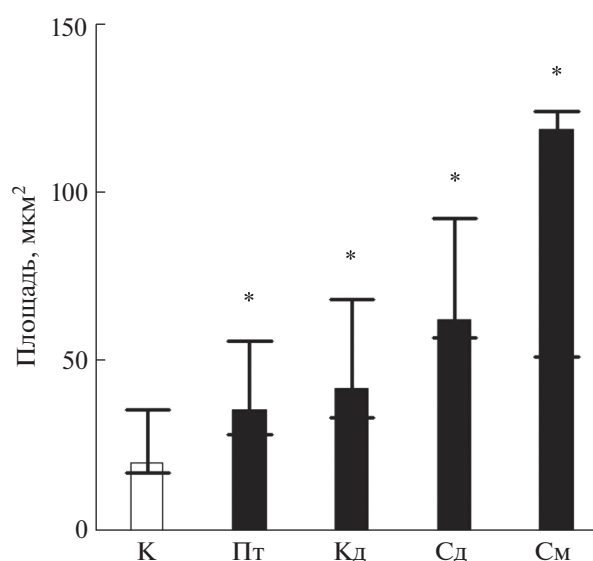


Рис. 2. Влияние полиаминов на агрегацию клеток *M. smegmatis*. Обозначения как на рис. 1. На графике приведены значения медианы и 1, 3 квартилей. * Статистически значимое отличие от контроля (с использованием критерия Манна–Уитни, $p \leq 0.05$).

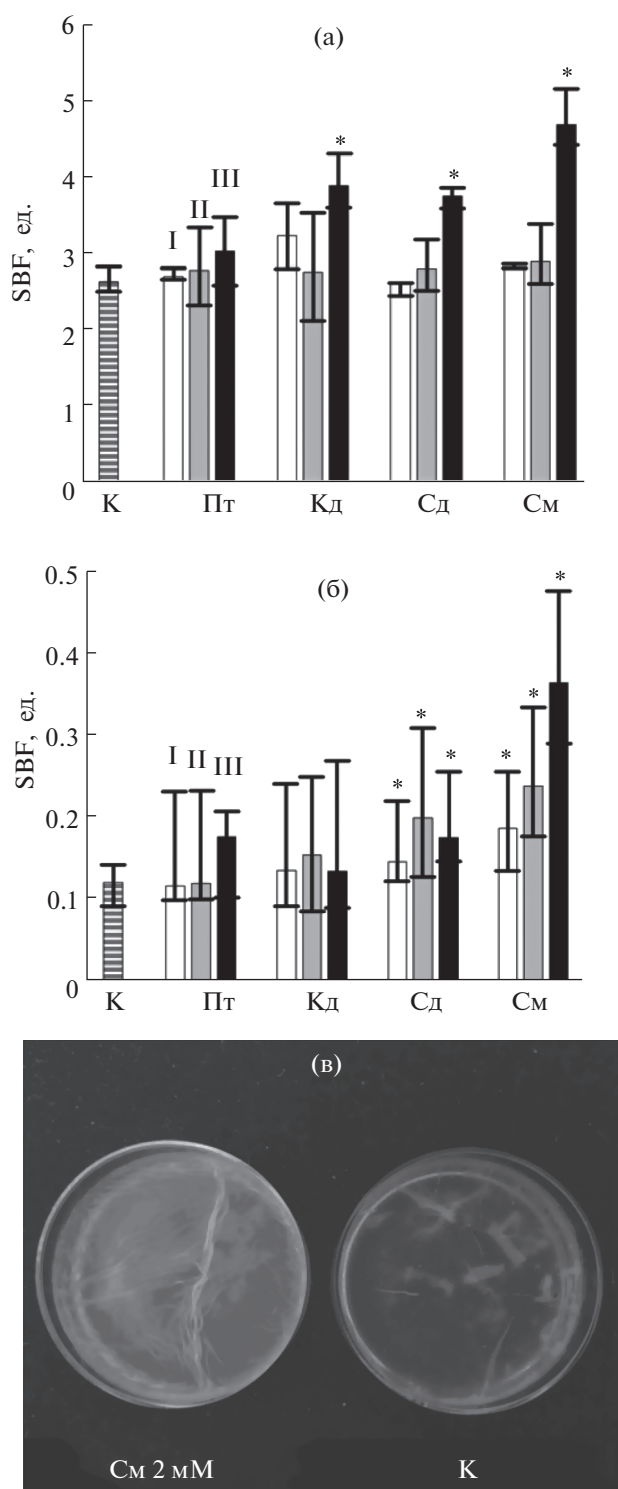


Рис. 3. Влияние полиаминов на формирование биопленок *M. smegmatis*: а – поверхностное биопленкообразование; б – придонное биопленкообразование; в – фото поверхностной биопленки. SBF – удельное биопленкообразование; К – контроль; Пт – путресцин; Кд – кадаверин; Сд – спермидин; См – спермин. I – 0.5 мМ; II – 1.0 мМ; III – 2 мМ полиаминов. На графиках приведены значения медианы и 1, 3 квартилей. * Статистически значимое отличие от контроля (с использованием критерия Манна–Уитни, $p \leq 0.05$).

ки являются гораздо более массивными, чем придонные. Присутствие биогенных полиаминов в среде культивирования стимулировало биопленкообразование *M. smegmatis*. Массивность поверхностной биопленки статистически значимо возрастала в присутствии 2 мМ кадаверина, спермидина и спермина, в то время как придонное биопленкообразование стимулировалось спермидином и спермином, начиная с минимальной из использованных нами концентраций (0.5 мМ). Наиболее выраженным действием, как в случае придонных, так и в отношении поверхностных биопленок, обладал спермин, эффект которого носил концентрационно-зависимый характер (рис. 3).

Известно, что существование бактерий в форме биопленок обеспечивает им ряд преимуществ по сравнению с планктонными клетками, в том числе, повышенную способность к выживанию при различных неблагоприятных воздействиях. Бактерии в составе биопленки демонстрируют высокую устойчивость к факторам иммунной системы макроорганизма [32], а также к действию антибактериальных препаратов [33, 34], что позволяет им эффективно выживать в условиях организма хозяина. Повышенная способность к биопленкообразованию в присутствии полиаминов в окружающей среде может также рассматриваться как один из факторов снижения чувствительности микобактерий к антибиотикам. Помимо этого, полиамины, как показано выше, снижают чувствительность уже сформированных биопленок к действию антибактериальных препаратов (табл. 1), что также является фактором, способствующим выживанию и длительной персистенции микобактерий.

Таким образом, биогенные полиамины оказывают влияние на такие параметры как способность микобактерий к скольжению, поверхностный заряд клетки, агрегация, формирование биопленок и чувствительность к антибиотикам.

Практически во всех проведенных нами исследованиях наибольший эффект оказывал спермин, который за очень редким исключением не продуцируется бактериями, но содержится в тканях макроорганизма, являющихся окружающей средой для патогенных и симбионтных форм бактерий. Это свидетельствует в пользу того, что действие на исследуемые параметры оказывают преимущественно не эндогенные, а экзогенные полиамины, которые находятся в клеточном окружении. Учитывая, что до сих пор не показано накопление значимых количеств полиаминов в клетках микобактерий, можно предполагать, что их эффект на исследуемые параметры реализуется за счет влияния на поверхностные структуры. В пользу этого говорит и тот факт, что воздействие полиаминов почти во всех случаях

было прямо пропорционально количеству аминогрупп в их молекулах. Атомы азота в амин- и иминогруппах полиаминов при нейтральных значениях pH протонированы и несут положительный заряд, что позволяет этим соединениям образовывать связи с отрицательно заряженными компонентами клетки, в том числе поверхностными структурами. Взаимодействие с поликатионами, по-видимому, приводит к снижению величины отрицательного заряда поверхности клеток, о чем свидетельствует изменение дзета-потенциала.

Известно, что величина дзета-потенциала характеризует степень устойчивости любых коллоидных систем, к которым можно отнести и культуру микроорганизмов в жидкой среде. Возрастание дзета-потенциала при значениях выше 30 мВ (по модулю) сопровождается увеличением стабильности системы, в то время как при снижении этого показателя ниже указанного уровня системы перестают быть устойчивыми, что может сопровождаться агрегацией частиц [35]. Подобную картину мы наблюдали в культуре микобактерий, когда в присутствии полиаминов происходила агрегация клеток, что сопровождалось снижением отрицательных значений дзета-потенциала (табл. 3). Эффект, который оказывают различные полиамины как на дзета-потенциал, так и на агрегацию клеток пропорционален количеству аминогрупп в молекулах этих соединений. Помимо этого, изменение поверхностного заряда, по-видимому, может отрицательно сказываться на скольжении бактериальных клеток и приводить к усилению биопленкообразования, что и наблюдается в присутствии полиаминов (рис. 1, 3).

В то же время, при воздействии полиаминов на агрегацию микобактерий, а также на их способность к биопленкообразованию и скольжению, нельзя полностью исключать эффект этих соединений на генную экспрессию. Известно, что у грамотрицательных микроорганизмов существует широкий, постоянно пополняющийся спектр генов, регулируемых полиаминами, выделенный в отдельную структурную единицу, называемую "полиаминовый модулон" [36]. В структуру полиаминового модулона входят, в том числе, гены, оказывающие влияние на формирование биопленок и выживаемость клеток [37]. Не исключено, что подобный эффект имеет место и у микобактерий. Среди генов, экспрессия которых регулируется полиаминами, могут быть участвующие, например, в метаболизме GPL, или ответственные за функционирование системы межклеточной коммуникации, под контролем которой находятся многие процессы, включая агрегацию и биопленкообразование [38]. Существование такого механизма можно предположить исходя из того, что у

микобактерий были обнаружены гены гомологичные тем, которые кодируют компоненты системы Quorum sensing грамотрицательных бактерий [39]. При этом биогенные полиамины, как показано, способны оказывать влияние на активность данной системы [38]. Однако для реализации всех вышеописанных механизмов у микобактерий необходимо накопление значительных количеств полиаминов в клетке, что потенциально возможно, однако до сих пор не обнаружено.

Тот факт, что полиамины уменьшали чувствительность к антибиотикам как планктонных клеток, так и клеток в составе сформированной биопленки, изменяя показатели MIC, MBC и MBEC аналогичным образом, указывает на возможность сходства механизма их действия в отношении обеих форм клеток. Учитывая существование значительных различий между этими двумя группами клеток по физиологическим параметрам и набору экспрессируемых генов [40], можно считать обоснованным предположение о преимущественном эффекте полиаминов на поверхностные структуры клеток.

Снижение чувствительности к антибиотикам в присутствии экзогенных полиаминов может быть связано с уменьшением проницаемости клеточной оболочки. Ранее показано, что полиамины способны изменять проницаемость пориновых каналов, взаимодействуя с белками, формирующими поры, что может препятствовать транспорту веществ в клетку через эти структуры [28, 41]. По-видимому, в этом случае эффективное действие могут оказывать именно внешние полиамины. Возможно, что свой вклад в регуляцию эффективности транспортных процессов вносит изменение заряда клеточной поверхности, хотя конкретные механизмы этого явления пока неизвестны.

Спермин, в отличие от остальных полиаминов, повышал чувствительность микобактерий к антибиотикам рифампицину. Механизм такого эффекта пока не ясен, однако, он представляет интерес с точки зрения антибиотикотерапии туберкулеза. Ранее показано, что возрастание устойчивости перисторных форм микобактерий к действию рифампицина связано с ограничением транспорта антибиотика в клетку. Предполагается, что это является следствием увеличения количества полисахаридных комплексов в клеточной оболочке, что приводит к возрастанию отрицательного поверхностного заряда клеток и способствует снижению транспорта в клетку незаряженных молекул антибиотика [42]. Можно предположить, что наблюдаемое нами усиление действия антибиотика связано со значительным снижением отрицательного заряда клеточной поверхности в присутствии спермина, что способствовало увеличению транспорта неза-

ряженных молекул, в том числе рифампицина, в клетку. Данный феномен, нуждается в дальнейшем изучении.

Таким образом, присутствие в среде биогенных полиаминов, в первую очередь спермидина и спермина, вызывает изменение свойств клеточной поверхности микобактерий, что приводит к ограничению скольжения, стимуляции агрегации и биопленкообразования, а также способствует изменению чувствительности к антибиотикам.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-73-10156.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO. Global Tuberculosis Report 2019. Geneva, 2019. <https://www.who.int/tb/global-report-2019>
2. Diaz M.A.A., Huff T.N., Libertin C.R. // J. Clin. Tuberc. Other Mycobact. Dis. 2019. V. 15. P. 100091.
3. Harms A., Maisonneuve E., Gerdes K. // Science. 2016. V. 354. № 6318. P. aaf4268 1-9.
4. Ткаченко А.Г. // Прикл. биохимия и микробиология, 2018. Т. 54. № 2. С. 110–133.
5. Tkachenko A.G., Kashevarova N.M., Tyuleneva E.A., Shumkov M.S. // FEMS Microbiol. Lett. 2017. V. 364. № 9. P. fnx084 1-9.
6. Michael A.J. // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. № 29. P. 14896–14903.
7. Herbst E.J., Weaver R.H., Keister D.L. // Arch. Biochem. Biophys. 1958. V. 75. № 1. P. 171–177.
8. Samartzidou H., Mehrazin M., Xu Z., Benedik M.J., Delcour A.H. // J. Bacteriol. 2003. V. 185. № 1. P. 13–19.
9. Tabor C.W., Tabor H. // Annu. Rev. Biochem. 1984. V. 53. № 1. P. 749–790.
10. Igarashi K., Kashiwagi K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. V. 271. № 3. P. 559–564.
11. Gevrekci A.Ö. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 33. № 11. P. 204.
12. Igarashi K., Kashiwagi K. // J. Biochem. 2006. V. 139. № 1. P. 11–16.
13. Tkachenko A.G., Akhova A.V., Shumkov M.S., Nestorova L.Yu. // Res. Microbiol. 2012. V. 163. № 2. P. 83–91.
14. Romano A., Trip H., Lolkema J.S., Lucas P.M. // J. Bacteriol. 2013. V. 195. № 6. P. 1249–1254.
15. Замахеев М.В., Григоров А.С., Капельянц А.С., Шумков М.С. // Вестн. перм. ун-та. Сер. Биология. 2018. № 3. С. 284–291.
16. Kashiwagi K., Igarashi K. // Methods Mol. Biol. 2011. № 720. P. 295–308.
17. Balasundaram D., Tyagi A.K. // Eur. J. Biochem. 1989. V. 183. № 2. P. 339–345.
18. Souzu H. // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 861. № 2. P. 361–367.
19. Gupta R. S., Lo B., Son J. // Front. Microbiol. 2018. V. 9. № 67. P. 1–9.
20. O'Toole G.A., Kolter R. // Mol. Microbiol. 1998. V. 30. № 2. P. 295–304.
21. Naves P., del Prado G., Huelves L., Gracia M., Ruiz V., Blanco J., Dahbi G., Blanco M., del Carmen Ponte M., Soriano F. // Microb. Pathog. 2008. V. 45. № 2. P. 86–91.
22. Ceri H., Olson M.E., Stremick C., Read R.R., Morck D., Buret A. // J. Clin. Microbiol. 1999. V. 37. № 6. P. 1771–1776.
23. Rosenberg M. // FEMS Microbiol. Lett. 2006. V. 262. № 2. P. 129–134.
24. McNeil M.B., Dennison D., Parish T. // Microbiology. 2017. V. 163. № 7. P. 1065–1070.
25. Halder S., Yadav K.K., Sarkar R., Mukherjee S., Saha P., Halder S., Karmakar S., Sen T. // Springerplus. 2015. V. 4. № 1. P. 642.
26. Ceri H., Olson M., Morck D., Storey D., Read R., Buret A., Olson B. // Methods Enzymol. 2001. V. 337. P. 377–385.
27. Garrison A.T., Huigens III R.W. // Curr. Top. Med. Chem. 2017. V. 17. № 17. P. 1954–1964.
28. Sarathy J., Lee E., Dartois V. // PLoS One. 2013. V. 8. № 6. P. e65806 1-6.
29. Martínez A., Torello S., Kolter R. // J. Bacteriol. 1999. V. 181. № 23. P. 7331–7338.
30. Recht J., Martínez A., Torello S., Kolter R. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. № 15. P. 4348–4351.
31. Kulka K., Hatfull G., Ojha A. K. // J. Vis. Exp. 2012. № 60. P. e3820 1-6.
32. Mulcahy L.R., Isabella V.M., Lewis K. // Microb. Ecol. 2014. V. 68. № 1. P. 1–12.
33. Stickler D. // Curr. Opin. Microbiol. 1999. V. 2. № 3. P. 270–275.
34. Mah T.F. // Future Microbiol. 2012. V. 7. № 9. P. 1061–1072.
35. Андреев В.С. // VI Международный конгресс “Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине”. 2012. 118 с.
36. Igarashi K., Kashiwagi K. // Methods Mol. Biol. 2011. V. 720. P. 51–65.
37. Sakamoto A., Terui Y., Yamamoto T., Kasahara T., Nakamura M., Tomitori H., Yamamoto K., Ishihama A., Michael A.J., Igarashi K., Kashiwagi K. // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2012. V. 44. № 11. P. 1877–1886.
38. Нестерова Л.Ю., Негорелова Е.В., Ткаченко А.Г. // Вестн. Перм. ун-та. Сер. Биология. 2019. № 3. С. 300–308.
39. Sharma I.M., Petchiappan A., Chatterji D. // IUBMB Life. 2014. V. 66. № 12. P. 823–824.
40. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. // Annu. Rev. Microbiol. 2000. V. 54. P. 49–79.
41. Samartzidou H., Delcour A.H. // J. Bacteriol. 1999. V. 181. № 3. P. 791–798.
42. Jeess S., Sharmada S., Parthasarathi A. // bioRxiv. 2019. Cold Spring Harbor Laboratory. <https://doi.org/> (дата обращения: 09.12.2019) <https://doi.org/10.1101/624569>

Biogenic Polyamines Influence the Antibiotic Susceptibility and Cell Surface Properties of *Mycobacterium smegmatis*

L. Yu. Nesterova^{a, b, *}, I. V. Tsyganov^{a, b}, and A. G. Tkachenko^{a, b}

^aPerm Federal Research Center, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia

^bPerm State University, Perm, 614990 Russia

*e-mail: larisa.nesterova@bk.ru

Biogenic polyamines were able to influence the cell surface properties of *Mycobacterium smegmatis*. The presence of spermidine and spermine in the culture medium had a significant effect on the charge of a cell surface and the sliding motility of mycobacteria, and did not affect the hydrophobicity of cells. Cell aggregation of *M. smegmatis* and its ability to form biofilms increased under polyamine treatment. Polyamine supplementation resulted also in a decrease in antibiotic susceptibility of both planktonic forms and biofilms. For the first time spermine has been shown to enhance the antimycobacterial activity of rifampicin, which is of interest for the treatment of mycobacterial infections.

Keywords: biogenic polyamines, antibiotic susceptibility, sliding, biofilm formation, *Mycobacterium smegmatis*

УДК 577.152.192:541.64

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩЕГО СОПОЛИМЕРА АНИЛИНА И 2-АМИНОФЕНЭТИЛОВОГО СПИРТА С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ГРУППАМИ

© 2020 г. М. Е. Хлупова¹, Г. П. Шумакович¹, И. С. Васильева¹,
Е. А. Зайцева², О. В. Морозова¹, А. И. Ярополов¹, *

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

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

*e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 13.01.2020 г.

После доработки 03.02.2020 г.

Принята к публикации 25.02.2020 г.

Сополимеры анилина и 2-аминофенэтилового спирта были синтезированы на матрице полисульфо-
фокислоты, поли(2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновой) кислоты в присутствии высоко
редокс-потенциальной грибной лакказы *Trametes hirsuta* в качестве катализатора окислительной со-
полимеризации. Атмосферный кислород являлся окислителем. Псевдодоводорастворимые сополи-
мер/полисульфокислота комплексы были охарактеризованы различными физико-химическими
методами. Удельная электропроводность сополимеров зависела от исходного молярного соотноше-
ния мономеров. Наилучшими характеристиками обладал сополимер, синтезированный при соот-
ношении 2-аминофенэтиловый спирт : анилин, равном 2 : 8. Показана возможность использования
системы лакказы/медиатор для окисления первичных спиртовых групп сополимера до реакционно-
способных альдегидных групп.

Ключевые слова: сополимеризация, электропроводящий поли(анилин-со-2-аминофенэтиловый
спирт), лакказы, редокс-медиатор

DOI: 10.31857/S055510992004008X

В последние годы наблюдается интерес к раз-
работке материалов для использования в раз-
личных биомедицинских устройствах [1]. Для
этих целей перспективными являются электро-
проводящие полимеры, обладающие собствен-
ной электронной проводимостью, биосовмести-
мостью и механическими свойствами, превосхо-
дящими свойства традиционных материалов на
основе металлов [2]. Получение электропрово-
дящих полимеров с функциональными группа-
ми расширяет возможности их практического
использования [3].

Полианилин (ПАНИ) и его производные пред-
ставляют собой один из наиболее перспективных
классов органических электропроводящих полиме-
ров благодаря простоте получения, стабильности в
условиях окружающей среды и хорошей электро-
проводимости [4–6]. Основным недостатком неза-
мещенных π -сопряженных полимеров, в том числе
и ПАНИ, является их недостаточная растворимость
в большинстве растворителей [6]. Для улучшения
технологичности использования ПАНИ были раз-
работаны различные подходы. К ним относятся: (1)

допирование основной цепи полимера различными
органическими и полисульфокислотами [7–11],
(2) получение методом *in situ* композитов ПАНИ с
термопластичными полимерами [12], (3) гомопо-
лимеризация производных анилина [7, 11, 13–15], а
также (4) сополимеризация анилина с другими мо-
номерами или с его производными [11, 15–19]. Два
последних подхода позволяют не только улучшить
эксплуатационные характеристики синтезируемых
полианилинов, но и получать полимер с реакцион-
носпособными группами, которые в дальнейшем
можно модифицировать различными соединения-
ми, в том числе биомолекулами.

К традиционным способам получения ПАНИ
относятся химический и электрохимический син-
тез [2, 4, 5]. Использование в качестве биокатализа-
торов для его синтеза ферментов является более
привлекательным, поскольку реакции проводятся в
мягких условиях с высокой степенью кинетическо-
го контроля реакции [19–21]. Ферментативные ре-
акции характеризуются как экологически чистые
процессы. Ранее было показано, что лакказы *Tra-*
metes hirsuta катализирует полимеризацию анилина,

в результате которой образуется электропроводящий ПАНИ [8–10, 22, 23].

Лакказы (*n*-дифенол кислород оксидоредуктаза, КФ 1.10.3.2) относится к группе медьсодержащих оксидаз и катализирует окисление различных соединений, включая ароматические фенолы и амины, атмосферным кислородом, который в результате реакции восстанавливается до воды [24]. В качестве биокатализатора лакказы имеет широкий спектр промышленного применения [25, 26]. В последнее время этот фермент привлекает все большее внимание в качестве катализатора для тонкого органического синтеза [27, 28].

Цель работы – ферментативная сополимеризация анилина (АНИ) и 2-аминофенэтилового спирта (АФС) на матрице поли(2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновой) кислоты (ПАМПС) и модификация сополимера с использованием лакказы-медиаторной системы.

МЕТОДИКА

АФС, ПАМПС и (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил (ТЕМПО) (“Aldrich”, США), диаммонийная соль 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты) (АБТС) и NaF (“Sigma”, США), NaOH, цитрат натрия и лимонная кислота (“Riedel-de Haën”, Германия) были использованы без дополнительной очистки. АНИ (“Sigma-Aldrich”, США) был очищен вакуумной перегонкой.

Лакказу с удельной активностью 163 МЕ/мг выделяли из культуральной жидкости базидиального гриба *T. hirsuta* согласно методу [29]. Активность фермента определяли спектрофотометрически, используя в качестве хромогенного субстрата 1 мМ раствор АБТС ($\lambda = 420$ нм; $\epsilon = 36000$ М⁻¹ см⁻¹) в 0.1 М Na-цитратно-фосфатном буфере, pH 4.5. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего окисление 1 мкм АБТС за 1 мин.

Ферментативную сополимеризацию АНИ и АФС на матрице ПАМПС проводили в 0.1 М Na-цитратном буфере, pH 2.8, при различном молярном соотношении мономеров (9 : 1, 8 : 2, 7 : 3 и 5 : 5). К 10 мл раствора, содержащего 10 ммоль ПАМПС (в пересчете на повторяющееся звено), добавляли определенное количество мономеров и перемешивали в течение 1 ч. Сополимеризацию инициировали добавлением лакказы (удельная активность в реакционной среде ~0.4 МЕ/мл) и проводили в течение 24 ч при 22–23°C. Для удаления непрореагировавших мономеров реакционную смесь диализовали против 0.1 М Na-цитратного буфера, pH 2.8. Ферментативный синтез гомополимеров (ПАНИ/ПАМПС и ПАФС/ПАМПС) осуществляли в аналогичных условиях. Все рас-

творы готовили с использованием воды, очищенной на установке Simplicity (“Millipore”, США).

Первичные спиртовые группы сополимера окисляли в присутствии лакказы-медиаторной системы (ЛМС) после добавления к 9 мл раствора сополимера 1 мл 10 мМ раствора ТЕМПО в 0.1 М Na-цитратном буфере, pH 2.8, и лакказы (удельная активность в реакционной среде ~0.4 МЕ/мл). Реакцию проводили при постоянном перемешивании в течение 1 ч при комнатной температуре (22–23°C) и останавливали добавлением 1 мл 10 мМ раствора NaF.

Для спектрофотометрических исследований использовали спектрофотометр Mini 1240 (“Shimadzu”, Япония). ИК-Фурье спектроскопию (Fourier transform infrared spectroscopy) образцов проводили по стандартной методике на спектрометре Frontier FT-IR/FIR (“PerkinElmer Inc”, США) с использованием таблеток KBr, а измерение электропроводности – стандартным четырехточечным методом на приборе Loresta GP (“Mitsubishi”, Япония).

Морфологию образцов исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEM-100CX/SFG (“Jeol”, Япония).

Электрохимические эксперименты проводили в 0.1 М H₂SO₄ на вольтамперометрическом анализаторе CV-50W (“BAS”, США) с использованием стеклянной ячейки по трехэлектродной схеме. Электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод той же фирмы, а вспомогательным электродом – платиновая проволока диаметром 1 мм. Стержни из спектрального графита (диаметр 3.05 мм, тип RW001, “Ringsdorff Werke GmbH”, Германия) с нанесенными образцами сополимеров являлись рабочим электродом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

АФС является производным анилина и содержит в орто-положении –CH₂–CH₂ОН группу. Сополимеризация АНИ и АФС позволит получить электропроводящий полимер, имеющий первичные спиртовые группы. Катализируемую лакказой сополимеризацию мономеров АФС и АНИ проводили на матрице полисульфокислоты ПАМПС, что позволило получить водорастворимые дисперсии комплексов поли(анилин-со-2-аминофенэтиловый спирт)/ПАМПС, в дальнейшем обозначенные как сополимер/ПАМПС. Схема реакции представлена на рис. 1.

На рис. 2 приведены УФ-видимые спектры сополимер/ПАМПС комплексов, синтезированных при различном молярном соотношении АФС : АНИ, а также спектры гомополимеров ПАНИ/ПАМПС и ПАФС/ПАМПС. На спектре

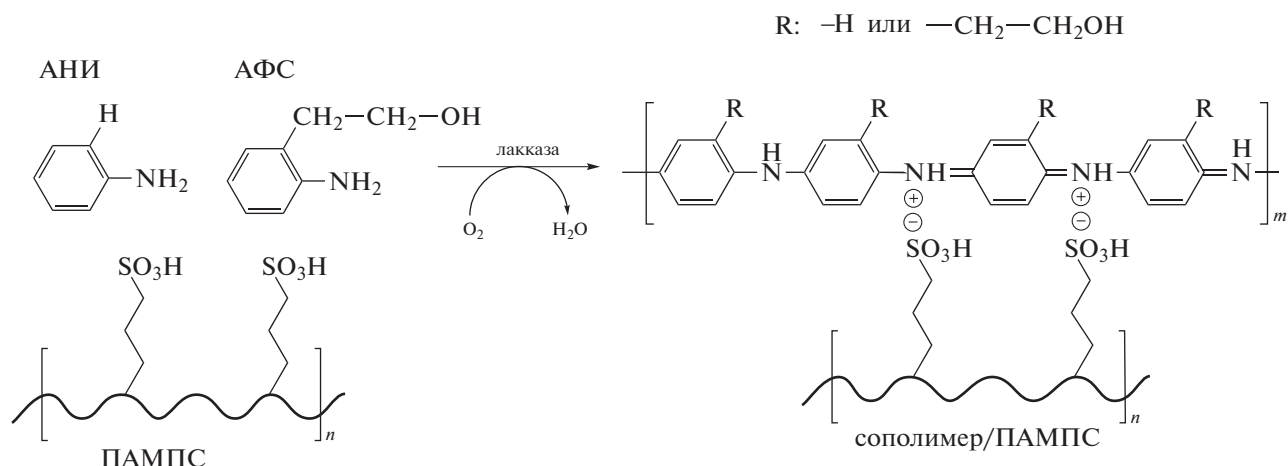


Рис. 1. Схема реакции ферментативной сополимеризации анилина и 2-аминофенэтилового спирта на матрице ПАМПС.

ПАНИ/ПАМПС присутствовали три полосы оптического поглощения, характерные для ПАНИ в электропроводящем состоянии эмеральдиновой соли. Первая полоса в области 360 нм отвечала π – π^* электронным переходам в бензеноидных фрагментах полимера. Вторая (420 нм) и третья (750 нм) — соответствовали допированной форме полимера и указывали на формирование полярона, который отвечал за электропроводящие свойства ПАНИ [30]. На спектрах сополимеров при увеличении соотношения АФС : АНИ пик поглощения полярона (750 нм) смещался в длинноволновую область, а пик в области 420 нм, связанный с протонированием (допированием) основной цепи полимера, уменьшался до полного исчезновения на

спектре ПАФС/ПАМПС. По-видимому, электрон-донорная группа АФС оказывала существенное влияние на формирование полярона в структуре сополимера [31].

Электрохимическая активность синтезированных сополимеров была изучена методом циклической вольтамперометрии в 0.1 М Н₂SO₄ (рис. 3). На циклических вольтамперограммах всех сополимеров видны две пары катодных и анодных максимумов токов, характеризующихся различной обратимостью. Наиболее четко они проявлялись в сополимере, синтезированном при соотношении АФС : АНИ = 2 : 8, редокс-превращения которого характеризовались двумя парами псевдообратимых пиков с потенциалами средней точки +202 и –75 мВ.

Электропроводность сополимеров уменьшалась с увеличением соотношения АФС:АНИ от значения 2.7 мСм/см для ПАНИ/ПАМПС до 4.6×10^{-5} мСм/см для ПАФС/ПАМПС (табл. 1). Для дальнейших экспериментов был выбран сополимер № 2, синтезированный при исходном соотношении АФС : АНИ = 2 : 8, который наряду с хорошей электропроводностью (2.9×10^{-3} мСм/см) содержал в своем составе значительное количество спиртовых групп.

Известно, что ПАНИ, допированный низкомолекулярными кислотами, находится в электропроводящем состоянии (в форме эмеральдиновой соли) только при pH < 3.0, а при более высоких значениях pH переходит в форму эмеральдинового основания, что приводит к потере электропроводности [31], а комплекс ПАНИ/ПАМПС находится в электропроводящем состоянии при pH 6.0–7.0 [10]. Исследование методом УФ-видимой спектроскопии сополимер/ПАМПС комплекса, ферментативно синтезированного при исходном молярном соотношении АФС : АНИ = 2 : 8,

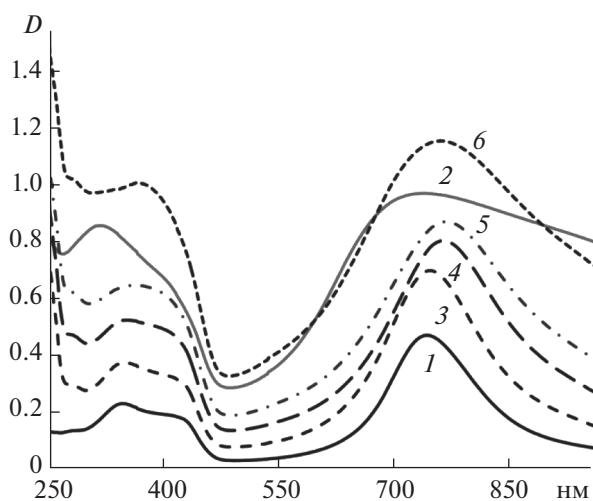


Рис. 2. УФ-видимые спектры гомополимеров ПАНИ/ПАМПС (1), ПАФС/ПАМПС (2) и сополимеров, синтезированных при различных молярных соотношениях АФС : АНИ — 1 : 9 (3), 2 : 8 (4), 3 : 7 (5) и 5 : 5 (6).

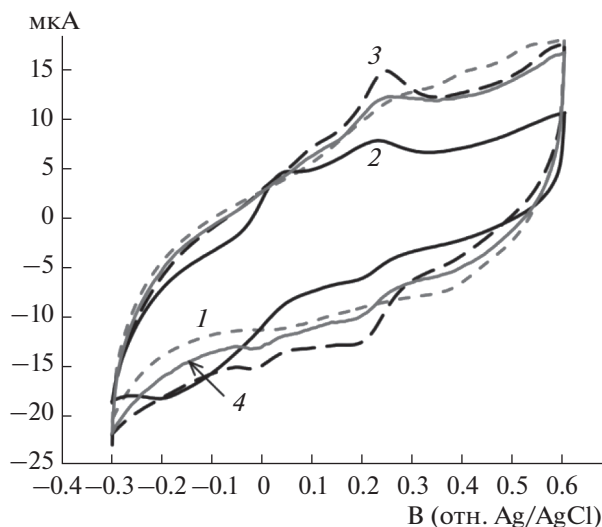


Рис. 3. Циклические вольтамперограммы сополимер/ПАМПС комплексов, синтезированных при различных молярных соотношениях АФС : АНИ – 1 : 9 (1), 2 : 8 (2), 5 : 5 (3) и 3 : 7 (4); скорость изменения потенциала 50 мВ/с.

показало, что он также находился в электропроводящем состоянии до pH 7.0 (рис. 4). Смещение полосы поглощения поларона (780 нм) при увеличении pH раствора в коротковолновую область спектра было обусловлено переходом сополимера в дедопированную (не электропроводную) форму. При pH > 8.0 сополимер полностью переходил в дедопированное состояние с характерной полосой поглощения при 550 нм. Данный переход визуально характеризовался изменением цвета раствора с зеленого на голубой. При уменьшении pH среды до первоначального значения 2.8 спектр комплекса практически полностью восстанавливался. Это свидетельствовало об обратимости процесса допирования/дедопирования, что важно для возможного практического использования сополимера.

Морфология сополимер/ПАМПС комплекса была изучена методом ПЭМ (рис. 5). Частицы этого комплекса образовывали хлопьевидные структуры, которые могли быть результатом агрегации более мелких гранулярных частиц. Необходимо отметить, что морфология высушенного сополимер/ПАМПС комплекса может отличаться от морфологии комплекса в водной среде.

Использование редокс-медиаторов значительно расширяет возможности практического применения лакказ. Редокс-медиаторы – это субстраты лакказы, в результате ферментативного окисления которых образуются стабильные высокопотенциальные продукты, способные вступать в химические (неферментативные) реакции с другими соединениями, которые не подвергаются окислению в присутствии одной лакказы [32]. В

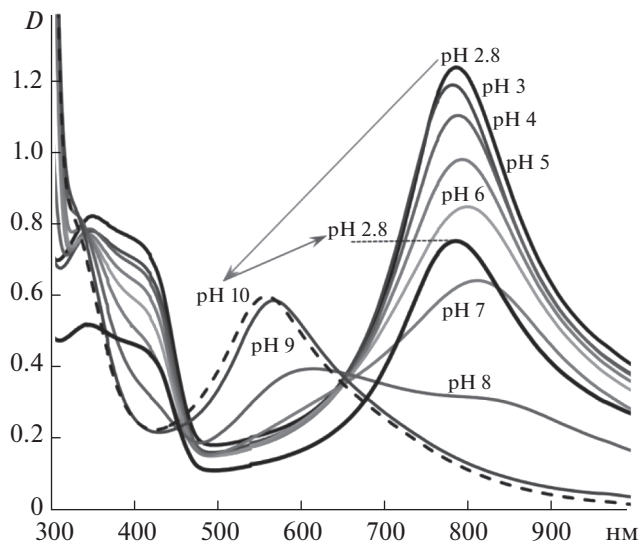


Рис. 4. УФ-видимые спектры сополимер/ПАМПС при различных значениях pH.

литературе имеется множество публикаций по использованию лакказы-медиаторных систем (ЛМС) в тонком органическом синтезе, для делигнификации бумажной пульпы и деградации ксенобиотиков, а также в пищевой, текстильной и косметической промышленности [24, 26–28, 32]. С помощью ЛМС можно эффективно окислять первичные спиртовые группы в “мягких” условиях с образованием реакционноспособных альдегидных групп [27, 33, 34]. В настоящей работе ЛМС на основе ТЕМПО была использована для окисления спиртовых групп сополимер/ПАМПС комплекса. Образование альдегидных групп в цепи сополимера было подтверждено реакцией “серебряного” зеркала, в результате которой на поверхности стеклянной колбы образовывался слой серебра. В контрольном эксперименте с исходным сополи-

Таблица 1. Электропроводность ферментативно синтезированных полимер/ПАМПС комплексов

Синтезированный полимер	Исходное молярное соотношение АФС : АНИ	Электропроводность, мСм/см
ПАНИ	0 : 10	2.7
Сополимер № 1	1 : 9	8.7×10^{-2}
Сополимер № 2	2 : 8	2.9×10^{-3}
Сополимер № 3	3 : 7	2.4×10^{-4}
Сополимер № 4	5 : 5	1.6×10^{-4}
ПАФС	10 : 0	4.6×10^{-5}

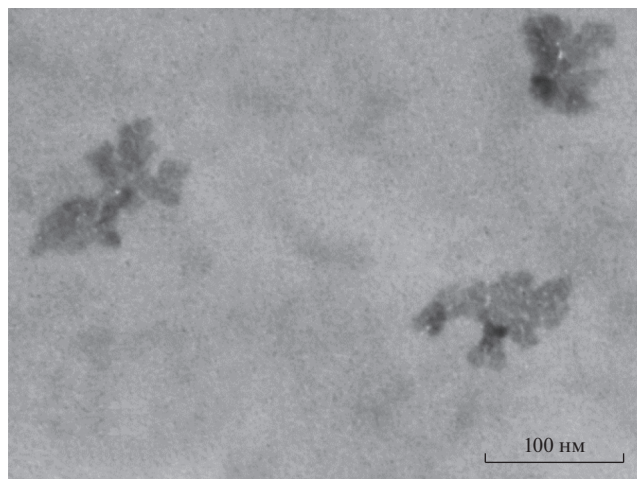


Рис. 5. ПЭМ изображение сополимер/ПАМПС комплекса, синтезированного при исходном молярном соотношении АФС : АНИ, равном 2 : 8.

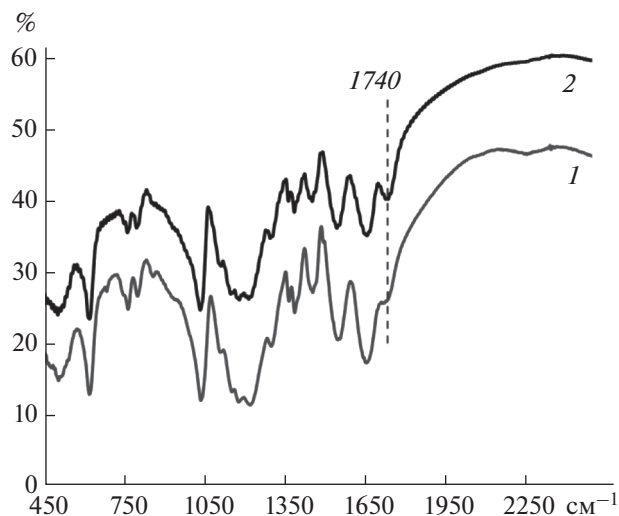


Рис. 6. ИК-Фурье спектры сополимер/ПАМПС комплекса до (1) и после (2) окисления первичных спиртовых групп с использованием ЛМС.

мером восстановления ионов серебра не наблюдалось. Исследование исходного и окисленного сополимера методом ИК-спектроскопии показало, что после обработки сополимера системой лакказы/ТЕМПО на спектре появлялся пик в области 1740 см^{-1} , соответствующий колебаниям $\text{C}=\text{O}$ связи альдегидной группы (рис. 6).

Таким образом, в работе показана возможность использования грибной лакказы для сополимеризации АНИ и АФС на матрице полисульфокислоты ПАМПС. Синтезированные сополимеры обладали электропроводностью. Первичные спиртовые группы $-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ в составе сополимера могут быть окислены до реакционноспособных альде-

гидных групп с помощью лакказы-медиаторной системы. Предложенный подход к синтезу электропроводящих полимеров, имеющих в своем составе функциональные группы, может быть использован для разработки нейроинтерфейсов, систем детекции различных соединений и т.д.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН.

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mendes P.M. // Chem. Soc. Rev. 2008. V. 37. № 11. P. 2512–2529.
2. Das T.K.; Prusty S. // Polymer-Plast. Tech. Eng. 2012. V. 51. № 14. P. 1487–1500.
3. Hackett A.J., Malmström J., Travas-Sejdic J. // Prog. Polym. Sci. 2017. V. 70. P. 18–33.
4. Bhadra S., Khastgir D., Singha N.K., Lee J.H. // Prog. Polym. Sci. 2009. V. 34. № 8. P. 783–810.
5. Ćirić-Marjanović G. // Synth. Met. 2013. V. 17. P. 1–47.
6. Jaymand M. // Prog. Polym. Sci. 2013. V. 38. № 9. P. 1287–2013.
7. Kulkarni M.V., Viswanath A.K. // Eur. Polym. J. 2004. V. 40. № 2. P. 379–384.
8. Vasil'eva I.S., Morozova O.V., Shumakovich G.P., Shleev S.V., Sakharov I.Yu., Yaropolov A.I. // Synth. Met. 2007. V. 157. № 18–20. P. 684–689.
9. Shumakovich G., Kurova V., Vasil'eva I., Pankratov D., Otrokhov G., Morozova O., Yaropolov A. // J. Mol. Cat. B. Enz. 2012. V. 77. P. 105–110.
10. Shumakovich G.P., Vasil'eva I.S., Morozova O.V., Khomenkov V.G., Staroverova I.N., Budashov I.A., Kurochkin I.N., Boyeva J.A., Sergeyev V.G., Yaropolov A.I. // J. Appl. Polym. Sci. 2010. V. 117. № 3. P. 1544–1550.
11. Borole D.D., Kapadi U.R., Mahulikar P.P., Hundi-wale D.G. // Mater. Lett. 2004. V. 58. № 29. P. 3816–3822.
12. Abbasian M., Jaymand M., Bonab S.E.S. // J. Appl. Polym. Sci. 2012. V. 125. № S1. P. E131–E140.
13. Gazotti W.A., DePaoli M.A. // Synth. Met. 1996. V. 80. № 3. P. 263–269.
14. Gök A., Sari B., Talu M. // Synth. Met. 2004. V. 142. № 1–3. P. 41–48.
15. Waware U.S., Rashid M., Summers G.J. // Polymer-Plast. Tech. Eng. 2018. V. 57. № 10. P. 1015–1025.
16. Baek S., Ree J.J., Ree M. // J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 2002. V. 40. № 8. P. 983–994.
17. Fatuch J.C., Soto-Oviedo M.A., Avellaneda C.O., Franco M.F., Romao W., De Paoli M.A., Nogueira A.F. // Synth. Met. 2009. V. 159. № 21–22. P. 2348–2354.
18. Lashkenari M. S., Eisazadeh H. // Adv. Polym. Technol. 2014. V. 33. № S1. Article number 21466.

19. Ćirić-Marjanović G., Milojević-Rakić M., Janošević-Ležaić A., Luginbühl S., Walde P. // Chem. Pap. 2017. V. 71. № 2. P. 199–242.
20. Xu P., Singh A., Kaplan D. // Adv. Polym. Sci. 2006. V. 194. P. 69–94.
21. Отрохов Г.В., Морозова О.В., Васильева И.С., Шумакович Г.П., Зайцева Е.А., Хлупова М.Е., Ярополов А.И. // Успехи биологической химии. 2013. Т. 53. С. 355–386.
22. Стрельцов А.В., Шумакович Г.П., Морозова О.В., Горбачева М.А., Ярополов А.И. // Прикл. биохимия и микробиология 2008. Т. 44. № 3. С. 296–303.
23. Streltsov A.V., Morozova O.V., Arkharova N.A., Klechkovskaya V.V., Staroverova I.N., Shumakovich G.P., Yaropolov A.I. // J. Appl. Polym. Sci. 2009. V. 114. № 2. P. 928–934.
24. Yaropolov A.I., Skorobogatko O.V., Vartanov S.S., Varfolomeyev S.D. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1994. V. 49. № 3. 257–280.
25. Mate D.M., Alcalde M. // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. № 6. P. 1457–1467.
26. Cannatelli M.D., Ragauskas A.J. // Chem. Rec. 2017. V. 17. № 1. P. 122–140.
27. Witayakran S., Ragauskas A.J. // Adv. Synth. Catal. 2009. V. 351. № 9. P. 1187–1209.
28. Mogharabi M., Faramarzi M.A. // Adv. Synth. Catal. 2014. V. 356. № 5. P. 897–927.
29. Горшина Е.С., Русинова Т.В., Бирюков В.В., Морозова О.В., Шлеев С.В., Ярополов А.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 638–644.
30. Yuan G., Kuramoto N., Su S. // Synth. Met. 2002. V. 129. № 2. P. 173–178.
31. Haba Y., Segal E., Narkis M., Titelman G., Siegmann A. // Synth. Met. 1999. V. 106. № 1. P. 59–66.
32. Морозова О.В., Шумакович Г.П., Шлеев С.В., Ярополов А.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 5. С. 583–597.
33. Fabbrini M., Galli C., Gentili P., Macchitella D. // Tetrahedron Lett. 2001. V. 42. № 43. P. 7551–7553.
34. Galletti P., Pori M., Funicello F., Soldati R., Ballardini A., Giacomini D. // ChemSusChem 2014. V. 7. № 9. P. 2684–2689.

Enzymatic Synthesis of a Conducting Aniline and 2-Aminophenethyl Alcohol Copolymer with Functional Groups

M. E. Khlopova^a, G. P. Shumakovich^a, I. S. Vasil'eva^a, E. A. Zaitseva^b,
O. V. Morozova^a, and A. I. Yaropolov^{a, *}

^aBach Institute of Biochemistry, Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^bFaculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru

The copolymers of aniline (ANI) and 2-aminophenethyl alcohol (APS) were synthesized on a poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic) acid (PAMPS) template using the highly redox potential fungal laccase *Trametes hirsuta* as a catalyst. Atmospheric oxygen was an oxidizing agent. The copolymer/PAMPS complexes were pseudo-soluble and were characterized by various physicochemical methods. The electrical conductivity of the copolymers depended on the initial molar ratio of monomers. The copolymer synthesized at the ratio of APS : ANI = 2 : 8 possessed the best characteristics. The possibility of using the laccase/mediator system for the oxidation of primary alcohol groups of the copolymer to reactive aldehyde groups is shown.

Keywords: copolymerization, conducting poly(aniline-co-2-aminophenethyl alcohol), laccase, redox-mediator

УДК 577.21

НО-СИНТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ФОТОМОРФОГЕНЕЗЕ *Neurospora crassa*

© 2020 г. С. Ю. Филиппович^{1, *}, М. В. Онуфриев², Д. И. Перегуд³,
Г. П. Бачурина¹, М. С. Крицкий¹

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

²Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, 117485 Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского Минздрава
России, Москва, 119034 Россия

*e-mail: syf@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 14.01.2020 г.

После доработки 03.02.2020 г.

Принята к публикации 25.02.2020 г.

Изучение превращения ³H-L-аргинина в ³H-L-цитруллин в клетках *Neurospora crassa* позволило выявить активность NO-синтазы. По чувствительности к ионам кальция, действию специфических ингибиторов фермента, вестерн-блот анализу NO-синтаза сходна с индуцибельной формой фермента млекопитающих. По данным Вестерн-блоттинга молекулярная масса фермента составляла около 130 кДа. Светозависимые изменения удельной активности NO-синтазы в фотокаротиногенезе и фотоконидиогенезе *N. crassa* не обнаружены.

Ключевые слова: NO-синтаза, конидиогенез, каротиногенез, *Neurospora crassa*

DOI: 10.31857/S0555109920040042

Оксид азота — короткоживущая молекула, обладающая высокой реакционной способностью. Функции NO разнообразны, от высокотоксичного агента до сигнальной молекулы, участвующей в регуляции разнообразных метаболических путей.

Важно, что онтогенез и биосинтетическая продуктивность мицелиальных грибов зависят от химической природы источников азота и метаболических путей их ассимиляции. В литературе представлены данные об участии оксида азота в физиологических и биохимических процессах у грибов. Целый ряд работ посвящен влиянию NO на процессы роста и дифференцировки грибов, принадлежащих к различным таксономическим группам, — *Colletotrichum coccodes* [1], *Aspergillus niger*, *Monilinia fruticola*, *Penicillium italicum* [2], *Botrytis cinerea* [3], *Penicillium expansum* [4], *Phycomyces blakesleeanus* [5], *Flammulina velutipes* [6], *Coniothyrium minitans* [7, 8] и *Aspergillus nidulans* [9].

Известно, что синтез NO осуществляется NO-синтазой (КФ 1.14.13.39), катализирующей превращение L-аргинина и кислорода в L-цитруллин и NO. Процесс описан для различных представителей высших и низших организмов. Наиболее хорошо изучен фермент млекопитающих, представленный 3 формами: нейрональной (nNOS), индуцибельной (iNOS) и эндотелиальной (eNOS), кодируемыми разными генами [10]. Он представляет

собой гомодимер, содержащий N-концевой каталитический или оксигеназный домен (NOSox), C-концевой редуктазный домен (NOSred) и регуляторный кальмодулинсвязывающий участок, соединяющий NOSox и NOSred в единый комплекс. У млекопитающих NO-синтаза регулирует кровяное давление, сокращение мышц, а также работу иммунной и нервной систем. NO-синтазы бактерий отличаются от одноименного фермента млекопитающих отсутствием редуктазного домена [11]. Единственное исключение из этого правила — NO-синтаза миксобактерии *Sorangium cellulosum*. Помимо отличия в структуре, NO-синтазы бактерий различаются и функциями — участвуют в нитровании индольного кольца триптофана и восстановлении повреждений, вызванных УФ-радиацией, в адаптации бактерий к окислительному стрессу, синтезе cGMP и устойчивости бактерий к антибиотикам. У высших растений образование NO происходит 2 путями: нитратредуктазным и L-аргинин-зависимым, причем данные о существовании второго пути являются противоречивыми [12, 13]. Вместе с тем, в 2016 г. Чанг с соавт. [14] разработали метод с применением нового флуоресцентного аналога аргинина, позволяющий напрямую идентифицировать NO-синтазу у высших растений, и успешно применили его для листьев табака. Этот метод можно сочетать с тести-

рованием ингибиторов фермента млекопитающих и иммуноцитохимическим анализом.

Пути синтеза и распада оксида азота, позволяющие поддерживать определенный баланс NO в клетках грибов, изучены мало [15]. Одним из основных препятствий является отсутствие в геноме большинства грибных организмов типичных полноценных генов, кодирующих NO-синтазы млекопитающих. Несмотря на это, активность фермента, определяемая изотопным методом, по превращению ^3H - или ^{14}C -L-аргинина в ^3H - или ^{14}C -L-цитруллин, обнаружена в таких грибах как *Neurospora crassa* [16], *F. velutipes* [6], *Saccharomyces cerevisiae* [17], *Blastocladiella emersonii* [18] и *C. minitans* [8]. Кроме того, у ряда грибов выявлены стадии развития, чувствительные к действию соединений, влияющих на активность NO-синтазы. Для зигомицета *P. blakesleeana* это светостимулируемое образование макроспорангиофоров [5], для базидиомицета *F. velutipes* — образование плодовых тел [6], для хитридиомицета *B. emersonii* — образование зооспор [18], для митоспорового гриба *C. minitans* — пикнидий [8].

При исследовании роли оксида азота в метаболизме аскомицета *N. crassa* сложилась противоречивая ситуация. Применив донор NO, нитропруссид натрия, а также специфические ингибиторы NO-синтазы, Ниннеманн и Майер [16] предположили, что NO ингибирует у *N. crassa* светостимулируемое образование вегетативных спор, конидий. Наряду с этим, в мицелии гриба изотопным методом они обнаружили NO-синтазную активность. Вместе с тем, как и у большинства грибов, в геноме *N. crassa* не удалось найти полноценный ген NO-синтазы животного типа. Ранее был проанализирован выход нитрат- и нитрит-ионов и их внутриклеточное содержание в качестве методического подхода к исследованию метаболизма и функций NO у *N. crassa* [19, 20]. Для этого гриба детально охарактеризован ряд генов, связанных с метаболизмом азота [21]. Структурный ген *nit-6* кодирует нитритредуктазу (НиР). Глобальный регуляторный ген *nit-2* кодирует ядерный белок, влияющий на экспрессию более 100 генов азотного метаболизма, при его повреждении в клетках гриба полностью отсутствует активность НиР и нитратредуктазы (НР). Использование *nit*-мутантов позволило измерить выход ионов нитрата и нитрита из клетки, избежав их вторичной ассимиляции. Изучение *N. crassa* вызывает также особый интерес в связи со светозависимой регуляцией процессов развития и дифференцировки этого гриба [22]. Установлено, что динамика выхода нитрита в ходе фотоиндуцированного каротиногенеза [19] и фотостимулируемого конидиогенеза [20] *nit-6* мутанта *N. crassa* свидетельствует о возможном участии NO-генерирующего механизма в трансдукции фотосигнала гриба.

Цель работы — определение NO-синтазной активности в клетках дикого типа *wt-987* и мутантов *nit-2* и *nit-6 N. crassa* и ее динамики при светозависимой стимуляции каротиногенеза и конидиогенеза.

МЕТОДИКА

Штаммы *N. crassa*, среды, культивирование. Штамм дикого типа *wt 987(74-0R23-1A)* и мутанты *nit-2 (33 A)* и *nit-6 (3463 A)* аскомицета *N. crassa* были получены из Центра по хранению генетического материала грибов (Fungal Genetic Stock Center — FGSC, США). Оба мутанта дефектны по НиР, а *nit-2* штамм лишен также и НР.

Состав сред, получение инокулята и условия культивирования дикого типа и *nit*-мутантов были описаны ранее [20, 22]. Мицелий выращивали на агаризованной среде Фогеля с 2%-ной сахарозой в качестве источника углерода, но с другим источником азота [22]. В опытах по конидиогенезу вместо 25 мМ NH_4NO_3 использовали 50 мМ NH_4Cl или 50 мМ NH_4NO_3 , или 50 мМ NaNO_3 .

Регуляция светом каротиногенеза и конидиогенеза. Фотоиндукцию каротиногенеза и фотостимуляцию конидиогенеза проводили согласно предыдущим работам [19, 20].

Получение экстрактов мицелия. После 24 ч выращивания в темноте при 28°C мицелий собирали с поверхности целлофана при красном свете, промывали дистиллированной водой, фильтровали через 3 слоя марли, высушивали с помощью фильтровальной бумаги и растирали с жидким азотом в течение 15 мин. Экстракцию осуществляли при слабом перемешивании в течение 30 мин тремя объемами 50 мМ Трис-НСl буфера, рН 8.0, содержащего 0.5 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитола, 5 мкг/мл леупептина, 5 мкг/мл апротинина, 5 мкг/мл пепстатина и 1 мМ фенолметилсульфонилфторида (PMSF). После центрифугирования при 20000 g в течение 30 мин при 4°C полученные супернатанты диализовали в течение ночи против того же буфера, содержащего в качестве ингибитора протеаз только 1 мМ PMSF. Аликвоты диализатов хранили при -70°C.

Определение активности NO-синтазы. Активность NO-синтазы оценивали по превращению ^3H -L-аргинина в ^3H -L-цитруллин. В серии предварительных экспериментов были определены оптимальные условия для ферментативной реакции. Реакционная смесь общим объемом 50 мкл содержала (мкМ): НАДФН — 1.0, ФАД — 5.0, ФМН — 5.0, тетрагидробиоптерин — 50, валин — 50 мМ, цитруллин — 1.0 мМ, аргинин — 10 мкМ и ^3H -аргинин — 0.5 мкл (“Amersham Biosciences”, США) с активностью 1 мкКюри/мл, растворенного в 50 мМ Трис-НСl буфере, рН 8.0. Ферментативную реакцию начинали добавлением 20 мкл диа-

лизата белков *N. crassa* и проводили в течение 20 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 300 мкл суспензии ионообменника Dowex 50 Wx8 (400 меш, Na⁺ форма; "Sigma-Aldrich", США) в 50 мМ HEPES буфере, pH 7.5. Положительно заряженный L-аргинин связывался с колонкой Dowex, а незаряженный продукт, ³H-цитруллин, оставался в растворе. Радиоактивность полученных проб определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Wallac 1420 ("Perkin Elmer", США). Для исключения неспецифического действия на ферментативную активность различных соединений, содержащихся в мицелиальном диализате, добавляли ингибитор индуцибельной NO-синтазы животных L-N⁶-(1-иминоэтил)-лизин (L-NIL). Для снижения влияния фоновой радиоактивности данные для реакционной смеси, содержащей воду, вычитали из данных для той же смеси с 0.1 мМ L-NIL вместо воды. Концентрацию белка измеряли по методу Бредфорд, используя БСА в качестве стандарта.

Удельную активность NO-синтазы выражали в пмоль цитрулина образовавшегося в мин на мг белка.

Вестерн-блоттинг. Диализаты *N. crassa* смешивали с равным объемом 125 мМ Трис-HCl буфера, pH 6.8, содержащего 4% ДДС, 10% глицерина, 0.006% бромфенолового синего, 1.8% β-меркаптоэтанол, прогревали при 100°C в течение 10 мин, пробы центрифугировали при 10000 g в течение 5 мин. После измерения концентрации белка в супернатанте его равные количества фракционировали методом электрофореза в 8%-ном ПААГ с Na-ДДС при 100 В в течение 90 мин. Затем белки переносили на мембрану из поливинилиденфторида с размером пор 0.2 мкм ("Bio-Rad Laboratories", США) при 150 мА в течение 180 мин. Предварительно окрашенные высокомолекулярные белковые стандарты ("Bio-Rad Laboratories", США) использовали в качестве маркеров для контроля переноса белков. Блокировку сайтов неспецифического связывания 20 мМ Трис-HCl буфером, pH 7.5, содержащим 150 мМ NaCl, 0.1% Твин-20 (TBST) и 5% сухое молоко проводили в течение ночи. Затем мембраны промывали в TBST и инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами к мышинной нейрональной NO-синтазе (разведение 1 : 2000, "Chemicon", США) или мышинной эндотелиальной NO-синтазе (разведение 1 : 5000, "BD Biosciences", США) или кроличьей индуцибельной NO-синтазе (разведение 1 : 5000, "Chemicon", США). После трехкратной промывки мембраны инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, которые визуализировали используя хемилюминесцентный субстрат SuperSignal West Pico ("Thermo Scientific Pierce", США).

Статистический анализ. Число биологических параллелей варьировало от 3 до 15, число биохимических параллелей было не ниже 3. Результаты представлены в виде средних значений ± ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение свойств NO-синтазы *N. crassa* с индуцибельным ферментом млекопитающих. Для определения активности фермента в диализатах мицелиальных клеток гриба был оптимизирован метод измерения скорости ферментативного окисления ³H-L-аргинина, использовавшийся ранее при исследовании клеток млекопитающих. Оказалось, что фермент *N. crassa* чувствителен к специфическим ингибиторам ферментов животного происхождения. Исследование проводили на диализатах супернатантов экстрактов мицелия и для исключения неспецифического действия различных примесей, а также эндогенного L-аргинина результаты измерения NO-синтазной активности представляли в виде разности активностей в пробах, содержащих и не содержащих ингибитор фермента. Ферментативная активность *N. crassa* была на порядок более чувствительна к L-NIL, чем к метиловому эфиру N-нитро-L-аргинина (NAME) (рис. 1а). Кроме того, аналогично ферменту из *P. blakesleeanus* [5], она не активировалась в присутствии ионов кальция (рис. 1б). Известно, что iNOS млекопитающих является Ca-независимой, так как она тесно связывается с кальмодулином вне зависимости от концентрации внутриклеточного кальция [23]. На основании результатов по действию специфических ингибиторов и ионов кальция на активность фермента было сделано предположение о сходстве NO-синтазы *N. crassa* с индуцибельной формой фермента животных.

Действительно, с помощью Вестерн-блоттинга (рис. 2) выявлено наличие у всех изучаемых штаммов *N. crassa* белка, с которым специфически связываются поликлональные антитела против iNOS изоформы фермента млекопитающих, но не взаимодействуют антитела против eNOS и nNOS изоформ фермента. Для прореагировавших антител иммуногеном служил C-концевой пептид, содержащий 14 аминокислот iNOS, полученный из макрофагов мыши. При сравнении с положением белковых метчиков было выявлено, что молекулярная масса обнаруженной формы фермента *N. crassa* близка к таковой для iNOS животных [24] и равна 130 кДа.

Данные о существовании различных форм NO-синтазы грибов, аналогичных формам, обнаруженным для фермента животных, немногочисленны. Канада с соавт. [25], используя моноклональные антитела против nNOS, выявили конститутивную форму NO-синтазы у дрожжей *S. cerevisiae*. В более поздней работе у этого же

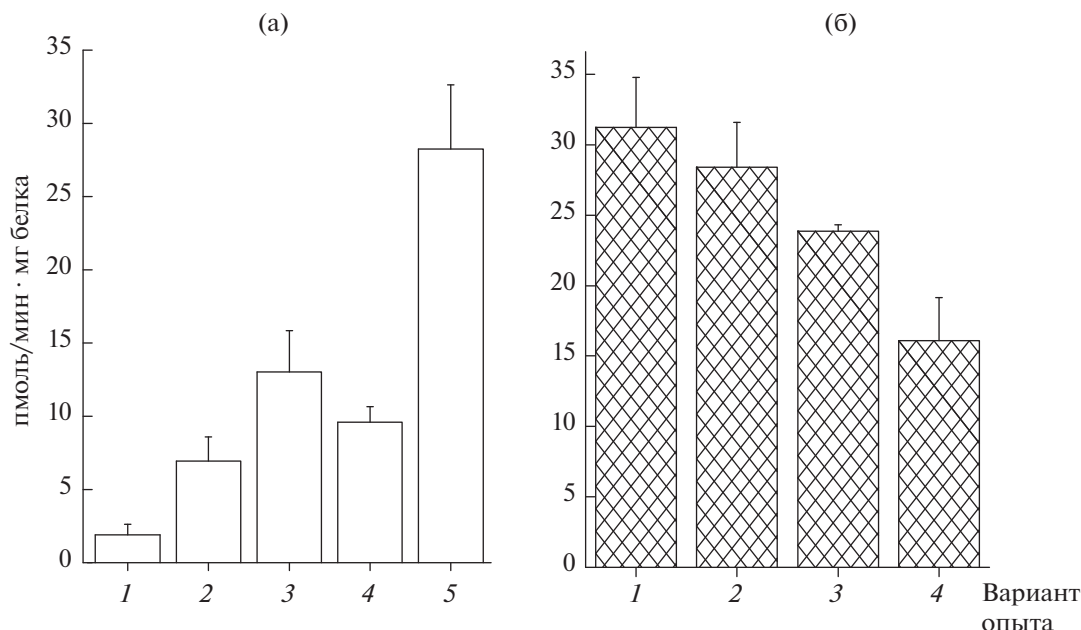


Рис. 1. Действие различных ингибиторов (а) и ионов кальция (б) на активность (пмоль цитруллина/мин · мг белка) NO синтазы *N. crassa*. а – 1 – 0.01 мМ L-NAME; 2 – 0.1 мМ L-NAME; 3 – 1 мМ L-NAME; 4 – 0.01 мМ L-NIL; 5 – 0.1 мМ L-NIL; б – 1 – 200 мМ ЭДТА; 2 – 1 мМ ЭГТА; 3 – 0.01 мМ Ca^{2+} ; 4 – 0.1 мМ Ca^{2+} . Способ подсчета удельной активности фермента описан в тексте статьи.

микроорганизма в экспоненциальной фазе роста выявлена экспрессия эндотелиальной, нейрональной и индуцибельной изоформ фермента [26]. Показано, что индукция различных изоформ NO-синтазы у этого гриба зависит от метаболического состояния клеток и ответа на стресс.

Таким образом, на основании комплекса полученных данных о чувствительности фермента к специфическому ингибитору iNOS и ионам кальция и его взаимодействию с поликлональными антителами против iNOS можно предположить существование в поверхностном мицелии *N. crassa* формы фермента, сходной с индуцибельной изоформой млекопитающих.

NO-синтаза в фотоморфогенезе *N. crassa*. На рис. 3 представлены результаты изменения удельной активности NO-синтазы в каротиногенезе у штамма дикого типа *N. crassa* в зависимости от времени освещения. Достоверных изменений этого параметра не наблюдалось как в освещенных культурах, так и в темновых контролях. Рост гриба осуществляли на стандартной среде Фогеля, содержащей 4 мМ хлорид аммония в качестве источника азота. Необходимо отметить, что, в противоположность дикому штамму, в этих условиях культивирования *N. crassa* NO-синтазная активность в диализатах *nit*-мутантов не обнаруживалась.

С результатами опыта, представленными на рис. 3 согласовывались результаты на рис. 4, согласно которым освещение мицелия гриба в присутствии ингибитора NO-синтазной реакции L-NIL

при концентрации от 0.1 до 1.0 мМ, практически не сказывалось на фоторегуляции каротиногенеза в клетках трех штаммов *N. crassa*.

В табл. 1 приведены результаты определения удельной активности NO-синтазы в фоторегулируемом конидиогенезе *N. crassa*, осуществляемом в сухой поверхностной культуре на средах с разными источниками азота. Ранее было показано [22], что в этих условиях совместное действие света и дегидратации в большинстве вариантов азотного статуса вызывало синергическое увеличение выхода конидий, поэтому для исследования были взяты варианты (штамм + источник азота в среде), в которых наблюдался эффект фотостимуляции конидиогенеза или же он отсутствовал. Было установлено, что при культивировании на среде с 50 мМ NH_4Cl активность фермента не была обна-

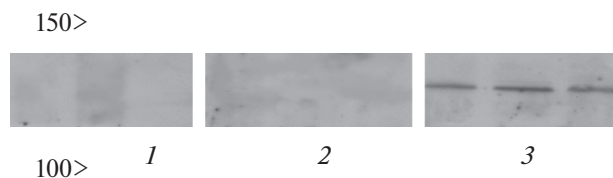


Рис. 2. Результаты Вестерн-блоттинга различных штаммов *N. crassa* с использованием антител к нейрональной (1), эндотелиальной (2) и индуцибельной (3) изоформам NO-синтазы млекопитающих; 1 – *nit-1* мутант; 2 – *nit-6* мутант и 3 – *wt-987* штамм *N. crassa*. Цифры обозначают молекулярные массы белков-метчиков (кДа).

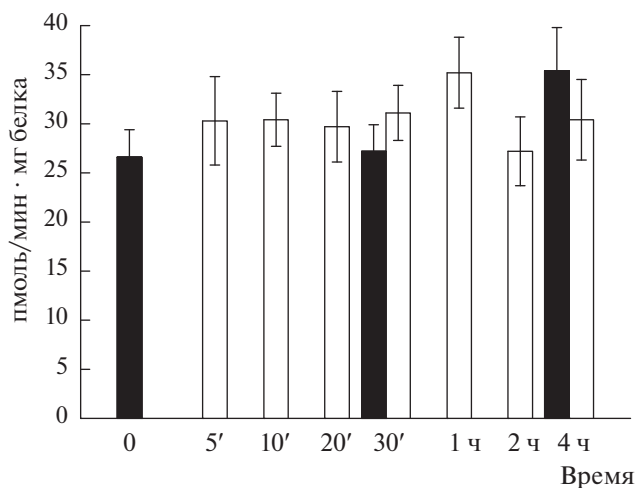


Рис. 3. Активность NO-синтазы в каротиногенезе *wt-987* штамма *N. crassa* (культивирование на среде с 4 мМ NH_4Cl в качестве источника азота). Темные столбики – темновые контроли, светлые – освещенные культуры. Способ подсчета удельной активности фермента описан в тексте статьи.

ружена как в вариантах, для которых отмечена фотостимуляция конидиогенеза, так и без нее. При выращивании дикого типа на среде с 50 мМ NaNO_3 фермент был активен, но величина удельной активности NO-синтазы оказалась одинаковой и в темновом контроле, и в мицелии, подвергнутом освещению. Сравнимая удельная активность фермента обнаружена у гриба-паразита *C. minitans* [8]. Примечательно, что она достигает максимального уровня 20 пмоль/мин · мг белка именно при конидиогенезе.

При увеличении концентрации хлорида аммония в среде культивирования дикого штамма *N. crassa* от 4 до 50 мМ активность NO-синтазы

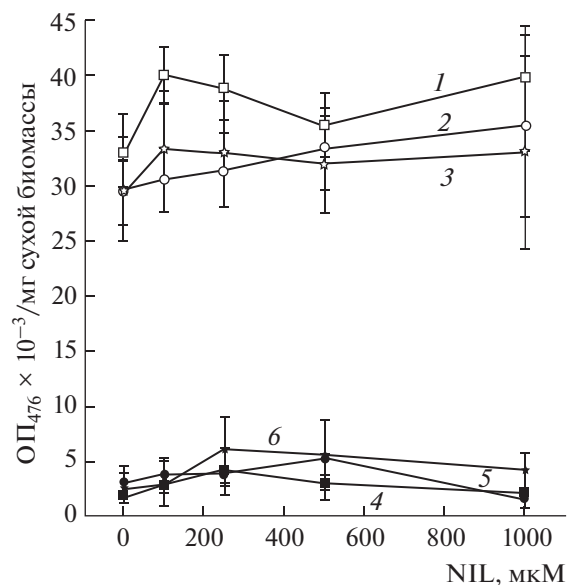


Рис. 4. Синтез каротиноидов в присутствии и отсутствии L-NIL у мутантов *nit-2* (1, 4), *nit-6* (2, 5) и штамма *wt-987* (3, 6) *N. crassa*. 1, 2, 3 – освещенный мицелий, 4, 5, 6 – темновые контроли.

исчезала. Вместе с тем активность фермента выявлялась при выращивании гриба на среде с 50 мМ NaNO_3 . Это позволило предположить наличие ингибирующего действия ионов NH_4^+ и активирующего NO_3^- на NO-синтазу *N. crassa*, подобного обнаруженному для НР [27].

Вестерн-блоттинг диализатов различных штаммов *N. crassa*, полученных для разных вариантов конидиогенеза аскомицета, с антителами к iNOS представлен на рис. 5а. Использовали разные варианты (штамм + источник азота в среде), в кото-

Таблица 1. NO-синтазная активность в конидиогенезе *N. crassa*

Источник азота в среде	Штамм	Эффект фотостимуляции конидиогенеза (дегидратированная культура)	Вариант опыта	Активность NO-синтазы, пмоль/мин · мг белка
50 мМ NH_4Cl	<i>wt-987</i>	Нет	Темновой контроль	0
			2 ч света	0
	<i>nit-2</i>	× 8.1	Темновой контроль	0
			2 ч света	0
	<i>nit-6</i>	× 12.3	Темновой контроль	0
			2 ч света	0
50 мМ NaNO_3	<i>wt-987</i>	× 8.1	Темновой контроль	28.5 ± 2.7
			2 ч света	28.0 ± 4.3

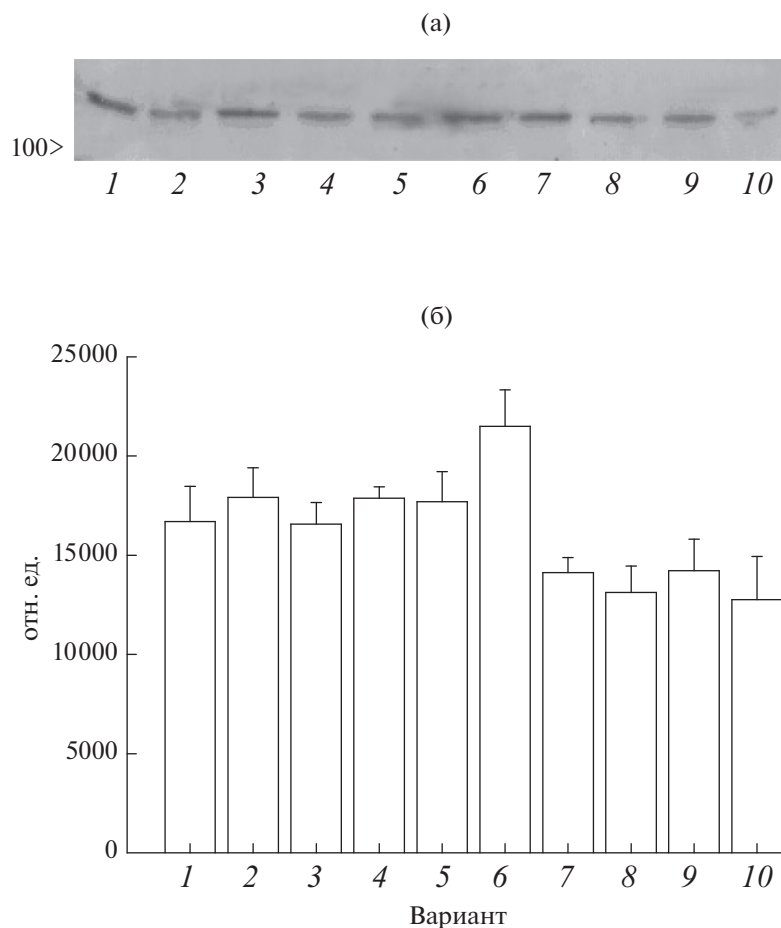


Рис. 5. Вестерн-блоттинг и денситометрический анализ диализатов различных штаммов *N. crassa*, полученных для разных вариантов конидиогенеза аскомицета, с поликлональными антителами к iNOS кролика (а) и денситометрия экспрессии NOS (б). а – 1, 2 – *wt-987* + 50 мМ NH_4Cl ; 3, 4 – *nit-2* + 50 мМ NH_4Cl ; 5, 6 – *nit-6* + 50 мМ NH_4Cl ; 7, 8 – *nit-6* + 50 мМ NH_4NO_3 ; 9, 10 – *wt-987* + 50 мМ NaNO_3 . 1, 3, 5, 7 – темновые контроли, 2, 4, 6, 8 – после 2-часовой стимуляции светом. Цифры обозначают молекулярные массы белков-метчиков(кДа).

рых эффект фотостимуляции конидиогенеза или был, или отсутствовал. Несмотря на отсутствие активности фермента в ряде случаев (табл. 1) иммунологически NO-синтаза выявлялась во всех вариантах. Средние показатели денситометрии экспрессии фермента в различных вариантах конидиогенеза из 3 Вестерн-блот опытов суммированы на диаграмме рис. 5б. Они свидетельствовали скорее о зависимости экспрессии фермента от состава среды культивирования, чем от влияния освещения мицелия в разных вариантах конидиогенеза *N. crassa*.

Изменение удельной активности NO-синтазы под действием света ранее было выявлено у зигомицета *P. blakesleeanus* [5]. Предполагали, что данный фермент является частью световой сигнальной цепи, так как образование цитруллина из аргинина увеличивалось под действием света в наиболее важных фазах развития зигомицета – в логарифмической фазе роста мицелия и при созре-

вании макроспорангиофоров. Увеличение активности NO-синтазы в 72 раза перед образованием плодовых тел происходило в освещенном мицелии базидиомицета *F. velutipes* [6], однако оценить вклад действия света в этот процесс сложно, так как темновые контроли не были поставлены. Основываясь на действии донора NO и ингибиторов NO-синтазы на фотоконидиогенез *N. crassa*, Ниннеманн и Майер [16] предположили, что свет может быть отрицательным регулятором функционирования NO за счет ингибирующего действия на фермент. Однако, в настоящей работе выявить какие-либо светозависимые изменения удельной активности NO-синтазы в светорегулируемых процессах каротиногенеза и конидиогенеза *N. crassa* не удалось. Вместе с тем, учитывая данные о динамике выхода нитрита из мицелия *nit-6* и изменения внутриклеточного содержания NO_3^- и NO_2^- у разных штаммов при фотоиндукции каротиногенеза и фотоактивации конидиогенеза [19, 20], можно так-

же предположить возможность L-аргинин-независимого синтеза NO у *N. crassa*. Он может осуществляться белком (или комплексом белков), обычно выполняющим другие ферментативные функции.

У высших растений в определенных условиях продукцию оксида азота катализируют НР [28, 29]. Недавно на примере *Aspergillus* установлено, что грибы также способны синтезировать NO при помощи НР [30]. Возможность участия НР и НиР в регуляции фотоконидиогенеза *N. crassa* (wt-987 штамм на среде с вторичным азотом) рассматривалась в предыдущей работе [22], однако наличие данных ферментов не являлось необходимым элементом процесса, так как и у *nit-2*, и *nit-6* мутантов наблюдалась светозависимая стимуляция образования спор. С использованием мутантов, дефицитных по НР и НиР было показано, что эти ферменты также не участвуют в синтезе NO у *Magnaporthe oryzae*, аскомицета, вызывающего гниль риса [31]. Другими вероятными кандидатами, ответственными за образование оксида азота, могут быть ксантиноксидоредуктаза [29], р450:НАДФН-Р450 редуктаза [31] или некоторые мембраносвязанные ферменты [29, 32]. Гипотеза, предложенная для высших растений, по которой NO-синтазоподобная активность, зависящая от L-Arg, может быть результатом кооперативного действия нескольких дискретных белков, собранных в сложный комплекс, в результате чего генерируется NO [12], может быть справедлива и для грибов.

Недавно Пенгкит с соавт. [33] выявили в геноме *N. crassa* ряд генов, имеющих высокую степень гомологии с генами NO-синтазы других грибов и человека. Анализируя их свойства, авторы предположили возможность существования различных путей синтеза NO (зависимого и независимо от NO-синтазы) у *N. crassa*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang J., Higgins V.J. // Fungal Genet. Biol. 2005. V. 42. № 4. P. 284–292.
2. Lazar E.E., Wills R.B., Ho B.T., Harris A.M., Spohr L.J. // Lett. Appl. Microbiol. 2008. V. 46. № 6. P. 688–692.
3. Turron-Gomez J.L., Eslava A.P., Benito E.P. // Fungal Genet. Biol. 2010. V. 47. № 5. P. 484–496.
4. Lai T., Li B., Qin G., Tian S. // Curr. Microbiol. 2011. V. 62. № 1. P. 229–234.
5. Maier J., Hecker R., Rockel P., Ninnemann H. // Plant Physiol. 2001. V. 126. № 3. P. 1323–1330.
6. Song N.K., Jeong C.S., Choi I.S. // Mycologia. 2000. V. 92. № 6. P. 1027–1032.
7. Gong X., Fu Y., Jiang D., Li G., Yi X., Peng Y. // Fungal Genet. Biol. 2007. V. 44. № 12. P. 1368–1379.
8. Li B., Fu Y., Jiang D., Xie J., Cheng J., Li G. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 9. P. 2830–2836.
9. Chiuchetta S.J.R., Castro-Prado M.A.A. // Genet. Mol. Biol. 2005. V. 28. № 4. P. 798–803.
10. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. // Biochem. J. 2001. V. 357. Pt. 3. P. 593–615.
11. Филиппович С.Ю. // Биохимия. 2010. Т. 75. № 10. С. 1367–1376.
12. Corpas F.G., Barroso J.B. // Nitric Oxide. 2017. V. 68. P. 5–6.
13. Santolini J., Andre F., Jeandroz S., Wendehenne D. // Nitric Oxide. 2017. V. 63. P. 30–38.
14. Chang K., Guo T., Li P., Liu Y., Xu Y., Fang Y., Qian X. // Sci. Reports. 2016. V. 6. P. 32630.
15. Cánovas D., Marcos J.F., Marcos A.T., Strauss J. // Curr. Genet. 2016. V. 62. P. 513–518.
16. Ninnemann H., Maier J. // Photochem. Photobiol. 1996. V. 64. № 2. P. 393–398.
17. Almeida B., Buttner S., Ohlmeier S., Silva A., Mesquita A., Sampaio-Marques B. et al. // J. Cell Sci. 2007. V. 120. № 18. P. 3279–3288.
18. Vieira A.L., Linares E., Augusto, O., Gomes S.L. // Fungal Genet. Biol. 2009. V. 46. № 8. P. 575–584.
19. Филиппович С.Ю., Бачурина Г.П., Крицкий М.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 3. С. 331–337.
20. Филиппович С.Ю., Онуфриев М.В., Бачурина Г.П., Крицкий М.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 4. С. 403–409.
21. Marzluf G.A. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997. V. 61. № 1. P. 17–32.
22. Филиппович С.Ю., Бачурина Г.П., Шербаков Д.Л. // Прикл. биохимия и микробиол. 2015. Т. 51. № 3. С. 326–334.
23. Ruan J., Xie Q., Hutchinson N., Cho H., Wolfe G.C., Nathan C. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 37. P. 22679–22686.
24. Hevel J.M., White K.A., Marletta M.A. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 34. P. 22789–22791.
25. Kanadia R.N., Kuo W.N., McNabb M., Botchway A. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1998. V. 45. № 6. P. 1081–1087.
26. Domitrovic T., Palhano F.L., Barja-Fidalgo C., DeFreitas M., Orlando M.T., Fernandes P.M. // FEMS Yeast Res. 2003. V. 3. № 4. P. 341–346.
27. Bahns M., Garret R.H. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 2. P. 690–693.
28. Moreau M., Lindermayr C., Durner J., Klessig D.F. // Physiol. Plant. 2010. V. 138. № 4. P. 372–383.
29. Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., van Dongen J.T. // Trends Plant Sci. 2011. V. 16. № 3. P. 160–168.
30. Marcos A.T., Ramos M.S., Marcos J.F., Carmona L., Strauss J., Cánovas D. // Mol. Microbiol. 2016. V. 99. № 1. P. 15–33.
31. Samalova M., Johnson J., Illes M., Kelly S., Fricker M., Gurr S. // New Phytol. 2013. V. 197. P. 207–222.
32. Baudouin E. // Plant Biol. 2011. V. 13. № 2. P. 233–242.
33. Pengkit A., Jeon S.S., Son S.J., Shin J.H., Baik K.Y., Choi E.H., Park G. // Sci. Reports. 2016. V. 6. Article № 30037.
<https://doi.org/10.1038/srep30037>

NO-Synthase Activity in Photomorphogenesis in *Neurospora crassa***S. Yu. Filippovich^{a,*}, M. V. Onufriev^b, D. I. Peregud^c, G. P. Bachurina^a, and M. S. Kritsky^a**^a*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*^b*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117485 Russia*^c*Serbsky Federal Medical Research Centre of Psychiatry and Narcology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 119034 Russia***e-mail: syf@inbi.ras.ru*

NO synthase activity was detected in *Neurospora crassa* cells by measuring the conversion of ³H-L-arginine to ³H-L-citrulline. Some properties of this activity (sensitivity to calcium ions, the action of specific enzyme inhibitors, Western blot analysis) were similar to those for inducible enzyme form in mammals. According to Western blotting, the molecular weight of the enzyme was about 130 kDa. No light-dependent changes in the specific activity of NO synthase were revealed in photocarotinogenesis and photoconidiogenesis of *N. crassa*.

Keywords: NO-synthase, conidiation, carotinogenesis, *Neurospora crassa*

УДК 66.061.34+579.66

БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ СУЛЬФИДНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ МЕДИ И ЦИНКА И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПОЛУЧАЕМЫХ ОСАДКОВ

© 2020 г. Н. В. Фомченко¹, М. И. Муравьев¹, *

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

*e-mail: maxmuravyov@gmail.com

Поступила в редакцию 15.01.2020 г.

После доработки 14.02.2020 г.

Принята к публикации 25.02.2020 г.

Исследовано биовыщелачивание сульфидных концентратов с различным содержанием меди и цинка в присутствии двух культур ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, растущих при 30 и 35°C. Установлено, что средние скорости выщелачивания меди зависели прямо пропорционально от ее содержания в концентрате, цинка не только от его содержания, но и от содержания меди. При этом удельная скорость выщелачивания меди изменялась незначительно (28–45 мг/(г · сут)), в то время как изменение удельной скорости выщелачивания цинка было значительно больше (107–319 мг/(г · сут)) и зависело от содержания металлов в концентратах. При всех условиях биовыщелачивания удельная скорость перевода цинка в раствор значительно возрастала при увеличении содержания меди в концентратах, что свидетельствовало о наличии гальванических взаимодействий. Показано, что при биовыщелачивании концентратов, в которых содержание меди превышало содержание цинка и составляло не менее 10%, можно было получить осадки, представляющие собой медные концентраты с незначительным содержанием цинка. Концентраты, содержание цинка в которых превышало содержание меди, биовыщелачиванию подвергать нецелесообразно.

Ключевые слова: биовыщелачивание, медно-цинковый концентрат, халькопирит, сфалерит, ацидофильные микроорганизмы, биогидрометаллургия

DOI: 10.31857/S0555109920040054

В настоящее время основное количество цветных металлов находится в месторождениях сульфидных руд, которые подвергают обогащению с получением сульфидных концентратов, которые перерабатывают на пирометаллургических заводах. Известные пирометаллургические способы получения металлов из сульфидных концентратов характеризуются большими пыле- и газовыделениями, а также потерями ценных компонентов в шлаках [1, 2]. Воздействие пирометаллургических предприятий на окружающую среду, особенно связанное с выбросами сернистого газа, носит ярко выраженный негативный характер. Даже высококачественные медные концентраты содержат цинк (как правило, более 2%), который полностью теряется в шлаках при пирометаллургической переработке. Хранение этих шлаков связано с негативными последствиями для окружающей среды вследствие выветривания и попадания тяжелых металлов в грунтовые воды [3]. Для снижения неблагоприятного влияния на окружающую среду значительный практический интерес представляет

замена известных пирометаллургических процессов на биогидрометаллургические [4, 5].

Биогидрометаллургические методы привлекают в последнее время все больше внимание исследователей, занимающихся переработкой как традиционного сырья цветных и благородных металлов, так и различных видов отходов обогачительной и металлургической промышленности, а также вторичного сырья [6–13].

На предприятиях по обогащению полиметаллических руд относительно легко и дешево получают коллективные медно-цинковые концентраты. Поиск способов их переработки с применением биовыщелачивания хемолитотрофными ацидофильными микроорганизмами является актуальной задачей. Ранее было проведено изучение этого процесса [14, 15]. Было показано, что при биовыщелачивании возможно значительное снижение содержания цинка в твердой фазе и повышение содержания в ней меди.

Наиболее перспективным для биовыщелачивания представляется исследование взаимодей-

Таблица 1. Характеристика сульфидных концентратов

№ концентрата	Содержание металлов, %			Содержание минералов, %		k
	Cu	Zn	Fe	CuFeS ₂	ZnS	
1	19.2	2.64	31.6	55.2	3.9	7.3
2	14.7	5.00	33.9	42.1	7.5	2.9
3	12.4	6.18	35.0	35.5	9.3	2.0
4	10.1	7.36	36.1	29.0	11.0	1.4
5	8.08	16.3	30.48	23.2	24.4	0.5
6	6.07	25.3	24.85	17.4	37.8	0.24
7	4.05	34.3	19.23	11.6	51.2	0.12
8	2.03	43.3	13.6	5.8	64.6	0.05

ствия медных и цинковых минералов в концентратах с различным содержанием меди и цинка.

Цель работы — изучение биовыщелачивания медно-цинковых концентратов с различным содержанием меди и цинка в присутствии ассоциаций хемолитотрофных ацидофильных микроорганизмов, а также определение скорости выщелачивания цветных металлов и зависимости качества получаемого осадка от содержания меди и цинка в исходном концентрате.

МЕТОДИКА

Сульфидные концентраты. В качестве объекта исследований были использованы восемь образцов флотационных медно-цинковых концентратов, полученных из сульфидной руды Тарньерского месторождения (Свердловская область, Россия) в производственных условиях на горно-обогатительном комбинате. Рудные минералы в концентрате представлены следующими сульфидами: халькопиритом (CuFeS₂), сфалеритом (ZnS), а также пирротинном (Fe_{1-x}S) и пиритом (FeS₂). В табл. 1 приведены характеристики концентратов по содержанию в них основных металлов и минералов цветных металлов, а также отношения содержания меди к содержанию цинка, рассчитанные по уравнению:

$$k = \frac{\beta_{\text{Cu}}}{\beta_{\text{Zn}}}, \quad (1)$$

где β — содержание металла в концентрате (%).

При этом в концентратах № 1–4 содержание меди было выше, чем содержание цинка (коэффициент k изменялся от 7.3 до 1.4), а в концентратах № 5–8 содержание цинка значительно превышало содержание меди (k изменялся от 0.5 до 0.05).

Биовыщелачивание. Опыты проводили на термостатируемых качалках с интенсивностью перемешивания 170 об./мин в конических колбах объ-

емом 250 мл, содержащих 100 мл суспензии. В колбы вносили 1.0 г концентрата, 90 мл среды 9К [16], разбавленной дистиллированной водой в 5 раз и содержащей сульфат двухвалентного железа в таком количестве, чтобы концентрация ионов Fe²⁺ составила 5.0 г/л, и 10 мл посевного материала. Необходимые значения pH устанавливали на уровне 1.3–1.4 и поддерживали добавлением 5 М серной кислоты.

Культуры микроорганизмов. Были использованы две культуры ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов. Первая культура, растущая при 30°C, включала бактерии *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* и *Leptospirillum spp.*, выделенные из хранилищ пиритных отходов флотации медно-цинковых руд Урала (ОАО “Святогор” и ПАО “Гайский ГОК”, Россия). Вторая, растущая при 35°C, включала бактерии *Leptospirillum spp.*, *A. caldus* и археи *Ferroplasma acidiphilum*, выделенные из сульфидных концентратов золотосодержащих руд месторождений Олимпиадинское (Россия), а также Кокпатас и Даугызтау (Узбекистан). Культуры микроорганизмов были получены смешиванием накопительных культур, выделенных из продуктов указанных месторождений.

Аналитические методы. Значения pH измеряли с помощью pH-метра pH-150МИ (“Измерительная техника”, Россия). Концентрации Fe³⁺ и Fe²⁺ в жидкой фазе определяли титриметрическим методом с трилоном Б [17], ионов меди и цинка — на атомно-абсорбционном спектрометре с пламенной атомизацией 3100 (“Perkin Elmer”, США).

Выход твердой фазы (%) определяли по формуле:

$$\gamma = \frac{m_{\text{ос}}}{m_{\text{исх}}} \times 100\%, \quad (2)$$

где $m_{\text{ос}}$ — масса осадка после биовыщелачивания (г), $m_{\text{исх}}$ — масса исходного концентрата в выщелачиваемой суспензии (г).

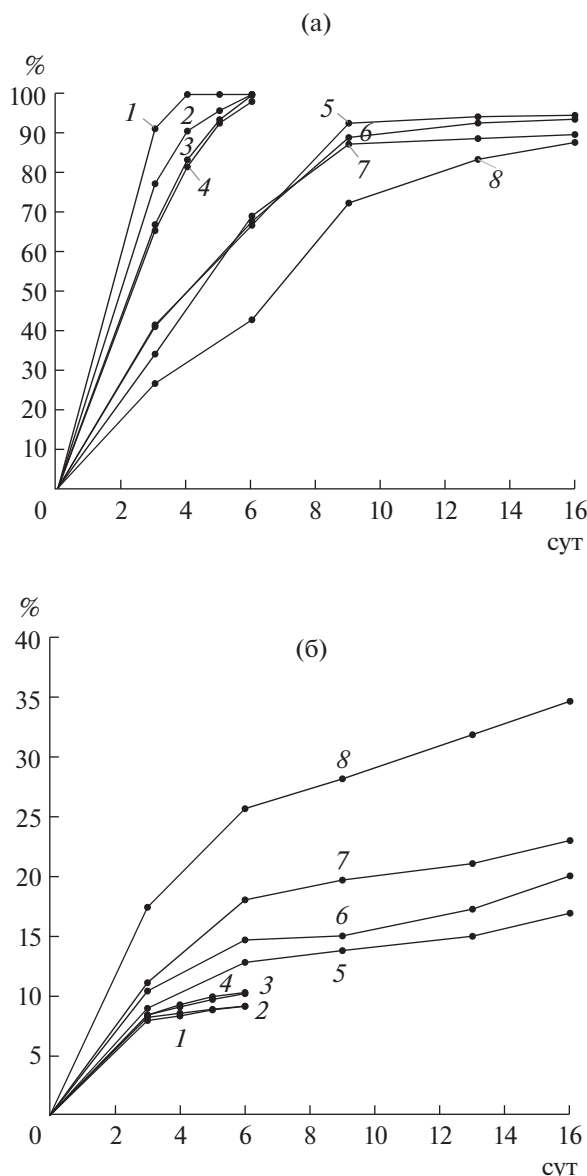


Рис. 1. Извлечение цинка (а) и меди (б) в ходе биовыщелачивания медно-цинковых концентратов (№ 1–8) при 30°C.

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

$$\varphi = 100 - \frac{\beta_{\text{ос}} \gamma}{\beta_{\text{исх}}}, \quad (3)$$

где $\beta_{\text{ос}}$ и $\beta_{\text{исх}}$ — содержание металла в осадке после биовыщелачивания и исходном концентрате соответственно (%).

Среднюю скорость биовыщелачивания меди и цинка (мг/л · сут) — по формуле:

$$\vartheta = \frac{C}{t}, \quad (4)$$

где C — концентрация металла в растворе (мг/л), t — время (сут).

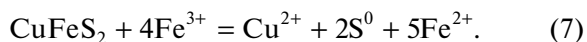
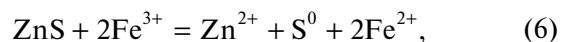
Удельную скорость выщелачивания меди и цинка (мг/г · сут) — по формуле:

$$\omega = \frac{\vartheta V}{m_{\text{исх}}} \times 100, \quad (5)$$

где V — объем раствора при выщелачивании (л).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основании данных минерального состава исследуемых сульфидных концентратов цветных металлов можно было заключить, что при их биоокислении с использованием ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов возможно разрушение минералов сфалерита (ZnS) и халькопирита (CuFeS_2). Окисление этих минералов протекает по следующим упрощенным реакциям:



При этом основной окислитель — ион Fe^{3+} , являлся продуктом метаболизма хемолитотрофных микроорганизмов, которые окисляют ион Fe^{2+} в питательной сернокислой среде.

Известно, что халькопирит и сфалерит характеризуются при их гальваническом взаимодействии принципиально различной кинетикой окисления в сернокислых растворах трехвалентного железа. Так, халькопирит, имеющий наиболее высокий электродный потенциал, будет служить катодом, а сфалерит, обладающий низкими значениями электродного потенциала, — растворяющимся анодом [18–20].

Изменение извлечения цветных металлов в жидкую фазу в процессе биовыщелачивания при 30 и 35°C представлены на рис. 1 и 2 соответственно. Из представленных на рис. 1 данных следует, что чем больше содержание меди в медно-цинковом концентрате, тем эффективнее было удаление из него цинка при биовыщелачивании, при этом извлечение меди менялось незначительно. Анализ выщелачивания концентратов № 1–4, в которых содержание меди превышало содержание цинка, показал, что в течение 5–6 сут основное количество цинка переходило в жидкую фазу. При этом извлечение цинка в раствор достигало 98–100%, а извлечение меди составляло только 9–10%. Результаты, приведенные на рис. 2, подтвердили полученные закономерности, однако извлечение цветных металлов в жидкую фазу оказалось выше на 3–4% для цинка и на 1.0–1.5% для меди. Результаты биовыщелачивания концентратов № 5–8, в которых содержание цинка превышало содержание меди, отличались от результатов выщелачивания концентратов № 1–4. При этом извлечение цинка было значительно меньше, а меди — больше. Так, за 6 сут биовыше-

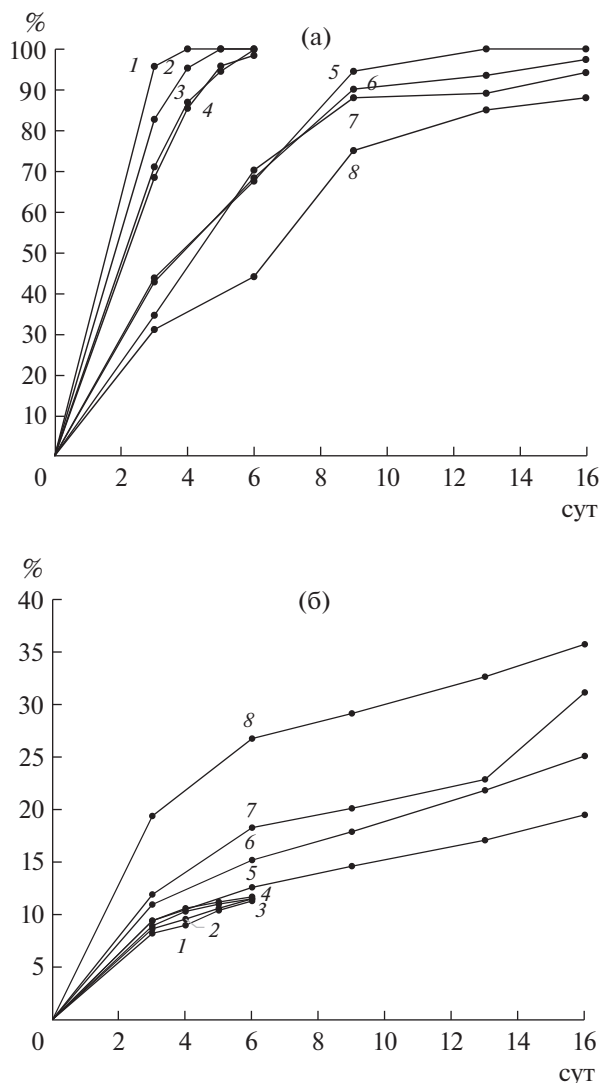


Рис. 2. Извлечение цинка (а) и меди (б) в течение биовыщелачивания медно-цинковых концентратов (№ 1–8) при 35°C.

лачивания при 35°C извлекалось только 44% цинка из концентрата с максимальным его содержанием (концентрат № 8), а за 16 сут это значение возрастало до 88%. Извлечение меди возрастало с 26.8 до 35.8%. Оказалось, что полное выщелачивание цинка происходило в течение 13 сут только из концентрата № 5, то есть время эффективного биовыщелачивания увеличивалось на 7–10 сут по сравнению с концентратом № 4.

Полученные результаты свидетельствовали о том, что цинк из концентратов № 1–4, в которых содержание меди было выше содержания цинка, выщелачивался значительно быстрее, чем из концентратов № 5–8, в которых содержание цинка превышало содержание меди.

На рис. 3 представлена средняя скорость выщелачивания цинка и меди на протяжении 3 сут

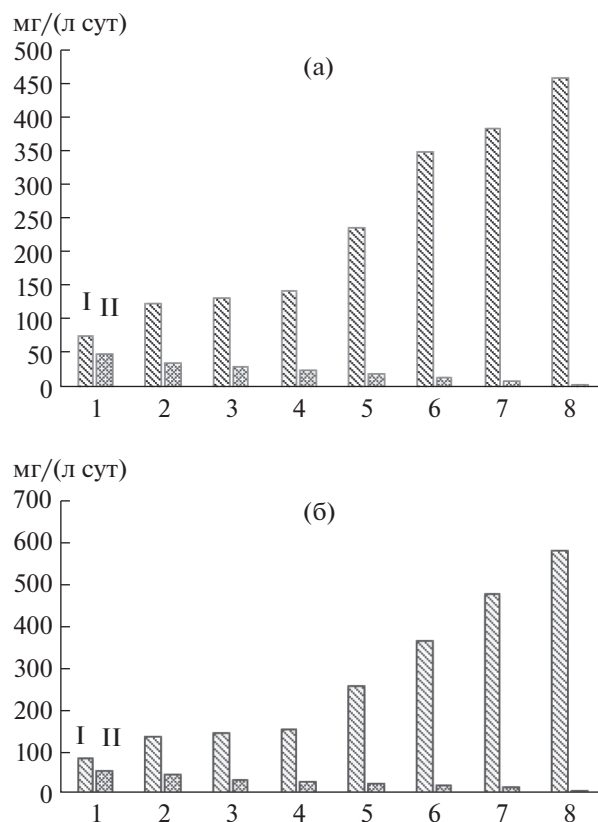


Рис. 3. Средняя скорость выщелачивания цинка (I) и меди (II) за 3 сут биовыщелачивания концентратов № 1–8 при 30 (а) и 35°C (б).

из исследуемых концентратов в процессе биокисления при 30 и 35°C соответственно. Необходимо отметить, что в течение 3 сут из концентратов № 1–4 было выщелочено основное количество цветных металлов. Из представленных данных следовало, что скорость выщелачивания цинка из всех исследуемых концентратов превышала скорость выщелачивания меди. При этом даже в концентрате № 1, в котором количество меди в 8 раз превышало содержание цинка, скорость его выщелачивания оказалась выше скорости выщелачивания меди в 1.5 раза. Необходимо отметить, что скорость выщелачивания цветных металлов оказалась прямо пропорциональна их содержанию в исследуемых концентратах, а при 35°C скорость их выщелачивания во всех опытах была выше. На основании данных рис. 3 была рассчитана разница между максимальной и минимальной скоростью выщелачивания цветных металлов, которая для цинка составила 497 мг/(л · сут), а меди — только 48 мг/(л · сут).

На рис. 4 представлена зависимость удельной скорости выщелачивания меди от содержания цинка и удельной скорости выщелачивания цинка от содержания меди в исследуемых концентратах в процессе их биовыщелачивания при 30 и

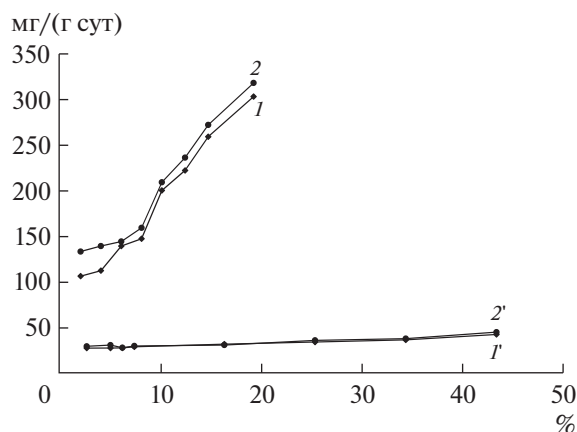


Рис. 4. Зависимости средних удельных скоростей выщелачивания цинка (1, 2) от содержания меди, а также меди (1', 2') от содержания цинка в течение 3 сут биовыщелачивания при 30 (1, 1') и 35°C (2, 2').

35°C. Из представленных данных следовало, что удельная скорость выщелачивания цинка значительно зависела от содержания меди в концентратах. Этот параметр резко возрастал при увеличении содержания меди в концентрате с 10.1 до 19.2%, при котором содержание цинка становилось меньше содержания меди (7.36–2.64%). Так, при максимальном содержании цинка (43.3%) и минимальном содержании меди (2.03%) удельная скорость выщелачивания цинка при 30°C составила только 106, а меди — 43.0 мг/(г · сут). При снижении содержания цинка до 7.36% и увеличении содержания меди до 10.1% этот параметр возрос до 201 мг/(г · сут) для цинка и снижился до 29.0 мг/(г · сут) для меди. При дальнейшем снижении содержания цинка до минимального значения (2.64%) удельная скорость его выщелачивания возрастала до 314 мг/(г · сут), а меди при максимальном ее содержании (19.2%) — снижалась до 27 мг/(г · сут). Закономерности, полученные при биовыщелачивании концентратов при 30°C полностью подтвердились при проведении биовыщелачивания при 35°C.

Анализ данных, представленных на рис. 4, показал, что при 30°C удельная скорость выщелачивания меди в зависимости от содержания металлов в концентратах изменялась незначительно (43–27 мг/(г · сут)). В то же время изменение удельной скорости выщелачивания цинка оказалось значительно больше (107–304 мг/(г · сут)). При 35°C показатели удельной скорости выщелачивания меди изменялись в диапазоне 45.5–29.8 мг/(г · сут), а цинка — 134–319 мг/(г · сут), то есть были несколько выше, чем при 30°C. Это свидетельствовало о том, что при всех условиях биовыщелачивания удельная скорость выщелачивания цинка значительно возрастала при увеличении содержания меди в концентратах, в то время как удельная

скорость освобождения меди при этом снижалась незначительно. Можно предположить, что это связано с наличием гальванического взаимодействия при совместном выщелачивании медного минерала халькопирита и цинкового минерала сфалерита. В концентратах, в которых содержание меди превышало содержание цинка, удельная скорость выщелачивания цинка из минерала сфалерита значительно повышалась.

Низкую удельную скорость выщелачивания меди из халькопирита можно объяснить известной его высокой устойчивостью к окислению в сернокислых растворах трехвалентного железа [21–24].

В табл. 2 представлены основные результаты биовыщелачивания медно-цинковых концентратов при 30 и 35°C. Из представленных данных следовало, что выход осадка после выщелачивания концентратов № 1–4, почти полное удаление цинка из которых было достигнуто за 6 сут, незначительно отличался для всех продуктов и составлял от 67 до 78%. Это при биовыщелачивании как при 30°C, так и 35°C позволило сконцентрировать медь в осадках и повысить ее содержание в них на 3–4% по сравнению с содержанием в исходном концентрате. При этом во всех этих исходных концентратах содержание цинка было ниже содержания меди.

При биовыщелачивании концентратов № 5–8, в которых содержание цинка превышало содержание меди, даже за 16 сут полностью удалить цинк удалось только из концентрата № 5, содержащем исходно 16.3 и 8.08% цинка и меди соответственно. При этом содержание меди в осадке также повышалось до 13.0% (при 35°C), что оказалось близким к результатам биовыщелачивания концентрата № 4 за 6 сут. Из концентратов № 6–8 не удалось полностью выщелочить цинк, при этом остаточное содержание цинка и меди было высоким. Следует отметить, что из всех выщелачиваемых концентратов в получаемых осадках вследствие их низкого выхода (40–53%) концентрировалась медь.

Анализ полученных результатов показал, что биовыщелачивание концентратов № 1–3 протекало относительно быстро и эффективно, и получаемые осадки соответствовали качественным медным концентратам. В то время как осадки, полученные из концентратов № 4–8, по содержанию в них цветных металлов не являлись ни концентратами, ни отходами. В связи с этим по своему химическому и минералогическому составу они оказались неперспективными для переработки с применением биовыщелачивания.

Качественные медные осадки могут быть эффективно переработаны с использованием пирометаллургических способов, при этом потери цветных металлов со шлаками будут незначительными вследствие очень низкого содержания в них цинка. Цветные металлы из растворов, получен-

Таблица 2. Основные результаты биовыщелачивания медно-цинковых концентратов* при 30 и 35°C

Температура, °C	№ концентрата	γ	100-ф		β_{oc}	
			Cu	Zn	Cu	Zn
30	1	78	89.7	0	22.1	0
	2	66	89.8	0	19.9	0
	3	71	90.9	0.10	16.9	0.01
	4	68	90.8	1.80	13.5	0.20
	5	53	83.1	5.31	12.6	1.62
	6	45	79.9	6.30	10.7	3.52
	7	44	77.0	10.2	7.06	7.91
	8	45	65.3	12.2	2.97	11.8
35	1	76	89.5	0	22.6	0
	2	71	89.3	0	18.5	0
	3	68	89.5	0.20	16.6	0.01
	4	67	89.7	1.60	13.5	0.18
	5	51	81.5	0	13.0	0
	6	42	74.9	2.60	11.7	0.87
	7	40	68.8	5.80	6.91	4.94
	8	40	64.2	12.0	3.25	12.9

* Продолжительность выщелачивания для концентратов № 1–4 составляла 5 сут, № 5–8 – 16 сут.

ных после биовыщелачивания концентратов, могут быть выделены в товарной форме с помощью известных способов [25, 26].

Таким образом, показана возможность прогнозирования эффективности удаления цинка и повышения содержания меди при биовыщелачивании медно-цинковых сульфидных концентратов в зависимости от соотношения в них минералов цветных металлов. Развитие исследований в этом направлении позволит повысить эффективность переработки медно-цинковых концентратов с применением технологии биовыщелачивания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Potysz A., van Hullebusch E.D., Kierczak J., Grybos M., Lens P.N.L., Guibaud G. // Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 2015. V. 45. № 22. P. 2424–2488.
2. Moskalyk R.R., Alfantazi A.M. // Miner. Eng. 2003. V. 16. № 10. P. 893–919.
3. Potysz A., van Hullebusch E.D., Kierczak J. // J. Environ. Manag. 2018. V. 219. P. 138–152.
4. Fomchenko N.V., Muravyov M.I. // J. Environ. Manag. 2018. V. 226. P. 270–277.
5. Fomchenko N.V., Muravyov M.I. // Hydrometallurgy. 2017. V. 174. № 1. P. 116–122.
6. Gu T., Rastegar S.O., Mousavi S.M., Li M., Zhou M. // Biores. Technol. 2018. V. 261. P. 428–440.
7. Mahmoud A., Cézac P., Hoadley A.F.A., Contamine F., D'Hugues P. // Int. Biodeter. Biodegr. 2017. V. 119. P. 118–146.
8. Muravyov M.I., Fomchenko N.V. // Miner. Eng. 2018. V. 122. P. 267–276.
9. Муравьев М.И., Фомченко Н.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 6. С. 561–569.
10. Baniyadi M., Vakilchap F., Bahaloo-Horeh N., Mousavi S.M., Farnaud S. // J. Ind. Eng. Chem. 2019. V. 76. P. 75–90.
11. Hoque M.E., Philip O.J. // Mater. Sci. Eng.: C. 2011. V. 31. № 2. P. 57–66.

12. *Kaksonen A.H., Boxall N.J., Gumulya Y., Khaleque H.N., Morris C., Bohu T., Cheng K.Y., Usher K.M., Lakanie-mi A.-M.* // *Hydrometallurgy*. 2018. V. 180. № 1. P. 7–25.
13. *Watling H.R.* // *Miner.* 2014. V. 5. № 1. P. 1–60.
14. *Фомченко Н.В., Муравьёв М.И.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2017. Т. 53. № 1. С. 82–87.
15. *Фомченко Н.В., Муравьёв М.И.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2017. Т. 53. № 4. С. 395–399.
16. *Silverman M.P., Lundgren D.C.* // *J. Bacteriol.* 1959. V. 77. № 5. P. 642–647.
17. *Davis D.G., Jacobsen W.R.* // *Anal. Chem.* 1960. V. 32. № 2. P. 215–217.
18. *Jyothi N., Sudha K.N., Natarajan K.A.* // *Int. J. Miner. Process.* 1989. V. 27. № 3–4. P. 189–203.
19. *Mehta A.P., Murr L.E.* // *Hydrometallurgy*. 1983. V. 9. № 3. P. 235–256.
20. *Arpalahti A., Lundström M.* // *Miner. Eng.* 2018. V. 119. P. 116–125.
21. *Tanne C.K., Schippers A.* // *Hydrometallurgy*. 2019. V. 187. № 1. P. 8–17.
22. *Zhao H., Zhang Y., Zhang X., Qian L., Sun M., Yang Y., Zhang Y., Wang J., Kim H., Qiu G.* // *Miner. Eng.* 2019. V. 136. P. 140–154.
23. *Tao H., Dongwei L.* // *Biotechnol. Rep.* 2014. V. 4. P. 107–119.
24. *Panda S., Akcil A., Pradhan N., Deveci H.* // *Biores. Technol.* 2015. V. 196. P. 694–706.
25. *Леонов С.Б., Минеев Г.Г., Жучков И.А.* *Гидрометаллургия. Ч. 2: Выделение металлов из растворов и вопросы экологии* Иркутск: Изд-во Иркут. гос. техн. ун-та, 1998, 2000. 491 с.
26. *Медведев А.С., Богатырева Е.В.* *Теория гидрометаллургических процессов*. М.: Изд. дом МИСИС, 2009. 346 с.

Bioleaching of Sulfide Concentrate Containing Different Amounts of Copper and Zinc and Evaluation of Bioleach Residue Grade

N. V. Fomchenko^a and M. I. Muravyov^{a,*}

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

^{*}*e-mail: maxmuravyov@gmail.com*

Bioleaching of sulfide concentrates with different copper and zinc contents was studied using two cultures of acidophilic chemolithotrophic microorganisms growing at 30 and 35°C. It was found that the average leaching rates of copper directly depends on its content in the concentrate. The leaching rate of zinc depends not only on its content but also on copper content. At the same time, the specific rate of copper leaching changed slightly (28–45 mg/(g · day)), and the range of changes in the specific rate of zinc leaching was significantly greater (107–319 mg/(g · day)) depending on the metals content in concentrate. Under all conditions of bioleaching, the specific rate of leaching of zinc significantly increased with an increase in the copper content in the concentrates, which indicated the presence of a galvanic interactions. It was shown the possibility obtaining copper concentrates with a low zinc content during bioleaching from concentrates in which the copper content exceeded the zinc content and was not less than 10%. Concentrates containing more zinc than copper should not be subjected to bioleaching.

Keywords: bioleaching, sulfide concentrate, biohydrometallurgy, acidophilic microorganisms

УДК 547.92,547.6.66

КОНВЕРСИЯ СОЕВОГО ФИТОСТЕРИНА В АНДРОСТА-4,9(11)-ДИЕН-3,17-ДИОН

© 2020 г. Т. С. Савинова^{1,*}, Д. В. Довбня², С. М. Хомутов²,
А. В. Казанцев¹, Л. Д. Ху³, Н. В. Лукашев¹, М. В. Донова²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино, Московская область, 142290 Россия

³Институт химии Вьетнамской академии наук и технологии, Ханой, A18, Вьетнам

*e-mail: tatiana_savinova@rambler.ru

Поступила в редакцию 08.11.2019 г.

После доработки 10.12.2019 г.

Принята к публикации 23.12.2019 г.

Разработан метод получения андроста-9(11)-диен-3,17-диона ($\Delta^{9(11)}$ -АД), представляющий собой комбинацию микробного окисления боковой цепи фитостерина с одновременным 9α -гидроксилированием и последующей химической региоселективной дегидратацией образованного 9α -гидроксидиена-3,17-дикето-интермедиата без его выделения и очистки. В процессе культивирования штамма *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D дикого типа фитостерин трансформировался в 9α -гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион (9-ОН-АД). Продукт экстрагировали из культуральной жидкости органическим растворителем и дегидратировали в экстракте минеральной кислотой. Образованный $\Delta^{9(11)}$ -АД очищали с использованием метода селективной кристаллизации. Минорные продукты выделены и идентифицированы. Показана способность штамма трансформировать стеринны с образованием метилового эфира 9α -гидроксипрегн-4-ен-3-он-20-карбоновой кислоты. Предлагаемый подход позволил упростить технологическую схему получения целевого соединения и не только исключить потери 9-ОН-АД, но и минимизировать количество отходов.

Ключевые слова: фитостерин, биоконверсия, *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D, 9α -гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион, андроста-4,9(11)-диен-3,17-дион, дегидратация, метиловый эфир прегна-4,9(11)-диен-3-он-20-карбоновой кислоты

DOI: 10.31857/S0555109920030125

Фитостерины – растительные стеринны – производятся в промышленности из масличного растительного сырья (соя, рапс и др.) при очистке растительных масел или отходов целлюлозно-бумажной промышленности [1]. В настоящее время фитостерины являются дешевым и доступным исходным материалом для производства различных терапевтических стероидов [2]. Обычно коммерчески доступный фитостерин представляет собой смесь нескольких стериннов, в основном β -ситостерина, стигмастерина, кампестерина и брассикастерина, содержащих в молекулярной структуре 3β -гидроксильную группу и 5,6-двойную связь (рис.1). Схемы получения терапевтических стероидов включают микробиологическую конверсию фитостериннов в ключевые интермедиаты, такие как андрост-4-ен-3,17-дион (АД), его 1-дегидро-аналог (АДД) и 9α -гидроксилированное производное (9-ОН-АД) [3–5].

Известно несколько подходов к получению 9-ОН-АД из фитостериннов. Один из них включает микробиологическое окисление фитостериннов до АД, его выделение, кристаллизацию и последующее гидроксилирование в положение 9α [6–9]. Способностью к 9α -гидроксилированию АД обладают бактерии и грибы, относящиеся к родам *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Cunninghamella* и *Neurospora* [10, 11]. Другим подходом к получению 9-ОН-АД является двухстадийная биоконверсия, включающая микробное окисление фитостериннов до АД и последующее его гидроксилирование в положение 9α без извлечения АД из ферментационной среды и кристаллизации с последовательным использованием штаммов *Mycobacterium neoaurum* и *Rhodococcus erythropolis* [12].

Экономически наиболее целесообразным в синтезе 9-ОН-АД из фитостериннов является подход, основанный на использовании штаммов акти-

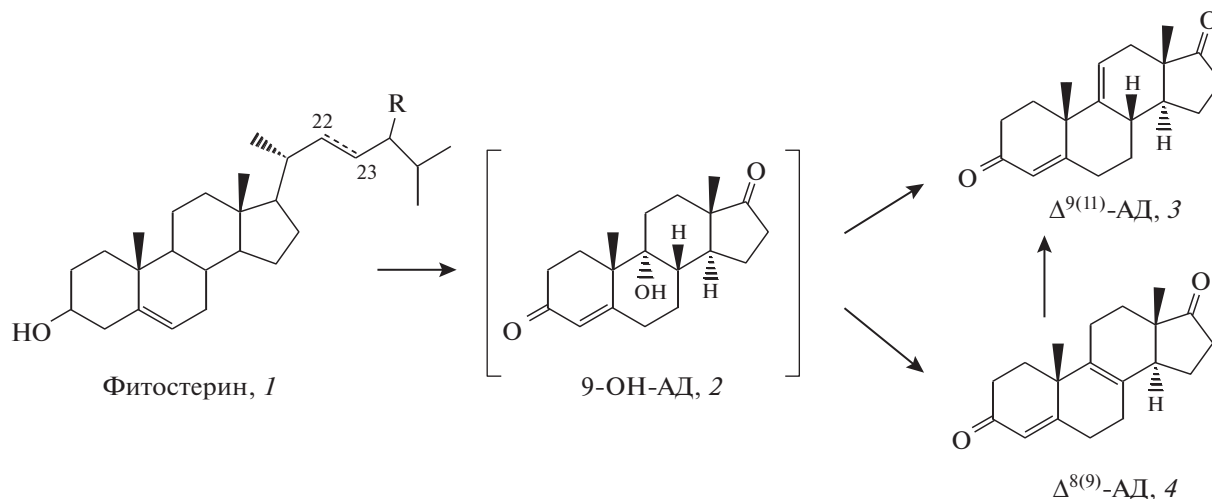


Рис. 1. Синтез $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) из стероидов через образование 9-ОН-АД (2): R = C₂H₅ – β -ситостерин; R = CH₃ – кампестерин; R = C₂H₅ и $\Delta^{22(23)}$ – стигмастерин, R = CH₃ и $\Delta^{22(23)}$ – брассикастерин.

нобактерий, способных в одностадийной биоконверсии накапливать 9-ОН-АД в качестве основного продукта. Ранее сообщалось, что некоторые штаммы микобактерий, полученные методом мутагенеза, конвертировали β -ситостерин в 9-ОН-АД [13, 14]. Однако не меньший интерес представляют природные штаммы, обладающие способностью к селективному образованию и накоплению 9-ОН-АД в процессе катаболической модификации фитостероидов. Одним из таких штаммов является сапротрофный быстро растущий выделенный из почвы непатогенный штамм *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D, способный отщеплять боковую цепь при C17 и вводить гидроксильную группу в положение C9 стерина с образованием 9-ОН-АД в качестве основного продукта [15–17]. Было проведено полное геномное профилирование штамма *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D и найдено, что штамм обладает множеством генов, кодирующих ферменты катаболизма стероидов, в том числе окислительной деструкции боковой цепи, разрушения стероидного ядра и транспорта стероидов [18]. Полная последовательность генома, необходимая для осуществления генетических манипуляций с целью создания новых стерин-трансформирующих биокатализаторов, была депонирована в GenBank под регистрационным номером CP009914 [19]. Таким образом, штамм *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D является перспективным объектом для создания на его основе новых промышленных штаммов.

Мультистадийные синтезы субстанций стероидных лекарственных средств из 9-ОН-АД часто включают комбинацию химических и биотехнологических стадий. При этом, как правило, на первом этапе проводят региоселективную дегид-

ратацию 9 α -гидроксильной группы с образованием андроста-4,9(11)-диен-3,17-диона ($\Delta^{9(11)}$ -АД). 9,11-Двойная связь обеспечивает большую стабильность стероидной молекулы по сравнению с 9 α -гидроксильной группой в условиях дальнейшей структурной модификации 17-кетогруппы, которая необходима при построении прегнановой цепи. Такой подход помогает предотвратить возможные перегруппировки с участием третичной гидроксильной группы при C9 и, в частности, модификацию кольца А молекулы стероида [20]. Так, получение $\Delta^{9(11)}$ -АД из 9-ОН-АД было проведено на первой стадии в синтезах $\Delta^{9(11)}$ -прекурсоров 11 β -гидроксилированных кортикостероидов (например, гидрокортизона и преднизолон [21–23]), а также других ключевых интермедиатов коммерчески важных кортикостероидов, молекулярная структура которых содержит атом галогена в положении C9 α , например, дексаметазона, триамцинолона, бетаметазона и др. [24–27]. В синтезе андрогенного средства флюоксиместерона из 11 α -ОН-АД [28] последний также сначала превращали в $\Delta^{9(11)}$ -АД.

Следует отметить, что эффективность технологии микробного производства ключевых стероидных интермедиатов зависит не только от активности штамма, селективности процесса и ряда других факторов, но и, в не меньшей степени, от эффективности методов выделения и очистки целевого продукта.

Цель работы – создание эффективной комбинированной схемы получения $\Delta^{9(11)}$ -АД из соевого фитостерина, включающей биоконверсию фитостерина в 9-ОН-АД культурой *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D и региоселективную дегидратацию

9 α -гидроксильной группы молекулы 9-ОН-АД в органическом экстракте ферментационной жидкости без выделения и очистки его кристаллов.

МЕТОДИКА

Использованные реактивы. Соевый фитостерин (“Jiangsu Spring Fruit Biological Products Co.”, Китай) в соответствии с сертификатом производителя содержал: трансформируемые стеринны — 95.5%, в том числе (%): β -ситостерин — 42.4; кампестерин — 23.5; стигмастерин — 26.1; брассикастерин — 3.5.

9-ОН-АД (CAS No. 560-62-3, $C_{19}H_{26}O_3$, М.м. 302.41) 99.3%-ного содержания (ВЭЖХ, 1H -ЯМР) и 9 α -гидроксипрегн-4-ен-3-он-20-карбоновая кислота (синоним 9 α -гидроксипрегн-3-кето-23,24-биснорхол-4-ен-22-овая кислота, **9-ОН-БНК**) 95%-ного содержания были получены в лаборатории микробиологической трансформации органических соединений ИБФМ РАН (Россия). АД (CAS No. 63-05-8, $C_{19}H_{26}O_2$, М.м. 286.41), АДД (CAS No. 897-06-3, $C_{19}H_{24}O_2$, М.м. 284.39) и $\Delta^{9(11)}$ -АД (CAS 1035-69-4, $C_{19}H_{24}O_2$, М.м. 284.39) производства “Steraloids Inc.” (США) были использованы в качестве аналитических стандартов.

Агар, дрожжевой экстракт (тип Д) и органические растворители для ВЭЖХ (LC-MS или Supergradient grade) — “Panreac” (Испания), очищенная вода для ВЭЖХ “MilliQ ultrapure water” (“Merck Millipore KGaA”, Германия). Реагенты для стадии дегидратации были производства “Sigma-Aldrich Co.” (США). Органические растворители для экстракции стероидов, компоненты питательных сред и другие материалы — “Экос-1” (Россия). Для мониторинга процесса дегидратации и препаративной ТСХ были использованы пластинки Silica gel 60 F₂₅₄, (“Merck KGaA”, Германия).

Микроорганизм и условия его культивирования. Быстро растущий непатогенный штамм *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D (по современной классификации *Mycolicibacterium* sp.) был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ ИБФМ РАН). Культуру поддерживали на скошенном агаре, посевную культуру выращивали в качалочных колбах емкостью 750 мл на питательной среде с глицерином и дрожжевым экстрактом, как было описано ранее [14].

Биоконверсия фитостерина. Биотрансформацию фитостерина проводили аэробно на орбитальной качалке при 220 об./мин и температуре 30°C в качалочных колбах на 750 мл со 100 мл конверсионной среды следующего состава (г/л дистиллированной воды): KH_2PO_4 — 0.8; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 4.2; $(NH_4)_2SO_4$ — 3.0; глицерин — 5.0; карбамид — 0.13; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.2; $FeSO_4 \cdot$

$7H_2O$ — 0.01; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.002; твин-80 — 1.0; фитостерин — 5.0 (в расчете на сумму трансформируемых стериннов); pH 7.2.

По окончании стерилизации среды в автоклаве фитостерин гомогенизировали с помощью ультразвука (42 кГц, 100 Вт) в течение 2 мин. Биоконверсию начинали с внесения посевной культуры (10% по об.). Пробы культуральной жидкости (**КЖ**) отбирали каждые 12 ч, содержание 9-ОН-АД и фитостерина контролировали с помощью ВЭЖХ. Для препаративной дегидратации 9-ОН-АД биотрансформацию проводили в 10 колбах и останавливали после 60 ч инкубации, когда глубина конверсии фитостерина достигала ~80%, а селективность образования 9-ОН-АД ~55% (в расчете на конвертированный фитостерин).

Получение экстракта. После завершения биоконверсии из КЖ (~980 мл, pH 6.5–6.7), содержащей клетки микобактерий и остаточный субстрат, экстрагировали 9-ОН-АД толуолом трижды по 0.5 л. Экстракт, содержащий 9-ОН-АД, промывали дважды по 100 мл 5%-ного водного раствора $NaHCO_3$ для удаления 9-ОН-БНК и дистиллированной водой до pH 7.0. Затем экстракт, содержащий 1.59 г 9-ОН-АД по данным ВЭЖХ анализа, концентрировали в вакууме до объема ~300 мл и далее использовали в реакции дегидратации без выделения кристаллического продукта.

Дегидратация. Толуольный экстракт (~300 мл), содержащий 1.59 г (5.258 ммоль) 9-ОН-АД, помещали в колбу с насадкой Дина Старка и добавляли 0.57 мл 85%-ной H_3PO_4 из расчета ~1.6 моль на 1 моль 9-ОН-АД. Реакционную массу нагревали до кипения. Отгоняемую воду собирали в насадке. Реакция завершалась через 5 мин после начала кипения. Окончание реакции контролировали методом ТСХ. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли 5%-ный водный раствор $NaCl$ в количестве, равном 1/2 об. реакционной массы. Органическую фазу отделяли, а водный слой экстрагировали толуолом. Объединенную органическую фазу промывали 5%-ным водным раствором $NaCl$ до нейтральной реакции и водой, а затем сушили над Na_2SO_4 , растворитель упаривали в вакууме досуха. Содержание $\Delta^{9(11)}$ -АД и остаточного количества 9-ОН-АД в сухом остатке после упаривания (2.11 г) определяли с помощью ВЭЖХ анализа. Согласно ВЭЖХ анализу содержание $\Delta^{9(11)}$ -АД составляло 1.477 г (селективность 98.8%), при этом сухой остаток не содержал 9-ОН-АД.

Очистка $\Delta^{9(11)}$ -АД. Сухой остаток, полученный после упаривания растворителя (2.11 г) и содержащий $\Delta^{9(11)}$ -АД (70% основного вещества согласно ВЭЖХ или 1.477 г в 100% исчислении) растворяли в 80 мл ацетона, раствор осветляли акти-

вированным углем (10% от веса стероида), уголь отфильтровывали, промывали на фильтре ацетоном. Затем к фильтрату (84 мл) медленно добавляли 56 мл дистиллированной воды в объемном соотношении 3 : 2 (раствор-вода). Суспензию перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Осадок, содержащий стеринны и побочные продукты, отфильтровывали и промывали на фильтре 60%-ным водным (об./об.) ацетоном. Фильтрат упаривали в вакууме для удаления ацетона. Суспензию охлаждали до 8–10°C, осадок $\Delta^{9(11)}$ -АД отделяли фильтрацией и промывали дистиллированной водой. После сушки получали 1.457 г целевого продукта $\Delta^{9(11)}$ -АД в виде почти белого кристаллического порошка с температурой плавления ($T_{пл}$) 203.5–206.5°C ($T_{пл}$ 201–204.5°C [29]) и выходом 97.46%, при расчете на 9-ОН-АД.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3): выбранные сигналы, δ , м.д.: 5.75 (д, $J = 1.8$ Гц, 1H, 4-CH); 5.55 (м, 1H, 11-CH); 1.35 (с, 3H, 19-CH₃); 0.87 (с, 3H, 18-CH₃).

Спектр ЯМР ^{13}C (100.6 МГц, CDCl_3): δ , м.д.: 221.0 (17-C(O)); 199.0 (3-C(O)); 168.9 (5-C); 145.1 (9-C); 124.2 (4-CH); 118.1 (11-CH); 48.0; 45.8; 41.1 36.8; 36.2; 34.2; 33.8; 33.4; 32.6; 31.1; 26.2; 22.6; 13.9 (19-CH₃).

Содержание основного вещества ($\Delta^{9(11)}$ -АД) и примеси $\Delta^{8(9)}$ -изомера в продукте определяли с помощью ВЭЖХ анализа. Продукт содержал 97.38% $\Delta^{9(11)}$ -АД, 0.86% $\Delta^{8(9)}$ -АД и 0.69% АД.

Разделение смеси стериннов и побочных продуктов. Влажный осадок, полученный после фильтрации раствора $\Delta^{9(11)}$ -АД в 60%-ном водном ацетоне и содержащий стеринны и побочные продукты, сушили до постоянного веса. К сухому остатку (0.65 г) добавляли 10 мл метанола, суспензию кипятили в течение 10 мин при перемешивании, затем через холодильник медленно добавляли 3 мл воды и кипятили еще в течение 10 мин. Реакционную массу медленно охлаждали до комнатной температуры, выдерживали 30 мин без перемешивания, осадок отфильтровывали и промывали на фильтре водным метанолом в соотношении вода-метанол 10 : 3 (об./об.). Получили 0.49 г фитостерина (содержание трансформируемых стериннов 93.7% суммарно).

Метанольно-водный маточный раствор, содержащий побочные продукты, упаривали в вакууме. Остаток сушили до постоянного веса. Для разделения смеси использовали препаративную ТСХ. Для этого 151 мг сухого остатка растворяли в минимальном количестве смеси дихлорметана и метанола 1 : 1 (об./об.), наносили раствор на пластинку для ТСХ полосой на линии старта и хроматографировали восходящим методом в системе

бензол-ацетон 9 : 1 (об./об.). В УФ-свете определяли зоны, соответствующие индивидуальным соединениям. Положение зоны, соответствующей фитостерину, определяли, проявляя контрольную пластинку 1%-ным раствором ванилина в 10%-ном растворе HClO_4 . Для элюирования индивидуальных соединений использовали смесь дихлорметана и ацетона в соотношении 95 : 5 (об./об.). Элюаты упаривали досуха. При этом получали три мажорных продукта: метиловый эфир прегна-4,9(11)-диен-3-он-20-карбоновой кислоты (МЭ $\Delta^{9(11)}$ -БНК) – 117 мг, $R_f = 0.625$; смесь стериннов – 17 мг, $R_f = 0.5$; и $\Delta^{9(11)}$ -АД – 15 мг, $R_f = 0.41$. Кроме того, тестостерон (ТС) и $\Delta^{9(11)}$ -тестостерон ($\Delta^{9(11)}$ -ТС) были идентифицированы как минорные продукты с помощью ЯМР и ВЭЖХ анализа.

МЭ $\Delta^{9(11)}$ -БНК кристаллизовали в диэтиловом эфире. После фильтрации и сушки до постоянного веса получили 71 мг аналитически чистого образца в виде почти белого кристаллического порошка с $T_{пл}$ 196–198°C ($T_{пл}$ 194–200°C [30]). Масс-спектр: MALDI-TOF: m/z $[M + H]^+$ 357. Вычислено для $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_3$ (%): С 77.49, Н 9.05. Найдено (%): С 76.98%, Н 8.96.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3): выбранные сигналы, δ , м.д.: 5.73 (1H, д, J 1.4 Гц, H-4), 5.45 (1H, м, H-11), 3.64 (3H, с, OCH_3), 1.32 (3H, с, H-19), 1.18 (3H, д, J 6.8 Гц, H-21), 0.66 (3H, с, H-18).

Спектр ЯМР ^{13}C (100.6 МГц, CDCl_3): δ , м.д.: 199.2 (C-3), 177.1 (C-22), 169.8 (C-5), 144.6 (C-9), 123.9 (C-4), 118.7 (C-11), 52.8, 52.3, 51.3, 42.4, 41.5, 40.8, 37.3, 34.2, 33.7, 32.8, 32.1, 27.4, 26.1, 25.2, 16.7 (C-21), 11.6 (C-18).

Тонкослойная хроматография (ТСХ). Реакцию дегидратации контролировали с помощью ТСХ на пластинках Silica gel 60 F₂₅₄ в системе дихлорметан – ацетон (10 : 1, об./об.). Пластинку просматривали в УФ свете (254 нм), затем опрыскивали 1%-ным раствором ванилина в 10%-ном водном растворе HClO_4 и проявляли при температуре 100–120°C.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Анализ продуктов биотрансформации проводили на приборе Infinity 1260 (“Agilent”, США), снабженном предколонкой Symmetry C₁₈, 5 мкм, 3.9 мм × 20 мм и колонкой Symmetry C₁₈, 5 мкм, 4.6 мм × 250 мм (“Waters”, США), в следующих условиях: мобильная фаза (об./об.): ацетонитрил – 52, деионизированная вода – 48, уксусная кислота – 0.01; скорость потока 1 мл/мин; температура колонки 50°C. Стероиды детектировали при длине волны 240 нм, для количественного определения использовали метод внешнего стандарта. Содержание минорных

сигналов продуктов биотрансформации, для которых отсутствовали стандартные соединения — 9α -гидрокситестостерон (**9-ОН-ТС**) и $9\alpha,21$ -дигидрокси-20-метилпрегн-4-ен-3-он (синоним $9\alpha,22$ -дигидрокси-23,24-биснорхол-4-ен-3-он (**9,22-ОН-БНХ**) и др. вычисляли полуколичественно с использованием в качестве внешнего стандарта АД (99% АД, “Bayer HealthCare Pharmaceuticals”, Германия), имеющего 3-кето-4-ен-хромовую группу, как в большинстве известных продуктов окисления стероидов. Значение времени удерживания R_t для 9-ОН-АД составляло 4.27 мин.

Анализ фитостерина осуществляли методом ВЭЖХ в тех же условиях, но с использованием мобильной фазы (об./об.): ацетонитрил — 50, изопропанол — 45, деионизированная вода — 5. Детекцию проводили при длине волны 200 нм. Для количественного определения калибровку сигнала фитостерина строили на основе профиля субстрата биоконверсии без выделения индивидуальных пиков.

Для анализа пробы КЖ развели 50%-ным водным раствором ацетонитрила 1 : 50 (для анализа продуктов) или 1 : 20 смесью ацетонитрил — 50, изопропанол — 45 (об./об.) и отделяли осадок.

Анализ продуктов дегидратации проводили на том же оборудовании с использованием мобильной фазы (об./об.): ацетонитрил — 40, деионизированная вода — 60, уксусная кислота — 0.01. Стероиды детектировали при длине волны 250 нм. Элюировали со скоростью потока 1 мл/мин при температуре 50°C.

Значения R_t составляли (мин): 9-ОН-АД — 6.62; $\Delta^{9(11)}$ -АД — 16.55; $\Delta^{9(11)}$ -АД — 17.27; АД — 18.4.

ЯМР-спектроскопия. Спектры ЯМР ^1H и ЯМР ^{13}C регистрировали на спектрометре “Bruker Avance 400” (“Bruker”, США) с рабочими частотами 400 МГц для ЯМР ^1H и 100.6 МГц для ЯМР ^{13}C (с полной развязкой протонов). Химические сдвиги измеряли в м.д. относительно сигналов растворителя в качестве внутреннего стандарта (CDCl_3 , $\delta^1\text{H}$: 7.26 м.д., ^{13}C : 77.1 м.д.) и относительно тетраметилсилана (**ТМС**), константы спин-спинового взаимодействия (J) приведены в Гц.

Масс-спектрометрия высокого разрешения. Спектры высокого разрешения регистрировали на Bruker micrOTOF II с электрораспылительной ионизацией, на положительных ионах (4500 V) со шприцевым вводом вещества. Для регистрации спектров использовали фракции ВЭЖХ, собранные из нескольких вводов образцов.

Масс-спектры MALDI-TOF регистрировались на приборе Bruker Daltonics UltraFlex (“Bruker”, США).

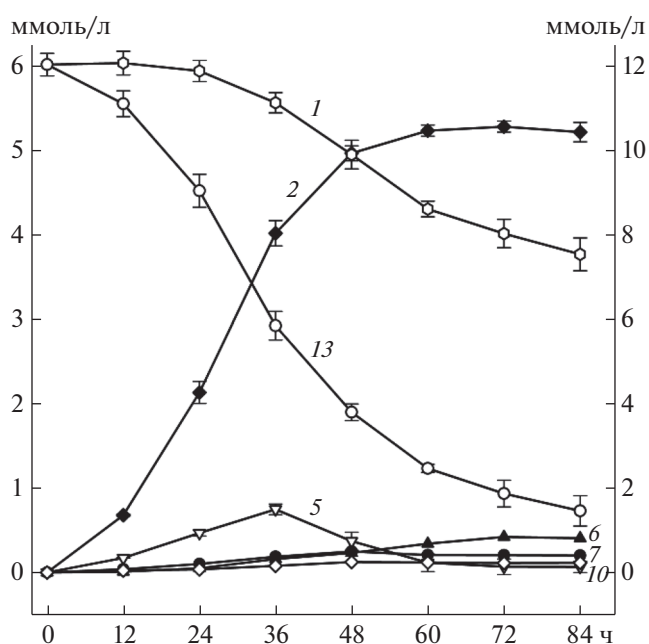


Рис. 2. Профиль биоконверсии фитостерина (5 г/л) растущей культурой *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D. 1 — фитостерин, 13 — суммарное содержание всех 3-кето- Δ^4 -стероидов и фитостерина (ось справа); 2 — 9-ОН-АД, 5 — 9-ОН-БНХ, 6 — 9-ОН-ТС, 7 — 9-ОН-БНХ, 10 — МЭ 9-ОН-БНХ (ось слева). Указаны величины стандартных ошибок, рассчитанные на основании данных трех независимых экспериментов биотрансформации.

Элементный анализ проведен с использованием прибора Elementar Vario MICRO cube (“Elementar Analysensysteme GmbH”, Германия).

Температуры плавления выделенных соединений были определены на приборе Melting Point M-565 (“Büchi Labor Technik AG”, Швейцария).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовали сапротрофный штамм *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D дикого типа для получения $\Delta^{9(11)}$ -АД из соевого фитостерина комбинированным химико-биотехнологическим методом.

Схема синтеза $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) из фитостерина (1) через 9-ОН-АД (2) изображена на рис. 1.

На первом этапе была проведена биотрансформация фитостерина (1) с нагрузкой 5 г/л в водной среде с образованием 9-ОН-АД (2) в качестве основного продукта. Накопление продукта происходило быстро в период от 12 до 48 ч, а затем биоконверсия значительно замедлялась (рис. 2).

После 36-часовой инкубации накопление 9-ОН-АД (2) происходило с меньшей скоростью,

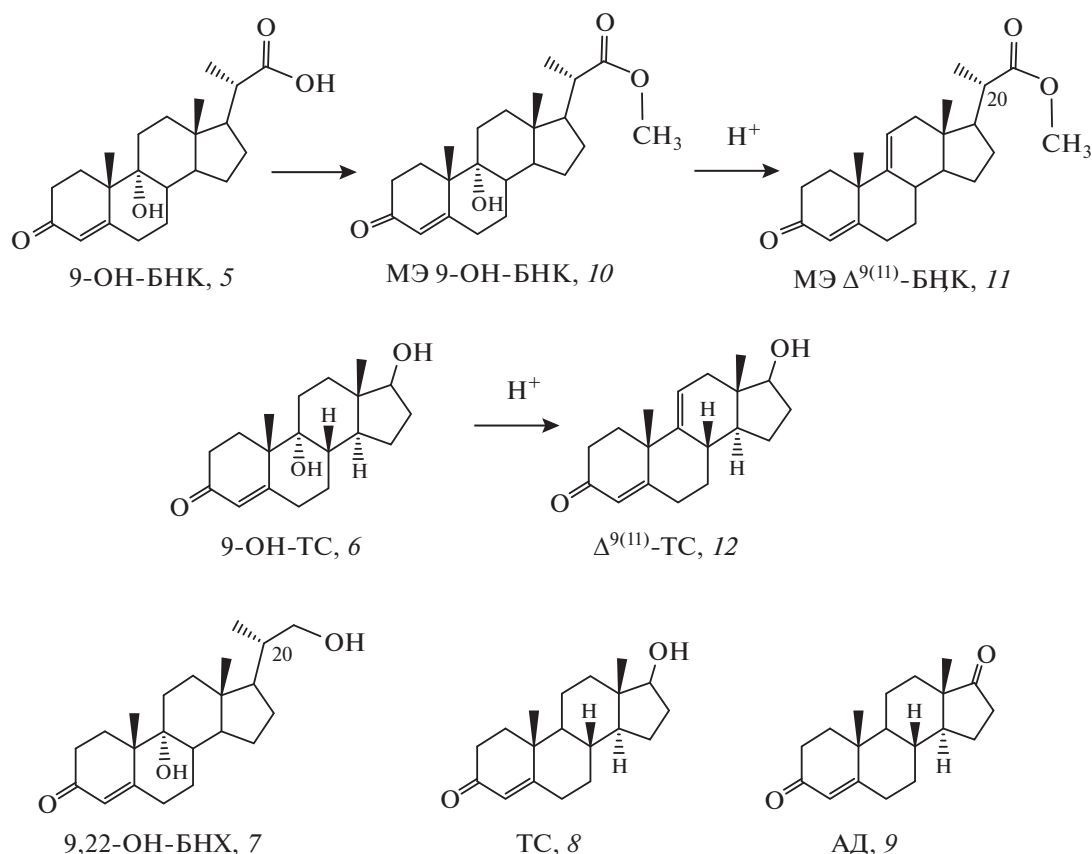


Рис. 3. Основные побочные продукты биоконверсии фитостерина в 9-ОН-АД (5–10) и реакции дегидратации (11 и 12).

а после 72 ч — прекращалось. При инкубации до 144 ч глубина конверсии фитостерина достигала 99–100%. Однако при этом селективность накопления 9-ОН-АД (2) снижалась. Вероятно, последнее является результатом частичной деструкции стероидного скелета продукта, которая имела место одновременно с образованием 9-ОН-АД (2) и происходила вследствие активности стероид-1-дегидрогеназы (*St1DH*) [31]. Для препаративного получения $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) после 60 ч прерывали культивирование в фазе замедления роста, когда глубина превращения фитостерина (1) достигала ~80%. При этом большая часть желаемого продукта 9-ОН-АД (2) была растворена (или солюбилизирована) в жидкой фазе (~97% от общего количества).

Таким образом, селективность процесса оценивалась как 54 ± 0.5 мол. % в расчете на конвертированный фитостерин, а молярный выход 9-ОН-АД составил 43.4%, при расчете на сумму трансформируемых стеринов, содержащихся в исходном субстрате. Структуры побочных продуктов биоконверсии, накапливающихся при биотрансформации в заметных количествах, показаны на

рис. 3. Это — 9-ОН-БНК (5, 5.6–7.7%), 9-ОН-ТС (6, 2.7–3.5%) и 9,22-ОН-БНХ (7, 6.0–6.2%).

Следует отметить, что способность микобактерий накапливать С22-спирты и соответствующие С-22 кислоты была подтверждена ранее в ряде работ по изучению трансформации стеринных штаммами рода *Mycobacterium* [32].

Стероиды экстрагировали из КЖ толуолом. Выбирая растворитель для экстракции, руководствовались требованиями последующего процесса дегидратации. Использовали толуол, образующий азеотропную смесь с водой (20.2% воды, $T_{\text{кип}} - 85^\circ\text{C}$). Стадию дегидратации проводили без выделения 9-ОН-АД (2) из упаренного в вакууме толуольного экстракта с использованием 85%-ной H_3PO_4 в качестве дегидратирующего агента.

Ранее [29] было показано, что проведение реакции в среде апротонного органического растворителя с 85%-ной H_3PO_4 при температуре кипения приводит к регионаправленной дегидратации. При этом оптимальным растворителем является толуол, продолжительность процесса в котором минимальна и не превышала 30 мин, се-

лективность образования при этом $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) достигала 98–99%, а содержание побочного андроста-4,8(9)-диен-3,17-диона ($\Delta^{8(9)}$ -АД, 4) в продукте составляла менее 1%. Следует отметить, что изомерные $\Delta^{9(11)}$ -и $\Delta^{8(9)}$ -олефины имеют одинаковое значение R_f на ТСХ и не могут быть разделены кристаллизацией. Количество примеси $\Delta^{8(9)}$ -изомера (4) может быть детектировано спектроскопически (^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР) [33, 34] или хроматографическими методами – ВЭЖХ [33, 34], ГЖХ [35].

Возможность количественной изомеризации нежелательной примеси побочного продукта $\Delta^{8(9)}$ -АД (4) в $\Delta^{9(11)}$ -АД (3), позволяющей повысить выход целевого соединения, была показана ранее [29]. Было обнаружено, что проведение реакции изомеризации 8,9-двойной связи в 9,11-двойную связь возможно в среде ароматического углеводорода под действием каталитического количества сильной кислоты, при этом процесс полностью завершался за 48 ч. Следует отметить, что согласно нашим наблюдениям пролонгация процесса дегидратации в толуоле с H_3PO_4 с 30 мин до 48 ч с целью проведения процесса изомеризации примеси $\Delta^{8(9)}$ -АД (4) в $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) уменьшала содержание примеси $\Delta^{8(9)}$ -олефина с 1.0% практически до 0%. Однако при этом происходило осмоление реакционной массы, и содержание целевого продукта 3 снижалось до 90%.

В связи с этим в работе проводили интенсификацию процесса дегидратации в среде толуола с использованием метода азеотропной отгонки для удаления воды во время реакции. В качестве дегидратирующего агента использовали 85%-ную H_3PO_4 . Реакция дегидратации проходила со 100% конверсией 9-ОН-АД (2) в течение 5 мин кипячения реакционной массы и селективностью до 99%. На основании полученных результатов было сделано заключение, что реакция с азеотропным удалением воды протекает значительно быстрее, не оказывая при этом влияния на выход и качество $\Delta^{9(11)}$ -АД (3).

В общем случае, обработка органическим растворителем ферментационной суспензии позволяла извлекать все стероидные соединения, включая стерины и продукты неполного окисления боковой цепи. Экстракция стероидов толуолом обеспечивала полное извлечение как основного и побочных стероидных продуктов, так и нетрансформированного субстрата. В то же время в этих условиях 9-ОН-БНК (5) частично в виде соли оставалась в водной фазе. Промывка толуольного экстракта 5%-ным водным раствором гидрокарбоната натрия обеспечивала полный возврат 9-ОН-БНК (5) в водную фазу, из которой после подкисления до pH 2.5–3.0 она далее была экс-

трагирована. Подобный подход для эффективного отделения побочной 9-гидрокси-С20-кислоты (5) был предложен ранее в работе [36].

Для отделения стеринов от 3,17-дикетоандростанов обычно используют хорошо известные способы. Это колоночная хроматография, селективная кристаллизация, использование адсорбционных материалов, селективно сорбирующих С19 стероиды. Метод селективного разделения стеринов и С19-стероидов из их смесей путем кристаллизации из 60–70% водного ацетона был описан ранее для биотехнологического процесса получения АД (9) из стеринов [37]. Однако метод селективной кристаллизации ранее не использовался для разделения смеси, содержащей $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) и стерины. Сухой остаток после упаривания растворителя, полученный, как описано в разделе Методы (см. Дегидратация), содержащий $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) и различные примеси, включая нетрансформированные стерины, кристаллизовали из водного ацетона в условиях, описанных ранее [37]. Нетрансформированные стерины и примеси осаждали из раствора продукта в ацетоне, медленно добавляя воду до тех пор, пока концентрация ацетона в водной среде не достигала 60%. Образованный осадок отфильтровывали. Таким образом, в водно-ацетоновом фильтрате отсутствовали стерины, а в осадке содержалось незначительное количество С19-стероидов. Для отделения фитостерина (1) из осадка использовали метод кондиционирования стеринов, разработанный ранее [7], без применения щелочи. Следует отметить, что нетрансформированный фитостерин может быть использован повторно.

Очевидно, что побочные соединения, образовавшиеся на стадии биоконверсии и имеющие в своей структуре 9 α -гидроксильную группу, будут подвергаться дегидратации с образованием 9(11)-двойной связи. Разделение стеринов и побочных продуктов, содержащих 9(11)-двойную связь, проводили методом препаративной ТСХ стерин-содержащего осадка после отделения водно-ацетонового раствора $\Delta^{9(11)}$ -АД (3). Одним из продуктов дегидратации, выделенных из осадка, был метиловый эфир 3-кето-23,24-биснорхола-4,9(11)-диен-22-овой кислоты (МЭ $\Delta^{9(11)}$ -БНК, 11), образованный из метилового эфира 9-ОН-БНК (МЭ 9-ОН-БНК, 10). Брутто-формулу МЭ 9-ОН-БНК подтверждали методом масс-спектрометрии высокого разрешения: $m/z = 397.23493$ (рассчитано для $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{Na}^+$); $m/z = 397.23535$ (получено для $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{Na}^+$, отклонение м.д. 1.055).

Образование соединения 10 как минорного продукта биотрансформации фитостерина штаммом *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D было обнаружено впервые. Его образование в процессе

трансформации стерина в 9-ОН-АД (2) штаммом *Mycobacterium roseum* было установлено ранее [38]. Об образовании 9-гидроксилированных продуктов неполного расщепления боковой цепи, включая соединение 10, в процессе микробиологической конверсии β -ситостерина культурой рода *Mycobacterium*, было сообщено Амбрус с соавт. [39].

Известно, что ферментативное *O*-метилирование гидроксильных и карбоксильных групп молекул органических соединений, приводящее к увеличению их гидрофобности, происходит в различных живых организмах, включая бактерии, грибы, растения и млекопитающих, с целью регулирования различных функциональных процессов их жизнеобеспечения. Ферментативное *O*-метилирование карбоксильной группы продуктов деградации боковой цепи стерина характерно также для представителей рода *Mycobacterium*. Ферментативное *O*-метилирование катализируется *O*-метилтрансферазами [ЕС 2.1.1.6.x] и включает перенос метильной группы *S*-аденозил-L-метионина (AdoMet) на гидроксильную группу молекулы акцептора с образованием его метилового эфира и *S*-аденозил-L-гомоцистеина в качестве продуктов [40]. Таким образом, образование метилового эфира 10, характерное для стерин-трансформирующих штаммов микобактерий, происходит, по-видимому, так же под действием *O*-метилтрансферазы, использующей в качестве донора метильной группы *S*-аденозил-L-метионин [41, 42].

В выделенной смеси стерина по данным ^1H -ЯМР спектра отсутствовали сигналы, соответствующие протонам при 22(23)-двойной связи боковой цепи. Это свидетельствовало о том, что, по-видимому, стерин с $\Delta^{22(23)}$ -связью (стигмастерин и брассикастерин) конвертировались в первую очередь. Кроме того, с помощью ВЭЖХ анализа были идентифицированы тестостерон (ТС, 8) и $\Delta^{9(11)}$ -тестостерон ($\Delta^{9(11)}$ -ТС, 12).

Таким образом, наличие метилового эфира прегна-4,9(11)-диен-3-он-20-карбоновой кислоты (11) как мажорной примеси среди побочных продуктов дегидратации свидетельствовало о способности штамма *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D не только трансформировать стерин с образованием 9 α -гидроксипрегн-4-ен-3-он-20-карбоновой кислоты (5), но и метилировать гидроксильную группу кислотного фрагмента с образованием метилового эфира (10).

Аналогичный результат трансформации стерина был ранее описан в работе [43]. Авторы сообщили, что мутантный штамм *M. fortuitum* NRRL В-8119, у которого была блокирована способность деградировать систему стероидных колец, эффективно конвертировал β -ситостерин в

9-ОН-АД (2) с образованием небольших количеств 9-ОН-ТС (6); 9,22-ОН-БНХ (7), 9-ОН-БНК (10) и соответствующего метилового эфира 11.

Соединения 10 и 11 могут представлять интерес для изучения их биологической активности. Кроме того, соединение 11 может быть использовано как исходный субстрат для перехода, например, к 11-гидроксилированным, 9-галоидированным и другим 9,11-замещенным производным, а соединение 10 — в синтезе дезоксихоловой кислоты [44] и новых производных брассиностероидов [45].

Известные методы получения $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) предусматривают использование в реакции дегидратации кристаллического 9-ОН-АД (2). В работе показана возможность объединения двух стадий синтеза $\Delta^{9(11)}$ -АД (3) из фитостерина (1): стадии микробиологической трансформации фитостерина с образованием 9-ОН-АД (2) и химической стадии дегидратации 9-ОН-АД (2), которая может быть проведена без выделения промежуточного соединения 9-ОН-АД (2) из экстракта культуральной среды.

Такой подход позволяет исключить потери 9-ОН-АД при его выделении в кристаллическом виде. Показано, что реакцию дегидратации в среде органического растворителя можно проводить с минимальным количеством дегидратирующего агента (1.6 моль на 1 моль 9-ОН-АД) и интенсифицировать процесс, удаляя воду путем азеотропной отгонки без ущерба для селективности превращения. При этом достигается высокая региоселективность реакции дегидратации. продемонстрирована возможность очистки $\Delta^{9(11)}$ -АД от остаточного стерина и продуктов неполной деградации его боковой цепи путем селективной кристаллизации из водного ацетона. Кроме того, впервые выявлена способность природного штамма *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D трансформировать стерин с образованием метилового эфира 9 α -гидроксипрегн-4-ен-3-он-20-карбоновой кислоты (10). Таким образом, штамм *Mycobacterium* sp. ВКМ Ас-1817D может быть использован для получения новых штаммов, способных к накоплению соединений 5 и 10 в качестве основных продуктов катаболизма стерина.

Разработанный метод получения $\Delta^{9(11)}$ -АД комбинацией микробиологического окисления фитостерина и химической дегидратации без выделения кристаллического 9-ОН-АД может быть также использован в биотехнологических процессах с применением других штаммов микобактерий, трансформирующих фитостерин в 9-ОН-АД. Метод позволяет упростить технологическую схему получения $\Delta^{9(11)}$ -АД и не только исключить потери 9-ОН-АД, но и минимизировать количе-

ство производственных отходов, что позволит усовершенствовать процесс без потери его эффективности.

Работа выполнена при частичной поддержке грантом Российского научного фонда (№ 14-24-00169).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Савинова Т.С., Лукашев Н.В., Хомутов С.М., Довбня Д.В., Донов М.В. // Масла и жиры. 2014. Т. 3. № 155. С. 14–15.
<http://www.oilbranch.com/publ/view/424.html>
2. Al Jasem Y., Khan M., Taha A., Thiemann T. // Med. J. Chem. 2014. V. 3. № 2. P. 796–830
3. Szentirmai A. // J. Ind. Microbiol. 1990. V. 6. № 2. P. 101–115.
4. Войшвилло Н.Е., Андриюшина В.А., Савинова Т.С., Стыценко Т.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 5. С. 536–543.
5. Wang F.-Q., Yao K. and Wei D.-Z. From Soybean Phytosterols to Steroid Hormones. In Soybean and Health. / Ed. H. El-Shemy. InTechOpen, 2011. P. 231–252.
6. Datcheva V.K., Voishvillo N.E., Kamernitskii A.V., Vlahov R.J., Reshetova I.G. // Steroids. 1989. V. 54. № 3. P. 271–286.
7. Савинова Т.С., Диеп Н.Т., Войшвилло Н.Е., Андриюшина В.А., Карпова Н.Е., Белецкая И.П., Нуу Л.Д. // Хим.-фарм. журн. 2012. Т. 46. № 3. С. 40–43.
8. Donova M.V., Egorova O.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 94. P. 1423–1447.
9. Zhang X., Zhu M., Han R., Zhao Y., Chen K., Qian K., Shao M., Yang T., Xu M., Xu J., Rao Z. // Molecules. 2019. V. 24. Article 2534.
10. Van der Geize R., Hessels G.I., Dijkhuizen L. // Microbiology. 2002. V. 148. P. 3285–3292.
11. Donova M.V. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. V. 43. № 1. P. 5–18.
12. Андриюшина В.А., Родина Н.В., Стыценко Т.С., Нуу Л.Д., Дружинина А.В., Ядерец В.В., Войшвилло Н.Е. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 3. С. 297–301.
13. Seidel L., Hörhold C. // J. Basic Microbiol. 1992. V. 32. № 1. P. 49–55.
14. Donova M.V., Gulevskaya S.A., Dovbnya D.V., Puntus I.F. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 67. P. 671–678.
15. Donova M.V., Dovbnya D.V., Koshcheyenko K.A. Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins., March 31–April 2, 1996, Budapest, Hungary. / Ed. J. Szejtli, L. Sente 1997. P. 527–530.
16. Donova M.V., Dovbnya D.V., Sukhodolskaya G.V., Khomutov S.M., Nikolayeva V.M., Kwon I., Han K. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2005. V. 80. № 1. P. 55–60.
17. Bragin E.Y., Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Dovbnya D.V., and Donova M.V. // BMC Biotechnology. 2019. V. 19. № 1. P. 1–16.
18. Bragin E.Y., Shtratnikova V.Y., Dovbnya D.V., Schelkunov M.I., Pekov Y.A., Malakho S.G., Egorova O.V., Ivashina T.V., Sokolov S.L., Ashapkin V.V., Donova M.V. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2013. V. 138. P. 41–53.
19. Shtratnikova V.Y., Schelkunov M.I., Dovbnya D.V., Pekov Y.A., Bragin E.Y., Ashapkin V.V., Donova M.V. // Genome Announc. 2015. V. 3. № 1. e01447–14.
20. Chinn L., Dodson R. // J. Org. Chem. 1959. V. 24. № 6. P. 879–879.
21. VanRheenen V., Shephard K.P. // J. Org. Chem. 1979. V. 44. № 9. P. 1582–1584.
22. Reid J.G., Debiak-Krook T. // Tetrahedron Lett. 1990. V. 31. № 26. P. 3669–3672.
23. Huy L.D., Diep N.T., Chang-Hee L., Hung N.D. // Vietnam J. Chem. 2014. V. 52. № 2.
24. Turuta A.M., Kamernitsky A.V., Fadeeva T.M., Huy L.D. // Mendeleev Commun. 1992. V. 2. № 2. P. 47–48.
25. Huy L.D., Diep N.T., Nhung L.T.K. // Pharm. Chem. J. 2014. V. 48. № 3. P. 220–223.
26. Патент РФ. 2014. № 2532902
27. Wang W., Ge F., Ma C., Li J., Ren Y., Li W., Fu J. // 3 Biotech. 2017. V. 7. P. 19.
28. Патент КНР. 2011. № 102040639
29. Савинова Т.С., Казанцев А.В., Нуу Л.Д., Лукашев Н.В. // Хим.-фарм. журн. 2017. Т. 51. № 7. С. 50–53.
30. Патент Венгрии. 1990. № 200203
31. Sukhodolskaya G.V., Nikolayeva V.M., Khomutov S.M., Donova M.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 74. P. 867–873.
32. Galán B., Uhía I., García-Fernández E., Martínez I., Bahillo E., de la Fuente J.L., Barredo J.L., Fernández-Cabezón L., García J.L. // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. P. 138–50.
33. Европейский патент. 1988. № 0253415.
34. Европейский патент. 1988. № 0294911.
35. Патент США. 1978. № 4102907.
36. Патент США. 1977. № 4029549.
37. Патент РФ. 1999. № 2126837.
38. Патент Германии. 1988. № 3739017.
39. Патент США. 1992. № 5112815.
40. Ibrahim R.K., Bruneau A., Bantignies B. // Plant Mol. Biol. 1998. V. 36. P. 1–10.
41. Li X., Chen X., Wang Y., Yao P., Zhang R., Feng J., Wu Q., Zhu D., Ma Y. // Steroids. 2018. V. 132. P. 40–45
42. Roje S. // Phytochemistry. 2006. V. 67. № 15. P. 1686–1698.
43. Wovcha M.G., Antosz F.J., Knight J.C., Kominek L.A., Pyke T.R. // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 531. P. 308–321.
44. Европейский патент. 2019. № 3464315.
45. Antonchick A.P., Schneider B., Zhabinskii V.N., Khripach V.A. // Steroids. 2004. V. 69. № 10. P. 617–628.

Conversion of Soybean Phytosterol into Androsta-4,9(11)-Diene-3,17-Dione

T. S. Savinova^{a,*}, D. V. Dovbnya^b, S. M. Khomutov^b, A. V. Kazantsev^a, L. D. Huy^c,
N. V. Lukashev^a, and M. V. Donova^b

^a*Lomonosov Moscow State University, Chemical Department, Moscow, 119991 Russia*

^b*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino,
Moscow Region, 142290 Russia*

^c*Vietnamese Academy of Science and Technology, Institute of Chemistry, Hanoi, A18, Vietnam*

*e-mail: tatiana_savinova@rambler.ru

In this work, we propose a method for producing androsta-9(11)-diene-3,17-dione ($\Delta^{9(11)}$ -AD), which is an environmentally attractive combination of microbial oxidation of the side chain of phytosterol with simultaneous 9 α -hydroxylation and subsequent chemical regioselective dehydration of 9 α -hydroxy-3,17-diketo-intermediate without isolation and purification. Phytosterol was converted into 9 α -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione (9-OH-AD) using the strain *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1817D wild type. The product was extracted from the culture medium with an organic solvent, and dehydrated in the extract with mineral acid. The resulting $\Delta^{9(11)}$ -AD was purified using the selective crystallization method. Minor products were isolated and identified. The ability of the strain to transform sterols with the formation of 9 α -hydroxy-pregn-4-en-3-one-20-carboxylic acid methyl ester is shown. Our approach allows us to simplify the flow chart for obtaining the target compound and not only eliminate the loss of 9-OH-AD, but also minimize the amount of production waste.

Keywords: phytosterol, bioconversion, *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1817D, 9 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione, androsta-4,9 (11)-diene-3,17-dione, dehydration, pregna-4,9 (11)-diene-3-one-20-carboxylic acid methyl ester

УДК 577.13:581.1

УЧАСТИЕ СЕРОВОДОРОДА В ИНДУЦИРОВАНИИ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ И ИХ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ

© 2020 г. Ю. В. Карпец¹, М. А. Шкляревский¹, Е. И. Горелова¹, Ю. Е. Колупаев¹, *

¹Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков, 62483 Украина

*e-mail: plant.biology.knau@gmail.com

Поступила в редакцию 14.01.2020 г.

После доработки 12.02.2020 г.

Принята к публикации 25.02.2020 г.

Исследовали возможную роль сероводорода как сигнального посредника при индуцировании теплоустойчивости проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) салициловой кислотой (СК). Обработка проростков 1 и 10 мкМ СК или 0.1 и 0.25 мМ донором сероводорода (NaHS) вызывала повышение их устойчивости к повреждающему прогреву (10 мин при 45°C). При этом под влиянием СК происходило транзитное увеличение содержания сероводорода в корнях с максимальным эффектом через 2–3 ч после начала обработки. Обработка корней СК вызывала повышение в них активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и гваяколпероксидазы. Под влиянием донора сероводорода NaHS существенно повышалась активность СОД и каталазы. Также обработка корней проростков СК и NaHS уменьшала вызываемое прогревом накопление продуктов перекисного окисления липидов. Ингибиторы синтеза сероводорода гидроксилламин и пируват калия частично устраняли вызываемые СК эффекты повышения активности антиоксидантных ферментов и развития теплоустойчивости проростков. В то же время комбинированная обработка 10 мкМ СК и 0.1 мМ NaHS способствовала дополнительному увеличению активности антиоксидантных ферментов и повышению выживаемости проростков после прогрева. Сделано заключение об участии сероводорода как одного из посредников в реализации протекторного влияния СК на проростки пшеницы при тепловом стрессе.

Ключевые слова: салициловая кислота, сероводород, сигнальные посредники, антиоксидантные ферменты, теплоустойчивость, *Triticum aestivum* L.

DOI: 10.31857/S0555109920040078

Сероводород (H_2S) является одним из газотрансмиттеров, участвующих в регуляции многих функций растительного организма, в первую очередь, адаптации к действию стресс-факторов [1, 2]. Показаны эффекты увеличения его содержания в клетках растений в ответ на действие гипо- и гипертермии, засухи и других стрессоров [3–5]. Имеются также сведения о повышении устойчивости растений к неблагоприятным абиотическим факторам различной природы под влиянием обработки донорами H_2S [6–8].

В реализации стресс-протекторного действия H_2S принимают участие другие компоненты сигнальной сети, в частности, ионы кальция, активные формы кислорода (АФК) и оксид азота (NO) [1, 4, 9]. В свою очередь получены экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что H_2S может выступать в роли посредника при передаче сигналов других мессенджеров [4, 10–12] в клетках растений.

В последние годы появляются сведения об участии H_2S в трансдукции сигналов фитогормонов. Так, показано, что стресс-протекторное влияние абсцизовой кислоты на растения арабидопсиса при засухе реализуется с участием сероводорода [13]. Индуцирование метилжасмонатом устойчивости растений проса к токсическому действию кадмия зависело от синтеза H_2S и угнеталось ингибитором L-цистеиндесульфгидразы [14].

Одним из фитогормонов, задействованных в формировании устойчивости растений к стрессорам различной природы, является салициловая кислота (СК) [15]. В многочисленных работах показана возможность индуцирования устойчивости растений к стрессовым температурам [16, 17], обезвоживанию [18] и засолению [19] под действием экзогенной СК. Установлена роль как сигнальных посредников (в частности, АФК и NO) [16, 20], так и гормонального комплекса в целом [21] в реализации ее стресс-протекторных эффектов. Однако на участие H_2S как посредника

физиологического действия СК указывают лишь единичные экспериментальные данные, полученные на проростках кукурузы. В работе [22] установлено, что индуцирование их теплоустойчивости экзогенной СК сопровождалось повышением содержания сероводорода в побегах. С использованием проростков кукурузы также показан синергический эффект активации антиоксидантной системы при совместном действии СК и донора сероводорода гидросульфида натрия (NaHS) [23]. В то же время связь между состоянием антиоксидантной системы и изменением эндогенного содержания H_2S при действии на растения СК специально не исследовалась. Не изученной оставалась и возможная роль сероводорода в стресс-протекторном действии СК на корни растений, которые отличаются от других органов большей "реактивностью" редокс-гомеостаза при внешних воздействиях [24] и повышенной чувствительностью к тепловому стрессу по сравнению с надземной частью растений [25]. Получение таких сведений представляет интерес для практического использования доноров сигнальных молекул для усиления физиологических эффектов фитогормонов.

Цель работы — изучение возможного участия эндогенного H_2S в индуцировании СК антиоксидантной системы корней проростков пшеницы и развитии их теплоустойчивости.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили 4-суточные (на момент начала эксперимента) проростки озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала. Семена после обеззараживания 6%-ным пероксидом водорода в течение 30 мин проращивали при 20°C на очищенной водопроводной воде. Затем проростки соответствующих вариантов переносили на растворы с СК в концентрации от 0.1 до 50 мкМ, NaHS (0.025–1.000 мМ), либо смесь 10 мкМ СК и 0.1 мМ NaHS и инкубировали 24 ч (поступление через корни). Корневую систему проростков отдельных вариантов инкубировали в течение 26 ч на растворах антагонистов H_2S (ингибиторов L-цистеиндисульфидразы [22]) 0.3 мМ гидроксиламина или 0.3 мМ пирувата калия. В вариантах с комбинированным действием на корни СК и этих соединений последние вносили в среду инкубации за 2 ч до добавления в нее СК. Концентрации гидроксиламина и пирувата калия, в наибольшей степени модифицирующие изучаемые эффекты СК, но не оказывающие на проростки видимого токсического влияния, были выбраны на основании предварительных опытов (результаты не приведены).

По окончании инкубации проростки подвергали повреждающему прогреву в водяном ультра-термостате при 45°C в течение 10 мин. После про-

грева проростки всех вариантов переносили на очищенную водопроводную воду. Часть из них инкубировали на свету (6000 лк, фотопериод 12 ч света/12 ч темноты) в течение 3 сут и определяли их выживаемость.

Содержание H_2S в корнях проростков определяли в динамике в течение 24 ч инкубации в растворе СК. Активность антиоксидантных ферментов в корнях анализировали по окончании 24–26-часовой инкубации в растворах исследуемых соединений и через 2 ч после повреждающего прогрева, содержание продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) малонового диальдегида (МДА) — через 24 ч после прогрева. Как было установлено в предварительных опытах, именно через такие временные интервалы проявлялись наибольшие различия изучаемых показателей между вариантами.

Содержание H_2S в корнях определяли по реакции с 5,5'-дителиобис-2-нитробензойной кислотой (ДТНБК) [26]. Для этого корни гомогенизировали при температуре $\approx 0^\circ\text{C}$ и полном погружении в реакционную смесь, содержащую 0.4 мМ ДТНБК, 0.15 М К, Na-фосфатный буфер, pH 7.0, и 10 мМ ЭДТА. Гомогенат центрифугировали на холоде при 10000 g в течение 15 мин на центрифуге MPW 350R ("MedInstruments", Польша). Оптическую плотность супернатанта определяли при 412 нм на спектрофотометре СФ-46 ("ЛОМО", Россия). В качестве стандарта использовали растворы NaHS.

Активность антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1), каталазы (КФ 1.11.1.6) и гваяколпероксидазы (КФ 1.11.1.7) определяли по методикам, описанным ранее [8, 16]. Корни гомогенизировали в 0.15 М К, Na-фосфатном буфере, pH 7.6, содержащем 0.1 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреитол на холоде. Для анализа использовали супернатант, полученный после центрифугирования гомогената при 8000 g в течение 10 мин при температуре не выше 4°C. Активность СОД определяли методом, основанным на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анион-радикалы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия НАДН и феназинметосульфата. Активность каталазы оценивали по количеству пероксида водорода, разложившегося за единицу времени. Активность гваяколпероксидазы определяли, используя в качестве донора водорода гваякол, а в качестве субстрата — пероксид водорода. Активность СОД и гваяколпероксидазы выражали в усл. ед./г сырой массы $\times$ мин), активность каталазы — в ммоль H_2O_2 /г сырой массы $\times$ мин).

Для определения продуктов ПОЛ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (преимущественно МДА), растительный материал гомогенизировали в реакционной среде, содержащей 0.25%-ную 2-тиобарбитуровую кислоту в 10%-ной

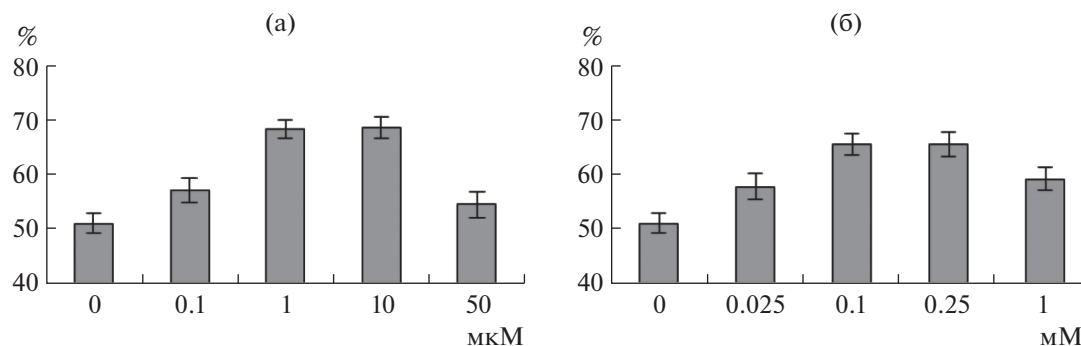


Рис. 1. Влияние СК (а) и NaHS (б) на теплоустойчивость проростков пшеницы (% выживших после 10 мин прогрева при 46°C).

ТХУ, гомогенат помещали на кипящую водяную баню на 30 мин. Затем пробы резко охлаждали и центрифугировали 15 мин при 10000 g. В супернатанте определяли продукты ПОЛ, реагирующие с 2-тиобарбитуровой кислотой (в основном МДА), измеряя оптическую плотность при длинах волн 532 нм (максимум светопоглощения МДА) и 600 нм (для поправки на неспецифическое светопоглощение) [27]. Содержание МДА выражали в нмоль/г сырой массы.

Опыты проводили в 3–4 кратной биологической повторяемости и каждый опыт воспроизводили независимо 3 раза. На рисунках приведены средние величины и их стандартные ошибки. Кроме отдельно оговоренных случаев обсуждались различия, достоверные при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Инкубация проростков в течение 1 сут на среде с добавлением СК вызвала повышение их устойчивости к повреждающему прогреву (рис. 1а). Наиболее заметный эффект проявлялся при использовании 1 и 10 мкМ СК.

Обработка проростков растворами донора сероводорода, NaHS, также способствовала повышению их теплоустойчивости (рис. 1б). Наибольшее защитное действие отмечали при использовании растворов 0.1 и 0.25 мМ NaHS.

При инкубации корней проростков пшеницы в растворе с добавлением 10 мкМ СК в них происходило транзитное увеличение содержания H_2S (рис. 2). Тенденция к такому эффекту проявлялась уже через 1 ч инкубации, а через 2–3 ч отмечалось максимальное (приблизительно на 45%) повышение содержания H_2S в корнях, которое затем уменьшалось. К 24 ч наблюдений содержание H_2S в корнях проростков, обработанных СК, снижалось до уровня контроля (рис. 2).

Таким образом, временное повышение содержания H_2S в корнях проростков пшеницы указы-

вало на его возможное участие в реализации действия СК.

Обработка проростков 0.3 мМ гидросиламином, который является ингибитором ключевого фермента синтеза сероводорода L-цистеиндисульфгидразы, снижала их выживание после повреждающего прогрева (рис. 3). При этом другой ингибитор этого фермента пируват калия в такой же концентрации почти не оказывал влияние на выживание проростков после теплового стресса. В то же время оба ингибитора практически полностью устраняли положительное действие СК на теплоустойчивость проростков. При комбинированном действии 100 мкМ NaHS и 10 мкМ СК выживание проростков после стресса оказалось заметно выше, чем при обработке проростков этими соединениями по отдельности.

Одной из протекторных систем, задействованных в салилат-индуцированном повышении теплоустойчивости проростков, может быть антиоксидантная система. Под влиянием СК в корнях проростков в отсутствие стрессового воздействия повышалась активность одного из важнейших антиоксидантных ферментов СОД (рис. 4а). Под дей-

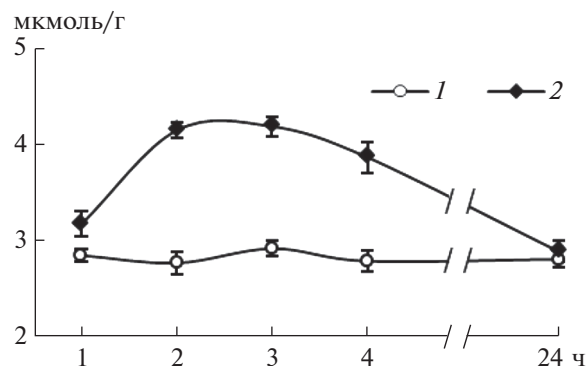


Рис. 2. Динамика содержания сероводорода в корнях проростков пшеницы при обработке СК. 1 – контроль; 2 – СК (10 мкМ).

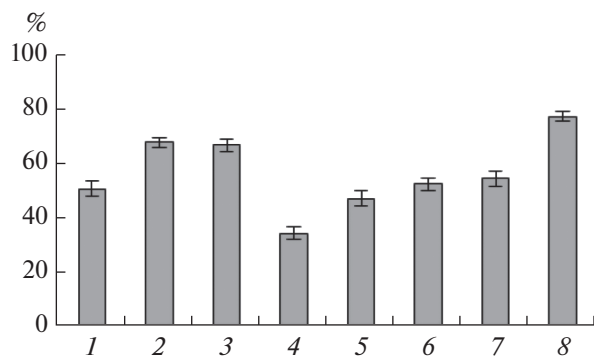


Рис. 3. Теплоустойчивость проростков пшеницы (% выживших после 10 мин прогрева при 46°C) при воздействии СК, NaHS, антагонистов сероводорода и комбинаций указанных соединений. 1 – контроль; 2 – СК (10 мкМ); 3 – NaHS (0.1 мМ); 4 – гидроксил-амин (0.3 мМ); 5 – пируват калия (0.3 мМ); 6 – СК (10 мкМ) + гидроксил-амин (0.3 мМ); 7 – СК (10 мкМ) + пируват калия (0.3 мМ); 8 – СК (10 мкМ) + NaHS (0.1 мМ).

ствием обоих ингибиторов синтеза сероводорода отмечалось небольшое снижение активности фермента. При комбинированной обработке этими ингибиторами совместно с СК влияние последней на активность СОД почти не проявлялось. В то же время при сочетании обработки СК с действием донора H_2S активность СОД была несколько выше, чем в вариантах только с СК или NaHS.

Через 2 ч после повреждающего прогрева активность СОД в контрольном варианте увеличилась, но не значительно. Более существенно ее активность повышалась в ответ на действие высокой температуры после обработки СК и донором H_2S (рис. 4а). В корнях проростков, обработанных пируватом калия, активность СОД после прогрева не изменялась, а после воздействия гидроксил-амин – несколько увеличивалась. При комбинированной обработке проростков СК и ингибиторами синтеза H_2S после теплового стресса активность СОД увеличивалась, однако этот эффект был достоверным только при $P \leq 0.1$. При этом абсолютные значения активности фермента были ниже, чем при воздействии только СК, что позволило предположить участие H_2S в реализации влияния СК на активность СОД. Примечательно, что в корнях проростков, обработанных комбинацией СК и донора H_2S , активность СОД после теплового стресса не повышалась. Можно предположить, что повышенная активность этого и других антиоксидантных ферментов после обработки комбинацией СК и донора H_2S была достаточной для антиоксидантной защиты в стрессовых условиях.

Под влиянием СК и донора H_2S активность каталазы в корнях увеличивалась (рис. 4б). Обра-

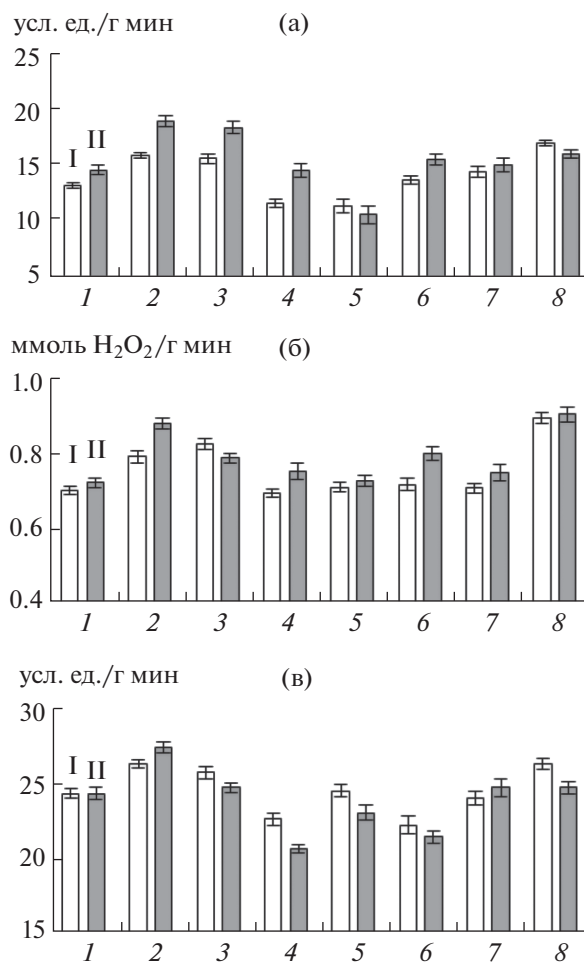


Рис. 4. Активность СОД (а), каталазы (б) и гваяколпероксидазы (в) в корнях проростков пшеницы при воздействии СК, NaHS, антагонистов сероводорода и комбинаций указанных соединений. I – до стрессового воздействия; II – через 2 ч после 10 мин прогрева при 46°C. 1 – контроль; 2 – СК (10 мкМ); 3 – NaHS (0.1 мМ); 4 – гидроксил-амин (0.3 мМ); 5 – пируват калия (0.3 мМ); 6 – СК (10 мкМ) + гидроксил-амин (0.3 мМ); 7 – СК (10 мкМ) + пируват калия (0.3 мМ); 8 – СК (10 мкМ) + NaHS (0.1 мМ).

ботка ингибиторами синтеза H_2S сама по себе существенно не влияла на активность фермента. При этом оба ингибитора полностью устраняли эффект повышения активности каталазы, вызываемый СК, что свидетельствовало в пользу предположения о роли H_2S в салицилатиндуцируемом изменении активности фермента. При комбинированной обработке проростков СК и донором сероводорода активность фермента достоверно превышала значения, которые наблюдались после обработки только с СК или только NaHS (рис. 4б).

После прогрева активность каталазы в контроле существенно не изменялась, а в варианте с СК она повышалась. В то же время в корнях проростков, обработанных донором сероводорода, актив-

ность каталазы незначительно снижалась (рис. 4б). При воздействии гидроксилamina или пирувата калия активность фермента в корнях после прогрева немного увеличивалась, однако этот эффект не был достоверным при $P \leq 0.05$. При комбинированной обработке проростков ингибиторами L-цистеиндесульфгидразы и СК активность фермента в корнях в ответ на гипертермию несколько увеличивалась, однако абсолютные ее значения были заметно ниже, чем при обработке только СК, что указывало на участие H_2S в реализации эффектов СК (рис. 4б). В варианте с комбинацией СК и донора сероводорода активность каталазы после теплового стресса существенно не изменялась, при этом ее абсолютные величины заметно превышали соответствующие значения в контроле и после воздействия только NaHS.

Обработка СК вызывала некоторое повышение активности гваяколпероксидазы в корнях (рис. 4в). При их обработке донором H_2S отмечалась только тенденция к небольшому повышению активности фермента. При воздействии на корни гидроксилamina активность гваяколпероксидазы немного снижалась, а при обработке пируватом калия не изменялась. При комбинированной обработке проростков СК и ингибиторами синтеза H_2S активность фермента практически не отличалась от величин контроля.

Таким образом, эти ингибиторы устраняли повышение активности гваяколпероксидазы, вызываемое СК. При комбинированном действии СК и донора H_2S активность гваяколпероксидазы в корнях не отличалась от величин в варианте с воздействием только СК (рис. 4в).

После теплового стресса активность гваяколпероксидазы во всех вариантах опыта изменялась незначительно. Заметным было лишь ее снижение после обработки проростков гидроксилaminом (рис. 4в).

Через 1 сут после воздействия теплового стресса в корнях контрольных и обработанных ингибиторами синтеза H_2S проростков наблюдалось повышение содержания МДА, продукта ПОЛ (рис. 5). Обработка проростков СК и NaHS, а также их комбинацией практически полностью устраняла этот эффект. Таким образом, СК и донор H_2S смягчали проявление окислительного стресса, вызываемого гипертермией. Ингибиторы синтеза H_2S уменьшали защитный эффект СК, но не устраняли его полностью (рис. 5).

В целом полученные результаты указывали на участие сероводорода в реализации влияния СК на устойчивость проростков пшеницы к гипертермии. Об этом, в частности, свидетельствовало транзитное увеличение его содержания в корнях (рис. 2). Следует отметить, что эффекты действия СК, зарегистрированные в корнях пшеницы,

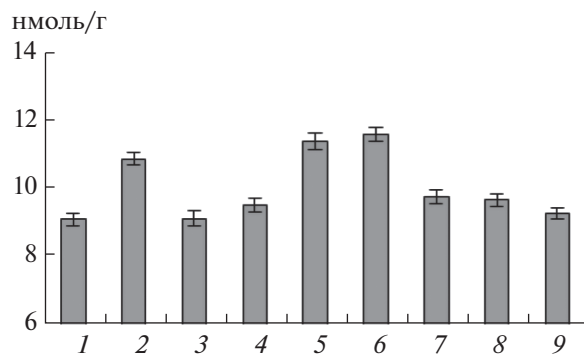


Рис. 5. Содержание МДА в корнях проростков пшеницы, обработанных СК, NaHS, антагонистами сероводорода и комбинациями указанных соединений, через 24 ч после 10 мин прогрева при 46°C. 1 – контроль (без прогрева); 2 – прогрев; 3 – прогрев + СК (10 мкМ); 4 – прогрев + NaHS (0.1 мМ); 5 – прогрев + гидроксилamin (0.3 мМ); 6 – прогрев + пируват калия (0.3 мМ); 7 – прогрев + СК (10 мкМ) + гидроксилamin (0.3 мМ); 8 – прогрев + СК (10 мкМ) + пируват калия (0.3 мМ); 9 – прогрев + СК (10 мкМ) + NaHS (0.1 мМ).

несколько отличались от тех, которые описаны для побегов кукурузы [22]. В цитируемой работе при обработке СК наблюдалось не транзитное, а монотонное увеличение содержания H_2S . Возможно, это связано с особенностями различных органов проростков. Известно, что для клеток корней свойственна более высокая степень изменений многих биохимических показателей по сравнению с клетками надземных органов [24, 25]. Следует отметить, что в целом для соединений, выполняющих сигнальные функции, в том числе газотрансмиттеров, характерно в основном транзитное изменение их содержания в клетках в ответ на те или иные воздействия [4].

Аргументом в пользу участия H_2S в реализации стресс-протекторного действия СК является и устранение ее положительного влияния на теплоустойчивость проростков пшеницы двумя различными ингибиторами L-цистеиндесульфгидразы – основного фермента синтеза сероводорода (рис. 3). Эти результаты полностью согласовывались с данными, полученными в работе Ли и соавт. для проростков кукурузы [22].

К одной из защитных систем, индуцируемых обработкой проростков СК, относится ферментативная антиоксидантная система (рис. 4). Вероятно, в реализации этого эффекта задействован и H_2S . В пользу такого предположения свидетельствовало нивелирование после обработки ингибиторами его синтеза повышения активности СОД, каталазы и гваяколпероксидазы в корнях, вызываемого СК. Для СОД и каталазы такой эффект отмечался в корнях проростков и после теплового стресса (рис. 4).

При комбинированном действии СК и донора H_2S наблюдалось дополнительное увеличение активности каталазы и тенденция к этому для активности СОД. В то же время после стрессового воздействия активность СОД и гваяколпероксидазы в корнях, обработанных комбинацией СК и NaHS, была ниже, чем при воздействии только СК. Можно предположить, что это связано с активацией других компонентов протекторных систем под влиянием H_2S и меньшей “нагрузкой” на ферментативные составляющие антиоксидантной системы. Известно, что при действии H_2S у растений может усиливаться функционирование аскорбат-глутатионового цикла, что приводит к повышению содержания аскорбата и восстановленного глутатиона [28]. Получены также сведения об усилении при влиянии H_2S накопления у растений различных низкомолекулярных соединений, обладающих антиоксидантными свойствами: антоцианов, пролина, глицин-бетаина и трегалозы [7, 29]. Следует отметить, что при исследовании комбинированного влияния СК и NaHS на активность антиоксидантных ферментов в побегах проростков кукурузы обнаружен более заметный синергический эффект [23], чем в корнях проростков пшеницы, наблюдаемый в настоящей работе. Это может быть связано как с особенностями различных органов, так и с различиями в экспериментальных условиях.

В целом есть основания утверждать, что индуцирование теплоустойчивости проростков пшеницы как СК, так и донором сероводорода сопряжено с активацией антиоксидантной системы. Об этом свидетельствует и устранение при обработке проростков этими соединениями накопления МДА, вызываемого тепловым стрессом (рис. 5). При этом положительное влияние СК частично снималось ингибиторами синтеза сероводорода. Не полное устранение физиологических эффектов СК ингибиторами синтеза H_2S может указывать на наличие путей салицилатного сигналинга, независимых от сероводорода. Для выяснения их вклада в реализацию эффектов СК целесообразны специальные исследования.

Стресс-протекторное действие как СК, так и сероводорода, может быть связано с активацией не только антиоксидантной, но и других защитных систем. Так, известно, что СК способна индуцировать синтез дегидринов [21]. Действие экзогенного H_2S , индуцирующее развитие теплоустойчивости растений земляники, сопровождалось усилением экспрессии генов БТШ 90, БТШ 80, БТШ 70, а также аквапоринов в корнях [28].

Таким образом, полученные результаты дают основания полагать, что сероводород участвует в процессе индуцирования теплоустойчивости проростков пшеницы экзогенной СК. Вероятно, что эти эффекты реализуются в тесной функциональной связи с другими сигнальными посредниками, в

частности, с АФК и оксидом азота, количество которых в растительных клетках также изменяется при действии СК [4, 16, 30]. Характер такого взаимодействия H_2S с другими компонентами сигнальной сети при реализации физиологических эффектов СК может стать предметом дальнейших исследований. В свою очередь комбинированное воздействие на растения СК и доноров H_2S может быть перспективным приемом индуцирования их устойчивости к гипертермии и другим стресс-факторам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li Z.-G., Min X., Zhou Z.-H. // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. 1621. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01621>
2. Singh S., Kumar V., Kapoor D., Kumar S., Singh S., Dhanjal D.S., Datta S., Samuel J., Dey P., Wang S., Prasad R., Singh J. // *Physiol. Plant.* 2020. V. 168. № 2. P. 301–317.
3. Chen X., Chen Q., Zhang X., Li R., Jia Y., Ef A.A., Jia A., Hu L., Hu X. // *Plant Physiol. Biochem.* 2016. V. 104. P. 174–179.
4. Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Beschastnyy S.P., Dmitriev A.P. // *Cytol. Genet.* 2019. V. 53. № 5. P. 392–406.
5. Liu Z., Li Y., Cao C., Liang S., Ma Y., Liu X., Pei Y. The role of H_2S in low temperature-induced cucurbitacin C increases in cucumber // *Plant Mol. Biol.* 2019. V. 99. № 6. P. 535–544.
6. Shi H., Ye T., Chan Z. // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 74. P. 99–107.
7. Chen J., Shang Y.T., Wang W.H., Chen X.Y., He E.M., Zheng H.L., Shangguan Z. // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. 1173. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01173>
8. Колупаев Ю.Е., Фурсова Е.Н., Ястреб Т.О., Луговая А.А. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2017. Т. 53. № 5. С. 502–509.
9. Fang H., Liu Z., Long Y., Liang Y., Jin Z., Zhang L., Liu D., Li H., Zhai J., Pei Y. // *Plant J.* 2017. V. 91. № 6. P. 1038–1050.
10. Li Z.-G., Gong M., Liu P. // *Acta Physiol. Plant.* 2012. V. 34. № 6. P. 2207–2213.
11. Ma Y., Zhang W., Niu J., Ren Y., Zhang F. // *Funct. Plant Biol.* 2019. V. 46. № 2. P. 136–145.
12. Li Z.G., Yang S.Z., Long W.B., Yang G.X., Shen Z.Z. // *Plant Cell Environ.* 2013. V. 36. № 8. P. 1564–1572.
13. Shi H., Ye T., Han N., Bian H., Liu X., Chan Z. // *J. Integr. Plant Biol.* 2015. V. 57. № 7. P. 628–640.
14. Tian B., Zhang Y., Jin Z., Liu Z., Pei Y. // *Front. Biosci. (Landmark).* 2017. V. 22. P. 530–538.
15. Shakirova F.M., Bezrukova M.V., Maslennikova D.R. // *Salicylic Acid* / Eds. S. Hayat, A. Ahmad, M.N. Alyemeni. Dordrecht: Springer Science + Business Media, 2013. P. 119–140.
16. Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Швиденко Н.В., Карпец Ю.В. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2012. Т. 48. № 5. С. 550–556.

17. Esim N., Atici Ö. // Front. Life Sci. 2015. V. 8. № 2. P. 124–130.
18. Alavi S.M.N., Arvin M.J., Kalantari K.M. // J. Plant Interact. 2014. V. 9. № 1. P. 683–688.
19. Сахабутдинова А.Р., Фатхутдинова Д.Р., Шакирова Ф.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 5. С. 579–583.
20. Tewari R.K., Paek K.Y. // J. Plant Growth Regul. 2011. V. 30. № 4. P. 396–404.
21. Shakirova F.M., Allagulova Ch.R., Maslennikova D.R., Klyuchnikova E.O., Avalbaev A.M., Bezrukova M.V. // Environ. Exp. Bot. 2016. V. 122. P. 19–28.
22. Li Z.-G., Xie L.-R., Li X.-J. // J. Plant Physiol. 2015. V. 177. P. 121–127.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.12.018>
23. Li Z.-G. // Plant Signal. Behav. 2015. V. 10. № 9. e1051278.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1051278>
24. Часов А.В., Минибаева Ф.В. // Физиология растений. 2014. Т. 61. № 5. С. 668–675.
25. Колупаев Ю.Е., Обозный А.И., Швиденко Н.В. // Физиология растений. 2013. Т. 60. № 2. С. 221–229.
26. Li Z.-G., Luo L.-J., Zhu L.-P. // Bot. Stud. 2014. V. 55. 20.
<https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-20>
27. Фазлиева Э.Р., Киселева И.С., Жуйкова Т.В. // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 3. С. 369–375.
28. Christou A., Manganaris G.A., Papadopoulos I., Fotopoulos V. // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. № 7. P. 1953–1966.
29. Колупаев Ю.Е., Горелова Е.И., Ястреб Т.О., Рябчун Н.И., Кириченко В.В. // Физиология растений. 2019. Т. 66. № 4. С. 277–285.
30. Corpas F.J., González-Gordo S., Canas A., Palma J.M. // J. Exp. Bot. 2019. V. 70. № 17. P. 4391–4404.

Participation of Hydrogen Sulfide in Induction of Antioxidant System in Roots of Wheat Plantlets and Their Heat Resistance by Salicylic Acid

Yu. V. Karpets^a, M. A. Shkliarevskiy^a, E. I. Horielova^a, and Yu. E. Kolupaev^{a,*}

^aDokuchaev Kharkiv National Agrarian University, Kharkiv, 62483 Ukraine

*e-mail: plant.biology.knau@gmail.com

The possible role of hydrogen sulfide as a signal mediator in the induction of heat resistance of wheat (*Triticum aestivum* L.) plantlets by salicylic acid (SA) has been investigated. The treatment of plantlets with SA (1 and 10 μ M) or hydrogen sulfide donor (NaHS – 0.1 and 0.25 mM) caused the increase of their resistance to the damaging heating (10 min at 45°C). Under the influence of SA the transient increase of hydrogen sulfide content in roots occurred with the maximum effect in 2–3 hours after the treatment start. The treatment of roots with SA caused the increase in the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase, and guaiacol peroxidase in them. Under the influence of hydrogen sulfide donor NaHS, the activity of SOD and catalase increased significantly. Also, the treatment of roots with SA and NaHS reduced the effect of accumulation of product of lipid peroxidation, malondialdehyde, caused by heating. The inhibitors of hydrogen sulfide synthesis – hydroxylamine and potassium pyruvate – partially eliminated the effects of increase in activity of antioxidant enzymes and the development of heat resistance, caused by SA. At the same time, the combined treatment of intact plantlets with 10 μ M SA and 0.1 mM NaHS contributed to the additional rise in activity of antioxidant enzymes and increased the survival of plantlets after the heating. The conclusion is made about the participation of hydrogen sulfide in the realization of protective influence of SA on the wheat plantlets under the heat stress.

Keywords: salicylic acid, hydrogen sulfide, signal mediators, antioxidant enzymes, heat resistance, *Triticum aestivum* L.

УДК 581.1:581.143.5

ВЛИЯНИЕ АССОЦИАТИВНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА РОСТ И УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К КСЕНОБИОТИКАМ И ФИТОПАТОГЕНАМ

© 2020 г. С. В. Пиголева¹, Н. С. Захарченко^{1, *}, О. В. Фурс¹, С. В. Тарлачков^{1, 2},
Т. В. Фунтикова², А. Е. Филонов^{2, 4}, А. В. Ариповский³, О. В. Дьяченко¹,
Я. И. Бурьянов¹, Т. В. Шевчук¹

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Московской обл., 142290 Россия

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пущино, Московской обл., 142290 Россия

³Научно-производственная компания ООО Фирма “А-БИО”, Пущино, Московской обл., 142290 Россия

⁴Тульский государственный университет, Тула, Тульская обл., 300012 Россия

*e-mail: znata_2008@mail.ru

Поступила в редакцию 03.12.2019 г.

После доработки 17.02.2020 г.

Принята к публикации 25.02.2020 г.

Исследованы эффекты колонизации томата (*Lucopersicon esculentum* Mill.) и табака (*Nicotiana tabacum* L.), бактериями *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas putida*, *Methylovorus mays*. Колонизация бактериями приводила к их стабильной ассоциации с растениями, у которых повышалась скорость роста, урожайность и адаптация к условиям *in vivo*. Колонизированные растения проявляли повышенную устойчивость к бактериальным фитопатогенам *Erwinia carotovora* и *Pseudomonas syringae*. Растения, колонизированные бактериями с устойчивостью к нафталину проявляли стабильный рост на среде с этим соединением. Полученные результаты указывают на перспективность использования ассоциативных микроорганизмов для разработки методов защиты растений от биотических и абиотических стрессовых факторов.

Ключевые слова: ассоциативные микроорганизмы, фитопатогены, колонизация растений

DOI: 10.31857/S0555109920040133

Повышение продуктивности растений и их устойчивости к различным биотическим и абиотическим стрессовым факторам является важной задачей современной биотехнологии. Одним из путей решения этой задачи является разработка методов защиты растений от фитопатогенов и ксенобиотиков с помощью их колонизации ассоциативными микроорганизмами. Ассоциированные с растениями микроорганизмы оказывают стимулирующее влияние на рост и урожай растений за счет способности к азотфиксации, вытеснению и подавлению роста патогенов, образованию физиологически активных веществ, мобилизации питательных элементов из почвы [1–3]. Способность ассоциаций растений с микроорганизмами-деструкторами можно также использовать в биотехнологии для защиты окружающей среды [4–6]. Ассоциированные микроорганизмы способны устанавливать с растениями прочную симбиотическую связь [7], что указывает на перспективность их применения в усло-

виях конкуренции с микроорганизмами различных агробиоценозов. На основе метода колонизации возможно создание экологически безопасных биопрепаратов для стимуляции роста сельскохозяйственных растений и защиты их от болезней [8–10]. Применение традиционных микробиологических препаратов для защиты растений приводит к кратковременным положительным эффектам и требует нескольких обработок растений в период вегетации. Это связано с применением в качестве защитных биопрепаратов таких микроорганизмов, которые, будучи антагонистами фитопатогенов, не являются активными колонизаторами растений. Таким образом, изучение ассоциативных связей между растениями и ассоциативными микроорганизмами важно для разработки экологически чистого способа защиты растений от патогенов и удаления из окружающей среды чужеродных соединений.

Томат (*Lycopersicon esculentum* L.) – вторая по значимости овощная культура после картофеля,

Таблица 1. Способность бактерий к росту на различных субстратах

Штамм	Нефть	Нафталин	Метанол, канамицин	Наличие плазмид	Ссылка
<i>P. putida</i> BS3701	+	+	—	pBS1141, pBS1142	[14]
<i>P. fluorescens</i> 142NF	+	+	—	pNF142	[14]
<i>A. baumannii</i> 7	+	+	—	5 плазмид	[5]
<i>R. erythropolis</i> S67	+	—	—	—	[16]
<i>P. aureofaciens</i> BS1393	—	—	—	—	[14]
<i>M. mays</i> BKMB-2221	—	—	+	pBin19	[15]

Примечание. “+” — способность бактерий к росту на субстрате; “—” — отсутствие роста на субстрате.

используемая также и для производства различных продуктов [11].

Цель работы — исследование физиолого-биохимических особенностей взаимодействия растений томата и табака с ассоциативными микроорганизмами.

МЕТОДИКА

Растительный материал. Объектами исследования служили растения томата (*Lucopersicon esculentum*) сорта Джина и табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Самсун. Семена стерилизовали в 2%-ном растворе гипохлорита натрия (“Лабтех”, Россия) и промывали 3 раза по 10 мин в стерильной воде. Семена проращивали *in vitro* на агаризованной безгормональной среде Мурасиге-Скуга (МС) [12]. Растения выращивали при температуре 22–24°C и 16-часовом световом дне и освещенности 2.5 клк. Проростки черенковали 1 раз в месяц.

Микроорганизмы и условия их культивирования. В качестве ассоциативных микроорганизмов использовали штаммы: *Pseudomonas aureofaciens* BS1393, *Pseudomonas fluorescens* 142NF, *Pseudomonas putida* BS3701 (pBS1141, pBS1142), *Acinetobacter baumannii* 7, *Rhodococcus erythropolis* S67, метиловых бактерий *Methylovorus mays* BKMB-2221 (табл. 1), полученные в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН (Пушино, Россия) (табл. 1) [7, 13–16]. Бактерии *A. baumannii*, *R. erythropolis* и бактерии рода *Pseudomonas* выращивали до D_{660} 1.0 при 28°C на роторной качалке (120 об./мин) в колбах Эрленмейера на 750 мл с 200 мл среды LB [17], содержащей бакто-триптон (“Difco”, США) — 10 г/л, дрожжевой экстракт (“Difco”, США) — 5 г/л и NaCl — 10 г/л. (“Химмед”, Россия).

Метилотриптон выращивали на среде Канада (К), содержащей (г/л): KH_2PO_4 — 2.0 (“CarlRoth”, Германия); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2.0 (“Химмед”, Россия); NaCl — 0.5 (“Химмед”, Россия); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.125 (“Химмед”, Россия); FeSO_4 — 0.002 (“Химмед”, Россия); агар — 12.0 (“Difco”, США), с добавлением 1.0% CH_3OH в качестве источника углерода и энергии [14] до оптической плотности

(D_{660}) 1.5, на роторной качалке (120 об./мин) в колбах Эрленмейера на 750 мл с 200 мл среды К при 37°C. Для колонизации использовали суспензию бактерий плотностью $2\text{--}3 \times 10^5$ КОЕ/мл.

В качестве фитопатогенных штаммов использовали бактерии *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* B15 (Horticulture Centre, Канада) и *Pseudomonas syringae*, полученный из коллекции Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН (Пушино, Россия). Остальные бактерии выращивали в жидкой среде LB.

Колонизация растений ассоциативными бактериями. Семена и молодые побеги томата и табака обрабатывали суспензией ассоциативных бактерий. Для этого семена помещали в жидкую культуру бактерий с титром $10^3\text{--}10^5$ на 1–2 мин, подсушивали на фильтровальной бумаге и переносили на чашки Петри, со средой МС.

Молодые побеги однократно опрыскивали 1 мл суспензии бактерий с титром $10^3\text{--}10^5$ и культивировали в стеклянных пробирках. В качестве контроля на среду МС помещали необработанные бактериями семена и побеги, и культивировали при 22–24°C и 16-часовом фотопериоде при освещенности 2 клк. Колонизированные и укорененные растения *in vitro* переносили в теплицу станции искусственного климата Биотрон.

Биотесты на стабильность ассоциаций. Микробиологическое тестирование различных эксплантов растений (листьев или корней) проводили через 7, 14 и 49 сут после колонизации. Для этого растительный экстракт, полученный путем гомогенизации 1 см² растительной ткани, наносили на поверхность твердой питательной среды LB или К с селективными антибиотиками в чашках Петри и инкубировали при температуре 22–24°C 2 сут, затем проводили подсчет КОЕ на 1 см² площади растительной ткани.

Устойчивость колонизированных растений к нафталину и нефти. Нафталин (“Химмед”, Россия) растворяли в спирте (исходный раствор 100 мг/мл). В расплавленную агаризованную среду МС добавляли нафталин (50–100 мкг/мл) или нефть (0.5–0.7%). Нефть получена с нефтеперерабатываю-

шего завода (“Газпромнефть” — Московский НПЗ”, Москва, Россия). Характеристики вносимой нефти: плотность — 0.868 г/см³; содержание воды — 0.06%; содержание солей — 45 мг/мл; механические примеси — 0.0080%; содержание серы — 1.42%; состав фракций (%): гексановая — 62.29; бензольная — 13.49; спиртобензольная — 11.21. В приготовленные пробирки пересаживали свежечеренкованные растения и проводили наблюдение за ростом растений в течение месяца.

Влияние нафталина на водоемкость, водообеспечение, водный дефицит растений томата. Для исследования влияния нафталина на водный режим [18] листья раскладывали на среду МС с нафталином (3–15 мкг/мл) и без нафталина (контроль), и инкубировали в чашках Петри течение 20 ч при температуре 22–24°C. Затем листья взвешивали (*A*), отмывали в дистиллированной воде и перекладывали в воду на 2 ч. Через 2 ч листья снова взвешивали (*C*) и высушивали в сушильном шкафу при температуре 60°C в течение 16 ч. Сухие листья снова взвешивали (*D*) и проводили расчет по формулам:

$$\text{водоемкость: } (G) - G = (C - D) \times 100 / C;$$

водообеспечение:

$$(I) - I = (A - D) \times 100 / (C - D);$$

водный дефицит

$$(K) - K = (C - A) \times 100 / (C - D),$$

где *A* — начальный вес листьев; *C* — листья после 2-часовой инкубации на воде; *D* — листья после высушивания.

Определение перекисного окисления липидов. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали спектрофотометрически по тесту с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (“Acros” Индия), основанному на взаимодействии ТБК с конечными продуктами окисления липидов, основную долю которых составлял малоновый диальдегид (МДА) (“Sigma”, США) [19]. Для этого растительный материал (300 мг) растирали в 5 мл 0.1 М Трис-НСl буфера (“Sigma”, США), pH 7.5, с 0.35 М NaCl (“Химмед”, Россия), отбирали 1.5 мл экстракта и добавляли к нему 1.0 мл 0.5%-ного ТБК в 20%-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ, “Химмед”, Россия). Смесь нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, затем очень быстро охлаждали во льду и центрифугировали при 12000 об./мин в течение 5 мин. После этого измеряли оптическую плотность проб при 532 и 600 нм.

Биотесты на изолированных листьях и растениях. Для проверки устойчивости колонизированных растений к фитопатогенам молодые листья инфицировали суспензией бактерий *E. carotovora* и *P. syringae*. В качестве контроля служили листья

не колонизированных растений. Фитопатогенными бактериями (суспензия 10³–10⁵ кл./мл) инокулировали черешки листьев колонизированных и не колонизированных растений, помещали их на агаризованную питательную среду МС в чашки Петри и выдерживали их в закрытых емкостях при 24°C и 16-часовом световом дне, через 1–7 сут оценивали степень повреждения. Целые растения заражали уколом иглы, смоченной в суспензии патогенных бактерий. В каждом варианте опыта заражали по 4 листа. В таблицах представлены средние арифметические величины и их стандартные отклонения по 3–5 опытам в 3 биологических повторностях в каждом из них *n* = 9–15 [7].

Анализ жирнокислотного состава семян томата. Подготовка пробы. Перевод липидов пробы в метиловые эфиры соответствующих высших жирных кислот выполняли методом безэкстракционного последовательного метилирования растворами метоксида натрия и трехфтористого бора в метаноле [20]. Каждый из образцов измельчали в кофемолке и просеивали сквозь сито с ячейками размером 0.7 мм. К навеске 16.0–22.0 мг порошкообразной пробы добавляли раствор 500 мкг марганевой кислоты в 220 мкл толуола (внутренний стандарт) и 350 мкл 1.0 М метанольного раствора метоксида натрия. Смесь нагревали 20 мин при 70°C, добавляли 400 мкл 15%-ного трехфтористого бора в метаноле и нагревали еще 20 мин при 70°C. К реакционной смеси добавляли 0.7 мл воды и 2 мл перегнанного гептана, и экстрагировали метиловые эфиры жирных кислот в органическую фазу, которую далее анализировали хроматографическим методом.

Хроматография. Анализ выполняли на аналитическом газовом хроматографе HP5890m (“Хьюлетт-Пакард”, США). Использована кварцевая капиллярная колонка размером 15 м × 0.2 мм × 0.2 мкм с полярной фазой “Супелковакс-10” м (“Supelco”, Швейцария), ввод пробы (0.5 мкл) — с делением потока газа-носителя (1 : 40). Температурная программа анализа — от 120°C (0.5 мин) до 240°C (5 мин) со скоростью 10°C/мин. Температуры испарителя/детектора (ДИП) — 260 и 255°C. Для регистрации сигнала использовали интегратор пиков “HP 3396A” (“Хьюлетт-Пакард”, США). Количественное определение жирных кислот масла семян томата выполнено методом внутреннего стандарта. Внутренний стандарт — марганевую кислоту (17 : 0) вносили в каждый из образцов исследуемого материала непосредственно перед его химической дериватизацией.

Определение сахаров и оксикислот в томатном соке. Подготовка образцов. К 50 мкл исследуемого сока добавляли 50 мкл водного раствора D-маннита с концентрацией 1.0 мг/мл (внутренний стандарт) и упаривали раствор досуха в вакууме ротационной сушилки “Савант спидвак” (“Savant

Instrument IN", США). К сухому остатку добавляли 50 мкл 2%-ного раствора гидрохлорида метоксимиана в пиридине и нагревали при 80°C в течение 15 мин, после чего добавляли 120 мкл чистого бис (N,O-триметилсилил)трифторацетамида и дополнительно нагревали при 80°C в течение 30 мин. Состав смеси полученных триметилсилильных эфиров анализировали методом газовой хроматографии.

Хроматография. Анализ выполняли на аналитическом газовом хроматографе HP5890 ("Хьюлетт-Паккард", США) со следующими параметрами процесса: использована кварцевая капиллярная колонка SPB-1, размером 20 м × 0.2 мм × 0.2 мкм, газ-носитель — гелий (1.8 мл/мин), метод ввода пробы — с делением потока газа-носителя (1 : 65), объем вводимой жидкой пробы — 1 мкл, температурная программа анализа — от 80°C (0.5 мин) до 310°C со скоростью 10°C/мин, температуры испарителя и пламенно-ионизационного детектора (ДИП) — 280 и 320°C соответственно. Для регистрации сигнала использовали интегратор пиков HP3396A. Для количественной обработки результатов использовали метод внутреннего стандарта с добавлением D-маннита [21].

Биометрические исследования. Для определения влияния ассоциативных бактерий на рост и развитие растений томата и табака и их адаптацию к условиям закрытого грунта, колонизированные растения из стерильных условий высаживали в закрытый грунт станции искусственного климата "Биотрон" ФИБХ РАН (Пушино, Россия). Биометрические измерения проводили еженедельно, отмечая время наступления фенологических фаз.

Статистические методы анализа. Для статистической обработки данных использовали программы Statistica 6.0 и MS Excel 2007. Измерения проводили в трех аналитических и трех биологических повторностях. На графиках и диаграммах приведены средние значения и их стандартные отклонения. Достоверность различий оценивали с использованием непараметрического критерия Мана—Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Колонизация растений. Колонизацию растений бактериальными штаммами проводили в условиях *in vitro*. Стерильные растения однократно опрыскивали суспензией одной из бактерий *P. fluorescens*, *A. baumannii*, *R. erythropolis*, *P. aureofaciens*, *P. putida*, *M. mays* (табл. 1), с титром клеток 10^3 — 10^5 . Через 1–2 нед. после черенкования проводили тестирование на установление ассоциативной связи бактерий с растениями *in vitro*. Затем растения высаживали в теплицу на 7 нед. после колонизации проводили тестирование растений *in vitro*. Для этого экстракты, полученные из растительных эксплантов, наносили на поверхность

Таблица 2. Количество бактерий на корнях томата после колонизации в расчете на 1 г сырой массы*

Колонизация, штамм	Время выращивания, сут		
	7	14	49
<i>M. mays</i>	—	2.45 ± 0.23	2.50 ± 0.29
<i>P. fluorescens</i>	3.30 ± 0.34	3.43 ± 0.29	3.53 ± 0.31
<i>P. putida</i>	3.15 ± 0.38	3.24 ± 0.30	3.34 ± 0.32
<i>P. aureofaciens</i>	3.34 ± 0.45	3.38 ± 0.31	3.49 ± 0.41
<i>A. baumannii</i>	2.38 ± 0.29	3.45 ± 0.27	3.55 ± 0.45
<i>R. erythropolis</i>	3.30 ± 0.43	3.42 ± 0.38	3.49 ± 0.48

* Приведены десятичные логарифмы КОЕ; допустимые значения отклонений в пределах от 0 до 1.0 lgКОЕ/г сырой массы. "—" — не определяли.

питательной среды с селективными антибиотиками в чашках Петри и инкубировали 2 сут при температуре 22–24°C (табл. 2). Через 1 нед. после колонизации томатов бактериями их численность на корнях увеличивалась с 2.4×10^3 до 2.0×10^4 КОЕ/г сырой массы, через 7 нед. с 3.2×10^3 до 3.6×10^4 КОЕ/г сырой массы. В последующих циклах микроразмножения растений содержание бактерий *M. mays*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aureofaciens*, *A. baumannii* и *R. erythropolis* в корнях сохранялось стабильно практически на одном уровне в течение всего периода вегетации, что указывало на их прочную ассоциацию с растениями.

Влияние колонизации на рост и развитие растений. Растения, колонизированные штаммами *Pseudomonas* и *M. mays*, отличались повышенной скоростью роста по сравнению с контрольными растениями (не колонизированными) (табл. 3). Бутонизация, цветение и плодоношение также начинались раньше у колонизированных растений. К 5 нед. роста в теплице растения, колонизированные *M. mays*, практически все уже были с бутонами (91%), количество бутонов у растений, колонизированных другими штаммами, было от 40 до 75%, а у контрольных растений — 42%. Цветение томатов наблюдали у 5–10% (от общего количества) растений, колонизированных *P. aureofaciens*, *M. mays* и *P. putida* на 6 нед. после высадки в теплицу, в то время как цветение контрольных растений начиналось только на 7 нед. (табл. 4). Колонизация растений положительно влияла на урожайность растений томата. Число плодов на одном колонизированном растении увеличилось в среднем на 10–20%, по сравнению с контрольными неколонизированными растениями (табл. 4). Средняя масса одного плода у контрольных растений составила 80.4 г. У колонизированных растений масса одного плода была в среднем выше на 2.1–17.7%. Растения томатов, колонизированные исследуемыми штаммами превосходили по урожайности контрольные растения на 14.6–45.9% (табл. 5).

Таблица 3. Высота колонизированных растений (см) через 1–7 нед. выращивания в теплице, см

Вариант	Время выращивания, нед						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>M. mays</i>	3.8 ± 0.3	6.8 ± 0.5	11.4 ± 1.0	19.3 ± 1.7	29.7 ± 2.5	40.5 ± 4.1	50.2 ± 5.0
<i>P. fluorescens</i>	4.3 ± 0.4	7.1 ± 0.6	12.2 ± 1.1	21.2 ± 1.9	31.3 ± 3.1	40.3 ± 3.9	48.5 ± 4.5
<i>P. putida</i>	5.1 ± 0.4	12.7 ± 0.9	13.7 ± 1.3	19.1 ± 1.6	25.2 ± 2.4	31.3 ± 3.1	45.6 ± 4.3
<i>P. aureofaciens</i>	4.7 ± 0.3	10.8 ± 1.1	12.9 ± 1.2	14.6 ± 1.3	26.6 ± 2.5	34.7 ± 3.5	43.7 ± 4.2
<i>A. baumannii</i>	3.4 ± 0.4	7.6 ± 0.6	11.4 ± 1.0	15.9 ± 1.5	20.8 ± 2.0	26.0 ± 2.4	35.5 ± 3.1
<i>R. erythropolis</i>	5.9 ± 0.5	14.3 ± 1.2	15.5 ± 1.4	22.1 ± 2.0	27.7 ± 2.7	39.3 ± 3.8	41.4 ± 4.0
Контроль	4.3 ± 0.4	6.7 ± 0.5	10.1 ± 0.8	15.7 ± 1.4	26.4 ± 2.5	35.0 ± 3.3	42.1 ± 4.3

Таблица 4. Бутонизация, цветение и плодоношение томатов (%) при колонизации различными штаммами бактерий

Колонизация, штамм	Показатель	Время выращивания, нед				
		5	6	7	8	9
<i>M. mays</i>	Бутонизация	91	100	100	100	100
	Цветение	—	10	82	100	100
	Плодоношение	—	—	—	54.5	100
<i>P. fluorescens</i>	Бутонизация	75	85	96	100	100
	Цветение	—	—	76	100	100
	Плодоношение	—	—	—	50	100
<i>P. putida</i>	Бутонизация	71	80	95	100	100
	Цветение	—	10	70	100	100
	Плодоношение	—	—	—	45	100
<i>P. aureofaciens</i>	Бутонизация	65	79	90	100	100
	Цветение	—	5	68	90	100
	Плодоношение	—	—	—	20	92
<i>A. baumannii</i>	Бутонизация	40	55	90	100	100
	Цветение	—	—	29	93	97
	Плодоношение	—	—	—	15	86
<i>R. erythropolis</i>	Бутонизация	41	62	95	100	100
	Цветение	—	—	30	55	88
	Плодоношение	—	—	—	19	90
Контроль	Бутонизация	42	75	100	100	100
	Цветение	—	—	33	41.7	100
	Плодоношение	—	—	—	16.7	91.7

Примечание. “—” — не определен.

Таблица 5. Урожайность томатов при колонизации растений различными штаммами бактерий

Колонизация, штамм	Масса одного плода, г	Количество плодов на 1 растении (15 нед)	Урожай с 1 растения, г	Число семян в 1 плоде
<i>M. mays</i>	90.4 ± 8.3	7.4 ± 0.6	668.9 ± 62	105.3 ± 9.4
<i>P. fluorescens</i>	88.5 ± 7.8	6.1 ± 0.4	539.8 ± 49	129.5 ± 11.2
<i>P. putida</i>	84.4 ± 9.1	6.7 ± 0.5	565.4 ± 57	131.1 ± 10.7
<i>P. aureofaciens</i>	85.6 ± 6.9	6.2 ± 0.4	530.7 ± 51	110.4 ± 11.6
<i>A. baumannii</i>	94.7 ± 9.4	5.9 ± 0.6	558.7 ± 61	99.8 ± 8.7
<i>R. erythropolis</i>	82.1 ± 8.5	6.4 ± 0.4	525.4 ± 48	126.8 ± 13.4
Контроль	80.4 ± 7.6	5.7 ± 0.5	458.2 ± 39	74.36 ± 7.9

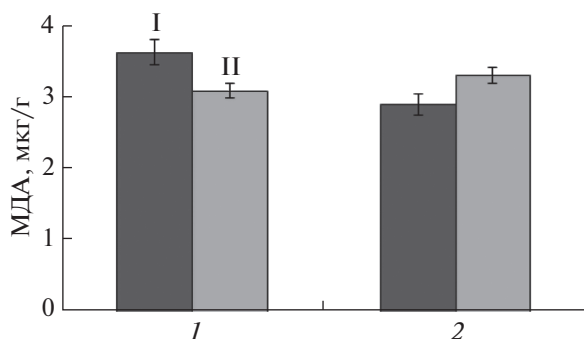


Рис. 1. Влияние нафталина на уровень ПОЛ у контрольных (I) и колонизированных (2) растений при выращивании *in vitro* в течение 1 сут. I — контроль, на среде МС, II — на среде МС с добавлением 50 мг/мл нафталина.

Устойчивость колонизированных растений к нафталину и нефти. В экспериментах по устойчивости растений к нефти и нафталину использовали растения табака. Бактерии штаммов *P. putida* BS3701, *P. fluorescens* 142NF содержали гены салицилатгидроксилазы NahG и NahU, которые играют основную роль в деградации токсичных полициклических ароматических углеводородов. [14, 22].

Контрольные и колонизированные *P. putida* растения были высажены на среды МС с добавлением нафталина 50, 70 и 100 мкг/мл. На среде с концентрацией нафталина 50 мкг/мл растения выращивались в течение месяца. При наблюдении за их ростом было отмечено, что как неколонизированные, так и колонизированные хорошо укоренялись, росли и внешне не отличаются от растений, растущих на среде МС без нафталина. Через 1 сут роста на среде с нафталином в растениях определяли уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ). У контрольных и колонизированных растений, растущих на нафталине, уровень ПОЛ практически не отличался от уровня растений, растущих на среде МС без нафталина (рис. 1).

При концентрации нафталина в среде 70 мкг/мл было показано, что колонизация растений микроорганизмами значительно повышала их устойчивость к этому ксенобиотику. Увеличение уровня ПОЛ на 85–86% по сравнению с растениями, растущими без нафталина, отмечали через 4, 7 сут выращивания на нафталине (рис. 2). У колонизированных *P. putida* растений уровень ПОЛ на среде с нафталином незначительно отличался от уровня ПОЛ растений, выращенных на среде МС без нафталина (рис. 2). Через 7 сут культивирования растений на среде с 70 мкг/мл нафталина отмечали пожелтение листьев контрольных растений, в то время как у колонизированных растений листья оставались зелеными. Уровень ПОЛ у контрольных растений на среде с нафталином увеличивал-

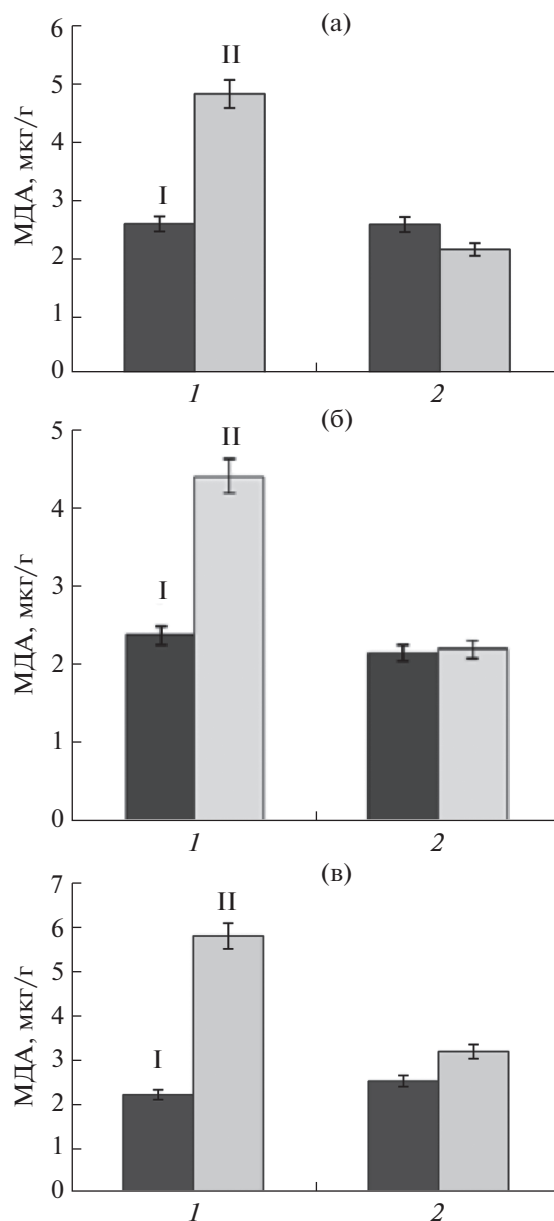


Рис. 2. Влияние нафталина на уровень ПОЛ у контрольных (I) и колонизированных (2) растений *in vitro* после первых (а) четвертых (б) и 7 сут (в) выращивания: I — среда МС; II — среда МС с добавлением 70 мг/мл нафталина.

ся на 160%, что указывало на сильный стресс для этих растений (рис. 2в), в то же время колонизированные растения практически не испытывали абиотический стресс при выращивании на среде МС с 70 мкг/мл нафталина в течение 7 сут.

При повышении концентрации нафталина в среде до 100 мкг/мл наблюдали потерю тургора листьев контрольных растений. Листья колонизированных растений сохраняли тургор и зеленый цвет. Уровень ПОЛ растений определяли через 7 сут

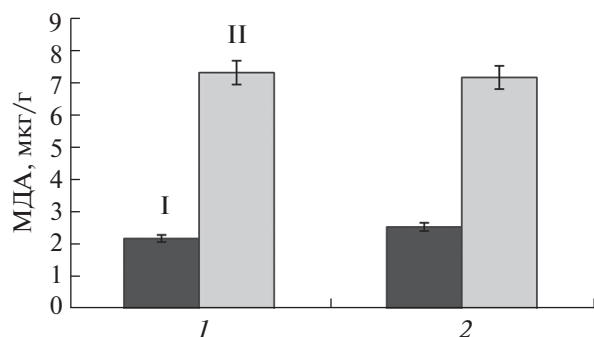


Рис. 3. Влияние нафталина на уровень ПОЛ у контрольных (1) и колонизированных *P. putida* (2) растений *in vitro* при выращивании в течение суток. I — среда МС, II — среда МС с добавлением 100 мкг/мл нафталина.

роста на среде с нафталином. При этом уровень ПОЛ у контрольных растений увеличивался на 230% и у колонизированных на 179%, что означало высокую токсичность его для растений обеих групп (рис. 3).

Влияние нафталина на водный режим растений томата. Для определения водного режима растений листья колонизированных и контрольных растений, выросших *in vivo*, подвергали абиотическому стрессу, выдерживая их в парах нафталина 3–15 мкг/мл в течение 20 ч. Растения, колонизированные *P. putida* были более устойчивы к стрессу, несмотря на действие нафталина и повышение водного дефицита в листьях до 20% (табл. 6). При повышении концентрации нафталина происходило нарушение метаболизма, листья теряли массу и погибали. У контрольных растений нарушение метаболизма наступало уже при концентрации нафталина 3 мкг/мл и измерение водного режима становилось недоступным.

Определение отношения площади листа к сухой массе наглядно показало, что при повышении концентрации стрессового агента происходило нарастание распада веществ как у колонизированных так и контрольных растений (табл. 7). Концентрации нафталина 10–15 мкг/мл оказались токсичными для клеток, и через сутки наблюдалась гибель листьев при таких концентрациях.

Исследование колонизированных растений, растущих на нефти. Для исследования устойчивости колонизированных растений к нефти растения высаживали на среду с различными концентрациями нефти (0.5–0.7%). Через неделю культивирования колонизированных растений на среде с нефтью на корнях обнаруживали рост бактерий *P. putida*. Для этого экстракты корней наносили на поверхность питательной среды с селективными антибиотиками и, после образования колоний через 2 сут, проводили подсчет КОЕ *P. putida*. (Данные не приведены). Предварительно для выполнения эксперимента на поверхность среды МС наносили 0.5–0.7% нефти (от объема среды). На эту среду высаживали контрольные и колонизированные *P. putida* растения, за которыми наблюдали в течение месяца. Стресс, обусловленный влиянием нефти, действовал на обе группы растений, однако колонизированные растения были более жизнеспособны за счет присутствия на корнях бактерий-нефтедеструкторов. На среде с содержанием нефти 0.5% колонизированные растения сохраняли способность к росту и образованию новых почек в течение времени эксперимента — 27 дней (рис. 4а), а повышение концентрации нефти до 0.7% в среде приводило к полной гибели контрольных растений и частичной гибели колонизированных растений, при этом верхушечные листья колонизированных растений оставались зелеными (рис. 4б).

Таблица 6. Водный режим листьев томата, колонизированных *Pseudomonas putida*

Концентрация нафталина, мкг/мл	Водоемкость	Водообеспечение	Водный дефицит
Листья растений, колонизированные <i>Pseudomonas putida</i>			
3	90.26 ± 9.7	81.42 ± 8.0	18.57 ± 1.7
5	90.10 ± 8.8	73.05 ± 7.2	20.18 ± 2.2
10			
15			
Вода	87.67 ± 8.7	89.00 ± 8.6	9.64 ± 0.7
Листья контрольных растений			
3	—	—	—
5	—	—	—
10	—	—	—
15	—	—	—
Вода	88.55 ± 8.6	90.92 ± 9.1	9.07 ± 0.7

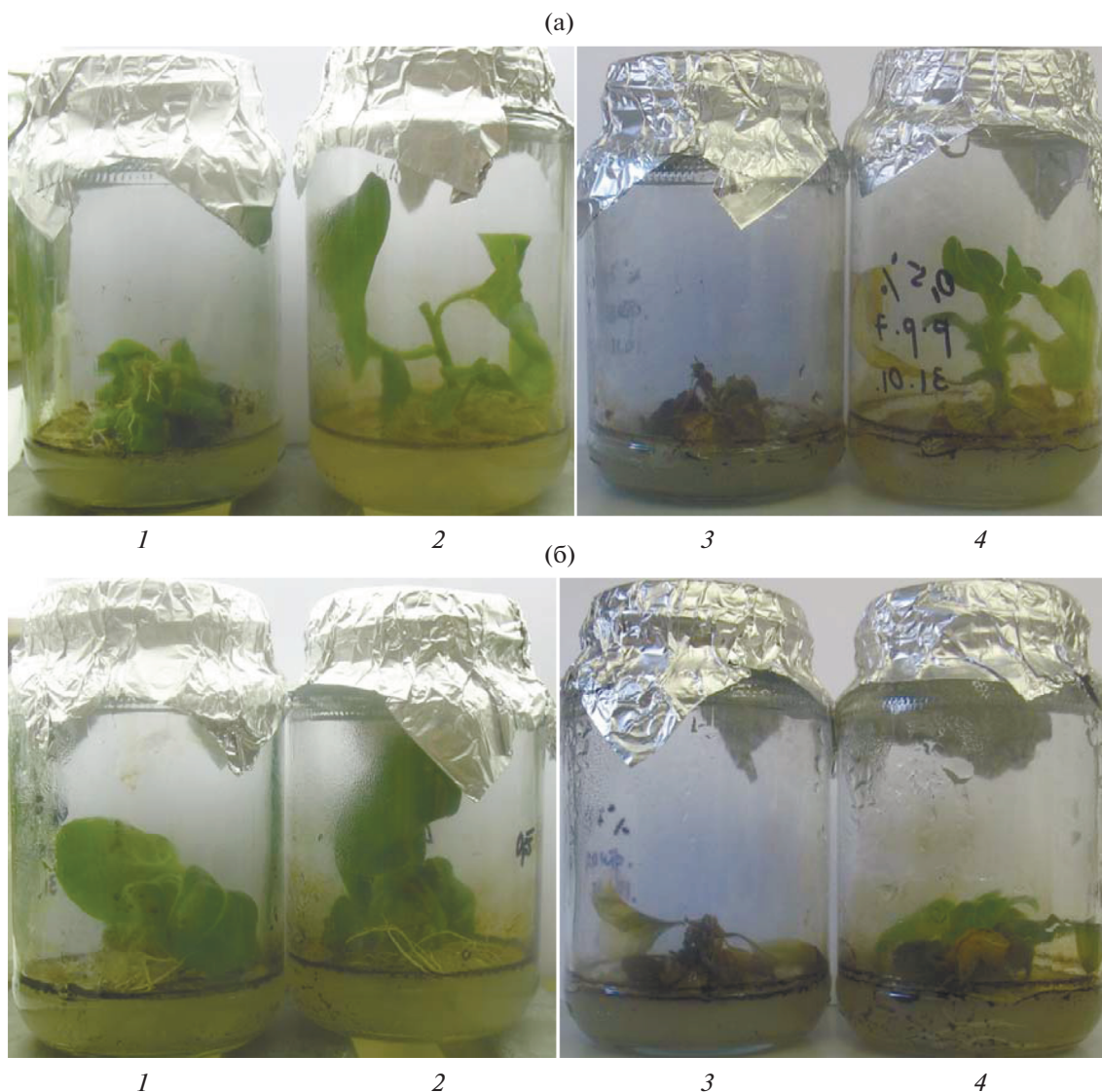


Рис. 4. Растения табака, культивируемые на среде с 0.5 (а) и 0.7%-ным (б) содержанием нефти. Растения в момент высадки (1, 2) и через 27 сут выращивания (3, 4). 1, 3 – контрольные растения; 2, 4 – растение, колонизированное *P. putida*

Устойчивость колонизированных растений к фитопатогенам. Уже через 1 сут после инокуляции на контрольных листьях, зараженных бактериальным штаммом *E. carotovora*, отмечали разрушение ткани мезофилла. К концу 2 сут поражение площади контрольных листьев составляло 100%. При заражении растений *P. syringae* признаки повреждения наблюдались через 4–5 сут – листья желтели и покрывались бурными пятнами. В то же время листья растений, колонизированных *P. aureofaciens* и *M. mays*, оставались без признаков повреждения (рис. 5а). Аналогичные симптомы болезни наблюдались при заражении целых растений. Колонизированные растения оставались неповрежденными в течение всего времени эксперимента, в то время как контрольные растения полностью погибали (рис. 5б).

Таблица 7. Изменение отношения площади листа к сухому весу в зависимости от концентрации нафталина

Вариант	Концентрация нафталина, мкг/мл	$S_{\text{листа}}/\text{сухой вес}$
Колонизированные <i>Pseudomonas putida</i>	3 нафталина	1.01×10^{-3}
	5	0.91×10^{-3}
	10	0.57×10^{-3}
	15	0.47×10^{-3}
	Вода	0.9×10^{-3}
Неколонизированные (контроль)	3	0.92×10^{-3}
	5	0.84×10^{-3}
	10	0.7×10^{-3}
	15	—
	Вода	1.15×10^{-3}

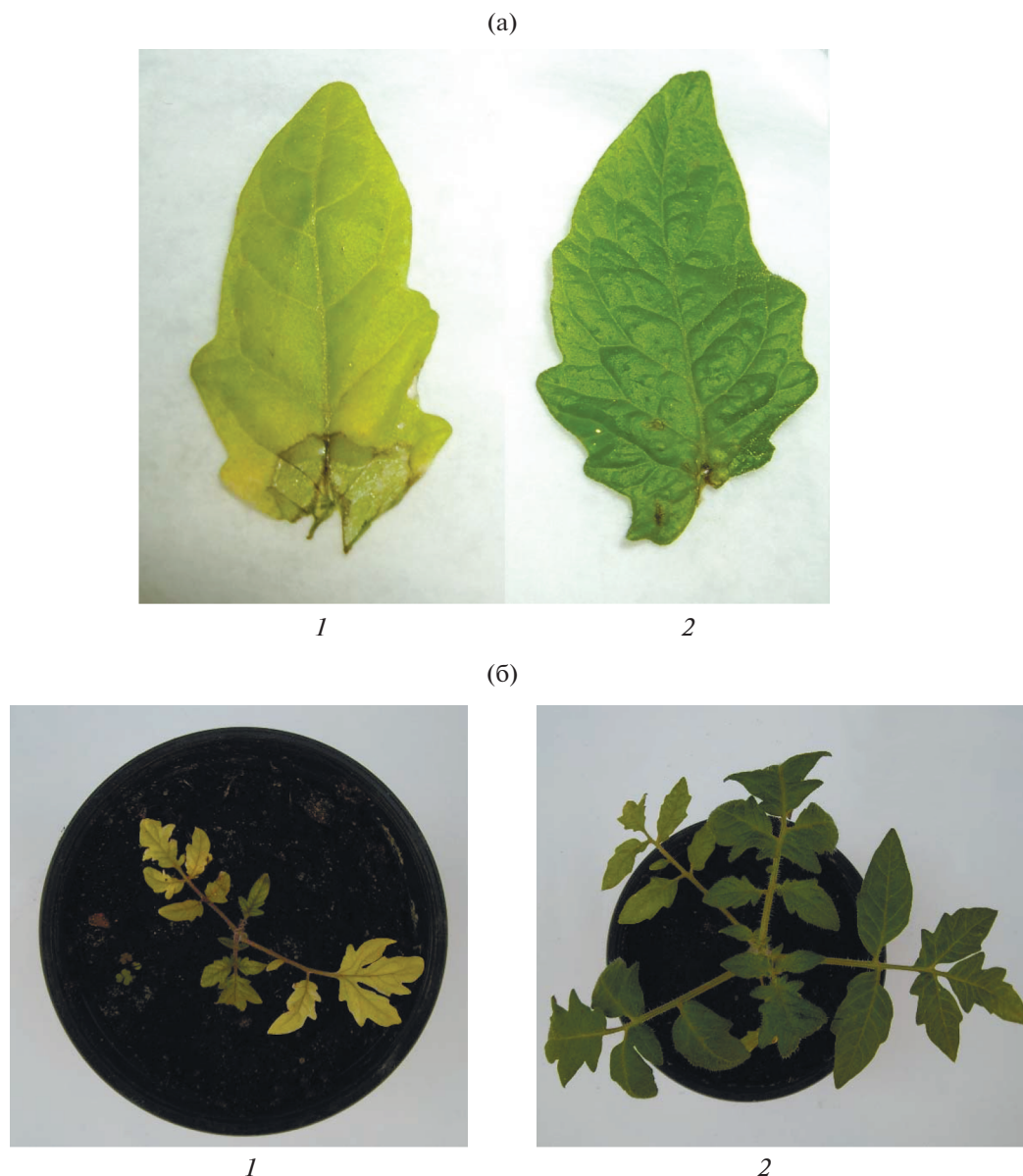


Рис. 5. Устойчивость отдельных листьев колонизированных *P. aureofaciens* растений томата к *Erwinia carotovora* (a) и *P. syringae* (б). 1 – лист контрольного растения – пожелтение и некроз ткани; 2 – лист колонизированного растения – полное сохранение первоначальных плотности и цвета.

Анализ жирнокислотного состава масла семян томатов. Семена томатов являются основным побочным продуктом при изготовлении томатной пасты в промышленности, которые составляют около 71–72% от общего производства отходов [23]. Масло семян томатов является отличным источником ценных жирных кислот (**ЖК**), которое используется в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности [24].

Исследовано влияние колонизации растений микробными штаммами на жирнокислотный состав семян томатов. Результаты относительного содержания индивидуальных ЖК к массе всех

ЖК семян приведены в табл. 8. Анализ показал увеличение процентной доли насыщенных ЖК стеариновой (C18:0) от 4.3% в контроле до 5.0–6.3% в опыте (колонизированные растения) и олеиновой (C18:1) от 18.5% в контроле до 19.7–20.1% в опыте, в зависимости от штамма. Суммарное содержание ЖК в биомассе семян (вес./%) было выше у семян колонизированных растений.

Известно, что липиды являются интегральными компонентами клеточных мембран. Среди групп липидов важное место занимают стерины, которые стабилизируют мембраны и контролируют их проницаемость. В растениях стерины в больших

Таблица 8. Состав и относительное содержание (%) жирных кислот липидов семян контрольных и колонизированных растений томата (*Lucopersicon esculentum* Mill.)*

Жирная кислота**	Контроль	<i>P.aureofaciens</i>	<i>P.putida</i>	<i>P.fluorescens</i>	<i>R.erythropulis</i>	<i>A.baumannii</i>	<i>M. mays</i>
Пальмитиновая (C16:0)	13.5	12.9	13.6	13.1	13.2	13.0	14.3
Стеариновая (C18:0)	4.29	6.11	4.62	5.33	4.95	6.25	5.14
Олеиновая (цис-9-октадеценовая, C18:1)	18.5	19.7	18.5	19.7	19.6	20.1	20.1
Линолевая (октадекадиеновая, C18:2 – ω6)	61.2	56.5	60.1	58.3	58.3	53.7	57.0
α-Линоленовая (октадекатриеновая, C18:3 – ω3)	2.51	2.45	3.38	2.54	2.63	2.35	2.40
Арахидовая (эйкозановая, C20:0)	0.34	0.44	0.35	0.38	0.41	0.46	0.46
Суммарное весовое содержание ЖК в биомассе семян, вес/%	26.2	26.9	26.6	28.8	29.5	30.8	26.4

* Приведены средние арифметические величины 3 аналитических измерений из 3 биологических повторностей. Во всех случаях величина стандартного отклонения не превышала 3% от среднего. ** В липидах растений содержались также пальмитиновая кислота (цис-9-гексадеценовая, C16:1-цис-9) и гондоиновая (цис-11-эйкозеновая) (C20:1), концентрация каждой из которых составляла ≤2%.

Таблица 9. Содержание кислот (мг/100 г сырого веса) и сахаров в зрелых плодах колонизированных растений томатов

Штамм, используемый для колонизации растений	Яблочная кислота	Лимонная кислота	Фруктоза, г/кг	Глюкоза г/кг
<i>M. mays</i>	60.0 ± 6.4	55.8 ± 5.6	12.5 ± 1.2	9.5 ± 0.9
<i>P. fluorescens</i>	65.9 ± 6.2	90.4 ± 8.7	10.9 ± 1.3	7.7 ± 0.8
Контроль	66.0 ± 7.1	62.1 ± 6.3	11.4 ± 1.1	8.0 ± 0.6

количествах обнаруживались в тех органах и тканях, которые интенсивно функционируют и содержат большое число делящихся клеток: меристема, хлоропласты, семена [25]. При стрессовых воздействиях на растение, таких как низкая температура уровень стерина повышается и тем самым стабилизирует состояние растительного органа [26]. В состав стерина входит олеиновая кислота. В экспериментах доля олеиновой кислоты в семенах повышалась после колонизации, что указывало на мобилизацию некоторых защитных систем растений.

Анализ сахаров и оксикислот в томатном соке. В томатном соке растений, колонизированных штаммами *M. mays* и *P. fluorescens*, обнаружены углеводы — фруктоза и глюкоза, оксикислоты — яблочная и лимонная (табл. 9). Различия в количестве сахаров и оксикислот в колонизированных томатах и контрольных практически не наблюдали.

Таким образом, методы создания стабильной ассоциации растений с микроорганизмами, способными стимулировать их рост, эффективно

конкурировать с фитопатогенами и вызывать деградацию чужеродных соединений в окружающей среде, перспективны для восстановления микробных биоценозов и поддержания естественного плодородия почв.

Работа выполнена по Госзаданию № 0101-2014-0046, РК 01201352439 и при частичной финансовой поддержке грантов РФФИ № 19.08.00375, 18-08-00752, 19-08-00299

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haas D., Defago G. // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. № 4. P. 307–319.
2. Lugtenberg B., Kamilova F. // Annu. Rev. Microbiol. 2009. V. 63. P. 541–556.
3. Glick B.R. // Hindawi Publishing Corporation Scientific. 2012. V. 2012. Article ID 963401, 15 p. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
4. Ветрова А.А., Овчинникова А.А., Пунтус И.Ф., Фионов А.Е., Боронин А.М. // Биотехнология. 2009. № 4. С. 82–90.

5. Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Пунтус И.Ф., Есикова Т.З., Гафаров А.Б., Кошелева И.А., Боронин А.М. // Микробиология. 2010. Т. 79. № 2. С. 1–7.
6. Тихонович И.А., Борисов А.Ю., Васильчиков А.Г., Жуков В.А., Кожмяков А.П., Наумкина Т.С., Штарк О.Ю., Яхно В.В., Чеботарь В.К. // Зернобобовые и крупяные культуры. 2012. № 3. С. 11–17.
7. Захарченко Н.С., Пиголева С.В., Кочетков В.В., Чепурнова М.А., Дьяченко О.В., Лебедева А.А., Захарченко А.В., Пунтус И.Ф., Боронин А.М., Бурьянов Я.И. // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 1. С. 89–98.
8. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 2. С. 133–143.
9. Кожмяков А.П., Белоброва С.Н., Орлова А.Г. // Сел.-хоз. биология. 2011. С. 112–115.
10. Логинов О.Н. Бактерии *Pseudomonas* и *Azotobacter* как объекты сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Наука, 2005. 166 с.
11. Knoblich M., Anderson B., Latshaw D. // J. Sci. Food Agric. 2005. V. 85. P. 1166–1170.
12. Murashige T., Skoog F. // Physiol. Plant., 1962, V. 15. № 3. P. 473–497.
13. Hol W.H.G., Bezemer T.M., Biere A. // Front. Plant. Sci. 2013. V. 10. № 4. P. 81.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00081>
14. Анохина Т.О., Сиунова Т.В., Сизова О.И., Захарченко Н.С., Кочетков В.В. // Агрохимия. 2018. № 10. С. 54–66.
15. Доронина Н.В., Кудинова Л.В., Троценко Ю.А. // Микробиология. 2000. Т. 69. С. 712–716.
16. Larkin M.J., Kulakov L.A., Allen C.C. // Curr. Opin. Biotechnol. 2005. V. 16. № 3. С. 282–290.
17. Sambrook J., Fritsch E.E., Maniatis T. // Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1626 p.
18. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. // Физиология растений. М.: "Высшая школа", 2005. 742 с.
19. Uchiyama M. // Analytic. Biochem., 1978. V. 86. P. 287–297.
20. Griffiths M.J., van Hille R.P., Harrison S.T. // Lipids. 2010. V. 11. № 45. P. 1053–1060.
21. Knapp D.R. Handbook of Analytical Derivatization Reactions. USA: Wiley–Interscience Publication, 1979. 553 p.
22. Пунтус И.Ф., Рязанова Л.П., Звонарев А.Н., Фунтикова Т.В., Кулаковская Т.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 2. С. 198–205.
23. Fahimdanesh M., Bahram M.E. // J. Nutr. Food Sci. 2013. V. 3. № 3.
<https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000206>
24. Botinestean C., Gruia A.T., Jianu I. // J. Material Cycles and Waste Management. 2015. V. 17. № 1. P. 118–124.
25. Grunwald C. // Plant Physiol., 1970. V. 45. № 4. P. 663–666.
26. Девятловская А.Н., Журавлева Л.Н., Алашкевич Ю.Д. Химия растительного сырья. 2014. № 2. С. 195–198.

Effects of Associative Microorganisms on Plant Growth and Resistance to Xenobiotics and Phytopathogens

S. V. Pigoleva^a, N. S. Zakharchenko^{a,*}, O. V. Furs^a, S. V. Tarlachkov^{a,b}, T. V. Funtikova^b,
A. E. Filonov^{b,d}, A. V. Aripovskii^c, O. V. Dyachenko^a, Y. I. Buryanov^a, and T. V. Shevchuk^a

^aShemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

^bSkryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290, Russia

^cCompany "A-BIO", Pushchino, 142290 Russia

^dTula State University, Tula, 300012 Russia

*e-mail: znata_2008@mail.ru

The *in vivo* and *in vitro* interactions between tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and bacteria *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas putida*, *Methylovorus mays*. Stable associations of these microorganisms with plants are demonstrated, colonized plants were characterized by accelerated growth, yield and better adaptation to *in vivo* conditions. Colonized plants were characterized enhanced resistance to bacterial phytopathogens *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas syringae*. Plants colonized by bacteria resistant to naphthalene can grow steadily on the medium containing this compound. The results obtained indicate a promising usage of beneficial associative microorganisms for the development of technologies for plant protection against biotic and abiotic stressors.

Keywords: associative microorganisms, phytopathogens, colonization

УДК 543.066:57.083.3

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОЕВОГО СЫРЬЯ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

© 2020 г. Н. И. Смирнова¹, Е. А. Зверева¹, А. В. Жердев¹, Б. Б. Дзантиев^{1, *}

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

*e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 26.12.2019 г.

После доработки 04.02.2020 г.

Принята к публикации 25.02.2020 г.

Разработана методика иммуноферментного анализа для контроля присутствия и оценки содержания соевого сырья в мясных продуктах питания, основанная на связывании специфических антител с антигенными детерминантами соевого ингибитора трипсина. Из-за возможного влияния ферментативной и высокотемпературной обработок продуктов, которые могут нарушать нативную структуру ингибитора и приводить к его фрагментации, анализ основан на конкурентном взаимодействии с антителами антигена, содержащегося в пробе и иммобилизованного в лунках микропланшета. Установлены условия проведения анализа, обеспечивающие минимальный предел обнаружения и высокую точность измерений. Разработанный анализ имел продолжительность 60 мин, предел обнаружения 3.5 нг/мл и диапазон определяемых концентраций ингибитора 7.7–110 нг/мл. Показана возможность использования предложенной методики для тестирования мясных продуктов.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, соевый ингибитор трипсина, безопасность пищевой продукции, контроль состава продуктов питания

DOI: 10.31857/S0555109920040157

В настоящее время широко распространено добавление в мясные продукты растительных белков, что обусловлено технологическими и экономическими причинами. Самым популярным растительным компонентом является соя, благодаря высокому содержанию в ней белка (около 40%), способности к эмульгированию, впитыванию воды и жира, а также регулированию консистенции пищевых продуктов [1, 2]. Рецептуры различных мясных продуктов устанавливают предельное содержание в них немясных компонентов, превышение которых рассматривается как фальсификация. Кроме того, использование соевого сырья сопряжено с рисками аллергических реакций на его компоненты — прежде всего на глицинин, β -конглицинин, профилин, вакуолярный соевый белок и ингибитор трипсина типа Кунитца [1, 3]. В связи с этим для контроля соблюдения рецептуры пищевых продуктов крайне важно располагать достоверными производительными методами, выявляющими специфические компоненты соевого сырья и позволяющими оценивать его содержание в изготовленной продукции [4].

Для детектирования соевых добавок в продуктах питания предложены и применяются разнообразные методы [5, 6]. Однако большинство из них сопряжено с использованием специализиро-

ванного оборудования и являются часто весьма трудоемкими и продолжительными. К таким методам относятся высокоэффективная жидкостная хроматография [7, 8], полимеразная цепная реакция [9–11], а также электрофоретический [12] и гистохимический [13] анализы.

Более перспективны для массового применения иммунохимические методы, характеризующиеся высокой производительностью, методической простотой и не требующие сложного приборного обеспечения [14, 15]. Описан ряд методов иммунодетекции соевых белков в продуктах питания [16], основанных, как правило, на принципах иммуноферментного [17–19] и иммунохроматографического [20] анализов. Однако выбор контролируемого биомаркера соевого сырья и формата иммуноанализа, обеспечивающих максимальную достоверность тестирования, остается дискуссионным. Так, в качестве кандидатных биомаркеров рассматривались β -конглицинин [17, 20], глицинин [19], Gly m 4 [21], Gly m 8 [22] и ингибиторы трипсина Баумана-Бирка [23] и Кунитца [18]. При этом в описанных аналитических системах реализован сэндвич-формат иммуноанализа с образованием детектируемых тройных комплексов (иммобилизованное антитело — антиген, содержащийся в пробе, — ме-

ченное антитело). Такой выбор оправдан, если необходимо достижение максимальной чувствительности анализа [24] и аналит в пробе не подвергается деструкции. Однако изготовление пищевых продуктов сопряжено с ферментативной и тепловой обработкой, в результате чего в тестируемых пробах содержатся как нативные белковые молекулы, так и их фрагменты, препятствующие образованию детектируемых тройных комплексов.

В настоящей работе рассматриваются возможности применения в качестве контролируемых компонентов молекул соевого ингибитора трипсина (СИТ) и их фрагментов. Данный белок является специфическим биомаркером для соевого сырья, который не имеет иммунохимического сходства с белками, содержащимися в мясе. Его содержание в сое высокое, что позволяет работать со значительными разбавлениями проб, исключая влияние компонентов матрикса на результаты анализа.

Установлено, что частичный гидролиз СИТ различными ферментами — алкалазой, трипсином, химотрипсином, бромелаином и папаином — не приводит к разрушению как минимум аллергенных детерминант, а в некоторых случаях даже усиливает связывание с ними [25]. Поэтому оправданным решением для контроля соевого сырья в мясопродуктах представляется реализация конкурентного иммуноанализа СИТ. Для повышения доступности антигенных детерминант были учтены рекомендации работы [26], предлагающие в качестве иммуногена подвергнутый структурной модификации СИТ. Такая модификация происходит, в частности, при конъюгировании СИТ с низкомолекулярными гаптенами. В связи с этим разработка анализа осуществлялась с использованием антисывороток против конъюгатов СИТ с гаптенами, отсутствующими в мясопродуктах.

Цель работы — разработка иммуноферментного анализа (ИФА) для определения соевого сырья в пищевых продуктах.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали соевый ингибитор трипсина Кунитца (Т9003), детергент тритон X-100 (“Sigma-Aldrich”, США), трис-основание (“Химмед”, Россия), однокомпонентный субстратный раствор тетраметилбензидаина (ТМБ) (“НВО Иммунотех”, Россия), антивидовые антитела (коза против кролика), меченные пероксидазой (“Медгамал”, Россия). Кроличьи поликлональные антитела против СИТ (8 препаратов) были получены в рамках предыдущих исследований лаборатории иммунобиохимии ФИЦ биотехнологии РАН (Россия). Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щелочи и органические растворители) были аналитической или

химической чистоты. Буферные растворы готовили на воде, деионизированной с помощью установки Milli-Q (“Millipore”, США). ИФА проводили в 96-луночных прозрачных полистироловых микропланшетах Costar 9018 (“Corning Costar”, США).

Тестирование связывания антисывороток с СИТ.

В лунках микропланшета сорбировали по 50 мкл раствора 0.1 мкг/мл СИТ в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 0.1 М NaCl (ФБС), в течение ночи при 4°C. Затем четырехкратно отмывали микропланшет ФБС, содержащим 0.05% Тритона X-100 (ФБСТ). Далее в лунки микропланшета вносили по 50 мкл антисывороток против СИТ (интервал разведений 1 : 200—1 : 10⁷), инкубировали в течение 1 ч при 37°C, а затем четырехкратно отмывали ФБСТ и добавляли в лунки по 50 мкл антивидовых антител, меченных пероксидазой (разведение 1 : 3.000 в ФБСТ), и снова инкубировали 1 ч при 37°C. После отмывки определяли пероксидазную активность связавшейся с носителем ферментной метки. Для этого в лунки микропланшета вносили по 50 мкл раствора субстрата, инкубировали 15 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию добавлением 25 мкл 1 М H₂SO₄. Оптическую плотность (D_{450}) продукта реакции измеряли при 450 нм с использованием микропланшетного фотометра Zenyth 3100 (“Anthos Labtec Instruments”, Австрия).

Конкурентный ИФА СИТ. В лунках микропланшета сорбировали по 50 мкл раствора 0.1 мкг/мл СИТ в ФБС в течение ночи при 4°C, после чего микропланшет четырехкратно отмывали ФБСТ. Далее в лунки вносили по 25 мкл раствора СИТ (интервал концентраций от 1 мкг/мл до 10 пг/мл) или экстрактов соевых продуктов (интервал разведений от 1 : 6 до 1 : 350.000) в ФБСТ и добавляли по 25 мкл антисывороток против СИТ в разведении 1 : 15.000 в ФБСТ. Микропланшет инкубировали 1 ч при 37°C, затем четырехкратно отмывали ФБСТ, добавляли в лунки по 50 мкл антивидовых антител, меченных пероксидазой (разведение 1 : 3.000 в ФБСТ), и снова инкубировали 1 ч при 37°C. После отмывки в лунки вносили по 50 мкл раствора субстрата, инкубировали 15 мин при комнатной температуре, останавливали реакцию добавлением 25 мкл 1 М H₂SO₄ и измеряли D_{450} . Каждую пробу тестировали в трех повторностях.

Зависимости оптической плотности (y) от концентрации антигена в пробе (x) аппроксимировали 4-параметрической сигмоидной функцией $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$ с помощью программного обеспечения Origin Pro 9.0 (“OriginLab”, США). Значение параметра C соответствовало концентрации антигена, ингибирующей связывание антител на 50% (IC_{50}). Концентрацию антигена, вызывающую 10%-ное ингибирование (IC_{10}), рассчитывали.

тивали с использованием той же функции и рассматривали как предел обнаружения.

Подготовка экстрактов из соевых продуктов.

Были протестированы препараты соевого белка и соевого изолята, любезно предоставленные Н.Л. Востриковой (Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН), а также приобретенные через розничную торговую сеть. К 15 мг сухих препаратов прибавляли 1.5 мл буферного раствора и тщательно перемешивали с помощью ротационного смесителя RM-1L ("Elmi", Латвия) в течение 15–45 мин. После этого растворы центрифугировали при 12000 g 10 мин и отбирали для анализа надосадочную жидкость.

Подготовка экстрактов из мясных продуктов.

Мясные продукты (колбаса, ветчина и сардельки) покупали в розничной торговой сети. Пробы (2 г) тщательно растирали в ступке с 4 мл буферного раствора, центрифугировали при 12000 g 10 мин и отбирали для анализа надосадочную жидкость.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика антисывороток. На первом этапе работы было изучено связывание препаратов кроличьих антисывороток с СИТ, иммобилизованным в лунках микропланшета. Из 8 охарактеризованных препаратов наиболее эффективно с антигеном взаимодействовали антисыворотки 3, 5, 6 и 8, кривые титрования которых представлены на рис. 1.

Разработка методики ИФА для определения СИТ. Отобранные препараты были использованы для реализации конкурентного ИФА СИТ. Использовали разведения, найденные по кривым титрования, — 1 : 15.000 (3), 1 : 5.000 (5), 1 : 20.000 (6) и 1 : 15.000 (8).

Для этих разведений были получены концентрационные зависимости аналитического сигнала (D_{450}) в диапазоне концентраций СИТ от 5 мкг/мл до 0.03 нг/мл. Пределы обнаружения СИТ варьировали от 0.24 (антисыворотка 8) до 22.9 нг/мл (антисыворотка 6). Следует отметить, что чувствительность ИФА не коррелировала с титром антисывороток, отражающим как аффинность специфических к СИТ антител, так и их содержание в антисыворотке. В дальнейших экспериментах использовали антисыворотку 8, обеспечивающую минимальный предел обнаружения СИТ в конкурентном ИФА.

Представленный на рис. 2 эксперимент был проведен при иммобилизации в лунках микропланшета 0.1 мкг/мл СИТ. Снижение концентрации иммобилизуемого в лунках СИТ, потенциально способствующее дополнительному увеличению чувствительности анализа, существенно снижало амплитуду изменений D_{450} и, соответ-

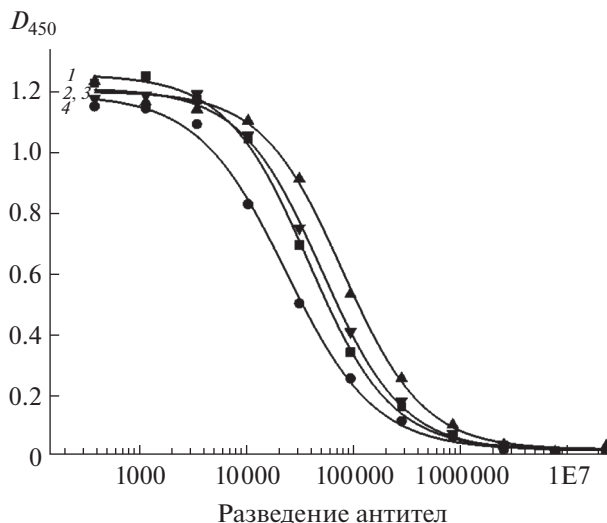


Рис. 1. Регистрация методом ИФА взаимодействия антисывороток № 3 (1), 8 (2), 6 (3) и 5 (4) с иммобилизованным СИТ в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 0.1 М NaCl и 0.05% Тритона X-100.

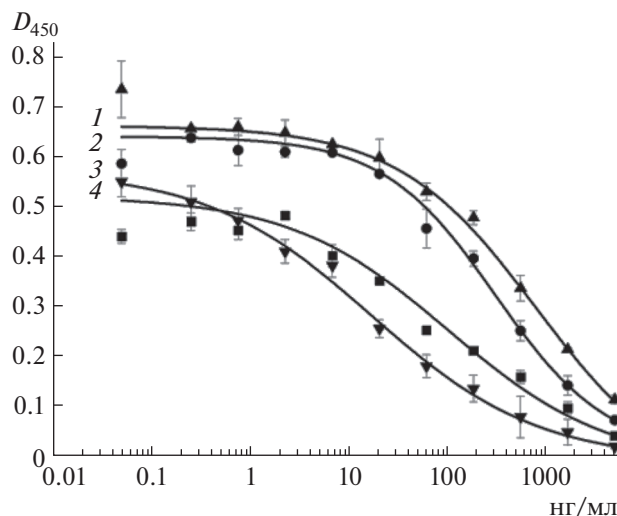


Рис. 2. Градуировочные кривые ИФА СИТ, полученные с использованием антисывороток № 3 (1), 8 (2), 6 (3) и 5 (4).

ственно, ухудшало точность определения его содержания в пробах (рис. 3).

Показано, что сокращение продолжительности конкурентной стадии (рис. 4а) и стадии взаимодействия с антивидами антителами (рис. 4б), мечеными пероксидазой, с 1 ч до 15 мин не приводило к потере чувствительности ИФА и амплитуды изменений D_{450} , что позволяло сократить продолжительность анализа с 2 ч 30 мин до 1 ч.

На рис. 5 представлен полученный в оптимизированных условиях градуировочный график за-

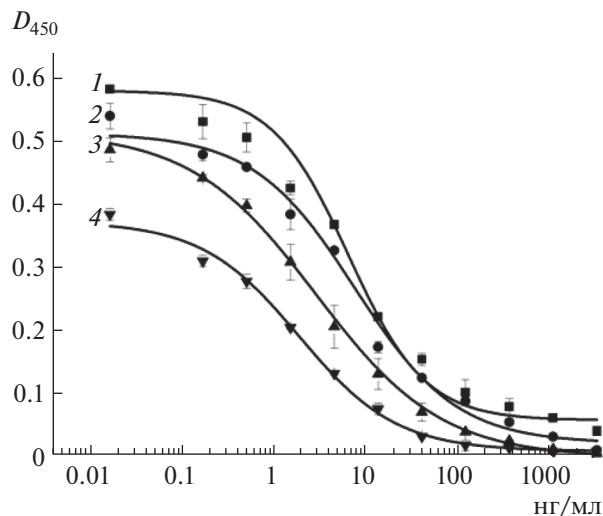


Рис. 3. Градуировочные кривые ИФА СИТ, полученные для 0.5 (1), 0.2 (2), 0.1 (3) и 0.05 (4) мкг/мл СИТ, иммобилизованных в лунках микропланшета.

зависимости оптической плотности при 450 нм от логарифма концентрации СИТ. Предел обнаружения СИТ составил 3.5 нг/мл, а диапазон определяемых концентраций — 7.7–110 нг/мл. Относительное отклонение сигнала в рабочем диапазоне анализа изменялось в интервале от 0.1 до 2.9%.

Пробоподготовка. Переход к анализу реальных проб сопряжен с необходимостью выбора режима пробоподготовки, прежде всего, состава экстрагирующего раствора, позволяющего, с одной стороны, максимально извлечь СИТ из препарата, а с другой — минимизировать влияние других компонентов матрикса на результаты ИФА. Вопросы пробоподготовки для иммуноанализа препаратов

сои неоднократно рассматривались в предыдущих работах и суммированы в сравнительных исследованиях [27, 28]. Однако вопросы о pH экстрагирующей среды и содержании в ней детергента оставались открытыми и потребовали дополнительного изучения.

Для экстракции СИТ из соевых препаратов, используемых при производстве продуктов питания (соевый изолят и соевый белок), были протестированы растворы с pH 5.0 (50 мМ ацетатный буфер), 7.4 (50 мМ ФБС) и 9.0 (50 мМ Трис-HCl).

Показано, что ФБС и Трис-HCl обладали одинаковой экстрагирующей способностью, тогда как с помощью ацетатного буфера за то же время экстрагировалось в 7–8 раз меньше иммуноактивных компонентов. Для дальнейших экспериментов был выбран ФБС, оптимальный для проведения ИФА.

Увеличение концентрации детергента Тритон X-100, добавляемого к экстрагирующему буферному раствору, в диапазоне от 0.05 до 1% не приводило к увеличению количества экстрагируемых из соевых препаратов иммуноактивных компонентов. Поэтому для дальнейшей работы использовали ФБС, содержащий 0.05% детергента.

Сравнение результатов ИФА при разной продолжительности экстракции показало, что основная часть (85–90%) белка экстрагировалась из соевых препаратов в первые 15 мин. Дальнейшее увеличение времени экстракции не приводило к существенному увеличению содержания экстрагируемого белка.

Для оценки эффективности выбранного таким образом протокола пробоподготовки были охарактеризованы результаты, получаемые при нескольких последовательных циклах экстракции.

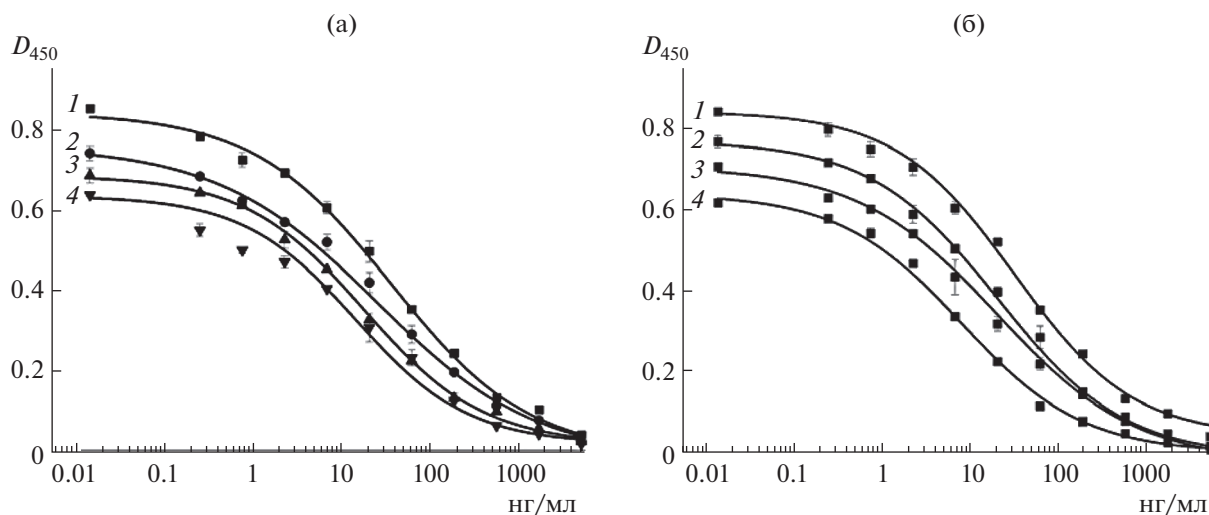


Рис. 4. Градуировочные кривые ИФА СИТ, полученные при изменении продолжительности конкурентной стадии от 60 (1), 45 (2), 30 (3) до 15 (4) мин (а) и стадии взаимодействия с мечеными антиидотипными антителами (б).

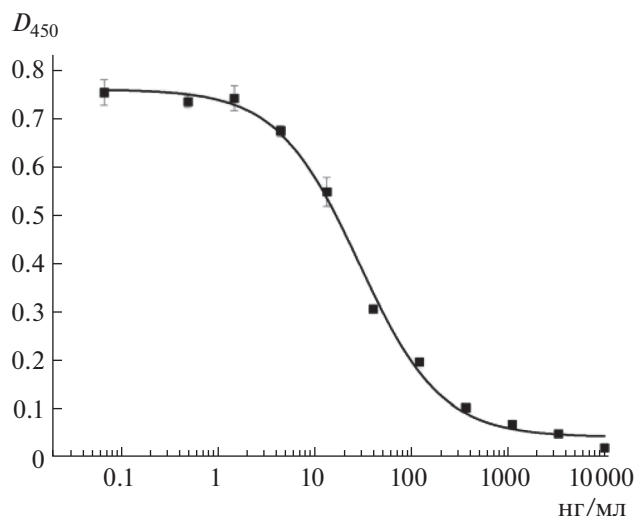


Рис. 5. Градуировочный график определения СИТ методом ИФА в ФБСТ.

После проведения первого цикла к полученному осадку добавлялась новая порция экстрагирующего буфера, смесь перемешивали, центрифугировали и отбирали супернатант, а полученный осадок подвергали очередной экстракции. При тестировании полученного ряда супернатантов методом ИФА показано, что 89.3% СИТ экстрагируется уже после первого цикла (табл. 1).

Использование разработанной методики ИФА для анализа пищевых продуктов. Разработанная методика была применена для анализа 6 препаратов сои. Для двух соевых изолятов содержание СИТ составило 309 и 137 мкг на мл экстракта, для четырех препаратов соевого протеина — 269, 154, 4.0 и 1.2 мкг на мл экстракта. Все величины, полученные методом ИФА, соответствовали данным изготовителей о номинальном содержании соевого сырья.

Разработанная методика была также применена для анализа 6 мясных продуктов. Содержание СИТ составило: для сарделек — 1.0%, для колбасы

ливерной — 0.05%, для ветчины из бедра индейки — 0.15%. В двух препаратах колбасы и препарате буженины СИТ не был выявлен. Как следует из полученных данных, несмотря на температурную и ферментативную обработки, сохранялись антигенные компоненты СИТ, которые позволили провести количественную оценку содержания соевого сырья. В отличие от соевых препаратов в данном случае достоверные сведения о составе продуктов были получены лишь для препарата колбасы, изготовленной в ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН (Москва, Россия). Тем не менее полученные результаты позволили сделать вывод как о пригодности разработанного аналитического метода, так и соответствии содержания соевого сырья в протестированных продуктах его допустимому уровню для соответствующей продукции.

Принципиальными преимуществами ИФА как средства характеристики состава пищевых продуктов являлись его малая продолжительность, производительность благодаря возможности одновременной характеристики нескольких десятков проб, доступность недорогого оборудования для проведения тестирования и регистрации результатов, автоматизация основных манипуляций и возможность количественной характеристики содержания контролируемых компонентов. Важно, что, несмотря на особенности технологии получения мясopодуков, вызывающие частичную деструкцию СИТ, сохраняющиеся антигенные детерминанты позволили осуществить достоверную иммунодетекцию.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-16-00108).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L'Hocine L., Boye J.I. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2007. V. 47. № 2. P. 127–143.
2. Choi M.S., Rhee K.C. // Med. Food. 2006. V. 9. № 1. P. 1–10.
3. He L., Han M., Qiao S., He P., Li D., Li N., Ma X. // Curr. Protein Pept. Sci. 2015. V. 16. № 7. P. 613–621.
4. Piccolo F., Vollano L., Base G., Girasole M., Smaldone G., Cortesi M.L. // Ital. J. Food Safety. 2016. V. 5. № 3(5780). P. 161–164.
5. Jiang T.L., Cai Q.F., Shen J.D., Huang M.J., Zhang L.J., Liu G.M., Cao M.J. // LWT — Food Sci. Technol. 2015. V. 64. № 1. P. 344–349.
6. Szychaj A., Pospiech E., Iwańska E., Montowska M. // J. Sci. Food Agric. 2018. V. 98. № 13. P. 4807–4815.
7. Hoffmann B., Münch S., Schwägele F., Neusüß C., Jira W. // Food Control. 2017. V. 71. P. 200–209.
8. Rosso M.L., Shang C., Edgar Correa E., Zhang B. // Crop Sci. 2018. V. 58. № 4. P. 1616–1623.
9. Espiñeira M., Santaclara F.J. // Methods Mol. Biol. 2017. V. 1620. P. 173–181.

Таблица 1. Определение СИТ с помощью разработанной методики ИФА в пробах, полученных после нескольких последовательных экстракций из соевого изолята

Цикл экстракции	СИТ	
	мкг/мл	%
1	29	89.3
2	2.7	8.3
3	0.4	1.2
4	0.3	0.9
5	0.1	0.3

10. Soares S., Amaral J.S., Oliveira M.B., Mafra I. // *Meat Sci.* 2014. V. 98. № 1. P. 41–46.
11. Costa J., Amaral J.S., Grazina L., Oliveira M.B.P.P., Mafra I. // *Food Chem.* 2017. V. 221. P. 1843–1850.
12. Woychik J.H., Happich M.C., Trinh H., Seilers R. // *J. Food Sci.* 1987. V. 52. № 6. P. 1532–1534.
13. Randulová Z., Tremlová B., Řezáčová–Lukášková Z., Pospiech M., Straka I. // *Czech J. Food Sci.* 2011. V. 29. № 4. P. 318–321.
14. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. // *TrAC Trends Anal. Chem.* V. 55. P. 81–93.
15. Alves R.C., Barroso M.F., González-García M.B., Oliveira M.B., Delerue-Matos C. // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2016. V. 56. № 14. P. 2304–2319.
16. Schubert-Ullrich P., Rudolf J., Ansari P., Galler B., Führer M., Molinelli A., Baumgartner S. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. V. 395. № 1. P. 69–81.
17. You J., Li D., Qiao S., Wang Z., He P., Ou D., Dong B. // *Food Chem.* 2008. V. 106. P. 352–360.
18. Xi J., Shi Q. // *Food Anal. Methods.* 2016. V. 9. № 11. P. 2998–3005.
19. Ma X., Sun P., He P., Han P., Wang J., Qiao S., Li D. // *Food Chem.* 2010. V. 121. P. 546–551.
20. Wang Y., Li Z., Pei Y., Li Q., Sun Y., Yang J., Yang Y., Zhi Y., Deng R., Hou Y., Hu X. // *Food Anal. Methods.* 2017. V. 10. № 7. P. 2429–2435.
21. Geng T., Liu K., Frazier R., Shi L., Bell E., Glenn K., Ward J.M. // *J. Agric. Food. Chem.* 2015. V. 63. № 20. P. 4947–4953.
22. Ueberham E., Spiegel H., Havenith H., Rautenberger P., Lidzba N., Schillberg S., Lehmann J. // *J. Agric. Food Chem.* 2019. V. 67. № 31. P. 8660–8667.
23. Wang Y., Li Y., Wu J., Pei Y., Chen X., Sun Y. // *Food Agric. Immunol.* 2019. V. 30. № 1. P. 1202–1211.
24. Wild D. *The Immunoassay Handbook*. 4th Ed. Amsterdam: Elsevier Science, 2013. 1036 p.
25. Panda R., Tetteh A.O., Pramod S.N., Goodman R.E. // *J. Agric. Food Chem.* 2015. V. 63. № 43. P. 9629–9639.
26. Cucu T., Devreese B., Kerkaert B., Rogge M., Vercruyse L., De Meulenaer B. // *Food Anal. Methods.* 2012. V. 5. № 5. P. 1121–1130.
27. Luthria D.L., John K.M.M., Marupaka R., Natarajan S. // *J. Sci. Food Agric.* 2018. V. 98. № 15. P. 5572–5580.
28. Amponsah A., Nayak B. // *J. Sci. Food Agric.* 2018. V. 98. № 6. P. 2378–2384.

Development of Immunoenzyme Assay for Detection of Soybean Raw Material in Food Products

N. I. Smirnova^a, E. A. Zvereva^a, A. V. Zherdev^a, and B. B. Dzantiev^{a,*}

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

^{*}*e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru*

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) has been developed to control the presence and estimate the content of soybean raw materials in meat food products, based on the binding of specific antibodies to antigenic determinants of a soybean trypsin inhibitor. Due to the possible influence of enzymatic and high-temperature treatments of products that can disrupt the native structure of the inhibitor and lead to its fragmentation, the analysis is based on competitive interaction with antibodies of the antigen contained in the sample and immobilized in microplate wells. The conditions to implement the ELISA were established, providing a minimum detection limit and high accuracy of measurements. The developed assay was characterized by duration of 60 min, detection limit of 3.5 ng/mL and range of detectable concentrations of 7.7–110 ng/mL. The possibility of using the proposed methodology for testing meat products was shown.

Keywords: enzyme immunoassay, soybean trypsin inhibitor, food safety, control of food composition