

СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 6, 2021

Сходство и различия в механизме антибактериального действия ионов и наночастиц серебра <i>А. Г. Хина, Ю. А. Крутяков</i>	523
Оксид азота в метаболизме грибов (обзор) <i>С. Ю. Филиппович, Г. П. Бачурина</i>	536
Идентификация стрессового белка Hli в пигмент-белковых комплексах <i>Arthrospira platensis</i> <i>Л. С. Шарапова, Н. П. Юрина</i>	549
Полимеризация (+)-катехина в глубоком эвтектическом растворителе с использованием грибной лакказы: физико-химические свойства продуктов и ингибирование α -глюкозидазы <i>М. Е. Хлупова, О. В. Морозова, И. С. Васильева, Г. П. Шумакович, Е. А. Зайцева, В. А. Чертков, А. К. Шестакова, А. И. Ярополов</i>	556
Внеклеточные высокостабильные щелочные пептидазы алкалофильных бактерий <i>Alkalicaulis satelles</i> и <i>Aliidiomarina</i> sp., перспектива их применения в составе детергентов <i>Е. В. Лаврентьева, Е. Б. Эрдынеева, Я. Е. Дунаевский, Ю. В. Болтянская, В. В. Кевбрин</i>	563
Моделирование структуры α -субъединицы бифенил диоксигеназы штаммов рода <i>Rhodococcus</i> и особенности деградации хлорированных- и гидроксильированных бифенилов при различных температурах <i>Д. О. Егорова, Т. И. Горбунова, Т. Д. Кирьянова, М. Г. Первова, Е. Г. Плотникова</i>	571
Активность метаногенных архей при компостировании органических отходов <i>В. В. Миронов, В. В. Потокина, Е. А. Бочкова, А. В. Вантеева, Н. А. Загустина, С. Н. Паршина</i>	583
Влияние бактерий <i>Bacillus subtilis</i> и сигнальных молекул на состояние про-/антиоксидантной системы и экспрессию генов защитных белков у растений картофеля при инфицировании возбудителем фитофтороза и недостатке влаги <i>Л. Г. Яруллина, В. О. Цветков, Г. Ф. Бурханова, Е. А. Черепанова, А. В. Сорокань, Е. А. Заикина, И. С. Марданишин, Ж. Н. Калацкая, Н. В. Балюк</i>	594
АФК-зависимое стресс-протекторное действие 24-эпикастерона и его моносапониата на проростки пшеницы при гипертермии <i>Р. П. Литвиновская, М. А. Шкляревский, Ю. Е. Колупаев, А. И. Кокорев, В. А. Хрипач</i>	605
Разработка иммунохроматографической тест-системы для выявления антибиотика клинафлоксацина и ее применение для контроля мёда <i>Е. А. Зверева, Д. В. Сотников, К. А. Беличенко, О. Д. Гендриксон, И. А. Шанин, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев</i>	613
Протеомная идентификация белков — потенциальных биомаркеров немясных компонентов в мясной продукции <i>Л. И. Ковалёв, М. А. Ковалёва, Л. А. Новикова, И. М. Чернуха</i>	621

CONTENTS

Vol. 57, No. 6, 2021

Similarities and Differences in the Mechanism of Antibacterial Action of Silver Ions and Nanoparticles <i>A. G. Khina and Yu. A. Krutyakov</i>	523
Nitric Oxide in Fungal Metabolism <i>S. Yu. Filippovich and G. P. Bachurina</i>	536
Identification of the Stress Protein Hli in the Pigment-Protein Complexes of <i>Arthrospira platensis</i> <i>L. S. Sharapova and N. P. Yurina</i>	549
Polymerization of (+)-Catechin in a Deep Eutectic Solvent Using a Fungal Laccase: Properties of the Products and Inhibition of α -Glucosidase <i>M. E. Khlopova, O. V. Morozova, I. S. Vasil'eva, G. P. Shumakovich, E. A. Zaitseva, V. A. Chertkov, A. K. Shestakova, and A. I. Yaropolov</i>	556
Extracellular Highly Stable Alkaline Peptidases of Alkalophilic Bacteria <i>Alkalicaulis satelles</i> G-192T and <i>Aliidiomarina</i> sp. P-156 and Their Possible Use in the Composition of Detergents <i>E. V. Lavrentyeva, E. B. Erdyneeva, Ya. E. Dunaevskii, Yu. V. Boltanskaya, and V. V. Kevbrin</i>	563
Modeling of the Biphenyl Dioxygenase α -Subunit Structure of <i>Rhodococcus</i> Strains and Features of the Destruction of Chlorinated and Hydroxylated Biphenyles at Different Temperatures <i>D. O. Egorova, T. I. Gorbunova, T. D. Kir'yanova, M. G. Pervova, and E. G. Plotnikova</i>	571
Activity of Methanogenic Archaea during Composting of Organic Waste <i>V. V. Mironov, V. V. Potokina, E. A. Botchkova, A. V. Vanteeva, N. A. Zagustina, and S. N. Parshina</i>	583
Effect of <i>Bacillus subtilis</i> Bacteria and Signaling Molecules on the State of the Pro-/Antioxidant System and Expression of Protective Protein Genes in Potato Plants in the Infection of Phytophthora <i>L. G. Yarullina, V. O. Tsvetkov, G. F. Burkhanova, E. A. Cherepanova, A. V. Sorokan, E. A. Zaikina, I. S. Mardanshin, J. N. Kalatskaya, and N. V. Balyuk</i>	594
ROS-Dependent Stress-Protective Effects of 24-Epicastasterone and Its Monosalicylate on Wheat Seedlings under Hyperthermia <i>R. P. Litvinovskaya, M. A. Shkliarevskiy, Yu. E. Kolupaev, A. I. Kokorev, and V. A. Khripach</i>	605
Development of an Immunochromatographic Test System for Detecting Antibiotic Clinafloxacin and Its Application for Honey Control <i>E. A. Zvereva, D. V. Sotnikov, K. A. Belichenko, O. D. Hendrickson, I. A. Shanin, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev</i>	613
Proteomic Identification of Proteins-Potential Biomarkers of Non-Meat Components in Meat Products <i>L. I. Kovalev, M. A. Kovaleva, L. A. Novikova, and I. M. Chernukha</i>	621

УДК 579.6

СХОДСТВО И РАЗЛИЧИЯ В МЕХАНИЗМЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ИОНОВ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

© 2021 г. А. Г. Хина¹, Ю. А. Крутяков^{1, 2, *}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 199991 Россия

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

*e-mail: yurii@petrol.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 21.04.2021 г.

После доработки 02.07.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

Рост числа клинических случаев обнаружения новых штаммов бактерий, резистентных к антибиотикам, делает необходимым поиск альтернативных путей решения проблемы множественной лекарственной устойчивости. Одним из таких путей, по крайней мере при местном применении в терапии инфекционно-осложненных поражений слизистых оболочек и кожных покровов, может стать коллоидное серебро, стабилизированное различными соединениями, в том числе проявляющими собственную биологическую активность. В представленном обзоре обобщены результаты экспериментальных исследований механизмов антибактериального действия серебра в ионной и нанодисперсной формах. При этом особое внимание уделено работам последнего десятилетия, целью которых являлось сопоставление различий в действии ионного и коллоидного серебра на молекулярном уровне. В результате проведенного анализа литературы показано, что наночастицы серебра достоверно обладают дополнительным фактором бактерицидности за счет эффективного связывания с мембраной бактерии и нарушением ее структуры, что приводит к существенному увеличению внутриклеточной концентрации ионов Ag^+ .

Ключевые слова: коллоидное серебро, наночастицы серебра, ионы серебра, бактерицидное действие, множественная лекарственная устойчивость, антибактериальный эффект, цитоплазматическая мембрана

DOI: 10.31857/S0555109921060052

Известно, что серебряные сосуды использовались для хранения и обеззараживания питьевой воды еще в античные времена [1]. В средневековые люди стали применять соединения серебра в медицине, например, кристаллический нитрат серебра (называемый тогда “лунный каустик” или “адский камень”) был очень популярен в терапии ожоговых и раневых поражений кожи, при хирургических вмешательствах, удалении кожных новообразований и др. [2]. В XIX веке области медицинского применения серебра существенно расширились — помимо хирургии, 1–2%-ные водные растворы нитрата серебра стали использовать в качестве антисептика для предотвращения гонорейной офтальмии у новорожденных [3]. Этот протокол лечения, предложенный выдающимся немецким акушером французского происхождения К. Креде, был разрешен в клиниках Германии вплоть до 1992 г. В 1897 г. его сын Б. Креде впервые предложил использовать водный раствор стабилизированного желатином коллоидного серебра (Collargol) в качестве антимикробного агента в терапии инфицированных ран вместо растворов нитрата

серебра, обладающих нежелательными побочными эффектами [4]. Максимальное распространение применение серебра и его соединения в медицинских целях, особенно в офтальмологии, урологии, гинекологии и дерматологии, получили в первые десятилетия XX века [5]. С внедрением в широкую медицинскую практику сульфонамидов в 1930 гг. и наступлением эры антибиотиков, когда в 1942 г. в США были запущены первые производственные мощности по наработке пенициллина, применение соединений на основе серебра в медицинской практике сошло на нет [2], за исключением ожоговой медицины. Действительно, сульфадиазин серебра, вошедший в медицинскую практику в 1960 гг., и по сей день считается одним из наиболее эффективных лекарственных средств в терапии ожоговых инфицированных ран. Однако, повсеместное использование антибиотиков в последней четверти XX и начале XXI в. привело к появлению больничных штаммов бактерий с лекарственной устойчивостью, в том числе к антибиотикам последнего поколения [6–10], и научный интерес к серебру вспыхнул с новой силой [11].

В результате современных исследований с помощью молекулярных методов было обнаружено, что катионы серебра обладают сильным антибактериальным эффектом за счет одновременного действия на большое количество молекулярных мишеней в бактериальной клетке, а выработка бактериями устойчивости к их действию затруднена [12, 13]. Развитие резистентности бактерий к ионному серебру хорошо задокументировано [14, 15], однако в сравнении с антибиотиками существенно затруднено в связи с одновременным действием серебра на большое число молекулярных мишеней. Катионы серебра (Ag^+) воздействуют на мембранные белки и ферменты дыхательной цепи, что приводит к образованию избыточного количества активных форм кислорода (АФК) вблизи мембраны и внутри бактериальной клетки, непосредственно связываются с ДНК, ингибируют процессы трансляции и иницируют развитие других патологических для клетки механизмов.

В свою очередь, развитие науки в области синтеза, стабилизации, химического поверхностного модифицирования и инструментальных методов исследования наноматериалов в последние 20 лет стимулировало взрывной рост числа научных работ, посвященных изучению биологической активности нанодисперсного серебра и композиционных материалов на его основе [16–21]. Оказалось, что наночастицы (НЧ) серебра обладают набором новых уникальных свойств по сравнению с ионной или макроскопической формой металла [22–24]. НЧ серебра демонстрируют высокую антибактериальную [25–31], умеренную фунгицидную [32, 33] и противовирусную [34–37] активности *in vitro* в отношении широкого спектра патогенов [38], в том числе обладающих множественной лекарственной устойчивостью [39–41]. Кроме того, в умеренных дозах НЧ серебра не проявляют выраженной острой и хронической токсичности при различных путях поступления, не обладают мутагенным, канцерогенным, нейротоксическим и эмбриотоксическим действием [42–45]. Серебро, будучи тяжелым металлом с высоким сродством к сере, не является кумулятивным ядом для теплокровных, в отличие от кадмия, ртути, свинца и других металлов. Этот факт находит объяснение в химическом сродстве серебра и меди, и наличии у эукариотических клеток теплокровных животных эффективных механизмов связывания и эффлюкса серебра с помощью специальных низкомолекулярных белков с высоким содержанием цистеина — металлотионеинов [46]. Подробно описанным в медицинской научной литературе побочным эффектом от действия на организм высоких доз серебра является аргирия — изменение цвета кожи на синий или голубовато-серый, обусловленное отложением сульфида и селенида серебра [47]. Яркие выраженные антибактериальные свойства содержащих НЧ серебра материалов позволили

им стать альтернативой антибиотикам в терапии инфицированных бактериями ран [48, 49], ожогов [50], язв и воспалений [51, 52], а также других заболеваний слизистых оболочек и кожных покровов бактериальной этиологии. Кроме того, НЧ серебра активно используют в качестве материала для покрытия медицинских изделий, например катетеров [53], в стоматологических амальгамах [54], в составе лекарственных препаратов для ветеринарного применения [55]. Помимо этого НЧ серебра на сегодняшний день являются одним из самых коммерчески успешных продуктов среди всех наноматериалов [56, 57] и используются в изготовлении широкого ассортимента товаров [58, 59], таких как косметические, дезинфицирующие и моющие средства, одежда [60], пестициды, агрохимикаты и регуляторы роста растений [61–63], упаковочные материалы для пищевой продукции [64, 65], фильтры для очистки воды [66–68], компоненты микросистемных схем и даже детских игрушек [69].

Несмотря на массовое использование НЧ серебра, до сих пор продолжают дискуссии о механизме их антибактериального действия [70, 71]. В частности, ведутся споры о наличии или отсутствии у НЧ серебра уникальных, не связанных с генерацией Ag^+ , механизмов действия на бактерии [23]. Целью настоящего обзора стало сравнение молекулярных механизмов, лежащих в основе воздействия Ag^+ и НЧ серебра на бактерии. Выводы о таких механизмах во многом стали возможны, в том числе, благодаря широкому использованию транскриптомных и протеомных методов исследования последних лет.

МЕХАНИЗМ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ Ag^+

Катионы серебра, являясь кислотой Льюиса, обладают химическим сродством к основаниям Льюиса — молекулам и группам, способным выступать донорами электронных пар. По этой причине азот-, фосфор- и серосодержащие группы, присутствующие в структурных элементах клеточной мембраны бактерий — белков, ферментов, фосфолипидов и др., могут стать центрами электрофильной атаки ионами Ag^+ . Так, было показано, что ионы серебра способны практически необратимо связываться с тиол-содержащими цистеином [72] и глутатионом [73, 74], а также флавиновыми группами [75], являющимися компонентами мембранных белков. Воздействуя на мембранные белки электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) [76], катионы серебра нарушают их уникальную трехмерную структуру, выводят из строя активные центры, препятствуя протеканию мембранного фосфорилирования — важной составляющей метаболизма бактериальной клетки, в том числе процесса синтеза АТФ. Другим след-

ствием воздействия ионов серебра на белки цитоплазматической мембраны (ЦПМ), является увеличение ее проницаемости, в результате чего происходит значительный приток протонов из внешней среды в цитоплазматическое пространство, что приводит к коллапсу протонной движущей силы [77], необходимой для осуществления трансмембранного транспорта. Помимо этого, падение градиента концентрации протонов приводит бактериальную клетку к необходимости выводить большее число протонов через дыхательную цепь, что вызывает стимуляцию дыхания и разобщение дыхательной цепи (независимость дыхания от синтеза АТФ) [78].

Описанные нарушения в транспортной и метаболической функциях бактериальных клеток, препятствующие протеканию анаболических процессов, а также изменения в структуре белков ЦПМ, приводят к невозможности поддержания бактериальной клеткой целостности структуры своей оболочки. С помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показано, что воздействие ионов серебра на грамположительные и грамотрицательные бактерии приводит к нарушениям целостности мембраны [79], повреждениям в клеточной стенке, ее отслоению от цитоплазматической мембраны. Помимо этого, наблюдаются снижение и гетерогенность электронной плотности в цитоплазме, а также лизис.

Антибактериальная активность ионов серебра обусловлена не только действием на мембранные белки и ферменты, но и внутриклеточным воздействием. В исследовании [12] методом ПЭМ совместно с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией среза клетки бактерии показано, что ионы серебра способны проникать внутрь клетки без повреждения клеточной мембраны. В случае действия на грамотрицательные бактерии, имеющие две клеточные мембраны — внешнюю (ВМ) и цитоплазматическую, это происходит в две стадии. Показано, что ионы серебра проникают через ВМ, проходя через расположенные в ней порины, являющиеся структурными элементами каналов пассивного транспорта, не обладающие высокой селективностью. Например, *Escherichia coli* K12 (грамотрицательная бактерия с устойчивостью к серебру, являющаяся по этой причине модельным объектом во многих микробиологических экспериментах с ним) обладает поринами, как минимум, двух типов (OmpC и OmpF) с диаметром пор, превышающим размер ионов серебра [80]. Это позволяет Ag^+ проникать в периплазматическое пространство бактериальной клетки. Механизм переноса ионов серебра через ЦПМ исследован мало, однако, есть основания полагать, что это происходит через активные транспортеры ионов Cu^+ , изоэлектронных Ag^+ . Медь — жизненно важный

микроэлемент, являющийся кофактором многих ферментов, необходимых для протекания процессов электронного транспорта, дыхания, а также участвующий в реакциях восстановления [81]. В то же время, окислительный потенциал меди может являться причиной серьезных повреждений бактериальной клетки за счет образования избыточного количества АФК при нарушениях регуляции концентрации этого элемента. В связи с этим, концентрация меди в цитоплазме тщательно регулируется бактериальными клетками [82]. На схожесть путей поступления ионов серебра и меди внутрь бактериальной клетки указывают результаты работы [83], в которой описываются механизмы эффлюкса ионов серебра и меди у грамотрицательных бактерий, а также способность эукариотических клеток поглощать Ag^+ через медный CTR1 транспортер [84]. Потенциальными кандидатами на роль импортера меди в бактериальных клетках могут быть белки, кодируемые генами *ccoA* и *hmtA*. Ген *ccoA* кодирует транспортный белок из суперсемейства MFS (major facilitator superfamily), содержащий несколько мотивов, аналогичных присутствующим в медных импортерах CTR-типа у эукариот [85, 86]. HmtA является АТФ-азой Р-типа, обеспечивающей транспорт тяжелых металлов, в частности меди и цинка, что подтверждается увеличением устойчивости бактерий к действию этих металлов при делеции соответствующего гена [87].

Попадая внутрь бактериальной клетки, серебро потенциально может взаимодействовать с огромным количеством биологических мишеней — белков [72], ферментов [76], нуклеозидов и нуклеотидов [88], РНК и ДНК [89], что, в свою очередь, может влиять на протекание многих жизненно важных для клетки процессов. Например, в исследовании [12] с помощью двумерного электрофореза и масс-спектрометрии МАЛДИ было показано, что при действии на *E. coli* ионов серебра, происходит снижение экспрессии S2 белка 30S субъединицы рибосом, играющей важнейшую роль в биосинтезе белков. Предполагается, что это вызвано денатурацией рибосом ионами серебра. В свою очередь, снижение экспрессии белка S2 вызывало снижение экспрессии других белков и ферментов, например, CoA сукцинил-синтазы, катализирующего внутриклеточное производство АТФ. В другой работе было обнаружено, что попавшие внутрь бактериальной клетки ионы серебра нарушают процессы образования дисульфидных S—S связей в белках [90]. Важным этапом в углублении понимания антимикробного внутриклеточного механизма действия ионов Ag стала работа [91]. В ней, с помощью изотермического калориметрического титрования было показано, что ионы серебра и ДНК взаимодействуют напрямую. Для изучения механизма взаимодействия ДНК и Ag^+ авторы исследования использо-

вали недавно разработанный метод изогнутых молекул ДНК [92]. В этом методе две отдельные нити ДНК разной длины (45 и 30 оснований) образуют кольцевую изогнутую молекулу, что создает несколько экспериментальных преимуществ. Во-первых, напряжения в полученной таким образом ДНК, вызванные изгибом одного из двух сегментов, делают молекулу более склонной к взаимодействию с другими веществами, что упрощает обнаружение этих взаимодействий. Во-вторых, так как гистонотипные H-NS белки связываются с изогнутой ДНК, способствуя соединению ее цепей [93], изогнутая ДНК может моделировать естественную ДНК, с которой связываются H-NS белки в живых бактериях, более эффективно, чем линейная ДНК. При исследовании изогнутой молекулы ДНК методом гель-электрофореза, после ее обработки Ag^+ , наблюдалось уменьшение интенсивности полосы изогнутой ДНК и появление полосы, соответствующей одноцепочечной ДНК состоящей из 45 оснований, что позволяет утверждать что ионы Ag^+ приводят к дегибридации кольцевой изогнутой ДНК. Также, в этой работе с использованием метода фотоактивированной локализационной микроскопии с отслеживанием отдельных частиц (sptPALM) было обнаружено, что действие ионов серебра на живые бактерии приводит к увеличению подвижности гистонотипного белка (H-NS protein). Данный белок является важнейшим для жизнедеятельности бактерии, так как регулирует экспрессию многих генов [94, 95], обеспечивает плотную упаковку ДНК [96, 97] и влияет на клеточную защиту от АФК [98]. С помощью анализа сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) было показано, что увеличение скорости диффузии этого белка вызвано ослаблением его связывания с ДНК при действии на систему ионов серебра. Таким образом, было подтверждено, что ионы серебра способны воздействовать на процессы экспрессии генов за счет нарушения структуры ДНК, а также препятствуя ее связыванию с H-NS белками.

Другим механизмом внутриклеточного антибактериального действия ионов серебра является окислительный стресс, вызываемый увеличением концентрации АФК в цитоплазме, что приводит к клеточным повреждениям [99]. В частности, известно, что генерация АФК приводит к повреждению белков, липидов и ДНК [100].

Установлено несколько механизмов генерации АФК в бактериях при действии на них Ag^+ . Во-первых, как было указано ранее, ионы серебра воздействуют на мембранные ферменты ЭТЦ, что препятствует нормальному переносу электронов к субстрату. В частности, известно, что ионы серебра нарушают работу тиоредоксиновой (Trx) и глутатионовой (GSH) редокс-систем [101, 102]. Вероятно, это происходит за счет действия Ag^+ на

тиоредоксинредуктазы (TrxR) [103] и глутатионредуктазы (GR) [104], осуществляющие перенос электронов от НАДФ к субстратам. Так как основной функцией этих тиол-содержащих антиокислительных систем является поглощение АФК для поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза и защита клетки от окислительного стресса, а нарушения в них приводят к неспособности клетки своевременно обезвреживать вновь сгенерированные АФК и, следовательно, их накоплению [105]. Во-вторых, так как АФК являются естественным продуктом дыхания бактерий, его стимуляция, вызванная упомянутой выше потерей трансмембранного градиента концентрации протонов [106], также может приводить к увеличению их концентрации. В-третьих, установлено, что действие Ag^+ вызывает протекание в цитоплазматическом пространстве реакции Фентона — катализируемого ионами железа(II) разложения пероксида водорода на гидроксильный и гидропероксильный радикалы ($\text{HO}\cdot$ и $\text{HO}\text{O}\cdot$, соответственно). В работе [90] показано, что это происходит за счет прямого действия Ag^+ на Fe—S кластеры, присутствующие в большом количестве в ферментах дыхательной цепи, и приводит к увеличению концентрации ионов Fe^{2+} в цитоплазме. Кроме того, существует еще непрямой механизм разрушения Fe—S кластеров за счет действия на них АФК, таких как супероксид-анион и пероксид водорода [76, 90], в результате чего, генерация АФК может приобрести автокаталитический характер.

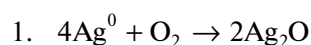
Таким образом, ионы серебра способны оказывать комплексное, многоуровневое действие на бактерии. Однако, встает вопрос о величине вклада того или иного механизма в суммарный антибактериальный эффект. В работе [76] было показано, что антибактериальная активность Ag^+ не снижалась при добавлении в систему эквимольного количества ДНК или не содержащей серу аминокислоты (глутамата). Напротив, эквимольные количества цистеина, содержащего тиольные группы, полностью лишают Ag^+ бактерицидных свойств. Таким образом, по данным исследования, именно тиольные группы, являются основными мишенями бактерицидной активности. Это, в свою очередь, может указывать на то, что действие ионов серебра на мембранные ферменты ЭТЦ, содержащие данные группы в большом количестве, является основным фактором их токсического действия. С другой стороны, в работе [106] с помощью вольт-амперометрического измерения скорости изменения концентрации ионов серебра в растворе при взаимодействии Ag^+ с живыми и мертвыми бактериальными клетками, показано, что лишь 40% взаимодействующего с бактериями серебра остается связанным на клеточной мембране, 60% же проникает в цитоплазму, что может говорить о

существенном вкладе внутриклеточных факторов токсичности Ag^+ в их общую антибактериальную активность. Остается не до конца ясным и вклад в антибактериальное действие окислительного стресса. Несмотря на то, что механизм генерации АФК всесторонне изучен, так как именно их действием обусловлена антибактериальная активность многих антибиотиков [107], проведено сравнительно немного исследований, подтверждающих бактерицидные свойства АФК, сгенерированных внутри бактериальной клетки при действии на нее ионов серебра. Одним из них стало исследование [108], в котором с помощью измерения антибактериальной активности ионов серебра, а также измерения активности супероксид-сенсорного белка SoxR при действии Ag^+ на бактерии в аэробных и анаэробных условиях, было показано, что бактерицидное действие ионов серебра на *E. coli* и *Staphylococcus aureus* практически наполовину обусловлено действием именно окислительного стресса. Таким образом, было установлено, что важнейшим фактором для проявления окислительного стресса является доступ кислорода к клеткам бактерий. Данный факт, а также несколько противоречивые результаты описанных экспериментов, могут говорить о том, что ключевая стадия антибактериального действия ионов серебра значительно зависит от условий эксперимента.

Подводя итог, можно сказать, что ионы серебра способны оказывать губительное действие на многие жизненно важные системы бактериальной клетки. За счет связывания с мембранными белками и ферментами они вызывают резкое падение мембранного потенциала, нарушают нормальную работу ЭТЦ. Помимо этого, ионы серебра проникают внутрь бактериальной клетки, где взаимодействуют с ДНК и белковыми субъединицами рибосом, что приводит к нарушениям в экспрессии генов. В свою очередь, описанные нарушения жизненно важных для бактериальной клетки процессов приводят к невозможности поддержания клеточной структуры и вызывают морфологические изменения: нарушение целостности мембраны, ее отслоение от клеточной стенки. Кроме того, стимуляция дыхания, вызванная воздействием ионов серебра, их взаимодействие с ферментами ЭТЦ и высвобождение ионов Fe^{2+} приводит к генерации АФК внутри бактериальной клетки, что вызывает окислительные повреждения. Представляется, что критическая стадия антибактериального действия ионов серебра определяется набором условий: видом бактерий, концентрацией ионов серебра, типом питательной среды, присутствием/отсутствием достаточного количества питательных веществ, наличием хелатирующих серебро соединений и др.

Механизм антибактериального действия НЧ серебра. Антибактериальное действие НЧ серебра

тесно связано с описанным выше антибактериальным действием ионов серебра, выделяющимися в две стадии с поверхности НЧ [109–111]. На первой стадии металлическое серебро окисляется под действием растворенного в среде кислорода, а на второй происходит растворение образовавшегося основного оксида в кислой среде [112]. Данный процесс окислительного растворения можно представить следующими уравнениями химических реакций:



Выделяющиеся с поверхности НЧ серебра ионы аналогично ионам Ag^+ , образующимся в результате диссоциации в воде неорганических солей серебра, действуют на тиольные группы мембранных белков и ферментов [113], увеличивая проницаемость мембраны и нейтрализуя ее заряд [114], проникают внутрь бактериальной клетки [115, 116], вызывают окислительный стресс [113, 117–119], а также повреждения в ДНК [120], что приводит к морфологическим изменениям в бактериальной клетке – дезорганизации мембраны [121], отслоению клеточной стенки, лизису [122], и, в конечном итоге, ее гибели.

Необходимость окисления НЧ серебра с выделением ионов Ag^+ для проявления ими антибактериальной активности была показана в работах [123, 124]. В этих работах синтезированные и испытанные в анаэробных условиях (и, потому, не способные к окислительному растворению) НЧ серебра, не проявляли антибактериальной активности. При этом, антибактериальные свойства проявлялись этими же НЧ при наличии доступа к кислороду воздуха.

Однако в ряде исследований [115, 116, 125] обнаружено, что равновесная концентрация ионов серебра, образующихся в результате высвобождения с поверхности НЧ при наличии у дисперсий ингибирующего действия на бактерии, много меньше ингибирующей концентрации ионов серебра при действии на бактерии AgNO_3 (табл. 1). Это свидетельствует о существовании альтернативного, специфического для НЧ серебра механизма антибактериального действия. В попытках установить такие механизмы было обнаружено, что некоторые НЧ серебра способны связываться с бактериальной мембраной [30]. Это может происходить за счет сродства НЧ к серосодержащим белкам внешней мембраны и электростатического притяжения между положительно заряженными ионами Ag^+ , адсорбирующихся на поверхности НЧ [112], и отрицательно заряженной мембраной бактериальной клетки [126]. При этом, связанные с поверхностью НЧ серебра нарушают структуру мембраны [30]. Кроме того, можно по-

Таблица 1. Концентрация ионов Ag^+ в питательной среде и внутри клетки при воздействии на бактерии AgNO_3 и НЧ серебра в ингибирующих рост концентрациях

Вид бактерии	Метод оценки антибактериальной активности	Форма серебра	Концентрация Ag^+ в питательной среде, мг/л	Внутриклеточная концентрация Ag^+ , мг/л	Ссылка
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EC20	AgNO_3	107.1	—	[125]
		Наночастицы (45 нм; стабилизатор — цитрат)	<0.20	—	
<i>E. coli</i>	Анализ кривых роста числа КОЕ	AgNO_3	3–9	—	[116]
		Наночастицы (142 нм; без стабилизатора)	0.440	—	
<i>E. coli</i>	IC50	AgNO_3	2	2	[115]
		Наночастицы (9.1 нм; стабилизатор — цитрат)	0.49	1.52	
		Наночастицы (17.9 нм; стабилизатор — поливинилпирролидон)	0.242	2.1	
		Наночастицы (23.3 нм; стабилизатор — полиэтиленмин)	0.59	2.4	

лагать, что адгезия НЧ серебра к поверхности мембраны может увеличивать локальную концентрацию ионов Ag^+ , а также ускорять переход НЧ в ионную форму за счет кислой среды, обусловленной трансмембранным градиентом концентрации протонов и необходимой на стадии растворения Ag_2O . Совокупность этих факторов приводит к повышенному притоку ионов Ag^+ в цитоплазматическое пространство клетки, создавая дополнительный фактор токсичности НЧ серебра (рис. 1), что и было показано в работе [115] с помощью измерения концентрации ионов Ag^+ внутри бактериальной клетки и в питательной среде (табл. 1).

В некоторых работах заявлено о другом специфическом механизме действия НЧ серебра, связанном с их непосредственным проникновением внутрь живой бактериальной клетки. Данное явление описано при действии НЧ серебра как на грамположительные [127, 128], так и на и грамотрицательные [129] виды. Однако, в исследованиях наличие НЧ внутри клетки обнаруживалось с помощью двумерных проекций ПЭМ, что оставляет возможность неправильной трактовки результатов. Кроме того, неверно интерпретировано как присутствие наноматериала внутри клетки [130] может быть и уранилацетатное окрашивание, наблюдаемое в виде электронно-плотного вещества [130]. Для решения этой проблемы, в работе [131] исследования ПЭМ проводились совместно с элементным анализом. В результате, было обнаружено, что НЧ серебра диаметром 10–50 нм

не проникают в грамотрицательные *E. coli*. Напротив, в работе [132] с помощью тех же методов обнаружено, что НЧ диаметром 4–10 нм способны проникать в грамотрицательные *Nitrosomonas europaea*, хотя и в ограниченном количестве. Также наличие небольших (до 10 нм) НЧ было обнаружено внутри различных грамотрицательных бактерий с помощью анализа элементного картирования с использованием рентгеновской энергодисперсионной спектроскопии (EDS) в ПЭМ [30]. Кроме того, авторы последнего из приведенных исследований показали, что только связанные с поверхностью мембраны НЧ серебра способны проникать внутрь бактериальной клетки. В работах [115, 116] НЧ относительно больших размеров также не были обнаружены внутри бактериальных клеток. Исходя из представленных экспериментальных данных, был предложен возможный механизм проникновения НЧ серебра внутрь клетки: адгезия НЧ к поверхности мембраны вызывает изменения в ее морфологии, влияет на нормальную работу трансмембранного транспорта, увеличивает проницаемость, что, в свою очередь, может привести к поглощению НЧ. Однако, в таком случае встает вопрос о важности проникновения НЧ внутрь бактериальной клетки с точки зрения проявления ими антибактериальной активности. У прокариотических клеток отсутствуют механизмы поглощения больших НЧ, а если проникновение происходит за счет пассивной диффузии НЧ через разрушенную мембрану, то это говорит о том, что данная бактериальная клетка уже подверглась необратимым изменениям в структуре,

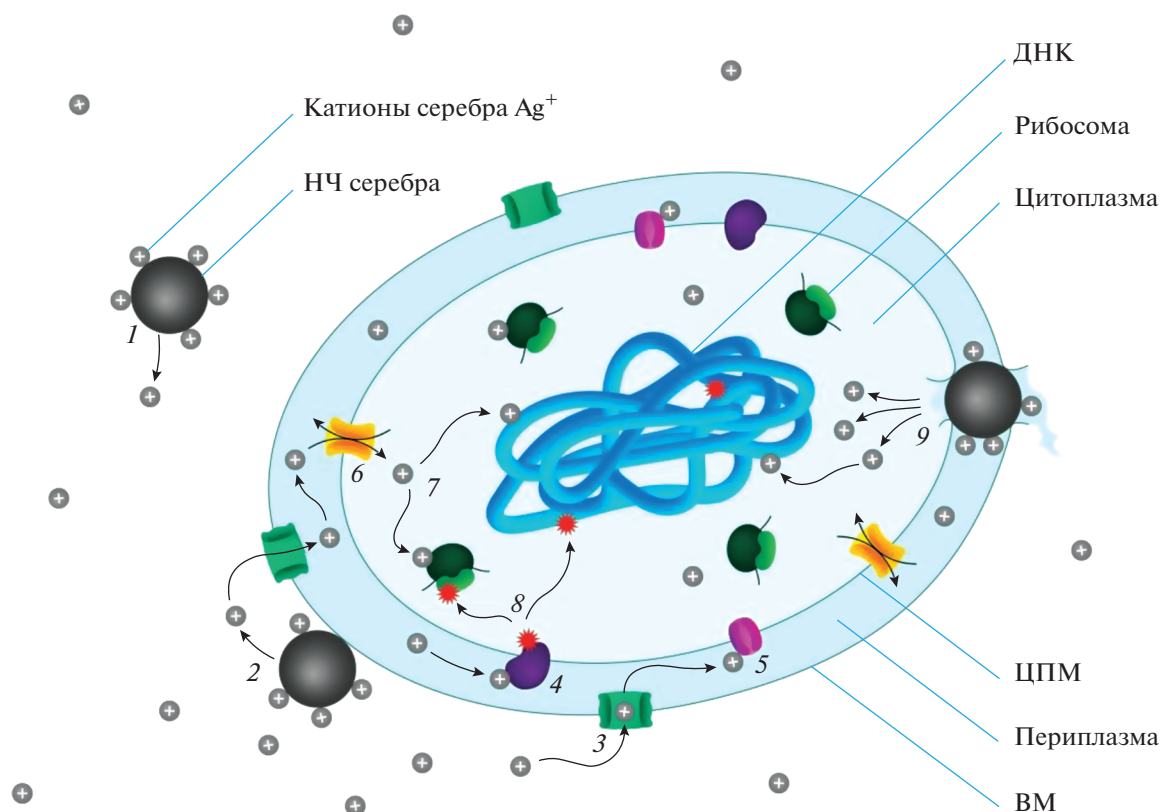


Рис. 1 Схематическое изображение антибактериального действия НЧ серебра на примере грамотрицательной бактерии: 1 – окислительное растворение НЧ серебра, приводящее к образованию ионов Ag^+ в окружающем клетку пространстве; 2 – адгезия НЧ серебра к мембране; 3 – проникновение ионов Ag^+ в периплазматическое пространство через порины; 4 – воздействие Ag^+ на ферменты ЭТЦ, приводящее к нарушениям метаболизма и генерации АФК; 5 – воздействие Ag^+ на белки ЦПМ, вызывающее нарушения транспортной функции клетки; 6 – проникновение Ag^+ в цитоплазму через активные транспортеры Cu^+ ; 7 – воздействие Ag^+ на внутриклеточные компоненты, такие как рибосомы и ДНК, вызывающее нарушения в процессе экспрессии генов; 8 – окисление внутриклеточных компонентов бактерии образовавшимися АФК; 9 – нарушения в структуре мембраны бактерии, возникшие в результате адгезии к ней НЧ серебра и приводящие к увеличению внутриклеточной концентрации Ag^+ и утечке внутриклеточных компонентов.

лизису, и ее жизнеспособность представляется маловероятной. Таким образом, можно полагать, что проникновение НЧ серебра внутрь бактериальной клетки существенно затруднено, а если оно и возможно, то его вклад в антибактериальную активность представляется весьма спорным.

Механизмы антибактериального действия НЧ серебра были изучены и подтверждены с помощью протеомных и транскриптомных исследований в двух пионерских работах Маккуиллана с соавт. [116, 133]. В них методом ПЦР в реальном времени показано, что обе формы серебра воздействуют на системы гомеостаза меди, что объясняется схожестью путей метаболизма ионов меди и серебра. Кроме того, с помощью технологии ДНК-микрочипа, позволяющей оценивать экспрессию генов, был изучен полный транскриптомный ответ *E. coli* K12 на действие $AgNO_3$ и НЧ серебра. Было подтверждено, что обе формы серебра воздействуют на *E. coli* K12 за счет нарушения трехмерной

структуры белков, а также окислительного стресса. В частности, наибольший ответ был зарегистрирован в регуляции генов, ответственных за контроль денатурации белков, наблюдалось повышение регуляции генов системы *saxRS* (защита от окислительного стресса и поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза), а также *isc* и *suf* (кодируют белки, участвующие в сборке железо-серных кластеров). В то же время наблюдалось снижение регуляции генов трансляции, что объясняется вызываемыми действием Ag^+ нарушениями процессов экспрессии генов и необходимостью клетки выработать адаптивный ответ, прежде чем использовать ресурсы для биосинтеза новых белковых молекул. Схожие данные были получены при исследовании ответа на действие НЧ серебра других видов бактерий. Например, в работе [134] методом количественного протеомного анализа показано, что действие НЧ серебра на *Pseudomonas aeruginosa* также приводит к увеличению

экспрессии генов, отвечающих за уменьшение окислительного стресса и снижению регуляции генов, кодирующих белки, необходимые для осуществления метаболических процессов и биосинтеза сложных макромолекул, а также структурных составляющих рибосом. В другой работе [135] механизмы действия НЧ серебра исследовались методами секвенирования РНК и количественного ПЦР с обратной транскрипцией. В нем в качестве объекта для изучения была выбрана грамотрицательная бактерия *Klebsiella pneumoniae* MGH78578, принадлежащая к семейству *Enterobacteriaceae* и обладающая множественной лекарственной устойчивостью. Как и в упомянутых ранее работах, наблюдалась активация систем, отвечающих за поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза. В частности, наблюдалось увеличение экспрессии генов систем *soxS* и *oxyR* — двух главных транскрипционных факторов, отвечающих за окислительный стресс в *Enterobacteriaceae*. Кроме того, наблюдалось значительное увеличение экспрессии системы эффлюкса ионов серебра *silCFBA*, кодирующей трехкомпонентный *SilCBA* эффлюксный СВА транспортер и мембранную эффлюксную АТФ-азу Р-типа *SilP* [14, 15], что объясняется попыткой бактерии вывести токсичные ионы серебра из цитоплазматического пространства.

Транскриптомные и протеомные исследования также позволили сопоставить между собой клеточные ответы бактерий на воздействие ионной и нанодисперсной форм серебра, что позволило обнаружить некоторые различия в механизмах их антибактериального действия. В работе [116] было показано, что ионы Ag^+ в большей степени регулируют экспрессию генов, кодирующих биосинтез поринов, а НЧ — системы эффлюкса, что указывает на различные пути транспорта ионов Ag^+ внутрь бактериальной клетки при действии этих двух форм. В работе [133] следствием специфического действия НЧ, но не ионов серебра, на *E. coli* K12 являлось снижение регуляции генов биосинтеза липидов и жирных кислот, являющихся компонентами мембраны, что может служить подтверждением факта специфического действия НЧ на мембрану, обусловленного их адгезией к ее поверхности. Кроме того, НЧ сильнее воздействовали на регуляцию белков, ответственных за внутриклеточные процессы трансляции, в то время как ионная форма серебра активнее влияла на регуляцию транспортных мембранных белков. Данный факт позволяет выдвинуть предположение, что нанодисперсная форма серебра сильнее влияет на внутриклеточные процессы в бактериальной клетке, в то время как действие ионной формы в основном обусловлено воздействием на мембранные белки и ферменты. Подтверждением данной гипотезы является работа [125], в которой был изучен протеомный ответ

Pseudomonas sp. M1 на воздействие НЧ и ионов серебра. Как и в работе [133], было обнаружено, что НЧ сильнее влияют на внутриклеточный процесс трансляции, что отражается в увеличении количества белков, входящих в структуру рибосом и/или связывающихся с РНК. В свою очередь, ионы Ag^+ активнее влияли на трансмембранный транспорт, что выражалось в увеличении количества белков ЦПМ, поринов и других белков внешней мембраны, а также на процессы денатурации белков. Кроме того, исследование активности антиоксидантных ферментов, показало, что она возрастала сильнее под действием Ag^+ , чем НЧ, что также косвенно подтверждает ранее высказанное предположение о том, что Ag^+ более активно воздействуют на мембранные белки, в том числе ферменты ЭТЦ.

В другой важной работе [115] для определения физиологических путей воздействия НЧ и ионов серебра на бактерии, была исследована полнотная библиотека *E. coli*, состоящая примерно из 4000 мутантов, каждый с делецией одного определенного гена. Как и в работах Маккуиллана с соавт., среди генов, экспрессия которых играет существенную роль при воздействии обеих форм серебра, было большое количество генов, участвующих в регуляции гомеостаза меди. В частности, мутанты с делецией генов *cueR* (кодирует Cu^+ -зависимый транскриптомный регулятор) и *cusS* (являющийся частью двухкомпонентной регуляторной системы, ответственной за экспрессию *cueR*) оказывались более чувствительными ко всем формам серебра, что, вероятно, связано с их ограниченными возможностями эффлюкса токсичных ионов Ag^+ из цитоплазмы. К увеличению восприимчивости к обеим формам серебра также приводила делеция генов *katE* (кодирует каталазу, индуцируемую при высоких уровнях концентрации пероксида) и *resA* (индуцируется повреждениями ДНК), что подтвердило ранее описанный механизм индуцирования ионами серебра окислительного стресса в бактериальной клетке, который приводит к повреждениям ДНК. Кроме того, среди генов, отсутствие которых приводит к увеличению чувствительности фенотипа к любой форме серебра, были обнаружены некоторые гены, кодирующие биосинтез белков, связанных с внутренней мембраной. Специфичным для НЧ было увеличение эффективности их действия на бактерии с делецией генов, ответственных за синтез липополисахаридов. Вероятно, это связано с упрощением адгезии НЧ к бактериям, неспособным создать защитный липополисахаридный слой на своей поверхности, что, в свою очередь, приводит к увеличению токсичности НЧ за счет повреждений мембраны и увеличения внутриклеточной концентрации ионов серебра. К тому же, авторы работы отмечают, что различные НЧ

(с различающимися размерами частиц и зарядом поверхности) имели различную активность в отношении бактерий с делецией того или иного гена, что говорит о различиях в механизме антибактериального действия НЧ серебра с различными физико-химическими параметрами.

Перспективными с точки зрения изучения механизмов антибактериального действия различных соединений, в том числе серебра, представляются развивающиеся в последние годы хеометрические исследования, связанные с анализом большого количества экспериментальных данных [136]. В качестве примера можно привести работу [137], в которой изучение механизма действия НЧ серебра в отношении *E. coli* было выполнено комбинированием методов ИК-спектроскопии и хеометрических исследований. В частности, проводилось сравнение характерных областей ИК-спектра поглощения *E. coli*, подвергшихся воздействию НЧ серебра, и четырех классов антибиотиков с известным механизмом антибактериального действия методами математической обработки и классификации данных, такими как, разведочный и кластерный анализ [136]. По результатам исследования, наибольшее сходство со спектром поглощения *E. coli*, подвергшихся воздействию НЧ серебра имели спектры поглощения бактерий, подвергшихся воздействию сульфадиазина. Механизм действия сульфадиазина заключается в ингибировании фермента дигидроптероатсинтазы, отвечающего за каталитическое образование фолиевой кислоты – ключевого предшественника в синтезе ДНК у бактерий [138]. Полученные данные могут быть дополнительным косвенным подтверждением установленного ранее внутриклеточного механизма воздействия НЧ серебра на ДНК как ключевой мишени их антибактериального действия, хотя его пути, вероятно, отличаются от путей воздействия сульфадиазина. В другой упоминаемой ранее работе [135] сравнение механизмов НЧ серебра и различных антибиотиков было выполнено с помощью сопоставления паттернов транскриптомного ответа при их действии на *K. pneumoniae* MGH78578. По результатам исследования наибольшая схожесть в изменении регуляции генов проявляется при действии НЧ серебра и триклозана. Триклозан является антимикробным агентом широкого спектра действия, который воздействует на бактерии за счет подавления синтеза жирных кислот [139]. О наличии схожего механизма воздействия у НЧ серебра говорит и значительное снижение в регуляции генов *fabA/H/D/G/F/B*, ответственных за биосинтез жирных кислот, установленное в этой же работе. Примечательно, что аналогичные данные были получены в работе [133] при изучении транскриптомного ответа *E. coli* K12 на действие НЧ серебра, но не AgNO_3 , что косвенно подтвердило специфичность взаимодействия нанодис-

персного серебра с мембраной бактерии, по сравнению с ионной формой этого металла. При этом, данный механизм вносит существенный вклад в общий антибактериальный эффект, что подтверждает выполненное в [135] исследование действия НЧ серебра на *K. pneumoniae* MGH78578 *soxS* с ослабленной возможностью ответа на окислительный стресс. В нем было показано, что изменения в гене *soxS*, отвечающего за защиту от окислительного стресса, не приводят к значительному уменьшению минимальной ингибирующей концентрации НЧ серебра. Это, в свою очередь, указывает на то, что окислительный стресс не вносит решающего вклада в антибактериальный эффект. Последний, очевидно, обусловлен сочетанием как окислительного стресса, так и специфичного только для НЧ серебра ингибирования биосинтеза жирных кислот.

В обзоре после рассмотрения основных механизмов биологического действия ионов серебра на бактериальные клетки, проведен сравнительный анализ экспериментальных данных, полученных в результате транскриптомных и протеомных исследований последних лет, целью которых являлось установление различий в механизмах антибактериальной активности ионов и НЧ серебра. Действительно, НЧ оказывают свое ключевое воздействие за счет ионов Ag^+ , выделяющихся с их поверхности при окислении серебра как в окружающей среде, так и в непосредственной близости к клеточной мембране. Однако НЧ являются не только резервуаром ионного серебра, но и проявляют специфический механизм его доставки внутрь бактериальной клетки. Ассоциируясь с мембраной, вызывая нарушения ее структуры, а также увеличивая локальную концентрацию ионов Ag^+ , НЧ увеличивают внутриклеточную концентрацию Ag^+ , что делает именно ее, а не концентрацию Ag^+ в окружающей клетку среде, основным фактором токсичности НЧ серебра. По этой причине, хотя основные мишени в бактериальной клетке для ионов и НЧ серебра совпадают, НЧ влияют, в первую очередь, на внутриклеточные процессы, такие как трансляция и синтез необходимых для поддержания жизнедеятельности биомолекул, например, жирных кислот. Ионная же форма серебра более активно воздействует на мембранные белки и ферменты, нарушая нормальную работу электронно-транспортной цепи, трансмембранного транспорта, вызывая окислительный стресс и препятствуя метаболизму бактерий.

Не до конца выясненными остаются вопросы, связанные с величиной вклада той или иной стадии механизма воздействия серебра в суммарный антибактериальный эффект и ее зависимости от внешних факторов, в частности типа используемого стабилизатора НЧ. В свете продолжающегося поиска новых антибактериальных агентов, эти

вопросы представляются нам весьма актуальными и заслуживающими дальнейшего развития, поскольку гибкое регулирование коллоидно-химических свойств НЧ и связанное с этим изменение ключевой стадии их действия на бактерии потенциально может привести к созданию новых классов антимикробных препаратов, выработка лекарственной устойчивости бактериями к действию которых будет существенно затруднена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Russell A.D., Hugo W.B. // *Prog. Med. Chem.* 1994. V. 31. № 1. P. 351–370.
2. Klasen H.J. // *Burns*. 2000. V. 26. № 2. P. 117–130.
3. Credé C. // *Arch. Gynak.* 1881. V. 17. № 1. P. 50–53.
4. Alexander J.W. // *Surg. Infect.* 2009. V. 10. № 3. P. 289–292.
5. Krutyakov Y.A., Kudrinskiy A.A., Kuzmin V.A., Pyee J., Gusev A.A., Vasyukova I.A., Zakharova O.V., Lisichkin G.V. // *Nanomaterials*. 2021. V. 11. № 2. P. 332–344.
6. Truszczyński M., Posyniak A., Pejsak Z. // *Med. Wet.* 2013. V. 69. № 3. P. 131–135.
7. Weese J.S. // *Vet. Rec.* 2001. V. 169. № 5. P. 122–123.
8. von Samson-Himmelstjerna G., Blackhall W. // *Vet. Parasitol.* 2005. V. 132. № 2. P. 223–239.
9. Morley P.S., Apley M.D., Besser T.E., Burney D.P., Fedorka-Cray P.J., Papich M.G., Traub-Dargatz J.L., Weese J.S. // *J. Vet. Intern. Med.* 2005. V. 19. № 4. P. 617–629.
10. Persoons D., Van Hoorebeke S., Hermans K., Butaye P., de Kruif A., Haesebrouck F., Dewulf J. // *Emerg. Infect. Dis.* 2009. V. 15. № 3. P. 452–453.
11. Klasen H.J. // *Burns*. 2000. V. 26. № 2. P. 131–138.
12. Yamana M., Hara K., Kudo J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 11. P. 7589–7593.
13. Mijndonckx K., Leys N., Mahillon J., Silver S., Van Houdt R. // *Biomaterials*. 2013. V. 26. № 4. P. 609–621.
14. Silver S. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2003. V. 27. № 2. P. 341–353.
15. Silver S., Phung T., Silver G. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 33. № 7. P. 627–34.
16. Sánchez-López E., Gomes D., Esteruelas G., Bonilla L., Lopez-Machado A.L., Galindo R., Cano A., Espina M., Ettcheto M., Camins A., Silva A.M., Durazzo A., Santini A., Garcia M.L., Souto E.B. // *Nanomaterials (Basel)*. 2020. V. 10. № 2. <https://doi.org/10.3390/nano10020292>
17. Makvandi P., Wang C., Zare E.N., Borzacchiello A., Niu L., Tay F.R. // *Advanced Functional Materials*. 2020. V. 30. № 22. Article № 1910021. <https://doi.org/10.1002/adfm.201910021>
18. Khan I., Saeed K., Khan I. // *Arab. J. Chem.* 2019. V. 12. № 7. P. 908–931.
19. Lee S.H., Jun B.H. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 4. <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>
20. Roy A., Bulut O., Some S., Mandal A., Yilmaz M.D. // *RSC Advances*. 2019. V. 9. P. 2673–2702.
21. Kudrinskiy A., Zharebin P., Gusev A., Shapoval O., Pyee J., Lisichkin G., Krutyakov Y. // *Nanomaterials (Basel)*. 2020. V. 10. № 8. <https://doi.org/10.3390/nano10081459>
22. Chernousova S., Eppe M. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2013. V. 52. № 6. P. 1636–1653.
23. Kędziora A., Speruda M., Krzyżewska E., Rybka J., Łukowiak A., Bugla-Płoskońska G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 2. <https://doi.org/10.3390/ijms19020444>
24. Rai M., Yadav A., Gade A. // *Biotechnol. Adv.* 2009. V. 27. № 1. P. 76–83.
25. Yousaf H., Mehmood A., Ahmad K.S., Raffi M. // *Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications*. 2020. V. 112. Article № 110901.
26. Shu M., He F., Li Z., Zhu X., Ma Y., Zhou Z., Yang Z., Gao F., Zeng M. // *Nanoscale Res. Lett.* 2020. V. 15. № 1. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3244-z>
27. Crisan C.M., Mocan T., Manolea M., Lasca L.I., Tăbăran F.A., Mocan L. // *Applied Sciences*. 2021. V. 11. № 3. Article № 1120.
28. Agnihotri S., Mukherji S., Mukherji S. // *Nanoscale*. 2013. V. 5. № 16. P. 7328–7340.
29. Radzig M.A., Nadtochenko V.A., Koksharova O.A., Kiwi J., Lipasova V.A., Khmel I.A. // *Colloids. Surf. B: Biointerfaces*. 2013. V. 102. P. 300–306.
30. Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramírez J.T., Yacaman M.J. // *Nanotechnology*. 2005. V. 16. № 10. P. 2346–2353.
31. Sondi I., Salopek-Sondi B. // *J. Colloid. Interface. Sci.* 2004. V. 275. № 1. P. 177–182.
32. Mondal A., Chowdhury S., Mondal N.K. et al. // *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2021. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03181-w>
33. Kora A.J., Mounika J., Jagadeeshwar R. // *Fungal Biol.* 2020. V. 124. № 7. P. 671–681.
34. Salleh A., Naomi R., Utami N.D., Mohammad A.W., Mahmoudi E., Mustafa N., Fauzi M.B. // *Nanomaterials (Basel)*. 2020. V. 10. № 8. Article № 1566.
35. Teirumnieks E., Balchev I., Ghalot R.S., Lazov L. // *Laser Physics*. 2020. V. 31. № 1. Article № 013001.
36. Lu L., Sun R.W., Chen R., Hui C.K., Ho C.M., Luk J.M., Lau G.K., Che C.M. // *Antivir. Ther.* 2008. V. 13. № 2. P. 253–262.
37. Rogers J.V., Parkinson C.V., Choi Y.W., Speshock J.L., Hussain S.M. // *Nanoscale Res. Lett.* 2008. V. 3. № 4. P. 129–133.
38. Lara H.H., Garza-Treviño E.N., Ixtapan-Turrent L., Singh D.K. // *J. Nanobiotechnology*. 2011. V. 9. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-30>
39. D’Lima L., Phadke M., Ashok V. // *New J. Chemistry*. 2020. V. 44. № 12. P. 4935–4941.
40. Shirzadi-Ahodashi M., Hashemi Z., Mortazavi Y., Khormali, K., Mortazavi-Derazkola S., Ebrahimzadeh M.A. // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2021. V. 617. Article № 126383.
41. Rai M.K., Deshmukh S.D., Ingle A.P., Gade A.K. // *J. Appl. Microbiol.* 2012. V. 112. № 5. P. 841–852.
42. Wang S.H., Chen C.C., Lee C.H., Chen X.A., Chang T.Y., Cheng Y.C., Young J.J., Lu J.J. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 143. P. 724–731.
43. Lansdown A.B. // *Toxicol.* 2007. V. 37. № 3. P. 237–50.
44. Lansdown A.B. // *Adv. Pharmacol. Sci.* 2010. V. 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/910686>

45. Wijnhoven S.W.P., Peijnenburg W., Herberts C.A., Hagens W.I., Oomen A.G., Heugens E.H.W., Roszek B., Bisschops J., Gossens I., van De Meent D., Dekkers S., Dejong W.H., van Zijverden M., Sips A., Geertsma R.E. // *J. Nanotoxicology*. 2009. V. 3. № 2. P. 109–138.
46. Sacký J., Leonhardt T., Borovička J., Gryndler M., Briksí A., Kotrba P. // *Fungal Genet. Biol.* 2014. V. 67. P. 3–14.
47. Chang A.L., Khosravi V., Egbert B.A. // *J. Cutan. Pathol.* 2006. V. 33 № 12. P. 809–811.
48. Ahmed M.K., Zayed M.A., El-Dek S.I., Hady M.A., El Sherbiny D.H., Uskoković V. // *Bioact. Mater.* 2021. V. 6. № 7. P. 2070–2088.
49. Mishra M., Kumar H., Tripathi K. // *Digest J. Nanomaterials and Biostructures*. 2008. V. 3. № 2. P. 49–54.
50. Atiyeh B.S., Costagliola M., Hayek S.N., Dibo S.A. // *Burns*. 2007. V. 33. № 2. P. 139–148.
51. Nadworny P.L., Wang J.F., Tredget E.E., Burrell R.E. // *J. Inflamm.* 2010. V. 7. № 1. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-13>
52. Boucher W., Stern J.M., Kotsinyan V., Kempuraj D., Papaliodis D., Cohen M.S., Theoharides T.C. // *J. Urology*. 2008. V. 179. № 4. P. 1598–1602.
53. Chen X., Schluesener H.J. // *Toxicol. Lett.* 2008. V. 176. № 1. P. 1–12.
54. Yin I.X., Zhang J., Zhao I.S., Mei M.L., Li Q., Chu C.H. // *Int. J. Nanomedicine*. 2020. V. 15. P. 2555–2562.
55. Krutyakov Yu., Klimov A., Violin B., Kuzmin V., Ryzhikh V., Gusev A., Zakharova O., Lisichkin G. // *Europ. J. Nanomed.* 2016. V. 8. № 4. P. 185–194.
56. Salata O. // *J. Nanobiotechnology*. 2004. V. 2. № 1. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-3>
57. Nowack B., Krug H.F., Height M. // *Environ. Sci. Technol.* 2011. V. 45. № 4. P. 1177–1183.
58. Kudrinskiy A.A., Krutyakov Yu.A., Olenin A.Yu., Romanovskaya G.I., Vasilyeva S.Yu., Lisichkin G.V. // *J. Fluorescence*. 2009. V. 19. № 3. P. 473–478.
59. Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Луничкин Г.В. // *Успехи химии*. 2008. Т. 77. № 3. С. 242–269
60. Quadros M.E., Marr L.C. // *Environ. Sci. Technol.* 2011. V. 45. № 24. P. 10713–10719.
61. Zhao L., Lu L., Wang A., Zhang H., Huang M., Wu H., Xing B., Wang Z., Ji R. // *J. Agric. Food Chem.* 2020. V. 68. № 7. P. 1935–1947.
62. Kutuzova I.A., Kokaeva L.Y., Pobendinskaya M.A., Krutyakov Y.A., Skolotneva E.S., Chudinova E.M., Elatsky S.N. // *J. Plant. Path.* 2017. V. 99. № 3. P. 635–642.
63. Gusev A.A., Kudrinsky A.A., Zakharova O.V., Klimov A.I., Zhrebina P.M., Lisichkin G.V., Vasyukova I.A., Denisov A.N., Krutyakov Y.A. // *Mater. Sci. Eng. C: Mater. Biol. Appl.* 2016. V. 62. P. 152–159.
64. He Y., Li H., Fei X., Peng L. // *Carbohydr. Polym.* 2021. V. 252. Article № 117156.
65. Edwards-Jones V. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2009. V. 49. № 2. P. 147–152.
66. Qumar U., Hassan J., Naz S., Haider A., Raza A., Ul-Hamid A., Haider J., Shahzadi I., Ahmad I., Ikram M. // *Nanotechnology*. 2021. V. 32. № 25. Article № 255704.
67. Gangadharan D., Harshvardan K., Gnanasekar G., Dixit D., Popat K.M., Anand P.S. // *Water Res.* 2010. V. 44. № 18. P. 5481–5487.
68. Krutyakov Y.A., Zhrebina P.M., Kudrinskiy A.A., Zubavichus Y.V., Presniakov M.Y., Yapyrintsev A.D., Karabitsva A.V., Mikhaylov D.M., Lisichkin G.V. // *J. Physics D – Applied Physics*. 2016. V. 49. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/37/375501>
69. Marambio-Jones C., Hoek E.M.V. // *J. Nanopart.* 2010. V. 12. P. 1531–1551.
70. Durán N., Durán M., de Jesus M.B., Seabra A.B., Fátima W.J., Nakazato G. // *Nanomedicine*. 2016. V. 12. № 3. P. 789–799.
71. Krutyakov Yu.A., Kudrinskiy A.A., Zhrebina P.M., Lisichkin G.V. // *J. Nanoparticle Research*. 2019. V. 21. № 4. Article № 69.
72. Liao S.Y., Read D.C., Pugh W.J., Furr J.R., Russell A.D. // *Lett. Appl. Microbiol.* 1997. V. 25. № 4. P. 279–283.
73. Masip L., Veeravalli K., Georgiou G. // *Antioxid. Redox. Signal.* 2006 V. 8. № 5. P. 753–762.
74. Fenoglio I., Corazzari I., Francia C., Bodoardo S., Fubini B. // *Free Radic. Res.* 2008. V. 42. № 8. P. 437–745.
75. Zeiri L., Bronk B.V., Shabtai Y., Eichler J., Efrima S. // *Appl. Spectrosc.* 2004. V. 58 № 1. P. 33–40.
76. Gordon O., Vig Slenters T., Brunetto P.S., Villaruz A.E., Sturdevant D.E., Otto M., Landmann R., Fromm K.M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. V. 54. № 10. P. 4208–4218.
77. Dibrov P., Dzioba J., Gosink K.K., Häse C.C. // *Antimicrob Agents Chemother.* 2002. V. 46. № 8. P. 2668–2670.
78. Yudkin J. // *Enzymologia*. 1937. V. 2. P. 161–170.
79. Jung W.K., Koo H.C., Kim K.W., Shin S., Kim S.H., Park Y.H. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. P. 2171–2178.
80. Nikaido H. // *J. Bacteriology*. 1999. V. 181. № 1. P. 4–8.
81. Silva J.J.R.F.D., Williams R.J.P. *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*. N.Y.: Oxford University Press, 1991. 561 p.
82. Argüello J.M., Raimunda D., Padilla-Benavides T. // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2013. V. 5. № 3. Article № 73.
83. Chacón K.N., Mealman T.D., McEvoy M.M., Blackburn N.J. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2014. V. 111. № 43. P. 15373–15378.
84. Bertinato J., Cheung L., Hoque R., Plouffe L.J. // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2010. V. 24. № 3. P. 178–84.
85. Puig S., Lee J., Lau M., Thiele D.J. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 29. P. 26021–26030.
86. Eisses J.F., Kaplan J.H. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 44. P. 37159–37168.
87. Lewinson O., Lee A.T., Rees D.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009. V. 106. № 12. P. 4677–4682.
88. Tu A.T., Reinoso J.A. // *Biochemistry*. 1966. V. 5. № 10. P. 3375–3383.
89. Arakawa H., Neault J.F., Tajmir-Riahi H.A. // *Biophys J.* 2001. V. 81. № 3. P. 1580–1587.
90. Morones-Ramirez J.R., Winkler J.A., Spina C.S., Collins J.J. // *Sci. Transl. Med.* 2013. V. 5. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006276>
91. Sadoon A.A., Khadka P., Freeland J., Gundampati R.K., Manso R.H., Ruiz M., Krishnamurthi V.R., Thallapuranam S.K., Chen J., Wang Y. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2020. V. 86. № 6. <https://doi.org/10.1128/AEM.02479-19>

92. *Freeland J., Khadka P., Wang Y.* // *Phys. Rev. E.* 2018. V. 98. № 6. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.98.062403>
93. *Sonnenfeld J.M., Burns C.M., Higgins C.F., Hinton J.C.* // *Biochimie.* 2001. V. 83. № 2. P. 243–249.
94. *Dorman C.J.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2004. V. 2. № 5. P. 391–400.
95. *Gao Y., Foo Y.H., Winardhi R.S., Tang Q., Yan J., Kenney L.J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017. V. 114. № 47. P. 12560–12565.
96. *Dame R.T., Wyman C., Goosen N.* // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. № 18. P. 3504–3510.
97. *Winardhi R.S., Yan J., Kenney L.J.* // *Biophys. J.* 2015. V. 109. № 7. P. 1321–1329.
98. *Gérard F., Dri A.M., Moreau P.L.* // *Microbiology.* 1999. V. 145. № 7. P. 1547–1562.
99. *Sies H.* // *Exp. Physiol.* 1997. V. 82. № 2. P. 291–295.
100. *Cabiscol E., Tamarit J., Ros J.* // *Int. Microbiol.* 2000. V. 3. № 1. P. 3–8.
101. *Zou L., Lu J., Wang J., Ren X., Zhang L., Gao Y., Rottenberg M.E., Holmgren A.* // *EMBO Mol. Med.* 2017. V. 9. № 8. P. 1165–1178.
102. *Zou L., Wang J., Gao Y., Ren X., Rottenberg M.E., Lu J., Holmgren A.* // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29313-w>
103. *Holmgren A., Björnstedt M.* // *Methods Enzymol.* 1995. V. 252. P. 199–208.
104. *Lillig C.H., Holmgren A.* // *Antioxid. Redox. Signal.* 2007. V. 9. № 1. P. 25–47.
105. *Messner K.R., Imlay J.A.* // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 15. P. 10119–10128.
106. *Holt K.B., Bard A.J.* // *Biochemistry.* 2005. V. 44. № 39. P. 13214–13223.
107. *Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J.* // *Cell.* 2007. V. 130. № 5. P. 797–810.
108. *Park H.J., Kim J.Y., Kim J., Lee J.H., Hahn J.S., Gu M.B., Yoon J.* // *Water Res.* 2009. V. 43. № 4. P. 1027–1032.
109. *Matai I., Sachdev A., Dubey P., Kumar S.U., Bhushan B., Gopinath P.* // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2014. V. 115. P. 359–367.
110. *Smetana A.B., Klabunde K.J., Marchin G.R., Sorensen C.M.* // *Langmuir.* 2008. V. 24. № 14. P. 7457–7464.
111. *Klimov A.I., Zhrebina P.M., Gusev A.A., Kudrinskiy A.A., Krutyakov Y.A.* // *IOP Conf. Ser.: Materials Science and Engineering.* 2015. V. 98. № 012034. P. 1–9.
112. *Liu J., Hurt R.H.* // *Environ. Sci. Technol.* 2010. V. 44. № 6. P. 2169–2175.
113. *Hwang E.T., Lee J.H., Chae Y.J., Kim Y.S., Kim B.C., Sang B.I., Gu M.B.* // *Small.* 2008. V. 6. P. 746–750.
114. *Ramalingam B., Parandhaman T., Das S.K.* // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016. V. 8. № 7. P. 4963–4976.
115. *Ivask A., Elbadawy A., Kaweeteerawat C., Boren D., Fischer H., Ji Z., Chang C.H., Liu R., Tolaymat T., Telesca D., Zink J.I., Cohen Y., Holden P.A., Godwin H.A.* // *ACS Nano.* 2014. V. 8. № 1. P. 374–386.
116. *McQuillan J.S., Infante H.G., Stokes E., Shaw A.M.* // *Nanotoxicology.* 2012. V. 6. № 8. P. 857–866.
117. *Adeyemi O.S., Shittu E.O., Akpor O.B., Rotimi D., Batiha G.E.* // *EXCLI J.* 2020. V. 19. P. 492–500.
118. *Xu H., Qu F., Xu H., Lai W., Andrew Wang Y., Aguilar Z.P., Wei H.* // *Biomaterials.* 2012. V. 25. № 1. P. 45–53.
119. *Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J., Kim S.H., Park Y.K., Park Y.H., Hwang C.Y., Kim Y.K., Lee Y.S., Jeong D.H., Cho M.H.* // *Nanomedicine.* 2007. V. 3. № 1. P. 95–101.
120. *Vishnupriya S., Chaudhari K., Jagannathan R., Pradeep T.* // *Particle & Particle Systems Characterization.* 2013. V. 30. № 12. P. 1056–1062.
121. *Akter S., Huq M.A.* // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2020. V. 48. № 1. P. 672–682.
122. *Du J., Hu Z., Dong W., Wang Y., Wu S., Bai Y.* // *Microchemical J.* 2019. V. 147. P. 333–338.
123. *Xiu Z.M., Ma J., Alvarez P.J.* // *Environ. Sci. Technol.* 2011. V. 45. № 20. P. 9003–9008.
124. *Xiu Z.M., Zhang Q.B., Puppala H.L., Colvin V.L., Alvarez P.J.* // *Nano Lett.* 2012. V. 12. № 8. P. 4271–4275.
125. *Barros D., Pradhan A., Mendes V.M., Manadas B., Santos P.M., Pascoal C., Cassio F.* // *Env. Science-Nano.* 2019. V. 6. № 4. P. 1207–1218.
126. *Abbaszadegan A., Ghahramani Y., Gholami A., Hemmateenejad B., Dorostkar S., Nabavizadeh M.* // *J. Nanomaterials.* 2015. V. 2015. Article № 720654.
127. *Dror-Ehre A., Mamane H., Belenkova T., Markovich G., Adin A.* // *J. Colloid Interface Sci.* 2009. V. 339. № 2. P. 521–526.
128. *Habash M.B., Park A.J., Vis E.C., Harris R.J., Khursigara C.M.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014. V. 58. № 10. P. 5818–5830.
129. *Mirzajani F., Ghassempour A., Aliahmadi A., Esmaeili M.A.* // *Res. Microbiol.* 2011. V. 162. № 5. P. 542–549.
130. *Brandenberger C., Clift M.J., Vanhecke D., Mühlfeld C., Stone V., Gehr P., Rothen-Rutishauser B.* // *Part. Fibre Toxicol.* 2010. V. 7. № 15. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-15>
131. *Chamakura K., Perez-Ballesteros R., Luo Z., Bashir S., Liu J.* // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2011. V. 84. № 1. P. 88–96.
132. *Yuan Z., Li J., Cui L., Xu B., Zhang H., Yu C.P.* // *Chemosphere.* 2013. V. 90. № 4. P. 1404–1411.
133. *McQuillan J.S., Shaw A.M.* // *Nanotoxicology.* 2014. V. 1. P. 177–84.
134. *Lia S.J., Zhang, Y.P., Pan X.H., Zhu F.Z., Jiang C.Y., Liu Q.Q., Cheng Z.Y., Dai G., Wu G.J., Wang L.Q., Chen L.Y.* // *International J. Nanomedicine.* 2019. V. 14. P. 1469–1487.
135. *Pareek V., Devineau S., Sivasankaran S.K., Bhargava A., Panwar J., Srikumar S., Fanning S.* // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Article № 638640.
136. *Brereton R.G., Jansen J., Lopes J., Marini F., Pomerantsev A., Rodionova O., Roger J.M., Walczak B., Tauler R.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2018. V. 410. P. 6691–6704.
137. *Neves A.C.O., Viana A.D., Menezes F.G., Neto A.O.W., Melo M.C.N., Gasparotto L.* // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 2021. V. 253. Article № 119558.
138. *Li P., Wu L., Li B., Zhao Y., Qu P.* // *Mater. Sci. Eng.* 2016. V. 60. P. 54–59.
139. *McMurry L.M., Oethinger M., Levy S.B.* // *Nature.* 1998. V. 394. № 6693. P. 531–532.

Similarities and Differences in the Mechanism of Antibacterial Action of Silver Ions and Nanoparticles

A. G. Khina^a and Yu. A. Krutyakov^{a, b, *}

^a*Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, 119991 Russia*

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

**e-mail: yurii@petrol.chem.msu.ru*

The rising number of clinical cases which reveal the new antibiotic resistant strains of bacteria makes it necessary to search for alternative ways to solve the problem of multi-drug resistance. Use of colloidal silver stabilized with different compounds, including those showing their own biological activity, is a promising approach to solve the antimicrobial resistance problem, at least when it is applied topically in the treatment of infectious-complicated lesions of the mucous membranes and skin. This review summarizes the results of experimental studies of the mechanisms of the antibacterial action of silver in the ionic and nanodispersed forms, paying special attention to the articles of the last decade that focus on the differences in the action of ionic and colloidal silver at the molecular level. It is shown that silver nanoparticles certainly possess additional bactericidal qualities due to effective binding to the bacterial membrane and rupture of its structure, which leads to a significant increase in the intracellular concentration of Ag⁺ ions.

Keywords: Colloidal silver, silver nanoparticles, silver ions, antimicrobial resistance, multidrug resistance, antibacterial effect, bacterial membrane

УДК 577.21

ОКСИД АЗОТА В МЕТАБОЛИЗМЕ ГРИБОВ (ОБЗОР)

© 2021 г. С. Ю. Филиппович¹ *, Г. П. Бачурина¹

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

*e-mail: syf55@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.06.2021 г.

После доработки 21.06.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

В обзоре суммированы последние данные об идентификации и синтезе оксида азота у грибов, а также механизмах действия NO у этих организмов, которые включают S-нитрозилирование и нитрование остатков аминокислот, инициирование разрывов ДНК, транскрипционную активацию генов и цГМФ-зависимый сигнальный путь. Особое внимание уделено NO-зависимой регуляции таких процессов как апоптоз и различные стрессовые ответы, прорастание спор, рост мицелия и дифференцировка грибов.

Ключевые слова: оксид азота, метаболизм грибов, дифференцировка, стресс, NO-синтаза, нитратредуктаза

DOI: 10.31857/S0555109921060039

Оксид азота — соединение, которое легко диффундирует через клеточные мембраны и обладает высокой реакционной способностью. Время полужизни молекулы внутри клеток составляет от 3 до 30 с в зависимости от начальной концентрации, а затем в присутствии воды и кислорода она превращается в нитрат и нитрит. Регулирующий эффект NO реализуется, прежде всего, в непосредственной близости от места его происхождения. Действие NO может изменяться в зависимости от концентрации — при низких концентрациях (несколько микромолей/кг ткани) соединение функционирует как сигнальная молекула, в более высоких концентрациях действует как защитный агент или токсический продукт окислительного метаболизма.

NO является медиатором, регулирующим целый ряд физиологических процессов у организмов, принадлежащих к разным таксономическим группам. У человека и животных NO участвует в функционировании и образовании кровеносных сосудов, гормональной регуляции, работе иммунной системы и нейротрансмиссии [1, 2]. У высших растений NO влияет на прорастание семян, созревание плодов, работу устьиц, развитие корневой системы, цветение, защиту от патогенов и апоптоз [3]. У бактерий NO участвует в регуляции денитрификации, вирулентности, подвижности, а также в образовании биопленок, восстановлении повреждений, вызванных УФ-радиацией, поглощении железа и адаптации к окислительному стрессу [4, 5]. Гораздо меньше изучена роль NO в

метаболизме грибов, но в последнее время число публикаций, посвященных этой теме, возросло [6–8].

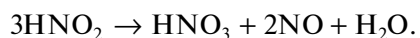
ИДЕНТИФИКАЦИЯ NO У ГРИБОВ

Образование NO в митохондриях [9] или клетках [10] дрожжей можно исследовать методами амперометрии, с использованием NO-чувствительного электрода Кларка, однако этот метод не получил широкого распространения для других грибов.

Для идентификации и функциональной оценки эндогенного оксида азота в клетках грибов применяют методы с использованием различных флуоресцентных индикаторов — 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифлуоресцеин диацетата (DAF-FM DA) [11–16] и диаминородамина (DAR-4M) [17]. Флуоресцентный краситель DAF-FM очень чувствителен к NO (предел обнаружения — 3 нМ), а DAF-FM DA способен пассивно диффундировать через клеточные мембраны и, проникнув в клетку, превращается эстеразами в DAF-FM [18].

Эффект, наблюдаемый после добавления доноров оксида азота, а также ингибиторов NO-синтазы млекопитающих и скавенджеров NO, является показателем синтеза оксида азота в клетках грибов [11–13, 19–22]. В качестве соединений, генерирующих оксид азота в растворах (доноров NO), используют молсидомин [23], нитропруссид натрия (SNP) [12, 20, 21, 24–26], S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин (SNAP) [25], S-нитрозоцистеин

(SNC) [27], S-нитрозо-N-ацетилцистеин (SNAC) [27], S-нитрозоглутатион (GSNO) [27–29], диэтилентриамин (DETA) [30], 2,2-(гидроксиинитрозо-гидразино)-бисэтанамином [31] и диэтилентриамин-NO-ат [32]. При низких значениях pH донором NO может служить нитрит натрия, при этом нитрозирующим агентом является протонированная азотистая кислота (pK_a 3.4) [27]:



NO доноры — гетерогенная группа молекул, способная выделять NO или его производные, такие как нитроксильный анион или катион нитрозония. Учитывая тот факт, что многие NO доноры в определенных концентрациях нетоксичны для клеток млекопитающих, в последнее время для борьбы с микотоксинами и токсикогенными грибами внимание исследователей привлекли наноматериалы, выделяющие это соединение [33]. Применение оксида азота в комбинации с наночастицами повышает стабильность, улучшает адресную доставку и контролируемое и долгосрочное высвобождение NO [34].

Для ингибирования NO-синтазной активности, ответственной за реакцию взаимодействия кислорода и L-аргинина с образованием оксида азота и L-цитруллина, у грибов применяют нитро-L-аргинин [11, 21, 29], метил-L-аргинин ацетат (L-NMMA) [11], аминоксидин [20, 36], метиловый эфир N-нитро-L-аргинина (L-NAME) [10, 12, 20, 35], L-N6-(1-иминоэтил)-лизин (L-NIL) [35], 1-[2-(трифтор-метил)фенил]имидазол (TRIM) [13]. Сквавенджерами NO могут служить оксигемоглобин Fe(II) [27] и 2-(4-карбоксифенил)-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксид (сРТИО) [16, 36, 37].

УЧАСТИЕ NO В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ У ГРИБОВ

Апоптоз и стресс. Избыточное количество оксида азота может привести к повреждению клеток и вызвать апоптоз. Получены свидетельства об участии NO в апоптозе, индуцированном пероксидом водорода, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [10, 38]. Для этого же гриба показано, что NO в низких концентрациях оказывает цитопротекторный эффект при стрессе, вызванном повышением температуры или гидростатического давления [39]. В условиях гипоксии митохондрии *S. cerevisiae* способны к NO₂-зависимому синтезу NO при участии флавогемоглобина YNб и цитохром-с-оксидазы [9], причем изоформы последнего фермента по-разному влияют на продукцию NO в зависимости от концентрации кислорода [40]. Получены также данные, свидетельствующие о синтезе NO из Arg в клетках этих дрожжей в ответ на тепловой стресс [41].

NO способен защитить клетки шампиньона двуспорового *Agaricus bisporus* от окислительного стресса [31]. Обработка донором NO, 2,2-(гидроксиинитрозогидразино)-бисэтанамином, уменьшала окислительное повреждение в собранных плодовых телах. При этом NO снижает содержание супероксид-радикала и H₂O₂, ингибирует полифенолоксидазу и активирует такие антиокислительные ферменты как каталаза, супероксиддисмутаза и аскорбатпероксидаза.

При тепловом стрессе оксид азота эффективно уменьшает окислительное повреждение в мицелии вешенки степной *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* [14] и *Trichoderma harzianum* LTR-2 [37]. Обнаружено также при данном виде стресса увеличение экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока, у *Ganoderma oregonense* [42].

NO может служить регулятором метаболизма металлов у грибов, причем его действие зависит от концентрации соединения. NO в низких концентрациях защищает клетки *S. cerevisiae* от токсичности ионов Cu²⁺, однако при обработке высокими концентрациями NO наблюдали противоположный эффект [43]. При этом происходило изменение активности Cu-зависимого фактора транскрипции Ace1, что может свидетельствовать об участии оксида азота в метаболизме Cu у этого гриба. При добавлении NO к мицелию *P. eryngii*, обработанному высокими концентрациями Cd²⁺, отмечено увеличение биомассы [44]. На основании анализа секвенирования РНК установлено, что увеличение толерантности к кадмию обусловлено активацией ряда оксидоредуктаз, дегидрогеназ, трансфераз и транскрипционных факторов в присутствии экзогенного NO. Защитный эффект оксида азота от токсичного Cd²⁺ выявлен также у трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* [45]. В мицелии этого гриба под действием кадмия образуются H₂O₂ и O₂⁻, а также запускается перекисное окисление липидов. Однако обработка 100 мМ SNP (донор NO) предотвращает эти процессы и активирует пероксидазу и каталазу.

Показано, что в условиях нитрозативного стресса, вызванного присутствием NO, выделяющегося при обработке клеток DETA паразита-некротрофа *Botrytis cinerea*, основной системой детоксикации NO служит флавогемоглобин BCFHG1 [30]. Флавогемоглобины являются NO-оксидоредуктазами, известными также как NO-диоксигеназы (КФ 1.14.12.17). Эти ферменты катализируют превращение NO в NO₃⁻ в присутствии НАДФН, ФАД и O₂.

Взаимодействие грибов. Оксид азота может быть вовлечен в механизм взаимодействия различных видов грибов. Показано, что в ответ на обработку элиситором, выделенного из аскомицета *Alternaria alternata*, в клетках базидиомицета

Таблица 1. Участие оксида азота в физиологических процессах у грибов

Гриб	Процесс, чувствительный к NO	Ссылка
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	H ₂ O ₂ -индуцированный апоптоз, гипоксия в митохондриях, стресс	[10], [9], [40], [39], [28]
<i>Agaricus bisporus</i> <i>Pleurotus eryngii</i> var. <i>tuoliensis</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Trichoderma harzianum</i> LTR-2 <i>Ganoderma oregonense</i>	Окислительный, тепловой, нитрозативный стресс	[31] [14] [30] [37] [42]
<i>Pleurotus eryngii</i> <i>Ganoderma lucidum</i> <i>S. cerevisiae</i>	Толерантность к кадмию Толерантность к меди	[44] [45] [43]
<i>Candida tropicalis</i>	Образование псевдомицелия	[23]
Взаимодействие между различными видами грибов	Генерация NO клетками базидиомицета в ответ на обработку элиситором из аскомицета NO-индукция биосинтеза стирилпилона	[36] [81]
<i>Aspergillus nidulans</i> <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus fumigates</i> <i>Colletotrichum coccoides</i> <i>Aspergillus niger</i> , <i>Monilinia fructicola</i> , <i>Penicillium italicum</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Magnaporthe oryzae</i> <i>Puccinia striiformis</i> <i>Westend f. sp. tritici</i>	Выживание и прорастание спор, рост мицелия	[22] [25] [27] [11] [46] [26], [74] [17] [47]
<i>Phycomyces blakesleanus</i> <i>Flammulina velutipes</i> <i>Coniothyrium minitans</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Blastocladiella emersonii</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Дифференцировка	[19] [20] [12], [21] [30] [22], [32], [51], [53] [13] [24], [52], [29], [35], [16] [75]

Inonotus obliquus происходит генерация NO [36]. Очевидно, оксид азота является медиатором элиситора, приводящего к активации фенилаланин-аммиак-лиазы и увеличению биосинтеза антиоксидантных полифенолов у чаги скошенной *I. obliquus*. Авторы предположили, что при взаимодействии этих грибов NO участвует в сигнальном пути, независимом от действия оксипинов.

Прорастание спор и рост мицелия. NO подавляет образование псевдомицелия у дрожжей *Candida tropicalis* [23].

В диплоидных клетках аспергилла гнездового *Aspergillus nidulans* NO, образованный донором SNP, способен ингибировать рост мицелия при концентрациях SNP от 40 до 320 мМ. Процесс сопровождался индукцией митотического кроссинговера [22].

При pH 4.5 обработка 2 мМ нитритом в течение 24 ч уменьшает прорастание спор патогенного гриба *Aspergillus fumigatus* на 23%, а при увеличении концентрации до 5 мМ через 16 ч наблюдается гибель 100% спор [27]. Нитрозо-производные глутатиона, SNC, SNAP и SNAC также губительны для

этих спор, но в меньшей степени. В противоположность этому GSNO не обладал фунгицидным действием, а наоборот, стимулировал прорастание спор.

Фунгицидную активность газообразного NO сравнили в опытах *in vitro* с патогенными грибами, развивающимися на растениях после сбора урожая. Обработке подвергали такие грибы как *Aspergillus niger*, *Monilinia fructicola* (возбудитель бурой гнили косточковых плодов) и *Penicillium italicum* (поражает плоды цитрусовых) [46]. Кратковременная обработка оксидом азота (50–500 мкл/л) ингибировала прорастание спор и рост мицелия, что позволило предложить NO в качестве природного фунгицида при хранении фруктов и овощей. Сходные результаты получены для *Penicillium expansum*, другого патогенного гриба, также поражающего фруктовые плоды [26]. Оксид азота, выделяющийся при действии 6 мМ SNP, ингибировал рост мицелия. Авторы обнаружили, что экзогенный NO в высоких концентрациях индуцирует образование активных форм кислорода (АФК), которые способны вызвать окислительное повреждение белков, необходимых для прорастания спор этих грибов. Вместе с тем, при индукции внутриклеточного синтеза NO у *S. cerevisiae*, вызванного добавлением синтетического фунгицидного гесапептида PAF26, аккумуляции АФК не наблюдалось [15]. В присутствии ингибитора NO-синтазы, L-NAME, происходило частичное восстановление роста дрожжей, обработанных PAF26.

В опытах *in vitro* NO, образованный донорами SNP и SNAP, активировал прорастание, но уменьшал жизнеспособность бластоконидий у *Candida albicans* [25], причем действие NO на споры было более заметным при кислых, чем при щелочных pH. Примечательно, что бластоконидии оказались более чувствительными к действию NO, чем гифы мицелия.

АФК и NO координированно регулируют прорастание спор и последующий рост зародышевых трубок ржавчинного гриба, *Puccinia striiformis Westend f. sp. tritici* [47]. По-видимому, в контроле прорастания трубок NO действует только совместно с АФК, так как повышение или снижение уровня одного из компонентов оказывает негативное влияние на процесс, тогда как накопление высокого уровня и NO, и АФК обеспечивало нормальный рост гриба. Очевидно, что для регулирования прорастания необходим определенный баланс NO и АФК. При достижении этого баланса как NO, так и АФК предпочтительно локализируются в порах и апексе растущих зародышевых трубок и влияют на их полярный рост.

Обработка аскомицета *Trichophyton rubrum* интенсивным импульсным светом с длиной волны 420 нм приводила к увеличению уровня NO в

клетках и ингибированию их роста по сравнению с контролем *in vitro* [48].

Аккумуляция NO выявлена на всех стадиях прорастания конидий *Colletotrichum coccoides*, вызывающего антракноз у томатов [11]. Вместе с тем, добавление экзогенного NO ингибировало прорастание спор этого гриба, а обработка ингибиторами нитро-L-аргинином и L-NMMA в разной степени ускоряла процесс, указывая на регуляторную роль NO в прорастании спор.

Применение флуоресцентного красителя DAR-4M и NO-скавенджеров позволило выявить синтез NO при прорастании и на ранних стадиях развития *Magnaporthe oryzae*, аскомицета, вызывающего гниль риса [17]. Вместе с тем, делеция ряда генов, кодирующих ферменты, потенциально ответственные за синтез этого соединения, не сказывается на генерации NO. Флуоресцентные сигналы, обнаруженные после действия DAF-FM DA, также свидетельствовали о возможности вовлечения NO в процесс прорастания спор и созревания аппрессориев у этого гриба [49].

Обработка *Fusarium oxysporum f. sp. fragariae* донором NO SNP приводила к дозо-зависимому уменьшению прорастания конидий и увеличению скорости роста мицелия [50]. Регуляция роста мицелия оксидом азота сопровождалась изменением образования супероксид аниона.

Дифференцировка грибов. В литературе приводятся данные о действии NO как сигнальной молекулы, контролирующей дифференцировку грибов, принадлежащих к различным таксономическим группам.

NO при участии L-Arg и cGMP влияет на конидиогенез митоспорового гриба *Coniothyrium minitans* [12, 21], паразитирующего на склероциях грибов – нитроаргинин ингибирует образование пикнидий, а добавление SNP приводит к образованию спор у дефицитного по конидиогенезу мутанта. Наибольшая концентрация NO выявлена в мицелии на стадии инициации пикнидий (72 ч постинкуляции).

Майер с соавт. [19] изучили действие SNP – донора NO, и L-NAME – ингибитора NO-синтазной активности, на образование спорангиофоров у зигомицета *Phycomyces blakesleeanus*. Указанные соединения действовали противоположным образом на формирование микро- и макроспорангиофоров: под действием SNP отмечено увеличение числа макроструктур и уменьшение числа микроструктур, а в присутствии L-NAME выявлена обратная зависимость, причем процесс был гораздо сильнее выражен при макроспорангиогенезе.

Корейские исследователи обнаружили стимуляцию образования плодовых тел в присутствии SNP у базидиомицета *Flammulina velutipes* и подавление процесса при добавлении L-NAME и аминоксидина [20].

Виера с соавт. [13], используя флуоресцентный индикатор DAF-FM DA, выявили образование *NO при споруляции водного хитридиомикета *Blastocladiella emersonii*. Если обработку клеток флуоресцентным детектором проводили в присутствии NO-синтазного ингибитора L-NAME, то интенсивность зеленого флуоресцентного сигнала резко снижалась. Применение количественного хемилюминесцентного анализа подтвердило, что при индукции образования подвижных зооспор происходило увеличение внутриклеточных продуктов, являющихся производными NO, почти в 3 раза.

В работе Пенгкита с соавт. [16] для идентификации и функциональной оценки эндогенного NO у аскомицета *Neurospora crassa* также был использован метод с этим же флуоресцентным индикатором. Степень флуоресценции, показывающая уровень внутриклеточного содержания оксида азота, сильно возрастала в гифах мицелия при росте в погруженной культуре, а также в конидиофорах при конидиогенезе в поверхностной культуре. Авторы также показали, что обработка мицелия NO-скавенджером, cPTIO, приводила к резкому уменьшению уровня транскрипции генов *con-10* и *con-13*, экспрессия которых возрастает при конидиогенезе. Авторы предположили, что оксид азота образуется внутри молодых растущих гиф и участвует в формировании конидий.

Под действием NO, генерированного донором SNP, происходило уменьшение образования конидий у аскомицета *A. nidulans* [22]. Позднее было показано, что у этого гриба синтез эндогенного NO возрастал на ранних стадиях дифференцировки, при переходе от вегетативного роста к конидиогенезу и добавление экзогенного NO служило индуктором этого перехода [51]. Уровень NO определял баланс между бесполом и половым циклами *A. nidulans* — искусственное повышение концентрации NO приводило к уменьшению конидиогенеза и индукции образования плодовых тел, клейстотециев, содержащих аскоспоры [32, 51].

Грибы могут обладать разной чувствительностью к NO в зависимости от стадии дифференцировки. Так, обработка клеток *Bacillus cinerea* [30] экзогенным NO, образованным донором DETA, приводит к изменению экспрессии гена, ответственного за синтез флавогемоглобина в мицелии и спорах. Установлено, что данный белок участвует в детоксикации NO, превращая активный NO радикал в нитрат. При обработке NO максимальная экспрессия гена, кодирующего этот белок, отмечена в прорастающих конидиях *B. cinerea*, но отсутствовала в растущем и активно ветвящемся мицелии.

В связи с тем, что свет является важным регуляторным фактором целого ряда жизненных циклов грибов, особый интерес представляет изуче-

ние роли оксида азота в трансдукции фотосигнала у *P. blakesleeanus* [19], *F. velutipes* [20], *N. crassa* [16, 24, 52] и *A. nidulans* [53].

Синий свет ингибирует образование микроспорангиофоров, но стимулирует формирование макроспорангиофоров у *P. blakesleeanus* [19]. Донор NO SNP способен замещать эффект активирующего действия света при макроспорангиогенезе, а ингибиторы NO-синтазной реакции подавлять его. Вместе с тем, свет индуцирует образование цитруллина из аргинина в наиболее важных для развития фазах роста — логарифмической фазе роста мицелия и при созревании макроспорангиофоров. Ингибирование биосинтеза тетрагидробиоптерина BH_4 , кофактора NO-синтазы (NOS), приводило к ингибированию фотоморфогенеза. При дифференцировке поверхностной культуры *P. blakesleeanus* значения удельной активности фермента в экстрактах мицелия и скорость образования NO в клетках гриба, измеренная хемилюминесцентной детекторной системой, были сходны и составляли от 1 до 10 $\text{пмоль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг белка}^{-1}$. Характерно, что образование цитруллина и эмиссия NO стимулировались светом и ингибировались при росте гриба на среде с 2,4-диамино-6-гидросипиримидином, ингибитором биосинтеза BH_4 . Авторы предположили, что NOS участвует в передаче светового сигнала при формировании спорангиев.

Перед образованием плодовых тел в освещенном мицелии опенка зимнего *F. velutipes* NO-синтазная активность возрастала в 72 раза [20], тем не менее оценить вклад действия света в этот процесс сложно, так как авторы не исследовали темновые контроли и, кроме того, одновременно с освещением культур изменили температурный режим с 18 до 10°C.

Результаты, полученные при действии SNP, экзогенного донора NO и специфических ингибиторов NOS, позволили предположить, что NO ингибирует светостимулируемое образование конидий у аскомицета *N. crassa* [24]. Наряду с этим, авторы, измерив превращение ^3H -L-аргинина в ^3H -L-цитруллин, выявили наличие NO-синтазной активности в клетках гриба. Следует отметить, что роль оксида азота в фотопроцессах *N. crassa* можно оценить по присутствию конечных продуктов распада NO, нитрата и нитрита, в мицелии и среде культивирования, используя определенные мутанты гриба [29, 52]. Клетки дикого типа *N. crassa* и других высших грибов обладают высокой активностью нитратредуктаз (НР) и нитритредуктаз (НнР), что позволяет им утилизировать нитрат и нитрит. В связи с этим измерение выхода этих ионов из клеток дикого типа невозможно, однако трудности можно избежать, используя мутанты, лишённые данных ферментов. Так, при использовании *nit-6* штамма *N. crassa*, в котором отсут-

ствует НиР, но осуществляется каталитическое превращение нитрата в нитрит, выход NO_2^- можно рассматривать как показатель суммарного содержания NO_3^- и NO_2^- вне клетки. Анализ динамики выхода ионов нитрита из мицелия в ходе фотоиндуцированного каротиногенеза [52] и фотостимулируемого конидиогенеза [29] *nit-6* штамма *N. crassa* свидетельствовал о возможном участии NO-генерирующего механизма в трансдукции фотосигнала гриба. Введение в среду культивирования донора оксида азота, GSNO, ингибировало, а ингибитор NOS, нитро-L-аргинина, стимулировало фотоконидиогенез *N. crassa*, что указывает на участие NO в данном процессе. Вместе с тем, отсутствие выхода NO_2^- из мицелия этого же штамма в ходе светозависимого развития протоперитециев, предшественников женских половых структур, свидетельствует о малой вероятности вовлечения NO в половой процесс гриба. Таким образом, в зависимости от природы трех светорегулируемых процессов (индукция каротиногенеза, стимуляция бесполого или полового циклов) роль NO-генерирующего механизма в трансдукции фотосигнала *N. crassa* может отличаться. Вместе с тем, светозависимые изменения удельной активности NOS, определенные измерением превращения ^3H -L-аргинина в ^3H -L-цитруллин, в фотокаротиногенезе и фотоконидиогенезе *N. crassa* выявлены не были [35].

Действие света на *A. nidulans* в присутствии кислорода инициирует образование бесполого спор, а темновые условия и гипоксия приводят к образованию половых структур. Недавно у данного гриба выявлена светорегулируемая индукция образования NO [53]. Уровень NO возрастал при освещении мицелия, культивируемого на нитрате или Arg, и уменьшался в темноте. Свет активирует 2 гена, связанных с регуляцией уровня NO, — *fhhB*, кодирующий флавогемоглобин, и *agaA*, кодирующий аргиназу, контролирующую уровень внутриклеточного аргинина. Флавогемоглобин превращает NO в безопасный нитрат, а Arg может служить субстратом для NOS. Для светозависимой индукции указанных генов необходимо функционирование гена фитохрома *fphA*, а ген *lreA* действует как репрессор в присутствии Arg в среде. При дифференцировке гриба концентрация внутриклеточного Arg возрастает, причем более заметно при индукции полового развития, чем бесполого. Аргининовый метаболизм и свет контролируют уровень конидиогенеза. Делеция *fhhB* приводит к частичной потере световой регуляции конидиогенеза на среде с Arg или нитратом, в то время как делеция *fhhA* влияет на световую регуляцию только на среде с нитратом. Авторы предположили, что нитрат-регулируемый *fhhA* и свето-регулируемый *fhhB* необходимы для корректной световой регуляции конидиогенеза *A. nidulans*.

СИНТЕЗ NO В КЛЕТКАХ ГРИБОВ

Вопрос о природе генерации NO у грибов в значительной степени остается открытым. Синтез NO может осуществляться неэнзиматически и энзиматически. Неэнзиматическое образование NO происходит из NO_2^- при низких значениях pH.

Известно, что у млекопитающих основным ферментом синтеза NO является NO-синтаза (КФ 1.14.13.396), представленная 3 формами, нейрональной (nNOS), индуцибельной (iNOS) и эндотелиальной (eNOS), кодируемыми разными генами [54]. Естественно, что по аналогии с млекопитающими наиболее вероятным претендентом на роль фермента, ответственного за синтез оксида азота у грибов, считался именно этот фермент. Однако вопрос о существовании NO-синтазной активности в клетках грибов до сих пор является дискуссионным. Оказалось, что типичные полноценные гены, кодирующие NOS млекопитающих, в геноме большинства грибов, как и у высших растений, отсутствуют. В связи с этим для обозначения энзима, осуществляющего функции NOS у этих организмов, иногда даже используется термин NO-синтазоподобная (NOS-like) активность. Вместе с тем, у некоторых из них активность фермента определяется изотопным методом, по превращению ^3H - или ^{14}C -L-аргинина в ^3H - или ^{14}C -L-цитруллин. Среди таких грибов — *N. crassa* [24, 35], *F. velutipes* [20], *P. blakesleeana* [19], *S. cerevisiae* [10, 39], *B. emersonii* [13] и *C. mini-tans* [21].

Показано, что подобно ферменту млекопитающих, NOS *F. velutipes* использует в качестве кофакторов НАДФН, ФАД, ФМН и BH_4 , но в отличие от него, не нуждается в ионах Ca^{2+} и кальмодулине [20]. K_M и $V_{\max}$ для данного фермента составляют 3.3×10^{-5} М и 2.4×10^{-4} $\mu\text{моль/мин/мг}$ белка соответственно, энзим ингибируется нитро-L-аргинином и аминогуанидином с величинами K_i 2.9×10^{-4} и 3.3×10^{-4} М соответственно. Авторы предполагают, что при действии этих ингибиторов, благодаря их низкому сродству к ферменту, происходит лишь задержка образования плодовых тел, но не полное ингибирование процесса. NOS *F. velutipes* представлена димером с молекулярной массой 100 кДа и имеет активность >500 $\mu\text{моль/мин/мг}$ белка (плодовые тела).

Активность NOS возрастает после обработки клеток дрожжей *S. cerevisiae* пероксидом водорода [10]. Кроме того, при этом наблюдается 2-кратное увеличение внутриклеточной концентрации L-Arg, что может быть определяющим фактором для синтеза NO при H_2O_2 -индуцированном апоптозе.

NO-синтазная активность выявляется в ходе споруляции хитридиомикета *B. emersonii* [13], достигая максимума через 150 мин после начала

процесса и снижаясь при добавлении ингибиторов фермента, L-NAME и TRIM. Фермент является Ca^{2+} -зависимым, обнаруживая в этом сходство с nNOS формой фермента млекопитающих.

Активность NOS гриба-паразита *C. minitans* достигала максимального уровня 20 пмоль/мин/мг белка на ранней стадии формирования пикнидий (72 ч постинкуляции) [21]. Это время совпадало с максимумом образования NO в клетках.

Данные о существовании различных форм NOS грибов, аналогичных формам, обнаруженным для фермента животных, немногочисленны. NO-синтазная активность аскомицета *N. crassa* по ряду свойств (чувствительность к ионам кальция, действие специфических ингибиторов фермента, Вестерн-блот анализ) сходна с iNOS формой фермента млекопитающих [35]. В работе использовали поликлональные антитела против iNOS изоформы фермента млекопитающих, иммуногеном для которых был C-концевой пептид, содержащий 14 аминокислот iNOS, полученный из макрофагов мыши. Молекулярная масса фермента составляет около 130 кДа, что близко к таковой для iNOS животных [55]. Использование моноклональных антител против nNOS позволило обнаружить конститутивную форму фермента с молекулярной массой 60 кДа у дрожжей *S. cerevisiae* [56, 57]. Домитрович с соавт. [39] выявили в экспоненциальной фазе роста этого же организма экспрессию nNOS, iNOS, и eNOS с молекулярными массами 160, 130 и 132 кДа, соответственно. Индуцированная NOS у этого гриба обладает изоформной специфичностью и зависит от метаболического состояния клеток и ответа на стресс. Молекулярная масса NOS *I. obliquus*, определенная изоферментным методом, составила 85 кДа для конститутивной и 110 кДа для индуцибельной форм фермента [58]. Совместное культивирование базидиомицета *I. obliquus* и трутового гриба *Phellinus morii* приводило к 5-кратному увеличению активности iNOS у первого гриба с последующим резким возрастанием образования NO [58]. По мнению авторов эта форма фермента может действовать как важный регулятор, влияющий на продукцию метаболитов фенилпропаноидов во время межвидовых взаимодействий между грибами.

Как указано выше, у грибов не удалось найти полноценный ген NOS животного типа. Вместе с тем, в грибных геномах *P. blakesleeanus* и *Magnaporthe grisea* обнаружен по крайней мере один фрагмент последовательности ДНК, сходный с таковым для NOS млекопитающих [13]. Сходные участки аминокислотных NO-синтазо-подобных последовательностей обнаружены в ходе анализа *in silico* у грибов *Aspergillus oryzae*, *Glomerella graminicola* и *Colletotricum gloeosporioides* [59]. Используя этот же метод, авторы выявили консерватив-

ные аминокислотные NO-синтазо-подобные последовательности у *Macrophomina phaseolina*. При помощи биоинформационного анализа в геноме базидиомицета *I. obliquus* были выявлены гены, имеющие определенное сходство с аналогичными генами, кодирующими конститутивную и индуцибельную формы NOS млекопитающих [58]. Недавно [16] в геноме *N. crassa* обнаружен ряд генов, имеющих высокую степень гомологии с генами NOS у других грибов и человека. Основываясь на их свойствах, авторы предположили возможность наличия различных путей синтеза NO (зависимого и независимого от NOS) у данного гриба.

У *M. oryzae* делеции ряда генов биосинтеза Arg, субстрата для NOS [49], а также генов NO-синтазо-подобной активности [17] не влияли на синтез NO, что также подтвердило возможность генерации NO у грибов независимым от NOS способом.

У дрожжей *S. cerevisiae* Arg-зависимое образование NO опосредовано флавопротеином Tah18 [41]. При этом в ответ на действие таких стрессоров как высокая температура, высушивание и замораживание/оттаивание происходит активация генов N-ацетилтрансферазы *MPR1* и пролиноксидазы *PUT1*, что ведет к значительному увеличению содержания Arg, являющегося субстратом NOS [41, 60]. Предполагают, что Tah18 белок гомологичен редуктазному домену NOS [61]. Установлено, что Tah18 переносит электроны от НАДФН на Fe-S кластеры Dre2 белка через ФАД и ФМН [62]. В условиях окислительного стресса Tah18-Dre2-комплекс распадается, что приводит к функциональному изменению Tah18 и электроны от НАДФН используются для синтеза NO. По-видимому, в условиях окислительного стресса Tah18-Dre2-комплекс может использоваться в качестве молекулярного переключателя для контроля синтеза NO, индуцируя апоптоз или защищая клетку дрожжей [61].

Корпас и Баррозо [63] в 2017 г. предложили для высших растений гипотезу, согласно которой L-Arg-зависимая NO-синтазо-подобная активность может быть результатом кооперативного действия нескольких различных ферментов, собранных в сложный комплекс. Предложенный механизм синтеза NO может существовать и у грибов.

Синтез NO может осуществляться не только NOS. Маркос с соавт. [51] обнаружили, что при дифференцировке *A. nidulans* синтез NO регулируется НР, причем ген *niaD*, кодирующий НР, активируется при индукции конидиогенеза даже в условиях репрессии азотом в присутствии аммония. Вместе с тем это не универсальный механизм, так как с использованием мутантов, дефицитных по НР и НиР, показано, что эти ферменты не участвуют в синтезе NO у аскомицета *M. oryzae* [17].

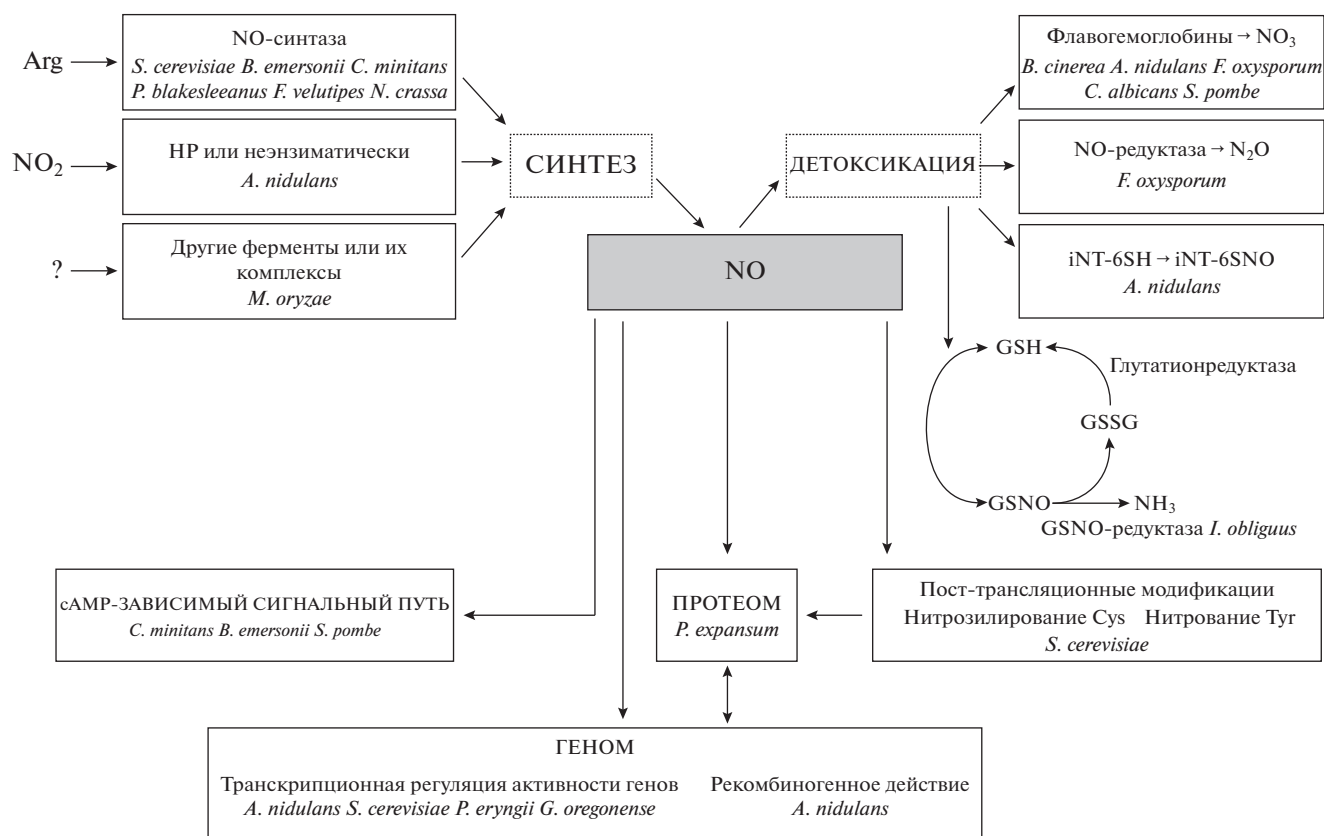


Рис. 1. Основные пути синтеза, действия и детоксикации оксида азота у грибов.

Установлено также, что НиР внутренней мембраны митохондрий грибов при участии НАДН способна восстанавливать NO^{2-} в NO [31]. Предполагают, что митохондриальные цитохром-с-оксидаза и НиР обеспечивают образование NO в условиях гипоксии или аноксии [9, 40].

Другими возможными кандидатами, ответственными за образование оксида азота у грибов, могут быть также ксантиноксидоредуктаза [64], p450:НАДФН-p450-редуктаза [17], некоторые мембраносвязанные ферменты [64, 65] или это может быть неэнзиматический синтез [66].

ПУТИ ДЕЙСТВИЯ NO У ГРИБОВ

Мишени для действия NO в клетках грибов разнообразны (рис. 1).

Геном. Образующийся из оксида азота в клетке пероксинитрит представляет собой сильный окислитель, который способен повреждать ДНК. Рекомбиногенный потенциал NO на клетки *A. nidulans* оценивали по действию SNP, экзогенного донора NO [22]. Это соединение стимулировало возникновение разрывов ДНК в G2 периоде деления. Авторы предполагают, что изменения интенсивности конидиогенеза *A. nidulans*, вызванные SNP, могут быть связаны с нарушением оксидом

азота транскрипционной активации структурных, специфичных для споруляции генов.

У дрожжей *Kluyveromyces lactis* после действия газообразного NO наблюдалось ингибирование ДНК-связывающей активности транскрипционного фактора LAC9, содержащего “цинковый палец” [67]. Поскольку NO способен вызывать S-нитрозилирование тиолов цинк-серных кластеров, что приводит к обратимому разрушению структур “цинковых пальцев”, это обеспечивает молекулярный механизм для регулирования транскрипции генов.

Обработка дрожжей *S. cerevisiae* GSNO, донором NO, вызывала мягкий окислительный стресс и увеличение активности антиоксидантных ферментов — супероксиддисмутазы и каталазы [28]. Предполагают, что в транскрипционной активации синтеза этих ферментов участвует Yap1p, ключевой регулятор ответа дрожжей на окислительный стресс.

Для выявления механизма действия NO, связанного с повышением толерантности *P. eryngii* к тяжелым металлам, Ли с соавт. [21] использовали транскрипционный анализ. Авторы обнаружили значительное увеличение экспрессии 45 генов, кодирующих оксидоредуктазы, дегидрогеназы, редуктазы, трансферазы и факторы транскрипции, в образцах, обработанных экзогенным NO, что спо-

собствовало повышению устойчивости гриба к чрезвычайно высокому уровню кадмия. Наиболее многочисленными оказались гены, кодирующие ферменты, участвующие в окислительно-восстановительных процессах, включая предположительно пиридиннуклеотид-дисульфид-оксидоредуктазы, ацил-КоА-редуктазы, альдегиддегидрогеназу, сульфитредуктазу, оксалакислородоксидоредуктазу и форматдегидрогеназу.

Насуно с соавт. [68] наблюдали у дрожжей *S. cerevisiae* под действием экзогенного NO индукцию экспрессии Cu-регулируемых генов, находящихся под контролем транскрипционного фактора Mac1, включая ген *CTR1*, кодирующий высокоаффинный транспортер меди. Оказалось, что NO усиливает связывание Mac1 с промоторами генов-мишеней. Обработка оксидом азота в условиях высокотемпературного стресса приводила к возрастанию ряда параметров — транскрипции гена *CTR1*, внутриклеточной концентрации меди, активности Cu,Zn-супероксиддисмутазы и жизнеспособности клеток. Наряду с этим, NO не влиял на экспрессию гена *MAC1*, что, по мнению авторов, свидетельствует об активации Mac1 за счет NO-зависимой посттрансляционной модификации путем S-нитрозилирования и/или фосфорилирования. Вместе с тем у этих же дрожжей NO ингибировал активность Cu-регулируемого транскрипционного фактора Ace1, что приводило к ингибированию Cu-зависимой индукции гена *CUP1* [69]. Предполагают, что под действием оксида азота происходит модификация связывающих металлы тиолов Ace1, уменьшающая способность фактора связывать медь.

Чен с соавт. [42] сравнили транскриптом мицелия *Ganoderma oregonense*, подвергнутого тепловому стрессу (32°C) и воздействию экзогенного NO, с таковым, полученным в условиях регуляции NO при нормальной температуре культивирования. В дополнение к усилению регуляции генов, кодирующих белки теплового шока (HSP), в условиях теплового стресса по сравнению с контролем, после обработки NO был выявлен ряд новых HSP — HSP 78, HSP 70, HSP 104, HSP 30 и HSP C4. Предполагают, что NO активирует HSP для защиты *G. oregonense* от абиотического стресса. Кроме того, тепловой стресс приводит к увеличению экспрессии генов, регулирующих активность оксидазы D-аминокислот и оксидоредуктазы.

S-Нитрозилирование и нитрование остатков аминокислот. NO-зависимые пост-трансляционные модификации могут изменять функциональную активность белков, участвующих в сигнальной трансдукции при разных физиологических и стрессовых условиях. Взаимодействие NO с белками способно приводить к S-нитрозилированию Cys остатков или нитрованию остатков Tug.

Выше уже упоминалось о том, что NO может быть использован в ответах клеток грибов на разные типы стресса. Так, на основании активации синтеза NO и S-нитрозилирования глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы, а также корреляции между уровнем внутриклеточной концентрации супероксидных анионов и образованием NO, Альмейда с соавт. [10] предположили участие NO в передаче сигнала при H₂O₂-индуцированном апоптозе *S. cerevisiae*. Ингибирование синтеза NO при помощи L-NAME привело к уменьшению S-нитрозилирования фермента, увеличению уровня АФК и выживаемости клеток. Оксид азота, синтезированный в митохондриях этих дрожжей, участвует в передаче сигнала в других стрессовых условиях — при гипоксии, вызывая увеличение уровня экспрессии гена гипоксии *CYC7*, которое сопровождается возрастанием нитрования Tug в белке [9]. Авторы обнаружили, что митохондрии дрожжей продуцируют NO при концентрации растворенного кислорода ниже 20 μM. Процесс катализируется цитохром-с-оксидазой и является pH-зависимым. Предполагают существование механизма положительной обратной связи, при котором NO, образованный в митохондриях, индуцирует экспрессию гена *COX5b*, кодирующего 5b-субъединицу цитохром-с-оксидазы, увеличивающую продукцию оксида азота в условиях гипоксии [40].

Известно, что в противоположность S-нитрозилированию нитрование Tug осуществляется не оксидом азота, а продуктом его взаимодействия с супероксидом ($O_2^{\bullet-}$) — пероксинитритом ($ONOO^-$) [70]. Предполагают, что нитрование Tug изменяет такие свойства аминокислоты как редокс-потенциал, объем, гидрофобность и pK(a) фенольной группы, что в свою очередь, может привести к глубоким изменениям структурных и функциональных свойств белка [71], определяя участие NO в широком спектре сигнальных и регуляторных процессов.

Использование двумерного гель-электрофореза с последующим Вестерн-блот-анализом позволило выявить нитрование цитозольных и митохондриальных белков *S. cerevisiae* [72]. Среди 8 белков митохондрий, подвергшихся нитрованию, 2 были идентифицированы как аконитаза и изоцитратдегидрогеназа. Позднее Канг с соавт. [73] изучили нитропротеомный профиль у этих же дрожжей и нашли изменения в состояниях нитрования 14 белков, участвующих в передаче сигнала спаривания — α-фактора. Показано, что вокруг нитрованных остатков Tug группировались остатки таких аминокислот как Asp, Glu и His. Предполагают, что остатки Tug нитруются легче, когда остатки кислых аминокислот находятся в непосредственной близости, а также что конформационные изменения при нитровании при-

Таблица 2. NOS грибов, выявленная изотопным методом

Гриб	Факторы, влияющие на активность NO синтазы	Стадии развития, чувствительные к соединениям, влияющим на NO-синтазу	Ссылка
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (аскомицет)	Концентрация H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ -индуцированный апоптоз	[10]
<i>Blastocladiella emersonii</i> (хитридиомицет)	Концентрация кальция	Образование зооспор	[13]
<i>Coniothorium minitans</i> (митоспоровый гриб)	Время роста	Развитие пикнидий	[21]
<i>Phycomyces blakesleeanus</i> (зигомицет)	Синий свет (стимуляция NO синтазной активности <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>)	Светостимулируемое образование макроспорангиофоров (SNP заменяет свет; L-NAME ингибирует)	[19]
<i>Flammulina velutipes</i> (базидиомицет)	Свет, понижение температуры	Формирование плодовых тел (SNP стимулирует; L-NAME и аминоксантидин ингибируют)	[20]
<i>Neurospora crassa</i> (аскомицет)	Синий свет	Бесполое развитие – светостимулируемое образование конидий (SNP ингибирует; L-NAME и нитроаргинин стимулируют)	[24], [35]

водят к тому, что остатки нитротирозина оказываются спрятанными внутри молекулы белка.

Протеом. Лай с соавт. [74] использовали протеомный подход для оценки механизма действия экзогенного NO при прорастании спор *P. expansum*. Методами двумерного электрофореза и масс-спектрометрии было показано, что после обработки спор NO происходило увеличение активности глутаминсинтетазы, амидогидролазы, нитрилиз, диоксигеназы оксида азота и HSP 70, а также уменьшение активности тетрапептидного структурного повтора, УДФ-N-ацетилглюкозамин пирогидроксилазы, энолазы, HSP 60 и К-гомологичного РНК-связывающего домена.

cGMP-зависимый сигнальный путь. NO способен изменять физиологический ответ клеток через cGMP-зависимый сигнальный путь за счет активации растворимой гуанилатциклазы [75]. Реализация данного пути обнаружена при конидиогенезе *C. minitans* [21] и биогенезе зооспор в водной культуре *B. emersonii* [13]. При дифференцировке *C. minitans* динамика изменения активности NOS была сходна с таковой для уровня cGMP, причем самая высокая активация наблюдалась на стадии пикнидиальной инициации [21].

При споруляции *B. emersonii* наряду с возрастанием уровня NO наблюдается стимуляция образования cGMP. При этом происходит активация транскрипционного профиля генов, кодирующих гуанилатциклазу и cGMP-фосфодиэстеразу [13]. У дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* эффект действия потенциальных ингибиторов гуанилат-

циклазы и NOS свидетельствует о NO-регулируемом спорообразовании через cGMP-зависимый путь [76]. Очевидно, что cGMP действует в качестве важного внутриклеточного вторичного мессенджера в NO-опосредованном процессе образования спор у столь разных по таксономической принадлежности грибов.

Флавогемоглобины, нитрозотионеин (iNT), S-нитрозоглутатионредуктаза (GSNO-редуктаза) и NO-редуктаза. При индукции конидиогенеза у *A. nidulans* NO-метаболизирующие флавогемоглобины FhbA и FhbB участвуют в координированной регуляции переключения от вегетативного роста к размножению [51]. Экспрессия цитоплазматического *fhbA* гена и гена HP *niaD* возрастала в течение первых часов конидиогенеза (до 10 ч) и затем снижалась, а увеличение экспрессии *fhbB* гена митохондрий наблюдалась в более поздний период развития (в интервале от 24 до 120 ч). Важно, что регуляция экспрессии первых 2 генов определяется глобальным регулятором азотного метаболизма AgeA и специфичным регулятором нитратного пути NirA. Считают, что у данного гриба гомеостаз NO достигается за счет баланса его синтеза, осуществляемого HP, и распада в результате действия флавогемоглобинов. Установлено также, что индуцибельный FhbA защищает HP и НиР от повреждения высокими концентрациями NO [77].

Флавогемоглобины различных видов дрожжей: *S. cerevisiae* (ScYhb1), *C. albicans* (CaYhb1) и *S. pombe* (SPAC869.02c), содержат 3 консервативных фрагмента – N-концевой гемовый,

ФАД-связывающий и С-концевой НАД(Ф)-связывающий домены [78]. У *S. cerevisiae* и *S. pombe* флавогемоглобины кодируются одним геном — *ScYHB1* и *SPAC869.02c* соответственно, а у *C. albicans* — тремя (*CaYHB1*, *CaYHB4* и *CaYHB5*), причем сходство последовательностей для первого и трех последних составляет от 31 до 25%. Предполагают, что флавогемоглобины способны защитить дрожжевые клетки как от внешних, так и внутренних источников NO и активных форм азота (АФА). Очевидно, что обнаруженные различия в составе и функционировании соединений могут быть обусловлены адаптацией к разным нишам обитания указанных видов дрожжей.

Баланс синтеза и распада NO важен для регуляции физиологических функций, так как избыток NO может вызвать нитрозативный стресс благодаря высокой реактивности NO и АФА. У *A. nidulans* в условиях нитрозативного стресса NO-индуцируемый 23-аминокислотный пептид нитрозотионеин (iNT) способен обезвреживать NO посредством S-нитрозилирования Cys остатков [79]. Тиоредоксин и его редуктаза денитрозировали S-нитрозилированный пептид, снижали клеточный S-нитрозотиол и обеспечивали толерантность гриба к NO, что указывает на опосредованное пептидами каталитическое удаление NO.

GSNO рассматривают как одну из физиологических форм хранения и транспорта оксида азота в высших растениях [80]. Очевидно, такой способ депонирования и детоксикации NO существует и в грибах. При совместном культивировании *I. obliquus* и *P. morii* наблюдается аккумуляция оксида азота, который используется для обратимого S-нитрозилирования фенилаланин-аммиак-лиазы, 4-кумарат-КоА-лигазы и стирилпирон-синтазы, ферментов, участвующих в биосинтезе стирилпирона [81]. При этом в регуляции как специфичности, так и обратимости S-нитрозилирования белка у *I. obliquus* принимает участие GSNO-редуктаза и тиоредоксин-подобные белки.

Удаление избыточно-токсичного NO из клеток грибов также может осуществлять NO-редуктаза — фермент, катализирующий образование N₂O из оксида азота [82]. Известно, что у грибов для этого используется цитохром P-450_{nor}, который передает электроны от НАДН без участия электрон-транспортной цепи. При нитратной диссимилиации у мутанта *F. oxysporum*, неспособного синтезировать NO-редуктазу и флавогемоглобин, отмечено нарушение работы дыхательной системы и ингибирование роста [83].

* * *

Основной метод, применяемый для идентификации и действия эндогенного оксида азота в клетках грибов — использование флуоресцентных

индикаторов. В последнее время для оценки участия NO в различных физиологических процессах этих организмов получило широкое применение доноры и скавенджеры NO, а также ингибиторы NO-синтазы млекопитающих. Достигнуты значительные успехи в исследовании роли оксида азота в регуляции у грибов апоптоза, различных видов стресса, метаболизма металлов, мицелиального роста, прорастания спор и дифференцировки. Уровень NO способен определять баланс между бесполом и половым циклами этих организмов, причем в регуляции жизненных циклов особое значение может приобретать участие оксида азота в трансдукции фотосигнала. Это может быть важно при разработке подходов к управлению жизненными циклами промышленно-значимых грибов. Разнообразие NO-зависимых сигнальных путей, задействованных в различных биологических процессах грибов, свидетельствует о сложности механизмов, регулируемых NO. Это расширяет наши знания о проблеме регуляции оксида азота у эукариот. Среди них — участие оксида азота в S-нитрозилировании и нитровании остатков аминокислот, иницировании разрывов ДНК, транскрипционной активации определенных генов и синтезе cGMP. Несмотря на отсутствие в геноме типичных полноценных генов, кодирующих NOS млекопитающих, у ряда грибов методом, основанным на превращении ³H- или ¹⁴C-L-аргинина в ³H- или ¹⁴C-L-цитруллин, выявлен данный фермент. Представляется важным дальнейшее подробное изучение ферментов, определяющих синтез NO, у этих организмов, а также NO-метаболизирующих флавогемоглобинов и NO-редуктазы.

Работа выполнена в рамках госзадания 0104-2019-0024 для ФИЦ биотехнологии РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 24. P. 9265–9269.
2. Tsoukias M. // Microcirculation. 2008. V. 15. № 8. P. 813–834.
3. Verma N., Tiwari S., Singh V.P., Prasad S.M. // Plant Growth Regul. 2020. V. 90. № 1. P. 1–13.
4. Филиппович С.Ю. // Биохимия. 2010. V. 75. № 10. P. 1367–1376.
5. Williams D.E., Boon E.M. // J. Innate Immun. 2019. V. 11. № 3. P. 205–215.
6. Cánovas D., Marcos J.F., Ana T., Marcos A.T., Strauss J. // Curr. Genet. 2016. V. 62. № 3. P. 513–518.
7. Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J. // Front. Plant Sci. 2016. V. 4. P. 252.
8. Zhao Y., Lim J., Xu J., Yu J.-H., Zheng W. // Mol. Microbiol. 2020. V. 113. № 5. P. 872–882.
9. Castello P.R., David P.S., McClure T., Crook Z., Poyton R.O. // Cell Metab. 2006. V. 87. № 4. P. 277–287.

10. Almeida B., Buttner S., Ohlmeier S., Silva A., Mesquita A., Sampaio-Marque, B. et al. // J. Cell Sci. 2007. V. 120. № 18. P. 3279–3288.
11. Wang J., Higgins V.J. // Fungal Genet. Biol. 2005. V. 42. № 4. P. 284–292.
12. Gong X., Fu Y., Jiang D., Li G., Yi X., Peng Y. // Fungal Genet. Biol. 2007. V. 44. № 12. P. 1368–1379.
13. Vieira A.L., Linares E., Augusto, O., Gomes S.L. // Fungal Genet. Biol. 2009. V. 46. № 8. P. 575–584.
14. Kong W.W., Huang C.Y., Chen Q., Zou Y.J., Zhang J.X. // Fungal Genet. Biol. 2012. V. 49. № 1. P. 15–20.
15. Carmona L., Gandía M., López-García B., Marcos J.F. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2012. V. 417. № 1. P. 56–61.
16. Pengkit A., Jeon S.S., Son S.J., Shin J.H., Baik K.Y., Choi E.H., Park G. // Sci. Rep. 2016. V. 6. article №30037. <https://doi.org/10.1038/srep30037>
17. Samalova M., Johnson J., Illes M., Kelly S., Fricker M., Gurr S. // New Phytol. 2013. V. 197. P. 207–222.
18. Kojima H., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Hirata Y., Nagano T. // Angew. Chem. Int. Ed. 1999. V. 38. № 21. P. 3209–3212.
19. Maier J., Hecker R., Rockel P., Ninnemann H. // Plant Physiol. 2001. V. 126. № 3. P. 1323–1330.
20. Song N.K., Jeong C.S., Choi I.S. // Mycologia. 2000. V. 92. № 6. P. 1027–1032.
21. Li B., Fu Y., Jiang D., Xie J., Cheng J., Li G. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 9. P. 2830–2836.
22. Chiuchetta S.J.R., Castro-Prado M.A.A. // Genet. Mol. Biol. 2005. V. 28. № 4. P. 798–803.
23. Wilken M., Huchzermeyer B. // Eur. J. Cell Biol. 1999. V. 78. № 3. P. 209–213.
24. Ninnemann H., Maier J. // Photochem. Photobiol. 1996. V. 64. № 2. P. 393–398.
25. Abaitua F., Rementeria A., Millan R.S., Eguzkiza A., Rodriguez J.A., Ponton J., Sevilla M.S. // Microbiology. 1999. V. 145. № 7. P. 1641–1647.
26. Lai T., Li B., Qin G., Tian S. // Curr. Microbiol. 2011. V. 62. № 1. P. 229–234.
27. Kunert J. // Folia Microbiol. 1995. V. 40. № 3. P. 238–244.
28. Lushchak O.V., Lushchak V.I. // Redox Rep. 2008. V. 13. № 6. P. 283–291.
29. Филиппович С.Ю., Онуфриев М.В., Бачурина Г.П., Крицкий М.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 4. С. 403–409.
30. Turrion-Gomez J.L., Eslava A.P., Benito E.P. // Fungal Genet. Biol. 2010. V. 47. № 5. P. 484–496.
31. Röszer T. // The Biology of Subcellular Nitric Oxide. New York, N.Y.: Springer & Business Media, 2012. 200 p.
32. Baidya S., Cary J.W., Grayburn W.S., Calvo A.M. // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. № 15. P. 5524–5528.
33. Nanomycotoxicology. Treating Mycotoxins in the Nano Way. / Eds. M. Rai and K.A. Abd-El Salam. N.Y.: Acad. Press, 2020. P. 481–501.
34. Hetrick E.M., Shin J.H., Paul H.S., Schoenfisch M.H. // Biomaterials. 2009. V. 30. № 14. P. 2782–2789.
35. Филиппович С.Ю., Онуфриев М.В., Перегуд Д.И., Бачурина Г.П., Крицкий М.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 4. С. 358–365.
36. Zheng W., Miao K., Zhang Y., Pan S., Zhang M., Jiang H. // Microbiology. 2009. V. 155. № 10. P. 3440–3448.
37. Yu Y., Yang Z., Guo K., Li Z., Zhou H., Wei Y. et al. // Curr. Microbiol. 2015. V. 70. № 4. P. 618–622.
38. Liu W.C., Yuan H.M., Li Y.H., Lu Y.T. // FEMS Yeast Res. 2015. V. 15. fov051. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov051>
39. 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.
40. Castello P.R., Woo D.K., Ball K., Wojcik J., Liu L., Poynton R.O. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 24. P. 8203–8208.
41. Nishimura A., Kawahara N., Takagi H. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2013. V. 430. № 1. P. 137–143.
42. Chen C., Li Q., Wang Q., Lu D., Zhang H., Wang J., Fu R. // Sci. Rep. 2017. V. 7. article 15694. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15340-6>
43. Chiang K.T., Shinyashiki M., Switzer C.H., Valentine J.S., Gralla E.B., Thiele D.J., Fukuto J.M. // Archiv. Biochem. Biophys. 2000. V. 377. № 2. P. 296–303.
44. Li Q., Huang W., Xiong C., Zhao J. // Chemosphere. 2018. V. 201. № 6. P. 294–302.
45. Guo S., Yao Y., Zuo L., Shi W., Gao N., Xu H. // J. Basic Microbiol. 2016. V. 56. № 1. P. 36–43.
46. 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.
47. Yin S., Gao Z., Wang C., Huang L., Kang Z., Zhang H. // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 178.
48. Huang H., Huang M., Lv W., Hu Y., Wang R., Zheng X. et al. // Front. Pharmacol. 2019. V. 10. P. 1143.
49. Zhang Y., Shi H., Liang S., Ning G., Xu N., Lu J. et al. // Microbial Res. 2015. V. 180. P. 11–22.
50. Do Y.J., Kim D.H., Jo M.S., Kang D.G., Lee S.W., Kim J.-W., Hong J.K. // Korean J. Mycol. 2019. V. 47. № 3. P. 219–232.
51. Marcos A.T., Ramos M.S., Marcos J.F., Carmona L., Strauss J., Canovas D. // Mol. Microbiol. 2016. V. 99. № 1. P. 15–33.
52. Филиппович С.Ю., Бачурина Г.П., Крицкий М.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 3. С. 331–337.
53. Marcos A.T., Ramos M.S., Schinko T., Strauss J., Canovas D. // Fungal Genet. Biol. 2020. V. 137. Article 10337. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103337>
54. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. // Biochem. J. 2001. V. 357. № 3. P. 593–615.
55. Hevel J.M., White K.A., Marletta M.A. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 34. P. 22789–22791.
56. Kuo W.N., Jn-Baptiste J.B., Kanadia R.N., McNabb L.D., Zhai L., Weeks K. et al. // Cytobios. 1996. V. 87. P. 251–263.
57. Kanadia R.N., Kuo W.N., McNabb M., Botchway A. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1998. V. 45. № 6. P. 1081–1087.

58. Zhao Y., Xi Q., Xu Q., He M., Ding J., Dai Y. et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. № 10. P. 4361–4372.
59. Sarkar T.S., Biswas P., Ghosh S.K., Ghosh S. // PLoS ONE. 2014. V. 9. e107348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107348>
60. Sasano Y., Haitani Y., Hashida K., Ohtsu I., Shima J., Takagi H. // Microb. Cell Fact. 2012. V. 11. P. 11–40.
61. Astuti R.I., Nasuno R., Takagi H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. № 22. P. 9483–9497.
62. Netz D.J., Stümpfig M., Doré C., Mühlenhoff U., Pierik A.J., Lill R. // Nat. Chem. Biol. 2010. V. 6. № 10. P. 758–765.
63. Corpas F.G., Barroso J.B. // Nitric Oxide. 2017. V. 68. P. 5–6.
64. Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., van Dongen J.T. // Trends Plant Sci. 2011. V. 16. № 3. P. 160–168.
65. Baudouin E. // Plant Biol. 2011. V. 13. № 2. P. 233–242.
66. Zweier J.L., Samouilov A., Kuppusamy P. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1411. № 2–3. P. 250–262.
67. Kröncke K.D., Fehsel K., Schmidt T., Zenke F.T., Dasting I., Wesener J.R. et al. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1994. V. 200. P. 1105–1110.
68. Nasuno R., Aitoku M., Manago Y., Nishimura A., Sasano Y., Takagi H. // PLoS ONE. 2014. V. 9. e113788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113788>
69. Shinyashiki M., Chiang K., Switzer C., Gralla E., Valentine J., Thiele D.J. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 6. P. 2491–2496.
70. Gunaydin H., Houk K.N. // Chem. Res. Toxicol. 2009. V. 22. P. 894–898.
71. Radi R. // Acc. Chem. Res. 2013. V. 46. № 2. P. 550–559.
72. Bhattacharjee A., Majumdar U., Maity D., Sarkar T.S., Goswami A.M., Sahoo R., Ghosh S. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 2009. V. 388. № 3. P. 612–617.
73. Kang J.W., Lee N.Y., Cho K.C., Lee M.Y., Choi D.Y., Park S.H., Kim K.P. // Proteomics. 2015. V. 15. № 2–3. P. 580–590.
74. Lai T., Chen Y., Li B., Qin G., Tian S. // J. Proteom. 2014. V. 103. P. 47–56.
75. Friebe A., Koesling D. // Circ. Res. 2003. V. 93. № 2. P. 96–105.
76. Kig C., Temizkan G. // Protoplasma. 2009. V. 238. № 1–4. P. 59–66.
77. Schinko T., Berger H., Lee W., Gallmetzer A., Pirker K., Pachlinger R. et al. // Mol. Microbiol. 2010. V. 78. № 3. P. 720–738.
78. Tillmann A., Gow N.A.R., Brown A.J.P. // Biochem. Soc. Trans. 2011. V. 39. P. 219–223.
79. Zhou S., Narukami T., Masuo S., Shimizu M., Fujita T., Doi Y. et al. // Nat. Chem. Biol. 2013. V. 9. № 1. P. 657–663.
80. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Chumikina L.V., Topunov A.F. // Nat. Prod. Commun. 2016. V. 11. P. 1189–1192.
81. Zhao Y., He M., Ding J., Xi Q., Loake G.J., Zheng W. // Sci. Rep. V. 6. Article 37601. <https://doi.org/10.1038/srep37601>
82. Морозкина Е.В., Кураков А.В. Прикл. биохим. и микробиология. 2007. Т. 43. № 5. С. 607–613.
83. Takaya N. // J. Biosci. Bioeng. 2002. V. 94. № 6. P. 506–510.

Nitric Oxide in Fungal Metabolism

S. Yu. Filippovich^{a,*} and G. P. Bachurina^a

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

**e-mail: syf55@yandex.ru*

The review summarizes the latest data on the identification and synthesis of nitric oxide in fungi, as well as the mechanisms of NO action in these organisms, including S-nitrosylation and nitration of amino acid residues, initiation of DNA breaks, transcriptional gene activation, and the cGMP-dependent signaling pathway. Particular attention is paid to the NO-dependent regulation of such processes as apoptosis and various stress responses, spore germination, mycelium growth, and fungal differentiation.

Keywords: nitric oxide, fungal metabolism, differentiation, stress, NO synthase, nitrate reductase

УДК 581.132

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СТРЕССОВОГО БЕЛКА Hli В ПИГМЕНТ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСАХ *Arthrospira platensis*

© 2021 г. Л. С. Шарапова¹, Н. П. Юрина¹, *

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

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

Поступила в редакцию 08.06.2021 г.

После доработки 28.06.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

Изучена ассоциация стрессовых белков Hli (high light inducible proteins) с пигмент-белковыми комплексами многоклеточной цианобактерии *Arthrospira platensis*. Согласно базе данных NCBI в геноме *A. platensis* обнаружено три гена Hli, которые кодируют белки длиной 47, 64 и 69 аминокислотных остатка (а.о.). Клетки *A. platensis* инкубировали в условиях светового стресса (500 мкмоль фотонов/м² · с, 1 ч). Затем с помощью двумерного электрофореза и последующей масс-спектрометрией изучали ассоциацию белков Hli с пигмент-белковыми комплексами тилакоидных мембран. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии в составе пигмент-белковых комплексов был идентифицирован Hli 47 а.о. Показано, что белок Hli47 ассоциирован с фотосистемой II и является гомологом белка HliC *Synechocystis* sp. 6803. С помощью биоинформатического анализа установлено, что аминокислотная последовательность идентифицированного белка обнаруживала более высокую степень гомологии с белками многоклеточных цианобактерий и меньшую с аминокислотной последовательностью Hli белков одноклеточных цианобактерий.

Ключевые слова: фотосистема II, световой стресс, светоиндуцируемые стрессовые белки, белки Hli (high light inducible proteins)

DOI: 10.31857/S0555109921060118

В последнее время цианобактериям уделяется большое внимание в связи с возможностью их широкого применения в производстве биотоплива и биоремедиации [1]. Они хорошо адаптируются к разнообразным условиям, включая экстремальные, синтезируя мало изученные стрессовые белки и вторичные метаболиты [2]. Идентификация и характеристика таких белков необходима как для изучения адаптации клеток к стрессам, так и для повышения их устойчивости к стрессам при практическом применении цианобактерий. Особый интерес представляют белки светового стресса, так как одним из основных стрессовых воздействий на клетку является избыточный свет. Свет необходим для фотосинтеза, однако избыток световой энергии может нарушать работу фотосинтетического аппарата в результате процессов фотоингибирования и фотодеструкции [3]. Когда поглощенная энергия не может полностью использоваться, в реакциях электронного транспорта происходит увеличение образования синглетного кислорода и других АФК. Для диссипации избыточно поглощенной энергии в фотосинтезирующих организмах образовались различные защитные механизмы [4]. Среди защитных ме-

ханизмов фотосинтеза отдельного рассмотрения заслуживают стрессовые белки, индуцированные интенсивным светом. К ним относятся стрессовые белки Hlips (high light inducible proteins) цианобактерий с одной трансмембранной спиралью. Четыре белка Hli (HliA, HliB, HliC и HliD) обнаружено у модельной цианобактерии *Synechocystis*. Белки Hlips необходимы для поддержания нормальной жизнедеятельности клетки. Предполагают, что белки Hli принимают участие в таких важных процессах, как: регуляция биосинтеза хлорофилла; транспорт и связывание молекул хлорофилла; тушение синглетного кислорода; сборка и репарация фотосистемы 2; нефотохимическая диссипация поглощенной световой энергии [5]. Белки Hli ассоциированы с фотосистемой II и по-видимому с фотосистемой I [6, 7]. Однако основная функция этих белков пока не ясна, а данные о белках Hli других видов цианобактерий практически отсутствуют в литературе.

Большой интерес вызывают цианобактерии, имеющие длинноволновые формы хлорофилла. Это обусловлено предположением об их участии в защите фотосинтетического аппарата от фотодеструкции [8]. В работе использовали нитчатую

многоклеточную экстремофильную цианобактерию *Arthrospira platensis*, содержащую данные формы хлорофилла [8]. Длинноволновый хлорофилл с полосой флуоресценции при 760 нм был обнаружен также у других нитчатых цианобактерий — *Pseudoanabaena* sp., *Phormidium uncinatum* и *Nostoc muscorum*, но не у одноклеточных цианобактерий *Synechocystis* sp. и *Synechococcus elongatus*, часто используемых для исследований по физиологии и биохимии фотосинтеза [8]. В этой связи нами была выдвинута гипотеза, что отличие фотозащиты фотосинтетического аппарата одноклеточных и многоклеточных цианобактерий, различающихся по наличию длинноволновых хлорофиллов, отразилось и на составе стрессовых белков Hli.

Цель работы — идентификация и изучение локализации белков Hli в пигмент-белковых комплексах тилакоидов многоклеточной экстремофильной цианобактерии *A. platensis* и определение их структурных и функциональных особенностей с помощью биоинформатических программ.

МЕТОДИКА

Объект исследования. Объектами исследования служили многоклеточная цианобактерия *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitl. IPPAS B-256 и одноклеточная цианобактерия *Synechocystis* sp. PCC 6803 (далее по тексту *Synechocystis*). Клетки цианобактерий выращивали при интенсивности освещения 50 мкмоль фотонов/м² · с, температуре 30°C и аэрацией воздухом до середины логарифмической фазы роста [6, 7]. Часть клеток подвергалась воздействию светового стресса (500 мкмоль фотонов/м² · с, в течение 1 ч).

Выделение тилакоидных мембран и фракционирование хлорофилл-белковых комплексов. Выделение тилакоидных мембран из клеток цианобактерий проводили методом, описанным ранее [6, 7]. Для экстракции нативных комплексов фотосистем из тилакоидных мембран использовали мягкий неионный детергент *n*-додецил-β-D-мальтозид (β-DM). Детергент добавляли к тилакоидным мембранам в соотношении детергент—хлорофилл 15 : 1 и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Лизат мембран центрифугировали при 18000 g в течение 10 мин. Осадок тилакоидных мембран использовали для дальнейшего анализа.

Содержание хлорофилла *a* в образцах определяли в этаноловом экстракте по формуле: [Chl_a] (мг/мл) = 1.21 A_{664} – 0.17 × A_{625} [9], где A_{664} — поглощение при длине волны 664 нм, A_{625} — поглощение при длине волны 625 нм.

Фракционирование пигмент-белковых и белковых комплексов тилакоидных мембран. Фракционирование проводили с помощью электрофореза в нативном неокрашенном полиакриламидном геле (ПААГ) [10]. К лизату тилакоидных мем-

бран *A. platensis* добавляли десятикратный буфер (200 mM BisTris pH 7.0; 75% сахара, 1.0 M 6-аминокапроновая кислота) в соотношении 10 : 1. Для электрофореза в первом направлении использовали градиентный ПААГ (4–12%). Электрофорез в первом направлении проводили на приборе фирмы “Hoefer” (США) при напряжении 100 В, в течение 2.5 ч. После окончания электрофореза гелевую пластину фотографировали, а затем одну полосу использовали для электрофореза во втором направлении в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата Na (ДДС-Na). Электрофорез белков проводился в трис-глициновом буфере (25 mM трис, 250 mM глицин, 0.1%-ный ДДС-Na, pH 7.5) при постоянной силе тока 120 мА в течение 2 ч в 12.5%-ном ПААГ. Затем гель окрашивали Кумасси R-250 в течение ночи.

Идентификация белков с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF. Триптический гидролиз белка в полиакриламидном геле, окрашенном Coomassie Brilliant Blue, проводили следующим образом: кусочек геля размером 3–4 мм³ дважды промывали для удаления красителя в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0.1 M NH₄HCO₃ в течение 20 мин при 37°C. После удаления раствора для дегидратации геля добавляли 100 мкл ацетонитрила. Затем удаляли ацетонитрил, высушивали кусочек геля и добавляли к нему 3.5 мкл раствора модифицированного трипсина (“Promega”, США) в 0.05 M NH₄HCO₃ с концентрацией 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 3 ч при 37°C, затем к раствору добавляли 5.25 мкл 0.5%-ной трифторуксусной кислоты (ТФУ) в 50%-ном растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Гидролизат использовали для получения MALDI-масс-спектров. Подготовка образцов для масс-спектрометрии проводилась следующим образом: на мишени смешивали по 1.5 мкл раствора образца и 0.5 мкл раствора 2,5-диоксибензойной кислоты (“Aldrich”, США, 10 мг/мл в 20% водном ацетонитриле, 0.5% ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrix-science.com). Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (“Bruker Daltonics”, Германия). Оборудование и программное обеспечение для масс-спектрометрии использовали на базе Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фракционирование хлорофилл-белковых комплексов тилакоидных мембран цианобактерий. Хлорофилл-белковые комплексы цианобактерий *Synechocystis* и *A. platensis* фракционировали с помощью нативного электрофореза в ПААГ (рис. 1).

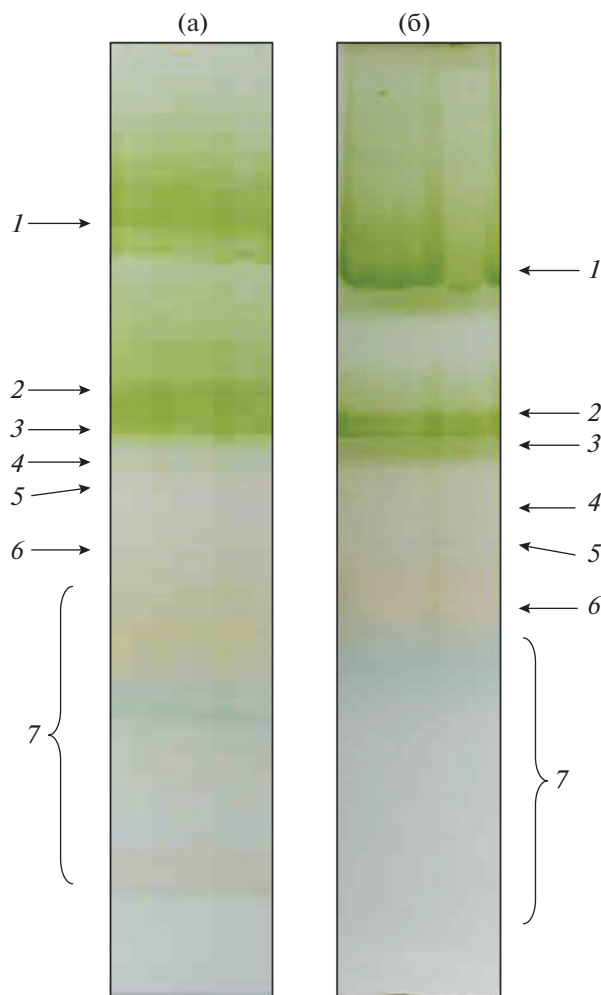


Рис. 1. Электрофореграмма пигмент-белковых комплексов тилакоидных мембран *Synechocystis* (а) и *A. platensis* (б) в ПААГ в нативных условиях: 1 – тримеры ФСI; 2 – мономеры ФСI; 3 – димеры ФСII; 4 – мономеры ФСII; 5 – НАДФ(Ф)Н-оксидоредуктаза; 6 – цитохром b₆/f, 7 – зона свободных белков.

При фракционировании пигмент-белковых комплексов в нативном геле обнаружены следующие компоненты тилакоидных мембран: тримеры и мономеры фотосистемы I, димеры и мономеры комплекса фотосистемы II, НАДФ-оксидоредуктаза, цитохромный комплекс b₆-f и белки, не включенные в комплексы (зона свободных белков). Показано сходство состава пигмент-белковых комплексов одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* и многоклеточной *A. platensis*.

Локализация белков Hli в хлорофилл-белковых комплексах тилакоидных мембран *A. platensis*. Гели с фракционированными комплексами подвергали электрофорузу во втором направлении, в денатурирующих условиях. Фракционирование белков хлорофилл-белковых комплексов *A. platensis* в денатурирующих условиях представлено на рис. 2.

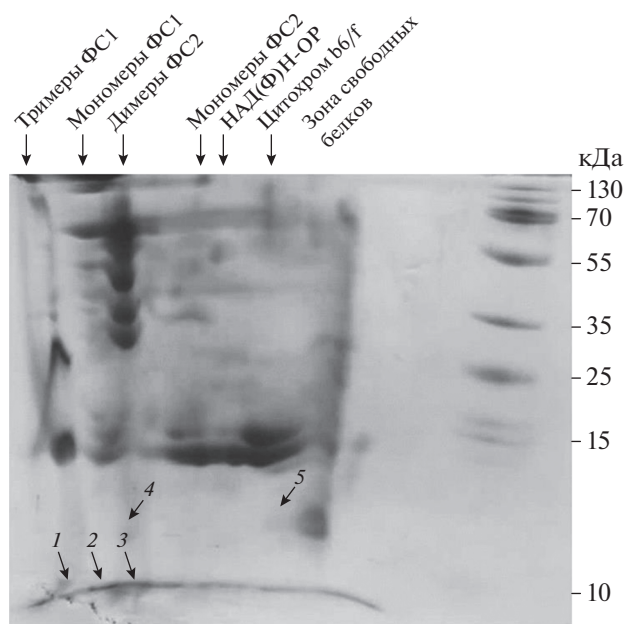


Рис. 2. Электрофореграмма белков тилакоидных мембран *A. platensis* в ПААГ с Na-ДДС (1-5 – порядковые номера белков, идентифицированных с помощью масс-спектрометрии): 1-3 – белок Hli47; 4 – белок Psb27 фотосистемы II; 5 – α -субъединица фикоцианина.

Для определения локализации белков в хлорофилл-белковых комплексах на геле второго направления были выбраны окрашенные кумасси участки геля, в которых могли быть обнаружены белки Hli. Выбор производился с учетом окрашивания белков Кумасси, молекулярной массы белка Hli и его наиболее вероятной локализации в хлорофилл-белковых комплексах цианобактерии. Выбранные образцы геля были проанализированы с помощью масс-спектрометрического анализа МАЛДИ-ТОФ. В образцах 1, 2 и 3 был идентифицирован белок Hli длиной 47 аминокислотных остатков (а.о.). В этих образцах кроме белка Hli47 были обнаружены белки фотосистемы II. Из полученных данных следует, что идентифицированный белок Hli47 *A. platensis*, ассоциирован с фотосистемой II.

Белок Hli *A. platensis*, идентифицированный с помощью масс-спектрометрии, был найден в базе данных NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_00661948923.02.19.23.02.19.g) [11]. С помощью биоинформатического анализа проведено описание некоторых структурных и функциональных особенностей идентифицированного белка Hli47.

Используя программу Smart Blast [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bast/smartblast/>], была проведена оценка степени филогенетического родства идентифицированного белка с белками Hli других организмов. Показано, что аминокислотная после-

<i>Arthrospira platensis</i> , 64 aa	1	-----MTETPQPTTTTPQTTPNLEPFKFFSNYSERLNGRAMIGFVITLAIYFTGGGLLAWLGLS	64
<i>Arthrospira platensis</i> , 69 aa	1	---MVRGQIMEEGGRANYVA-IEPVYVEAQGFPEFNKHAEKLNGLAMIGFSVALAVLTGHGLIGWTSI	69
<i>Arthrospira platensis</i> , 47 aa	1	-----MENQGTRFGEFEFAETWNGLRAMLGFGVIGVGTELLTGGGILSQLGLM	47
<i>Synechocystis</i> sp., hliA, 70 aa	1	MTRRGFRLLDQNRLNNFA-IEPEVYVDSSVQAGWTXYAEKMNGRFAMIGFASLLIMVVTGHGVIGWLNSL	70
<i>Synechocystis</i> sp., hliB, 70 aa	1	MTRSGRFLRDQNRNLNNA-IEPPVYVDSVQAGWTXYAEKMNGRFAMIGFISLLAMVVTGHGVIGWLSSL	70
<i>Synechocystis</i> sp., hliD, 57 aa	1	-----MSEELQPNTQVPQGDPEKFENNYYAEKLNGRAMVGGELLIVIFYFTNGCVLAWLGLR	57
<i>Synechocystis</i> sp., hliC, 57 aa	1	-----MNNESEKFEFTAENWNGLAMIGFSALLILELVSGCGVLHFFGIL	47

Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей белков Hli *Synechocystis* и *A. platensis* с помощью программы UniProt. Выделено темно-серым (*) – полное совпадение а.о., серым (:) – близкие по свойствам а.о., светло-серым (.) – сходные по свойствам а.о.

(a)

Synechocystis sp., hliC, 47 aa 1 MNNENSKFGFTAPFAENWNGRLAMIGFSSALILELVSQGVHFFGIL 47
Arthrospira platensis, 47 aa 1 MENQGTKFGFTEFAETWNGRLAMIGFVIGVTALLTGQGIISQLGLM 47
 *: : . : * :

(b)

Synechocystis sp., hliD, 57 aa 1 -----MSEELQFNQTFVQEDPKFGFNNAEKLNGRAAMVGFLLIIVIEYFTNQGVLAWLGR 57
Arthrospira platensis, 64 aa 1 MTETPQPTITTPQTITTINLQEPKFGENSYSERLNGRAAMIGFVITIAIEYFTQGGLLAWLGIS 64
 : * * * * : *

(c)

Synechocystis sp., hliA, 70 aa 1 MTRGFRLDQDNRLNFAIEPEVVYDSVQAGWTKYAEKNRGRFAMIGFASLLIMEVVTHGHVIGWINSL 70
Arthrospira platensis, 69 aa 1 -MYRGQIMEEGGRAIVYAIEPEQVYVEEQCFGENKHAEKLNGLRAMIGFVSALALEVLITGHGLIGWITS 69
 : : : : : * * : *

Рис. 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей белков *Synechocystis*. а – HliC *Synechocystis* и идентифицированного белка Hli 47 а.о. *A. platensis*; б – белка HliD *Synechocystis* и белка Hli 64 а.о. *A. platensis*; в – белка HliA *Synechocystis* и белка Hli 69 а.о. *A. platensis*. Выделено темно-серым (*) – полное совпадение а.о., серым (:) – близкие по свойствам а.о., светло-серым (.) – сходные по свойствам а.о.

довательность идентифицированного белка Hli *A. platensis* имеет высокую степень идентичности с белками Hli других многоклеточных цианобактерий (Hli_p 47 а.о., *Leptolyngbya* sp. — 89%; Hli_p 47 а.о., *Geitlerinema* sp. — 87%). В то же время с аминокислотная последовательность белка Hli одноклеточной *Synechocystis* sp. идентифицированный белок имеет значительно меньшее сходство, всего — 55% (приведено ниже на рис. 4).

Филогенетически наиболее родственными Hlip 47 а.о. *A. platensis*, являются белки Hli других многоклеточных (нитчатых) цианобактерий. Ближайшие соседи – *Limnospira indica*, *Planktothrix agardhii* содержат белки Hli, имеющие аминокислотную последовательность, практически аналогичную Hlip 47 а.о. *A. platensis*. Полученный результат согласуется как с данными, полученными с помощью программы Smart Blast, так и с литературными данными [12]. Род *Limnospira* был совсем недавно выделен в отдельную группу от рода *Arthrospira*, а *Planktothrix* является близкородственным для *Arthrospira* [12]. Белки Hli одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* филогенетически менее сходны с Hli 47 а.о. *A. platensis*. При поиске аминокислотных последовательностей, идентичных Hlip 47 а.о. *A. platensis*, программой Smart Blast практически не находит таковых у одноклеточных цианобактерий.

Для определения сходства белков Hli *Synechocystis* sp. и *A. platensis* с помощью программы UniProt (<https://www.uniprot.org/>) было проведено выравнивание их аминокислотных последовательностей. Показано, что их общая идентичность составляет всего 15.5% (рис. 3). Парное сравнение каждой из последовательностей белков Hli *Synechocystis* sp. с последовательностью идентифицированного белка Hli 47 а.о. *A. Platenis* показало, что аминокислотная последовательность белка HliC *Synechocystis* sp. наиболее гомологична последовательности идентифицированного белка Hli *A. platensis* 47 а.о. Их общая идентичность составляет 55% (рис. 4а).

Ранее белок HliC был выделен из цианобактерии *Synechocystis* sp. и охарактеризованы некоторые его структурные и физико-химические свойства [13]. Полученные структурные данные позволили предположить, что с белком HliC связывается по меньшей мере четыре молекулы хлорофилла и две молекулы β -каротина. Это указывало на участие этих белков в фотозащите и на их способность связывать вредоносные молекулы свободного хлорофилла, вызывающие фотодеструкцию.

Чтобы составить более полное представление о степени гомологии первичной структуры белков Hli *Synechocystis* sp. и *A. platensis*, было проведено парное сравнение каждой из последователь-

ностей белков Hli *Synechocystis* sp. с последовательностями белков Hli 64 и 69 а.о. *A. platensis*. В результате такого сравнения было показано, что Hli 64 а.о. *A. platensis* имел наиболее высокий процент сходства с последовательностью белка HliD *Synechocystis* sp. — 55% (рис. 4б). Аминокислотная последовательность Hliр 69 а.о. *A. platensis* имела наибольшее сходство с HliA *Synechocystis* sp. — 56% (рис. 4в). Гомология между представленными парами белков напрямую зависит от длины их аминокислотной последовательности. Также следует отметить, что даже самый большой процент сходства аминокислотных последовательностей между белками Hli *Synechocystis* sp. и *A. platensis*, не превышал 56%. Таким образом, в составе белков Hli *A. platensis* обнаружены гомологи охарактеризованных ранее белков *Synechocystis*: Hli64 — гомолог HliD; Hli69 — гомолог HliA и Hli47 гомолог HliC. Гомолог HliB отсутствовал в геноме *A. platensis*.

С помощью программы EMBOSS Pepwindow (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepwindow/, 28.10.19. г.) был построен график гидрофобности белка Hli 47 а.о. *A. platensis* (рис. 5). Из полученного графика следует, что идентифицированный белок Hli 47 а.о. содержал достаточно протяжённый гидрофобный участок, характерный для трансмембранных доменов и являлся мембранным белком.

Для выяснения функций идентифицированного белка Hli 47 а.о. *A. platensis*, а также понимания пространственного расположения молекулы и ее локализации в клетке, с помощью программы I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>, 29.10.19. г.) была построена трёхмерная модель белка (рис. 6). Моделирование I-TASSER [14–16] начинается с поиска шаблонов структур в библиотеке PDB (Protein Data Bank). В качестве наиболее удачного шаблона для построения модели белка Hli 47 а.о. *A. platensis* программа выбрала модель кристаллической структуры фотозащитного белка PsbS шпината (*Spinacia oleracea*). Это хлоропластный мембранный белок, локализован в фотосистеме II шпината, мол. масса 22 кДа и содержит четыре трансмембранных спирали. Этот белок PsbS фотосистемы II играет важную роль в нефотохимическом тушении [17], которое защищает растения от фотоповреждений в условиях избыточного освещения [18].

Таким образом, полученные с помощью биоинформатических методов данные свидетельствуют, что Hliр 47 а.о. *A. platensis* — трансмембранный односторонний белок, компонент клеточной мембраны цианобактерий. Анализ структуры белка подтвердил наличие сайтов связывания лигандов, среди которых хлорофилл а является наиболее значимым. Возможно, что белок участвует в нефото-

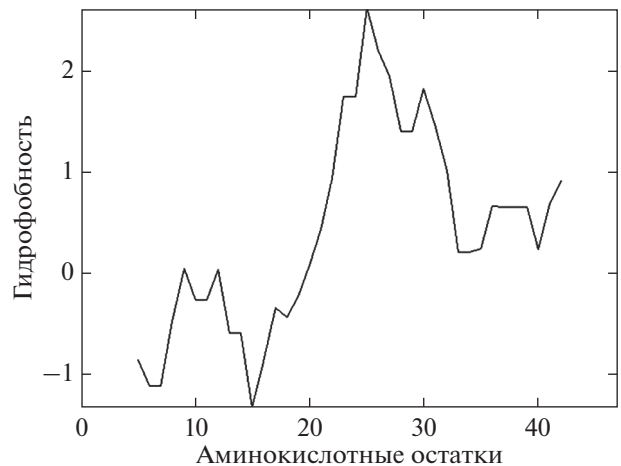


Рис. 5. График гидрофобности белка Hli 47 а.о. *A. platensis*. На оси x — номера аминокислотных остатков (а.о.), на оси y — гидрофобность аминокислот, входящих в состав белковой последовательности.

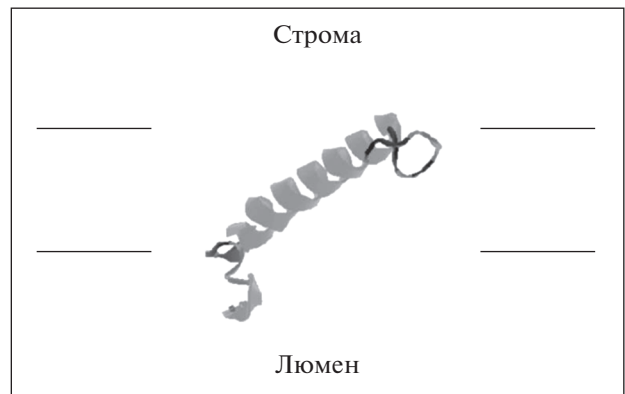


Рис. 6. Структурная модель низкомолекулярного светоиндуцируемого белка Hli 47 а.о. *A. platensis*. Модель рассчитана на основании кристаллической структуры фотозащитного белка PsbS шпината (*Spinacia oleracea*, <http://www.rcsb.org/>) Приведено пространственное расположение молекулы белка в тилакоидной мембране относительно стромы клетки и люмена тилакоида.

химическом тушении избыточно поглощённой световой энергии.

Метаболизм азотистых соединений входит в число биологических процессов, в которых предположительно участвует идентифицированный белок. В исследованиях, проведенных ранее на *Synechocystis*, было обнаружено, что содержание белка HliC в клетке значительно повышается в условиях дефицита азота. При этом содержание остальных белков Hli остается на низком уровне [19]. Первичная структура HliC, как было отмечено, имеет значительное сходство с Hli 47 а.о. *A. platensis*.

На основании сходства аминокислотных последовательностей белка Hli 47 а.о. *A. platensis* и

белка HliC *Synechocystis* sp., можно предположить, что в цианобактериальных клетках они выполняют сходную фотозащитную функцию, связывая фототоксичные свободные молекулы хлорофилла. Белки Hli, связывая свободный хлорофилл, препятствуют образованию активных форм кислорода [20].

Семейство стрессовых светоиндуцируемых белков Hli цианобактерий рассматривается как эволюционные предшественники хлорофилл a/b связывающих белков светособирающего комплекса ЛНС растений и водорослей [4]. Большинство исследований этих важных белков выполнено на клетках цианобактерии *Synechocystis*. В настоящей работе впервые изучены Hli белки многоклеточной цианобактерии *A. platensis*. Согласно базе данных NCBI в геноме *A. platensis* обнаружено три гена Hli, которые кодируют белки длиной 47, 64 и 69 а.о. В то время как в полностью секвенированном геноме цианобактерии *Synechocystis* были идентифицированы четыре гена, кодирующих белки Hli: HliB, HliC, HliD. Кроме того, Hli-домен был обнаружен на С-конце фермента феррохелатазы [21, 22]. В геноме *A. platensis* не содержится гена белка, гомологичного белку HliB *Synechocystis* sp.

В ассоциации с пигмент-белковыми комплексами у *A. platensis* участвует Hli47 — гомолог белка HliC. Доказательство связывания других белков Hli *A. platensis* с пигмент-белковыми комплексами ФС I и ФС II требует дальнейших исследований. С помощью биоинформатического анализа установлено, что аминокислотная последовательность белка Hli47 обнаруживает более высокую гомологию с белками многоклеточных цианобактерий и меньшую степень гомологии с аминокислотной последовательностью Hli белков одноклеточных цианобактерий.

Проведенное сравнение состава белков Hli у одноклеточной цианобактерии *Synechocystis* и многоклеточной экстремофильной цианобактерии *A. platensis*, содержащей длинноволновые формы хлорофилла [8], показало различия в содержании белков Hli в составе пигмент-белковых комплексов фотосистем. Не исключено, что различия в составе белков Hli одноклеточной и многоклеточной цианобактерий отражают особенности механизма фотозащиты этих цианобактерий.

Изучение механизмов фотопротекции у разных видов цианобактерий позволяет расширить знания о фотозащитных функциях односпиральных светоиндуцируемых белков Hli. Эти исследования открывают новые возможности селекции устойчивых к избыточному освещению и высокоурожайных сортов и гибридов, фотосинтетический аппарат которых позволит эффективнее использовать абсорбированную световую энергию. Механизм функционирования стрессовых белков

может быть использован также при создании систем искусственного фотосинтеза.

Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 190400798).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khetkorn W., Rastogi R.P., Incharoensakdi A., Lindblad P., Madamwar D., Pandey A. // *Bioresour. Technol.* 2017. V. 243. P. 1194–1206.
2. Babel P.K., Kumar J., Chaturvedi V. // *Frontiers in Microbiology*. 2019. V. 10. Art. 1315. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01315>
3. Jensen P.E., Leister D. // *F1000Prime Rep.* 2014. V. 6. Art. 40. <https://doi.org/10.12703/P6-40>
4. Tibiletti T., Rehman A.U., Vass I. // *Photosynth. Res.* 2018. V. 135. P. 103–114.
5. Komenda J., Sobotka R. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. V. 1857. P. 288–295.
6. Акуликина Д.В., Большевцева Ю.В., Еланская И.В., Карапетян Н.В., Юрина Н.П. // *Биохимия*. 2015. Т. 80. № 10. С. 1522–1531.
7. Шарапова Л.С., Акуликина Д.В., Большевцева Ю.В., Еланская И.В., Юрина Н.П. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2019. Т. 55. № 1. С. 69–76.
8. Карапетян Н.В., Большевцева Ю.В., Юрина Н.П., Терехова И.В., Шубин В.В. // *Биохимия*. 2014. Т. 79. № 3. С. 283–292.
9. Lichenthaler H.K. // *Methods in Enzymology*. 1987. V. 148. P. 350–382.
10. Schagger H., von Jagow G. // *Anal. Biochem.* 1991. V. 199. P. 223–231.
11. Fujisawa T., Narikawa R., Okamoto S., Ehira S., Yoshimura H., Suzuki I. et al. // *DNA Res.* 2010. V. 17. P. 85–103.
12. Nowicka-Krawczyk P., Mühlsteinová R., Hauer T. // *Scientific Reports*. 2019. V. 9. Art. 694. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36831-0>
13. Shukla M.K., Llansola-Portoles M.J., Tichy M., Pascal A.A., Bruno R., Sobotka R. // *Photosynthesis Research*. 2017. V. 137. P. 29–39.
14. Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y. // *Nature Methods*. 2015. V. 12. P. 7–8.
15. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. // *Nature Protocols*. 2010. V. 5. P. 725–738.
16. Zhang Y. // *BMC Bioinformatics*. 2008. V. 9. P. 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
17. Ruban A.V. // *Plant Physiology*. 2016. V. 170. P. 1903–1916.
18. Fan M., Li M., Liu Z., Cao P., Pan X., Zhang H., Zhao X., Zhang J., Chang W. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015. V. 22. P. 729–735.
19. Kopf M., Klahn S., Scholz I., Matthiessen J.K., Hess W.R., Voss B. // *DNA Res.* 2014. V. 21. P. 527–539.
20. Staleva H., Komenda J., Shukla M.K., Šlouf V., Kaňa R., Polívka T., Sobotka R. // *Nat. Chem. Biol.* 2015. V. 11. P. 287–291.
21. Kaneko T., Sato S., Kotani H., Tanaka A., Asamizu E., Nakamura Y. et al. // *DNA Res.* 1996. V. 3. P. 109–136.
22. Funk C., Vermaas W. // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 9397–9404.

Identification of the Stress Protein Hli in the Pigment-Protein Complexes of *Arthrospira platensis*

L. S. Sharapova^a and N. P. Yurina^{a,*}

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

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

In this work, Hli proteins of the multicellular cyanobacterium *Arthrospira platensis* were studied. According to the NCBI database, three Hli genes were found in the *A. platensis* genome, which encode proteins 47, 64, and 69 a.a. *A. platensis* cells were incubated under light stress (500 $\mu\text{mol photons/m}^2 \text{ s}$, 1 h). Then, the association of Hli proteins with pigment-protein complexes of thylakoid membranes was studied using two-dimensional electrophoresis and subsequent mass spectrometry. Only Hli 47 a.o. was detected in the composition of pigment-protein complexes using MALDI-TOF mass spectrometry. The identified Hli47 protein was shown to be associated with photosystem II and to be a homolog of the HliC protein *Synechocystis* sp. Bioinformatic analysis has shown that the amino acid sequence of the identified protein shows a higher homology with the proteins of multicellular cyanobacteria and a lower degree of homology with the amino acid sequence of Hli proteins of unicellular cyanobacteria.

Keywords: photosystem II, light stress, light-induced stress proteins, Hli proteins (high light inducible proteins)

УДК 557.152.192.3

ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ (+)-КАТЕХИНА В ГЛУБОКОМ ЭВТЕКТИЧЕСКОМ РАСТВОРИТЕЛЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГРИБНОЙ ЛАККАЗЫ: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОДУКТОВ И ИНГИБИРОВАНИЕ α -ГЛЮКОЗИДАЗЫ

© 2021 г. М. Е. Хлупова¹, О. В. Морозова¹, И. С. Васильева¹, Г. П. Шумакович¹,
Е. А. Зайцева², В. А. Чертков², А. К. Шестакова³, 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

³Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений, Москва, 105118 Россия

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

Поступила в редакцию 26.05.2021 г.

После доработки 18.06.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

Глубокие эвтектические растворители (ГЭР) являются альтернативой традиционным органическим растворителям для проведения ферментативных реакций между соединениями с плохой растворимостью. Проведена биокаталитическая полимеризация флавоноида (+)-катехина (КХ) с использованием лакказы из культуральной жидкости базидиального гриба *Trametes hirsuta* в ГЭР-буферной смеси (бетаин/глицерин 60 об. % — буфер 40 об. %). Подобраны условия синтеза олигомеров катехина (олигоКХ), растворимых в органических растворителях. По данным высокоэффективной жидкостной хроматографии олигоКХ имели среднечисленную молекулярную массу 10620 и 2540 г/моль с индексом полидисперсности 1.1 и 1.09, соответственно. Исследованы физико-химические свойства полученных олигомеров методами УФ-видимой, FTIR, ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии. Полученные олигоКХ ингибировали активность α -глюкозидазы ($\text{IC}_{50} \sim 8$ мкг/мл).

Ключевые слова: (+)-катехин, лакказа, глубокие эвтектические растворители, ферментативная полимеризация, олигомеры катехина, ингибирование α -глюкозидазы

DOI: 10.31857/S0555109921060064

Катехины относятся к растительным флавоноидам и обладают антиканцерогенными, антибактериальными, антиоксидантными, кардиопротекторными и хелатирующими свойствами, а также ингибируют активность различных ферментов [1–6]. Биологические свойства катехинов сильно зависят от их химической структуры. В отличие от полифенольных соединений с низкой молекулярной массой, их полимерные и олигомерные производные обладают улучшенными физиологическими характеристиками и более продолжительным временем жизни *in vivo* [7]. В литературе описано получение олигомеров/полимеров КХ ферментативной полимеризацией мономера с использованием лакказ и пероксидазы [8–10], фотополимеризацией [11] и HCl-катализируемой полимеризацией [12]. В связи с плохой растворимостью катехинов в водных растворах, их полимеризацию обычно проводят в водно-органических смесях. Катехины и их олигомеры проявля-

ют ингибиторную активность по отношению к α -амилазе и α -глюкозидазе [8, 13, 14]. Эти ферменты играют значительную роль в гидролизе полисахаридов, способствуя уменьшению уровня глюкозы в крови и, таким образом, влияют на развитие сахарного диабета 2 типа — хронического заболевания для многих людей во всем мире. Одним из направлений лечения этого заболевания является уменьшение скорости разложения полисахаридов путем ингибирования активности α -амилазы и α -глюкозидазы. Таким образом, олиго-/поликатехины, обладающие большей стабильностью по сравнению с мономером КХ, могут являться перспективной субстанцией для лечения диабета 2 типа.

Лакказа (*n*-дифенол:кислород оксидоредуктаза, КФ 1.10.3.2) относится к “голубым” оксидазам, катализирует окисление различных органических соединений, включая полифенолы, метокси-замещенные фенолы, полиамины молекулярным

кислородом. При ферментативном окислении фенольных субстратов образуются радикальные продукты, которые вступают в реакции сочетания с образованием олигомерных/полимерных соединений [15, 16]. Этот фермент привлекает большое внимание в качестве катализатора для тонкого органического синтеза [17, 18] и может быть использован для полимеризации различных органических соединений.

В последние годы появился новый класс растворителей, названных глубокими эвтектическими растворителями (ГЭР) [19], которые имеют большое преимущество перед традиционными органическими растворителями, а именно, нетоксичность, невоспламеняемость, биodeградируемость и др. Они рассматриваются как “зеленые” растворители. Как правило, ГЭР получают простым термическим смешиванием как минимум двух компонентов, в результате которого образуется эвтектический раствор с температурой плавления ниже, чем у отдельных компонентов [19–21]. Компоненты ГЭР обычно представляют собой органические соединения, одно из которых является акцептором, а другое донором водородных связей. ГЭР или их смеси с буферным раствором могут использоваться в различных областях, в том числе для проведения биокаталитических реакций [22]. В литературе описано весьма ограниченное количество примеров использования оксидоредуктаз для синтеза соединений в ГЭР-буферных смесях [23, 24].

Цель работы – проведение окислительной полимеризации (+)-катехина с участием грибной лакказы *Trametes hirsuta* в ГЭР-буферной смеси и исследование структуры и свойств полученных продуктов.

МЕТОДИКА

Лимонная кислота, NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , NaOH – производства “Riedel-de Haën” (Германия), 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат) (АБТС), α -глюкозидаза из *Saccharomyces cerevisiae*, *N*-нитрофенил- α -D-глюкопиранозид (ПНФГ) – “Sigma-Aldrich” (США), тетрагидрофуран (ТГФ), диметилформамид (ДМФА), ацетонитрил, бетаин моногидрат “Acros Organics” (США), (+)-катехин ($\geq 96\%$) – “Carl Roth GmbH” (Германия), диметилсульфоксид (ДМСО) – “Marbiopharm” (Россия), ДМСО- D_6 (“Aldrich”), глицерин 99% “Pan-teas” (Испания), уксусная кислота высшей степени очистки производства “Химмед” (Россия) были использованы без дополнительной очистки.

Лакказа была выделена из культуральной жидкости базидиального гриба *Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilát (штамм *T. hirsuta* 56) согласно методу [25]. Фермент был гомогенен по данным ДДС-электрофореза и имел удельную активность 163 МЕ/мг белка. Активность фермента определяли спектрофотометрически, используя в качестве хромоген-

ного субстрата 1 мМ раствор АБТС ($\lambda = 420$ нм; $\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) в 0.1 М Na-цитратно-фосфатном буфере, pH 4.5. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль АБТС за 1 мин при температуре 22°C. Концентрация белка, измеренная согласно методу [26], составляла 7.8 мг/мл.

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

ГЭР бетаин-глицерин получали термическим смешиванием компонентов с молярным соотношением 1 : 2 при 45°C. Смесь ГЭР/буфер с соотношением 60 : 40 об. % готовили добавлением соответствующего объема 0.1 М Na-цитратно-фосфатного буфера, pH 4.5, к ГЭР.

Ферментативную полимеризацию КХ проводили следующим образом: 15 мг КХ растворяли в 1.8 мл ГЭР, добавляли 1.2 мл буферного раствора и интенсивно перемешивали. Концентрация КХ в реакционной среде была 17 мМ. Полимеризацию инициировали добавлением фермента (удельная активность в реакционной смеси 1.05 МЕ/мл). Синтез проводили в аэробных условиях при комнатной температуре (21–22°C) и постоянном перемешивании со скоростью 400 об./мин на магнитной мешалке RT-10 (“IKA®-Werke GmbH & Co”, Германия) в течение 24 ч. Затем прозрачный раствор разбавляли в 5 раз деионизированной водой, образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (7000 g, 20 мин) с использованием центрифуги Eppendorf 5804 R (Австрия), многократно промывали 3%-ным раствором этанола, высушивали при 37°C до постоянного веса и использовали в дальнейших экспериментах. Выход продукта рассчитывали, как процентное отношение массы полученного олигоКХ к массе исходного мономера.

Среднечисленную молекулярную массу и индекс полидисперсности олигоКХ определяли методом гель-проникающей хроматографии на хроматографе высокого давления “Waters” (США), оснащенный колонкой Styragel HR 1E, 300 × 7.8 мм (“Waters”, США), УФ- и рефрактометрическим детекторами. В качестве элюента использовали ТГФ, скорость потока 1 мл/мин, объем вводимой пробы 40 мкл. Калибровку системы проводили по полистирольным стандартам.

УФ-видимые спектры регистрировали на спектрофотометре UV1240 mini (“Shimadzu”, Япония), ИК спектры образцов в таблетках KBr на спектрометре Frontier FT-IR/FIR (“PerkinElmer Inc.”, США). Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали в ДМСО- D_6 при температуре 303К на спектрометре AV-600 (“Bruker”, США) с рабочей частотой 600.03 МГц для ядер ^1H . Для отнесения сигналов ядер ^1H и ^{13}C использовали данные двумерных экспериментов COSY, HSQC и HMBC [27]. Полученные параметры спектров мономера КХ

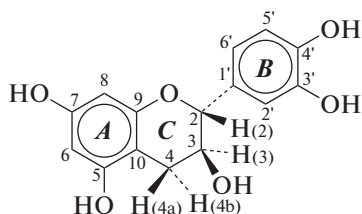


Рис. 1. Структурная формула (+)-катехина и нумерация атомов в молекуле.

ЯМР ^1H : 2.354 (1H, dd, $J = 15.96$; 8.12, H_{4b}); 2.660 (1H, dd, $J = 15.96$; 5.36, H_{4a}); 3.812 (1H, ddt, $J_d = 7.49$; 8.12, $J_t = 5.25$, H_3); 4.482 (1H, d, $J_d = 7.49$, H_2); 4.836 (1H, d, $J_d = 5.17$, 3-OH); 5.691 (1H, d, $J_d = 2.29$, H_8); 5.889 (1H, d, $J_d = 2.29$, H_6); 6.597 (1H, dd, $J_d = 2.05$, 8.02 H_6); 6.686 (1H, d, $J_d = 8.02$ H_5); 6.725 (1H, d, $J_d = 2.05$ H_2); 8.774 (1H, s, 4'-OH); 8.822 (1H, s, 3'-OH); 8.906 (1H, s, 7-OH); 9.139 (1H, s, 5-OH); ЯМР ^{13}C : 27.91 (C_4); 66.39 (C_3); 81.07 (C_2); 93.94 (C_8); 95.21 (C_6); 99.14 (C_{10}); 114.60 (C_2); 115.15 (C_5); 118.48 (C_6); 130.69 (C_1); 144.90 (C_3 & C_4); 155.42 (C_9); 156.23 (C_5); 156.52 (C_7). Химические сдвиги приведены в м.д., константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) — в Гц, s — синглет, d — дублет, dd — дублет дублетов, ddt — дублет дублетов триплетов.

Активность α -глюкозидазы определяли по гидролизу субстрата фермента ПНФГ, продукт гидролиза которого имеет максимум поглощения при 400 нм. Определение ингибирования α -глюкозидазы проводили по методу [28] с минимальными изменениями. В реакционную смесь: 100 мкл α -глюкозидазы (0.5 МЕ/мл) и 600 мкл 0.1 М фосфатного буфера (pH 6.9) вносили 50 мкл раствора исследуемого вещества в ДМСО в концентрации 31.25, 62.5, 125, 250, 500 и 1000 мкг/мл. Затем смесь инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Реакцию инициировали добавлением 100 мкл 5 мМ раствора ПНФГ в 0.1 М фосфатном буфере (pH 6.9) и инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Затем реакцию останавливали добавлением 400 мкл 0.2 М раствора Na_2CO_3 и измеряли поглощение при 400 нм при комнатной температуре. Ингибирование фермента рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = \frac{D_0 - D}{D_0} \times 100,$$

где D_0 — контроль (поглощение раствора без исследуемого вещества); D — поглощение раствора в присутствии КХ или олигоКХ. Влияние ДМСО на фермент учитывали в контроле. Определение ингибирующего действия мономера КХ проводили аналогично в диапазоне концентраций 1–20 мг/мл ДМСО.

Эффективность ингибирования оценивали по значению IC_{50} , которое определяли из графика зависимости ингибирования (%) от concentra-

ции исследуемого вещества. IC_{50} — концентрация вещества, необходимая для ингибирования 50% активности фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена структурная формула (+)-катехина, использованного в данной работе. Согласно литературным данным, ГЭР сохраняют свои свойства в составе водных смесей при содержании ГЭР выше 50 вес. %. При меньшем содержании ГЭР, смесь ГЭР/вода нужно рассматривать как водный раствор отдельных компонентов [29]. Ферментативную полимеризацию КХ проводили в смеси ГЭР/буфер, содержащей 40 об. % (~35 вес. %) буфера. Были подобраны условия полимеризации КХ (активность фермента в реакционной среде, время реакции) для получения продуктов полимеризации, растворимых в ацетонитриле, ДМСО, ТГФ и ДМФА. Обнаружено, что для получения растворимых в органических растворителях олигоКХ, активность лакказы в реакционной среде должна быть 1.05 МЕ/мл, а время синтеза — 24 ч. Выход продуктов в этих условиях составлял 32%. При увеличении активности фермента продукты полимеризации КХ были не растворимы в указанных выше растворителях, что препятствовало их исследованию.

По данным гель-проникающей хроматографии в результате ферментативной полимеризации КХ в смеси ГЭР/буфер образовывалось два продукта со среднечисленной молекулярной массой 10620 и 2540 г/моль и индексом полидисперсности 1.1 и 1.09 соответственно. Таким образом, в результате ферментативной полимеризации КХ в смеси ГЭР/буфер образуется 2 олигомера со степенью полимеризации 24 и 6.

УФ-видимые спектры мономера КХ и олигоКХ в ДМСО представлены на рис. 2. Острый пик при 280 нм на спектре КХ соответствует π - π^* переходам ароматических фрагментов мономера. Продукты ферментативной полимеризации КХ, растворимые в ДМСО, поглощают в широком диапазоне длин волн, вплоть до 600 нм. На спектре олигоКХ помимо максимума при 280 нм видны максимумы при 260, 330 и 370 нм.

На рис. 3 представлены ИК-Фурье спектры КХ и олигоКХ. На спектре мономера (рис. 3, кривая 1) присутствуют полосы, соответствующие валентным колебаниям связи О—Н (широкий максимум в области 3200–3550 cm^{-1}), валентным колебаниям $\text{C}=\text{C}$ и $\text{C}-\text{C}$ связей ароматических колец (1430–1625 cm^{-1}) и $\text{C}-\text{O}$ фенолов и простых эфиров (1100–1310 cm^{-1}), деформационным колебаниям $\text{C}-\text{OH}$ (1330–1390 cm^{-1}) и $\text{C}-\text{H}$ (650–900 cm^{-1}) связей ароматических колец [30]. Характерные области адсорбции для этих групп отмечены на рис. 3 горизонтальными линиями. На спектре олигоКХ также присутствовали

полосы, характерные для валентных колебаний групп О–Н, С=С, С–С и С–О (рис. 3, кривая 2), однако их интенсивность снижена по сравнению со спектром КХ. Наиболее существенные различия наблюдались в низкочастотной области спектров: на спектре олигоКХ отсутствовали полосы, соответствующие колебаниям связи $C_{аром}-H$. Можно предположить, что при ферментативной полимеризации КХ происходило замещение ароматических протонов.

Для структурного анализа олигоКХ была использована спектроскопия ЯМР на ядрах 1H и ^{13}C (рис. 4, 5). Было проведено отнесение всех сигналов в спектрах ЯМР 1H и ^{13}C мономера КХ (нумерация атомов показана на рис. 1). Опорными служили сигналы протонов Н4а и Н4б, имеющие характерную мультиплетность (рис. 4а). Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР 1H и ^{13}C также использовали данные двумерных спектров ЯМР COSY, HSQC и HMBC. В настоящей работе с использованием двумерных спектров HMBC впервые было проведено отнесение сигналов протонов всех гидроксильных групп. Значения параметров спектров ЯМР мономера КХ приведены в экспериментальной части.

Следует отметить характерную особенность структуры КХ: кольцо С этой молекулы является неплоским. Наибольший выход из плоскости наблюдается для атомов углерода С2, С3 и С4. Согласно нашим оценкам, эти отклонения составляют от 0.2 до 0.4 Å. При этом протон Н4б, ароматическое кольцо В и гидроксильная группа 3-ОН занимают псевдоэкваториальное положение, а протоны Н2, Н3 и Н4а — псевдоаксиальное [31].

Сравнительный анализ спектров ЯМР 1H и ^{13}C олигоКХ и мономера КХ показал, что всем сигналам в спектрах мономера соответствуют группы сигналов в спектрах олигоКХ, что свидетельствует о сохранении углеродного скелета КХ в процессе ферментативной олигомеризации. В спектре ЯМР 1H олигоКХ (рис. 4б) видны уширенные сложные мультиплеты в областях 6.3–7.4 и 5.6–6.3 м.д., которые соотносятся с протонами ароматических колец В (Н2', Н5', Н6') и А (Н6 и Н8), соответственно. При этом суммарная интегральная интенсивность протонов кольца А олигоКХ почти в 3 раза ниже, чем интенсивность протонов кольца В, хотя в мономере КХ общий интеграл протонов кольца А меньше общего интеграла протонов кольца В всего в 1.5 раза. В области 4.3–5.5 м.д. находятся сигналы протона Н2 и гидроксильного протона 3-ОН, а в диапазоне 3.6–4.3 м.д. — сигнал протона Н3. Интегральные интенсивности сигналов этих протонов также сильно снижены по сравнению со значениями для мономера КХ. В области 2.2–3.0 м.д. находятся сигналы протонов Н4а и Н4б CH_2 -группы с интегралом, близким к значению для мономера. В слабopольной части спектра ЯМР 1H олигоКХ наблюдались уширен-

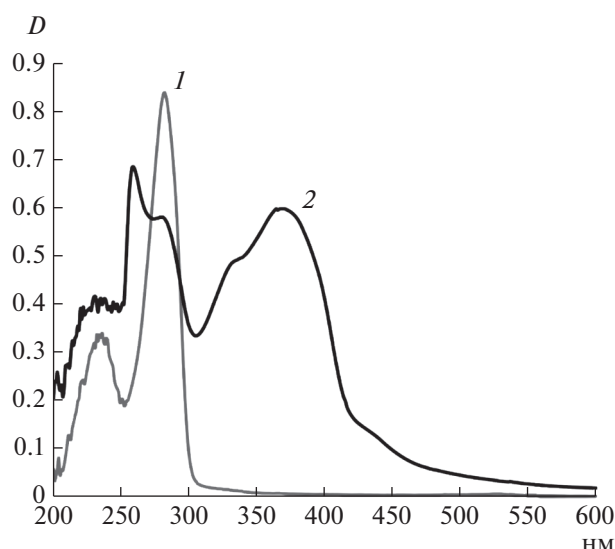


Рис. 2. УФ-видимые спектры мономера КХ (1) и олигоКХ (2) в ДМСО.

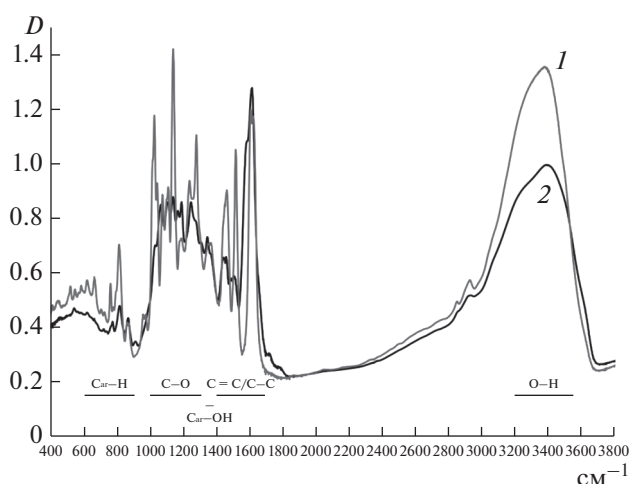


Рис. 3. ИК-Фурье спектры мономера КХ (1) и олигоКХ (2).

ные сигналы в области 8.0–11.3 м.д. с общей интегральной интенсивностью, соответствующей трем протонам, которые соответствуют фенольным гидроксилам. Важно отметить, что интенсивность уширенных сигналов протонов Н4а и Н4б при С4 соответствует интенсивности двух протонов. Это однозначно свидетельствует о том, что в олигоКХ не происходит образование связей в положении С4. Однако в литературе ранее отмечалось, что образование димеров и тримеров КХ природного происхождения может происходить за счет окислительного кросс-сочетания с образованием связей между атомами С4 одной молекулы с атомом углерода С6 или С8 другой молекулы флавоноида [32]. Очевидно, что механизм “сшивания” молекул флавоноидов может существенно различаться в зависимости от условий реакций.

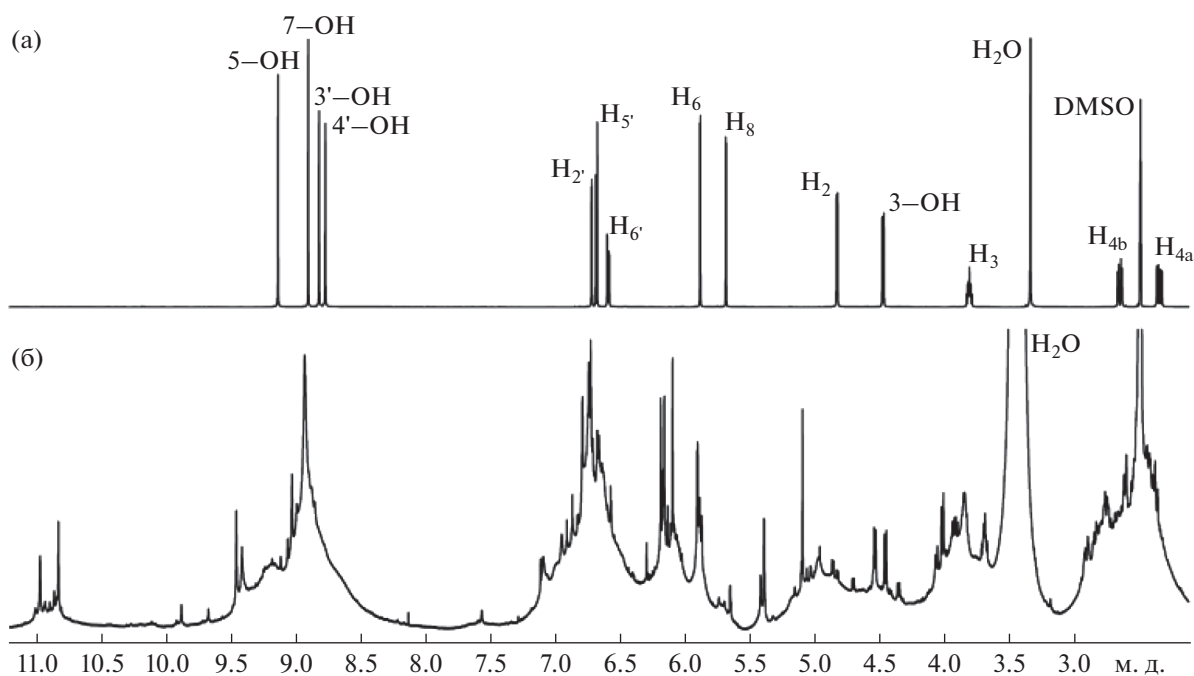


Рис. 4. Спектры ЯМР ^1H мономера КХ (а) и олигоКХ (б).

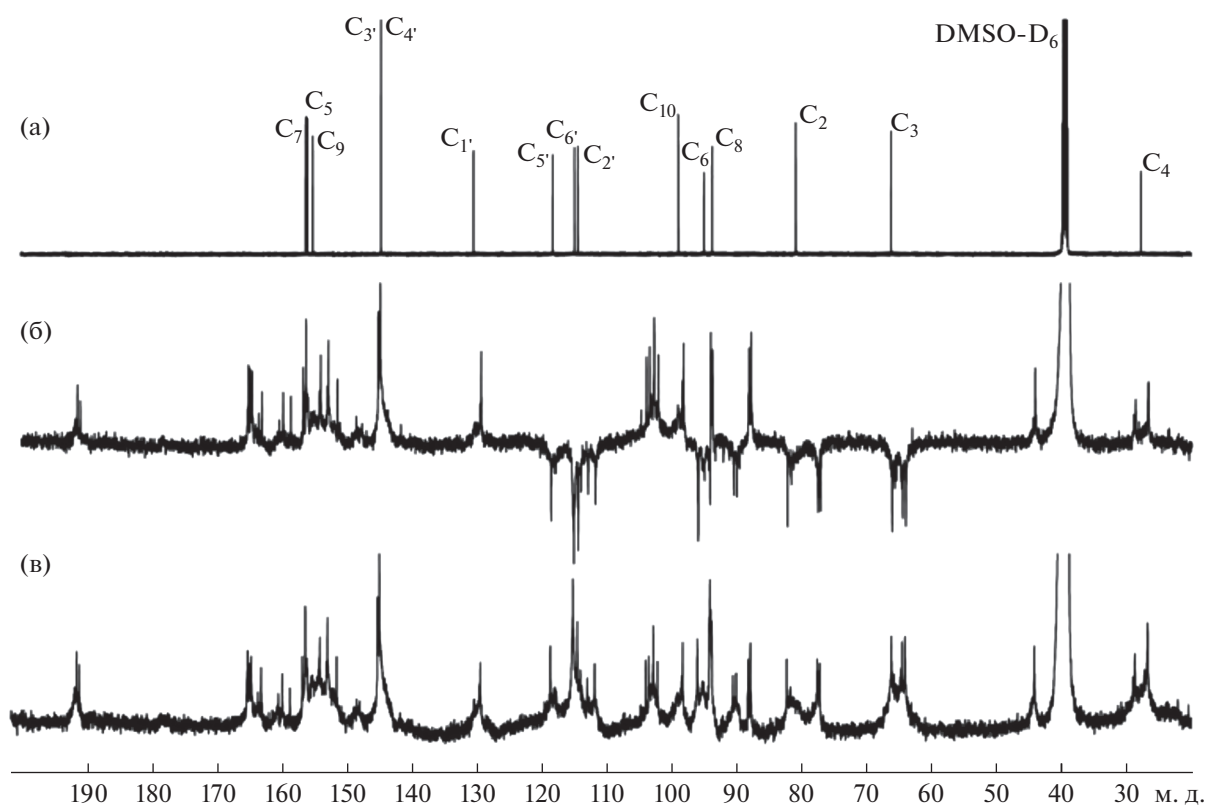


Рис. 5. Спектры ЯМР ^{13}C (а) $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ мономера КХ, (б) ^{13}C -АПТ олигоКХ (сигналы четвертичных атомов водорода и CH_2 -группы направлены вверх, а сигналы CH -групп вниз) и (в) $^{13}\text{C}\{-^1\text{H}\}$ олигоКХ.

Анализ спектров ЯМР ^1H олигоКХ позволяет обоснованно предположить, что при ферментативной полимеризации сохраняется углеродный

скелет молекулы КХ (кольца *A*, *B* и *C*), при этом один из протонов кольца *A* (H_6 и/или H_8) замещается на алкоксильную или арилоксильную

группу, образованную из другой молекулы КХ. Также при отрыве атома водорода от 3-ОН группы кольца **C** под действием лакказы помимо образования алкокси-радикала происходит частичное окисление 3-ОН до карбонильной группы.

Анализ спектров ЯМР ^{13}C (рис. 5) показал, что всем сигналам атомов углерода кольца **B** мономера КХ соответствуют уширенные интенсивные сигналы в спектре олигоКХ. При замещении протона в бензольном кольце арилокси- или алкокси-группой химические сдвиги всех атомов углерода в кольце должны заметно измениться (до 10 м.д.). Однако при ферментативной полимеризации КХ таких изменений в кольце **B** не наблюдается.

Сигналы углерода C2 и C3 в спектре олигоКХ (рис. 5б, 5в) представляют собой группы уширенных сигналов, занимающих довольно широкие области спектра 77–82 м.д. и 64–66 м.д. соответственно. Поскольку в процессе ферментативной полимеризации КХ не происходило замещение протонов кольца **B**, т.е. структура кольца **B** сохранялась, на изменение химических сдвигов C2, по-видимому, существенное влияние оказывали изменения при атоме C3. Сигналы углеродов C6 и C8 лежат в области 90.0–96.0 м.д. и имеют сильно пониженную для сигналов СН-групп интенсивность. При этом к четвертичному атому углерода C10 помимо основного сигнала при 98.3 м.д. относятся еще несколько сигналов при 88.3 м.д., 94.1 м.д. и широкий сигнал при 102.0–104.0 м.д. Такое разнообразие сигналов атома C10 олигоКХ обусловлено эффектами, связанными с замещением атомов водорода в кольце **A**, и частичным окислением 3-ОН группы до карбонильной группы. Те же эффекты приводят к появлению многочисленных сигналов четвертичных углеродов в области 157.0–165.0 м.д. Эти сигналы относятся как к атомам углерода C5, C7, C9 кольца **A**, так и к сигналам четвертичных углеродов C6 и C8, возникающим в процессе замещения атома водорода на арилокси- или алкокси-группы. Подтверждением образования продукта, содержащего карбонильную группу при C3, служит характеристичный сигнал четвертичного углерода при 193.6 м.д. и появление сигнала СН₂-группы при 44.0 м.д., который оказывается смещенным в слабое поле относительно основного сигнала при 26.0–29.0 м.д.

Таким образом, анализ спектров ЯМР ^1H и ^{13}C олиго КХ и мономера КХ позволяет заключить, что при ферментативной полимеризации сохраняется углеродный скелет молекулы КХ, а в образовании активных радикальных частиц участвуют все пять гидроксильных групп мономера. Образующиеся радикалы атакуют углерод C6 и/или C8 кольца **A** другой молекулы КХ, в результате чего происходит замещение протона на алкокси- или арилокси- группу. Также при отрыве атома водорода от гидроксила в положении C3 под действи-

ем лакказы параллельно происходит окисление 3-ОН группы до карбонила. Количество звеньев, содержащих карбонильную группу, в олигоКХ составляет 15–20% от общего количества мономерных звеньев.

Важно отметить, что механизм ферментативной полимеризации КХ, описанный в данной работе, подобен механизму лакказы-катализируемой полимеризации дигидрокверцетина в смеси ГЭР/буфер [33]. В обоих случаях это двухстадийный процесс. Первая стадия — это ферментативное окисление гидроксильных групп с образованием радикалов. Вторая стадия — радикальная атака активных частиц на ароматическую систему другой молекулы флавоноида. Однако, структура олигоКХ существенно отличается от структуры олигомера дигидрокверцетина. При полимеризации КХ атака происходит по атомам углерода C6 и C8 кольца **A**, в то время как при полимеризации дигидрокверцетина атака идет исключительно по атому углерода C6' кольца **B**. Согласно проведенным нами квантовохимическим расчетам, причиной этого являются существенные различия в электронной структуре этих флавоноидов. Наличие в молекуле дигидрокверцетина карбонильной группы в положении C4 существенно дестабилизирует энергию переходного состояния при радикальной атаке по атомам C6 и C8 дигидрокверцетина. В случае КХ этой дестабилизации нет, а согласованный эффект трех кислородсодержащих заместителей кольца **A** оказывается сильнее, чем аналогичный эффект двух заместителей кольца **B**, поэтому радикальная атака в КХ идет по кольцу **A**.

Синтезированные олигоКХ были протестированы на ингибирование активности α -глюкозидазы. Концентрация олигоКХ, необходимая для ингибирования 50% активности фермента (IC_{50}) с использованием в качестве субстрата ПНФГ составляла ~8 мкг/мл, в то время как для мономера КХ IC_{50} — ~980 мкг/мл.

Таким образом, олигомеры катехина, синтезированные с использованием грибной лакказы *T. hirsuta* в ГЭР-буферной смеси, являются эффективными ингибиторами α -глюкозидазы и могут быть перспективной субстанцией для лечения сахарного диабета 2-го типа.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (проект № 20-08-00104а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vinson J.A. // Adv. Exp. Med. Biol. 1998. V. 439. P. 151–164.
2. Jankun J., Selman S.H., Swiercz R., Skrzypczak-Jankun E. // Nature. 1997. V. 387. № 6633. P. 561.
3. Bordoni A., Hrelia S., Angeloni C., Giordano E., Guarnieri C., Caldarella C.M., Biagi P.L. // J. Nutr. Biochem. 2002. V. 13. № 2. P. 103–111.

4. Nakagawa K., Ninomiya M., Okubo T., Aoi N., Juneja L.R., Kim M., Yamanaka K., Miyazawa T. // J. Agric. Food Chem. 1999. V. 47. № 10. P. 3967–3973.
5. Kumar S., Pandey A.K. // Scientific World J. 2013. V. 2013. Article № 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
6. Latos-Brozio M., Masek A., Piotrowska M. // Biomacromolecules. 2021. V. 11. № 1. P. Article № 50.
7. Hagerman A.E., Riedl K.H., Jones G.A., Sovik K. N., Ritchard N.T., Hartzfeld P.W., Riedel T.L. // J. Agric. Food Chem. 1998. V. 46. № 5. P. 1887–1892.
8. Jeon S.Y., Oh S.J., Kim E., Imm J.Y. // J. Agric Food Chem. 2013. V. 61. № 19. P. 4577–4584.
9. Kurisawa M., Chung J.E., Uyama H., Kobayashi Sh. // Macromol. Biosci. 2003. V. 3. № 12. P. 758–764.
10. Kurisawa M., Chung J.E., Kim Y.J., Uyama H., Kobayashi Sh. // Biomacromolecules. 2003. V. 4. № 3. P. 469–471.
11. Liang J.Y., Yang M.Y., Hu A., Chen L.Y. // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 2016, V. 165. P. 115–120.
12. Oliver S., Hook J.M., Boyer C. // Polym. Chem. 2017. V. 8. № 15. P. 2317–2326.
13. Kim T., Choi H.J., Eom S.H., Lee J., Kim T.H. // Bioorg. Med. Chem. Letters. 2014. V. 24. № 6. P. 1621–1624.
14. Rasouli H., Hossein-Ghazvini S.M.-B., Adibi H., Khodarahmi R. // Food and Function. 2017. V. 8. № 5. P. 1942–1954.
15. Hollmann F., Arends I. // Polymers. 2012. V. 4. № 1. P. 759–793.
16. Bassanini I., Ferrandi E.E., Riva S., Monti D. // Catalysts. 2021. V. 11. № 1. P. 26.
17. Witayakran S., Ragauskas A.J. // Adv. Synth. Catal. 2009. V. 351. № 9. P. 1187–1209.
18. Mogharabi M., Faramarzi M.A. // Adv. Synth. Catal. 2014. V. 356. № 5. P. 897–927.
19. Abbott A., Boothby D., Capper G., Davies D., Rasheed R. // J. Am. Chem. Soc. 2004. V. 126. № 29. P. 9142–9147.
20. Smith E., Abbott A., Ryder K. // Chem. Rev. 2014. V. 114. № 21. P. 11060–11082.
21. Dai Y., Witkamp G.J., Verpoorte R., Choi Y. // Food Chem. 2015. V. 187. P. 14–19.
22. Cicco L., Dilauro G., Perna F., Vitale P., Capriati V. // Org. Biomol. Chem. 2021. V. 19. № 12. P. 2558–2577.
23. Ünlü A., Prasad B., Anavekar K., Bubenheim P., Liese A. // Prep. Biochem. Biotechnol. 2017. V. 47. № 9. P. 918–924.
24. Altundağ A., Ünlü A.E., Takaç S. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2020. V. 96. № 4. P. 1107–1115.
25. Горюшина Е.С., Русинова Т.В., Бурюков В.В., Морозова О.В., Шлеев С.В., Ярополов А.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 638–644.
26. Ehresmann B., Imbault P., Well J.H. // Analyt. Biochem. 1973. V. 54. № 2. P. 454–463.
27. Chertkov V.A., Davydov D.V., Shestakova A.K. // Chem. Heterocycl. Compd. 2011. V. 47. № 1. P. 45–54.
28. Nazir N., Zahoor M., Ullah R., Ezzeldin E., Mostafa G.A.E. // Molecules. 2021. V. 26. № 1. Article № 137. <https://doi.org/10.3390/molecules26010137>
29. Hammond O.S., Bowron D.T., Elder K.J. // Angew. Chem. Int. 2017. V. 56. № 33. P. 9782–9785.
30. Ramos-Tejada M.M., Durán J.D.G., Ontiveros-Ortega A., Espinosa-Jimenez M., Perea-Carpio R., Chibowski E. // Colloids Surf. B: Biointerfaces. 2002. V. 24. № 3–4. P. 297–308.
31. Chertkov A.V., Pokrovskiy O.I., Shestakova A.K., Chertkov V.A. // Chem. Heterocycl. Compd. 2008. V. 44. № 5. P. 621–623.
32. Tarascou I., Baratheu K., Andre Y., Pianet I., Dufourc E.J., Fouquet E. // Eur. J. Org. Chem. 2006. V. 2006. № 23. P. 5367–5377.
33. Khlopova M., Vasil'eva I., Shumakovich G., Zaitseva E., Chertkov V., Shestakova A., Morozova O., Yaropolov A. // Catalysts. 2021. V. 11. № 5. Article № 639. <https://doi.org/10.3390/catal11050639>

Polymerization of (+)-Catechin in a Deep Eutectic Solvent Using a Fungal Laccase: Properties of the Products and Inhibition of α -Glucosidase

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

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

^b Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^c State Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds, Moscow, 105118 Russia

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

Deep eutectic solvents (DES) are an alternative to traditional organic solvents for carrying out enzymatic reactions of compounds with poor solubility. Biocatalytic polymerization of the flavonoid (+)-catechin (CC) was carried out using laccase from the fungus *Trametes hirsuta* in DES-buffer mixture (betaine/glycerol 60 vol % – buffer 40 vol %). The conditions for the synthesis of catechin oligomers (oligoCC) soluble in organic solvents, have been selected. OligoCC had a number average molecular weight of 10620 and 2540 g/mol and a polydispersity index of 1.1 and 1.09, respectively, according to the data of high performance liquid chromatography. The physicochemical properties of the oligomers obtained were studied by UV-visible, FTIR and ¹H, ¹³C NMR spectroscopy. The resulting oligoCCs had α -glucosidase inhibitory activity with an IC₅₀ value of 8 μ g/mL.

Keywords: (+) catechin, laccase, deep eutectic solvent, enzymatic polymerization, catechin oligomers, characterization, α -glucosidase inhibition

УДК 579.66

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЫСОКОСТАБИЛЬНЫЕ ЩЕЛОЧНЫЕ ПЕПТИДАЗЫ АЛКАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ *Alkalicaulis satelles* И *Aliidiomarina* sp., ПЕРСПЕКТИВА ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В СОСТАВЕ ДЕТЕРГЕНТОВ

© 2021 г. Е. В. Лаврентьева^{1, 2, *}, Е. Б. Эрдынеева¹, Я. Е. Дунаевский³,
Ю. В. Болтянская⁴, В. В. Кевбрин⁴

¹Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, 670047 Россия

²Бурятский государственный университет им. Д. Банзарова, Улан-Удэ, 670000 Россия

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

⁴Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

*e-mail: lena_l@mail.ru

Поступила в редакцию 30.04.2021 г.

После доработки 30.06.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

Изучена пептидазная активность в культуральной среде алкалофильных протеолитических бактерий *Alkalicaulis satelles* G-192^T и *Aliidiomarina* sp. P-156, выделенных из системы гиперсоленых щелочных озер Танатар (Алтайский край, Россия). Обнаружено, что секретируемые пептидазы штаммов G-192 и P-156 способны гидролизовать *n*-нитроанилидные субстраты, проявляя максимальную активность при гидролизе аминокислотного субстрата LpNa. Анализ частично очищенных препаратов пептидаз из штаммов G-192 и P-156 показал, что исследуемые ферменты отличались наибольшей активностью и стабильностью при pH от 8.4 до 11. Ферменты штаммов G-192 и P-156 были высокостабильными по отношению к NaCl, сохраняя активность при 220 и 70 г/л NaCl соответственно. Данные ингибиторного анализа и субстратной специфичности внеклеточных ферментов указывают на их принадлежность к классу металлопептидаз аминокислотного типа. Щелочные пептидазы показали значительную устойчивость к поверхностно-активным веществам тритон X-100, ДДС-Na и окислителю H₂O₂ и могут быть использованы при разработке новых моющих средств.

Ключевые слова: алкалофильные бактерии, стабильные щелочные пептидазы, биотехнологический потенциал, детергенты

DOI: 10.31857/S0555109921060088

Пептидазы (ЕС 3.4.21) обнаружены у всех групп живых организмов и представляют собой отдельную подгруппу гидролитических ферментов, способных к гидролизу пептидных связей в белках и пептидах. Эти ферменты разнообразны по структуре и свойствам, выполняют множество сложных биологических функций и участвуют в биогеохимическом цикле углерода и азота [1]. В коммерческом отношении пептидазы бактерий являются наиболее ценной группой ферментов, на долю которых приходится 60% общемировых продаж промышленных ферментов [2]. Щелочные пептидазы уникальны по стабильности в широком диапазоне температур, pH и концентраций NaCl и широко используются в пищевой и кормовой промышленности, в медицине, а также при переработке органических отходов [3, 4]. Одним из основных применений этих пептидаз является производство моющих средств, поскольку

pH стиральных порошков находится в диапазоне pH 7–11. Щелочные пептидазы используются в различных составах моющих средств вместе с другими гидролитическими ферментами в качестве добавок для облегчения расщепления и высвобождения белковых загрязнений [5].

Важным источником щелочных ферментов являются алкалофильные бактерии из местообитаний с высоким значением pH. К таким, в частности, принадлежат содовые озера, представляющие естественную среду обитания алкалофилов, относящихся к экстремальным микроорганизмам. Исследование секреции внеклеточных пептидаз у новых представителей экстремофильных бактерий дает возможность выявлять природные штаммы с различным спектром секретируемых пептидаз, обладающих высокой ферментативной активностью. Потенциал пептидаз бактерий из содовых озер рассмотрен в работах [6, 7]. Показано, что щелочные

пептидазы бактерий рода *Bacillus*, — благодаря высокому уровню их стабильности и способности к разложению широкого спектра субстратов, доминируют на коммерческом рынке. Секвенирование и аннотирование геномов позволило выявить высокий потенциал секретируемых щелочных пептидаз у этой группы бактерий для практического применения [8].

Однако в связи с непрерывным развитием технологий и ужесточением экологических норм поиск новых видов алкалофильных бактерий из природных местообитаний, способных продуцировать стабильные щелочные ферменты, остается актуальным направлением в современной микробиологии. В последние годы внимание исследователей привлечено к таксономическим группам бактерий, выделенным из содовых озер и способным активно секретировать щелочные пептидазы: *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Geomicrobium*, *Salipaludibacillus*, *Brachybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Halomonas* и *Alkalibacillus* [9–13].

Цель работы — поиск и характеристика внеклеточных щелочных пептидаз у двух штаммов новых алкалофильных бактерий родов *Alkalicaulis* и *Aliidiomarina*, оценка возможности их применения в составе синтетических моющих средств (детергентов).

МЕТОДИКА

Культивирование штаммов-продуцентов. Штамм G-192 культивировали на среде следующего состава (г/л): NaHCO_3 — 13, Na_2CO_3 — 46, KH_2PO_4 — 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.12, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0.015, дрожжевой экстракт — 0.1 и 1.0 мл раствора микроэлементов [15]. Рост штамма P-156 поддерживали на среде следующего состава (г/л): NaCl — 30, NaHCO_3 — 7, NaHCO_3 — 23, KH_2PO_4 — 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.12, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0.015, дрожжевой экстракт — 0.1 и 1.0 мл раствора микроэлементов [15]. В качестве индуктора пептидаз в среды добавляли казеинат натрия — 2.0 г/л. Штаммы выращивали в 250 мл среды в конических колбах без перемешивания при pH 9. Инкубацию проводили в течение 48–72 ч при температуре 35°C. После окончания роста клетки отделяли от среды центрифугированием 10000 g в течение 5 мин при 4°C и отбрасывали. Собранную бесклеточную культуральную жидкость хранили в холодильнике при 4°C для дальнейшей работы.

Определение протеолитической активности. Внеклеточную протеолитическую активность ферментов, содержащихся в полученных супернатантах определяли согласно методу Эрлангера [16]. В работе использованы следующие *n*-нитроанилидные субстраты, специфичные для эндопептидаз определенного типа или класса): GlpAALpNA (пироглутамил-аланил-аланил-лейцин-*n*-нитро-

анилид) — для субтилизин-подобных пептидаз; BzRpNA (N-бензоил-L-аргинил-*n*-нитроанилид) — для трипсин-подобных пептидаз; GlpFpNA (пироглутамил-фенилаланил-*n*-нитроанилид) — для хитотрипсин-подобных пептидаз; GlpFApNA (пироглутамил-фенилаланил-аланил-*n*-нитроанилид) — для цистеиновых пептидаз. Субстраты для аминопептидаз: LpNA (L-лейцил-*n*-нитроанилид); FpNA (L-фенилаланил-*n*-нитроанилид).

Эти субстраты содержат аналог пептидной связи, которая расщепляется под действием протеолитических ферментов. В результате расщепления выделяется *n*-нитроанилин, окрашивающий раствор в желтый цвет. Все субстраты вносили в концентрации 5 мМ.

Для измерения активности пептидаз в ячейку микропланшета вносили 160 мкл 0.1 М фосфатного буфера, pH 7.0, добавляли 10–20 мкл культуральной жидкости, 5 мкл соответствующего субстрата и измеряли оптическое поглощение раствора в начальный момент времени. Затем поглощение измеряли через 12 ч инкубации при 37°C. Количество образовавшегося *n*-нитроанилина определяли спектрофотометрически при 405 нм на микропланшетном фотометре StatFax 2100 (“Awareness Technology”, США), используя дифференциальный фильтр 405 нм. За 1 единицу активности (U) принимали изменение оптической плотности (ОП) опытных растворов относительно контрольных на 0.01 за 12 ч при 405 нм и 37°C. В качестве контроля использовали ОП реакционной смеси, измеренную сразу после добавления субстрата. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм. При определении активности цистеиновых пептидаз к реакционной смеси дополнительно добавляли 5 мкл свежеприготовленного раствора дитиотреитола с концентрацией 10 мг/мл.

Очистка пептидаз. Щелочные пептидазы штаммов G-192 и P-156 очищали, используя осаждение сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией и гель-фильтрацией. На первом этапе белок из супернатанта культуральной жидкости осаждали сульфатом аммония, внесенного до насыщения 60%. Растворы оставляли при 4°C на ночь, чтобы обеспечить более полное осаждение белка. После этого осадок отделяли центрифугированием при 10000 g в течение 15 мин, затем растворяли в небольшом объеме 0.1 М фосфатного буфера pH 7.0. Полученный раствор обессоливали диализом против 0.1 М фосфатного буфера при 4°C в течение 24 ч, определяли содержание белка и анализировали наличие активности пептидаз.

Ионообменную хроматографию осуществляли на колонке Mono Q (FPLC), уравновешенной 0.01 М фосфатным буфером, pH 7.0. Белок, сорбирующийся на колонке, элюировали градиен-

том NaCl (0–1 М) со скоростью 1 мл/мин. Фракции (1 мл) собирали, анализировали на содержание белка и протеолитическую активность. Активность измеряли по выбранным субстратам при 405 нм. Фракции, проявляющие протеолитическую активность, объединяли. Объединенные фракции подвергали гель-фильтрации с использованием колонки, заполненной Superdex 75, 60 × 1 см (“Pharmacia”, Швеция). Элюирование проводили 0.01 М фосфатным буфером, pH 7, со скоростью 1 мл/мин. Все фракции были проанализированы на протеолитическую активность и содержание белка.

Определение оптимума pH-активности и pH-стабильности фермента. При определении pH оптимума секретируемой пептидазы по отношению к синтетическим субстратам был использован универсальный буфер в диапазоне pH 2–11 с шагом 1. В состав буфера входили: 0.02 М H_3PO_4 , 0.02 М CH_3COOH , 0.02 М H_3BO_3 . Необходимое значение pH получали, добавляя к смеси кислот 0.02 М NaOH. После инкубации 10 мкл препарата фермента с 20 мкл буфера определенного pH и 5 мкл субстрата при 37°C к каждой пробе добавляли 160 мкл 0.1 М фосфатного буфера pH 7.5 и измеряли поглощение как описано выше.

Для определения pH стабильности ферментный препарат инкубировали 4 ч при 37°C в универсальном буферном растворе с pH от 2 до 11, затем образцы доводили до pH 7.5 с помощью 0.1 М фосфатного буфера, pH 7.5 при pH от 8.0, либо 0.1 М NaOH в при pH до 8.0. Активность ферментов определяли по методу, описанному выше.

Определение температурного оптимума и стабильности фермента. Определение температурного оптимума фермента проводили в диапазоне температур от 5 до 65°C. Для изучения температурной стабильности раствор фермента инкубировали при тех же температурах в течение 4 ч, затем приводили к комнатной температуре и определяли активность при 37°C, как указано выше.

Определение оптимума концентрации хлорида натрия для исследуемого фермента. При определении оптимума концентрации хлорида натрия для проявления активности секретируемой пептидазы были подготовлены солевые растворы с концентрацией от 0 до 300 г/л (0, 10, 30, 50, 80, 100, 150, 200, 250, 300 г/л). Фермент инкубировали в растворах хлорида натрия и определяли активность, как указано выше. Для определения стабильности пептидазы выдерживали в течение 4 ч при 37°C при различных концентрациях хлорида натрия, а затем добавляли специфичный *n*-нитроанилидный субстрат и определяли активность.

Определение влияния специфических ингибиторов на ферментативную активность. Ингибиторный анализ проводили с очищенными ферментными препаратами и с культуральной жидкостью.

В работе использовали специфические ингибиторы: – ФМСФ (фенилметилсульфонилфторид) для сериновых пептидаз; ЭДТА (этилендиаминтетраацетат натрия) для металлопептидаз; ЙАА (2-йодацетамид) для цистеиновых пептидаз.

К 50 мкл раствора фермента добавляли 5 мкл раствора ингибитора определенной концентрации (0.01 и 0.1 М) и выдерживали смесь 50–60 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 700 мкл фосфатного буфера (0.1 М, pH 8) и 10 мкл раствора соответствующего *n*-нитроанилидного субстрата и определяли остаточную активность пептидазы. Ферментативную активность в отсутствие ингибиторов использовали в качестве контроля.

Для приготовления растворов ингибиторов ЭДТА и ЙАА растворяли в фосфатном буфере (0.1 М, pH 8), а ФМСФ в этаноле; в тех случаях, когда используемый ингибитор был растворен в спирте, в качестве контроля к раствору фермента добавляли 5 мкл спирта.

Влияние поверхностно-активных веществ и окислителя на стабильность пептидаз. Влияние некоторых поверхностно-активных веществ (ПАВ), таких как тритон X-100 (неионное ПАВ), ДДС-Na (анионное ПАВ) и окислителя (пероксид водорода) на стабильность фермента изучали путем инкубации ферментов в течение 4 ч при 37°C с указанными добавками. После инкубационного периода измеряли остаточную активность пептидазы в стандартных условиях анализа. Активность фермента без добавок принимали за 100%.

Концентрации тритон X-100 и ДДС-Na составляли 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0% и 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8% соответственно. Пероксид водорода добавляли в концентрациях 0.5, 1.0 и 3.0%.

Статистический анализ. Эксперименты проводили в трех повторностях, результаты обрабатывали с использованием программного пакета Microsoft Excel 2013. Для полученных результатов рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Штаммы – продуценты. Штаммы новых аэробных алкалофильных бактерий, использованных в работе, были выделены из разных щелочных биоценозов. Штамм G-192 был выделен из лабораторного консорциума галоалкалофильной цианобактерии *Geitlerinema* sp. Z-T0701 с ее естественными хемоорганотрофными спутниками [15]. Синтез протеолитических ферментов у этого штамма, вероятно, связан с обитанием в природном микробном консорциуме за счет утилизации отмирающих клеток или прижизненных белковых выделений цианобактерии, являясь деструктором (или редуцентом, в современной терминологии) биомассы первичного продуцента. Учитывая место

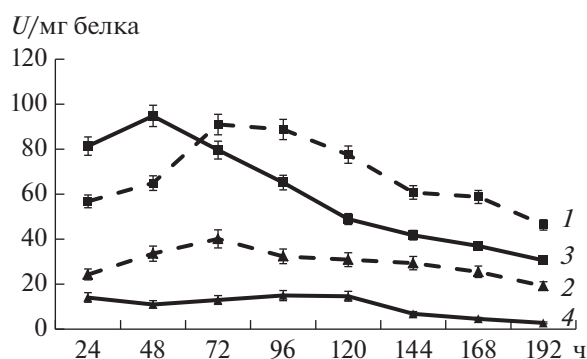


Рис. 1. Активность пептидаз (удельная активность, U/мг белка) на разных субстратах: 1 — пептидаза штамма G-192 на субстрате LpNa, 2 — пептидаза штамма G-192 на субстрате GlpAALpNa, 3 — пептидаза штамма P-156 на субстрате LpNa, 4 — пептидаза штамма P-156 на субстрате GlpAALpNa.

штамма G-192 в трофической цепи, представляло интерес выяснить, какими пептидазами располагает деструктор для выполнения своей роли в алкалофильном микробном сообществе. По таксономическому положению штамм G-192 образовал новый род и вид — *Alkalicaulis satelles* G-192^T gen. nov., sp. nov. в составе нового семейства *Maricaulaceae* fam. nov. (VKM B-3306^T, KCTK 72746^T) [15]. Штамм P-156 был выделен из прибрежных осадков озера Петуховское (Алтайский край, Россия), из мест, где наблюдалось спонтанное разложение альго-цианобактериальной биомассы. Так же, как и штамм G-192, штамм P-156 был выделен как протеолитик для выяснения его роли в алкалофильном микробном сообществе. На основании филогенетического анализа штамм P-156 оказался в кластере *Aliidiomarina* (семейство *Idiomarinaceae*), где он, по-видимому, образует новый вид.

Субстратная специфичность внеклеточных пептидаз. Использование *n*-нитроанилидных субстра-

тов для определения класса секретируемых пептидаз штаммов G-192 и P-156 выявило присутствие субтилизин-подобной пептидазы (по субстрату GlpAALpNa) и аминопептидазы (по субстрату LpNa) (рис. 1). Оба штамма проявили наибольшую активность в отношении субстрата, специфичного для аминопептидаз — LpNa. Высокая активность по этому субстрату приходилась на экспоненциальную фазу роста бактерий (48–96 ч) и к 192 ч роста активность заметно снижалась.

Из рис. 1 видно, что максимальная активность пептидазы штамма G-192, наблюдалась на 72 ч культивирования и составляла 91 U/мл при определении с субстратом LpNa. У пептидаз штамма P-156 уровень активности по тому же субстрату был максимальным на вторые сутки и составил 94.8 U/мл. При использовании в качестве субстрата GlpAALpNa для субтилизин-подобных пептидаз определяемые активности были значительно ниже. Изученные штаммы не гидролизировали субстраты, специфичные для химотрипсин-подобных, трипсин-подобных и цистеиновых пептидаз.

Способность изученных бактерий секретируют пептидазы, активные на синтетических субстратах LpNa и GlpAALpNa, возможно, указывает на способность в выработке определенных типов внеклеточных протеолитических ферментов в ответ на конкретные условия окружающей среды. Причиной, вероятно, может быть специфическая ниша обитания.

Очистка аминопептидаз. Поскольку аминопептидазы обоих штаммов показали более высокую активность по сравнению с субтилизин-подобными ферментами, они были частично очищены с целью дальнейшего описания их свойств (табл. 1). В процессе очистки были получены аминопептидазы со степенью очистки 4.7, выходом 2.3% и удельной активностью 96.4 U/мг для штамма G-192 и со степенью очистки 9.7, выходом 1.8% и удельной активностью 109.7 U/мг для штамма P-156. Аналогичная хроматографическая процедура была при-

Таблица 1. Очистка щелочных аминопептидаз штаммов G-192 (1) и P-156 (2)*

Стадия очистки	V, мл		Активность, U/мл		Белок, мг/мл		Удельная активность, U/мг белка		Выход, %		Степень очистки	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Культуральная жидкость	50	50	40.7	19.9	2.0	1.8	20.7	11.3	100	100	1	1
Осаждение сульфатом аммония (60%)	5	4	96.2	28.5	3.1	2.2	30.9	13.2	23.6	11.5	1.5	1.17
Ионообменная хроматография (Моно Q)	4	—	9.8	—	0.2	—	46.7	—	1.9	—	2.3	—
Гель-хроматография (Superdex75)	3	5	16.0	3.62	0.2	0.03	96.4	109.7	2.3	1.8	4.7	9.7

* Очистка на колонке с Моно Q для штамма P-156 не проводили.

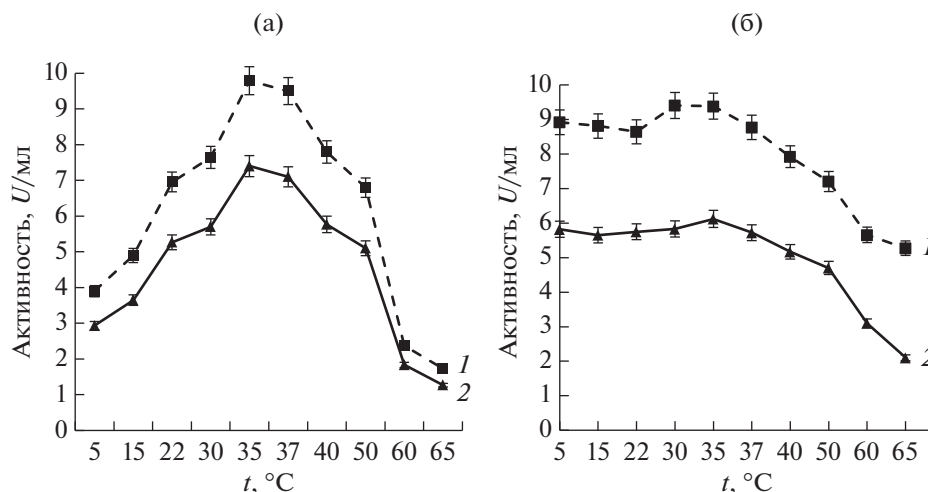


Рис. 2. Температурный оптимум (а) и термостабильность (б) пептидаз штаммов G-192 (1) и P-156 (2).

менена для пептидаз из *Bacillus subtilis* AU-2 [17], алкалофильного штамма *Salipaludibacillus agaradhaerens* AK-R [18], *Staphylococcus sciuri* [19], штамма *Aeribacillus pallidus* C10 [20], галотолерантного штамма *Salinicoccus* sp. UN-12 [21].

Физико-химические свойства выделенных пептидаз. Изучение физико-химических свойств ферментов было проведено с использованием синтетического субстрата для пептидаз LpNa на очищенных препаратах штаммов G-192 и P-156.

Определение температурного оптимума и термостабильности пептидаз у изученных штаммов проводили в диапазоне температур 5–65°C (рис. 2). Показано, что температурный оптимум активности пептидаз находился в пределах 30–50°C, с максимумом при температуре 35–37°C. Изученные ферменты были стабильны до температуры 50°C, повышение температуры до 65°C приводит к снижению активности у штамма G-192 до 56% и у штамма P-156 до 34% от исходной активности.

Полученные нами результаты сопоставимы с активностью и стабильностью внеклеточной металлопептидазы морской бактерии *Vibrio* sp. LA-05 [5], которая, как показано, была активна и стабильна при 25–40°C.

Известно, что температурный оптимум и термостабильность пептидаз варьируют в зависимости от вида бактерий. В ранее проведенных исследованиях сообщалось, что щелочные сериновые пептидазы бактерий *Salipaludibacillus agaradhaerens* AK-R и *Bacillus caseinilyticus* SP^T, выделенных из щелочных озер Индии и Египта, имеют более высокий температурный оптимум – 60°C [18, 22]. Термостабильность пептидазы у штамма *Salipaludibacillus agaradhaerens* AK-R сохранялась при более низких температурах 40–45°C.

Исследования pH оптимума ферментов были проведены в диапазоне pH 2.5–11.5. Установлено, что пептидазы активны в широком диапазоне значений pH, при этом наибольшая активность наблюдалась при pH от 8.4 до 11.0 (рис. 3) и следовательно, они могли быть отнесены к классу щелочных пептидаз. Пептидаза штамма G-192 проявляла максимальную активность при pH 9.0, тогда как пептидаза штамма P-156 при 10.1. Обычно коммерческие микробные пептидазы имеют оптимумы при pH от 7 до 11, хотя оптимумы могут различаться в зависимости от использованных субстратов [23].

Анализ pH-стабильности пептидаз показал, что обе исследуемые аминопептидазы стабильны в широком диапазоне pH от 4.5 до 11.5. При щелочном pH (11.5) пептидаза штамма G-192 сохраняла более 51% от исходной активности, а пептидаза штамма P-156 – 67.5% активности.

Следует отметить, что изученные нами пептидазы имели более широкий диапазон pH-стабильности от 4.5 до 11.5, чем ранее изученные пептидазы бактерий [20].

Влияние хлорида натрия на активность аминопептидаз представлено на рис. 4. Для фермента штамма G-192 установлено, что аминопептидаза была высокостабильной в широком диапазоне концентраций NaCl от 10 до 220 г/л. При этом при концентрации NaCl 270 г/л фермент сохранял 45% от максимальной активности. Аминопептидаза штамма P-156 была стабильной при концентрации NaCl от 10 до 70 г/л, тогда как при 90 г/л активность фермента снижалась в два раза.

Галотолерантность пептидаз является важной характеристикой, поскольку NaCl входит в состав ядра, используемого в процессе грануляции пептидазы перед ее включением в качестве добавки в состав моющего средства [24]. Способность со-

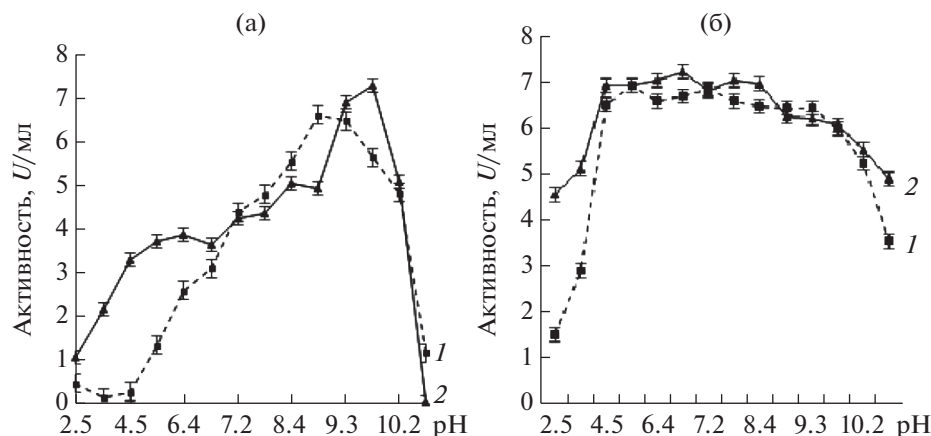


Рис. 3. pH оптимум (а) и pH-стабильность (б) пептидаз у штаммов G-192 (1) и P-156 (2).

хранять активность в условиях высоких концентраций солей очищенных пептидаз делает их многообещающими для использования в качестве экологичной, биологически активной и стабильной добавки в составе детергентов.

Таким образом, определение физико-химических свойств ферментов из штаммов G-192 и P-156 показало, что исследуемые аминопептидазы имели высокую активность и стабильность в широком диапазоне pH (от 4.5 до 11.5) и температуры (5–60°C), а также демонстрировали устойчивость в растворах с высоким содержанием соли (до 220 г/л).

Определение влияния ингибиторов на активность пептидаз. Ингибиторный анализ показал, что активности пептидаз штаммов G-192 и P-156 по субстрату LpNa ингибируются ЭДТА – специфическим ингибитором металлопептидаз, тогда как специфические ингибиторы сериновых пептидаз (ФМСФ) и цистеиновых пептидаз (ЙАА) подавляли активность в заметно меньшей степени (табл. 2). Таким образом, по типу ингибирования

выделенные пептидазы можно отнести к классу металлопептидаз.

Влияние поверхностно-активных веществ и окисляющего агента на стабильность щелочных пептидаз.

Поверхностно-активные вещества, окислители и ферменты являются важными компонентами современных моющих средств. Существует широкий спектр анионных, неионных, катионных и амфотерных поверхностно-активных веществ и окислителей, которые используются в составе детергентов [25]. Обычно в их составе используются смесь от двух до четырех ПАВ. Преобладающим типом являются анионные ПАВ (например, ДДС-Na), за которыми следуют неионные (трилон X-100). Комбинация анионных и неионных ПАВ позволяет в значительной степени преодолеть вредное воздействие анионных ПАВ на конформацию ферментов. На активность фермента также может влиять концентрация используемых ПАВ и этот эффект проявляется по-разному для разных классов ферментов [26]. Для возможного применения щелочных пептидаз в составе моющих средств они должны функционировать и быть стабильными в различных химически агрессивных условиях.

Влияние некоторых ПАВ на стабильность пептидаз штаммов G-192 и P-156 изучали путем предварительной инкубации фермента с химическими добавками различной концентрации. Показано, что в присутствии трилон X-100 в концентрации от 0.5 до 4.5% остаточная активность пептидаз была 30–45% (табл. 3). Щелочные пептидазы штамма G-192 сохраняли до 50% активности в присутствии сильного анионного ПАВ ДДС-Na при его концентрации от 0.1 до 0.6%. Пептидаза штамма P-156 сохраняла активность на 47% при концентрации ДДС-Na 0.5%. В присутствии H₂O₂ (3.0%) используемого для отбеливания, пептидаза штамма G-192 сохраняла 50% активности, тогда как у пептидазы штамма P-156 остаточная активность со-

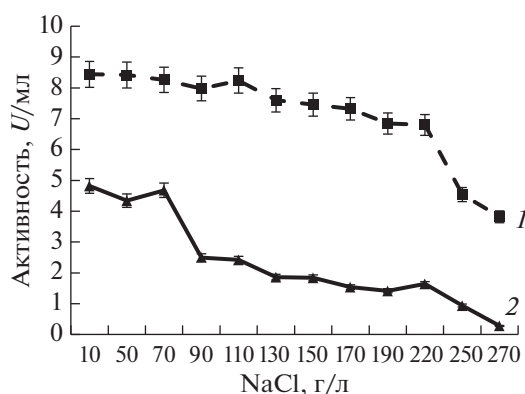


Рис. 4. Активность внеклеточных пептидаз штаммов G-192 (1) и P-156 (2) при различных концентрациях NaCl.

Таблица 2. Влияние ингибиторов на активность аминопептидаз

Ингибиторы	Концентрация, М	Остаточная активность пептидаз штаммов, %	
		G-192 ^T	P-156
Контроль	—	100	100
ЭДТА	0.04	46.9	44.8
ЙАА	0.04	78.8	68.4
ФМСФ	0.04	84.8	73.5

ставила 20%. Ингибирование активности от 20 до 50% некоторых щелочных пептидаз у алкалофилов в присутствии 1–5% детергента тритон X-100 описано в работах [20, 21]. Следует отметить, что

Таблица 3. Влияние поверхностно-активных веществ и окислителя на активность аминопептидаз из штаммов G-192 и P-156

Реагент	Остаточная активность, % (вес/об.)*	
	G-192	P-156
Тритон X-100, %		
0.5	39.4 ± 1.5	41.5 ± 1.7
1	43.2 ± 1.3	43.5 ± 1.5
1.5	43.1 ± 1.7	45.7 ± 1.9
2	34.9 ± 0.9	40.2 ± 2.1
2.5	33 ± 2.0	41.2 ± 0.6
3	30 ± 1.9	40.7 ± 1.5
3.5	29.4 ± 1.3	42.7 ± 0.7
4	15.2 ± 0.7	42.5 ± 1.3
4.5	6.5 ± 1.8	38.4 ± 0.9
5	5 ± 1.5	12.8 ± 1.7
5.5	6.4 ± 0.9	14.1 ± 2.0
6	4.8 ± 1.7	8.5 ± 1.3
ДДС, %		
0.1	74.5 ± 0.6	88.1 ± 1.1
0.2	62.2 ± 0.8	90.1 ± 1.6
0.3	58.4 ± 1.1	78.7 ± 2.1
0.4	55.7 ± 1.6	78.1 ± 0.6
0.5	52.6 ± 2.2	46.6 ± 0.4
0.6	50.8 ± 0.8	38.2 ± 0.7
0.7	22.9 ± 1.6	38.5 ± 1.1
0.8	23.5 ± 0.6	36.5 ± 0.8
H ₂ O ₂ , %		
0.5	69.8 ± 0.9	80.4 ± 0.4
1.0	54.5 ± 1.4	57.6 ± 1.7
2.0	52.8 ± 1.3	32.2 ± 0.9
3.0	51.8 ± 0.7	19.8 ± 1.3

* За 100% принимали активность в контроле.

в некоторых работах показана стимуляция протеолитической активности фермента при инкубации его в тритон X-100 в концентрациях 0.1, 1.0 и 5.0% [18, 19, 27]. Подавление активности ферментов на 20–50% в присутствии малых концентраций ДДС-Na описано также и в работах [18, 19]. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии отдельных ПАВ на стабильность пептидазы, что в дальнейшем должно быть учтено при разработке моющих средств с оптимальными характеристиками.

Таким образом, было подтверждено, что одним из потенциальных источников щелочных пептидаз могут быть новые алкалофильные бактерии, способные расти в щелочных условиях. Секретируемые пептидазы новых видов алкалофильных бактерий были частично очищены и охарактеризованы. Пептидазы продемонстрировали такие свойства, как высокую стабильность при щелочных pH, устойчивость к ПАВ и солёности среды, что указывало на возможность их использования в качестве добавок при разработке моющих средств.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-04-00236, частично в рамках госзадания АААА-А19-119020590109-3 для ФИЦ Биотехнологии РАН и частично в рамках госзадания 0271-2021-0003 (FWSM-2021-0003) для ФГБУН ИОЭБ СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luo L., Meng H., Gu J.-D. // J. Environ. Manage. 2017. V. 197. P. 539–549.
2. Ibrahim A.S.S., Al-Salamah A.A., El-Badawi Y.B., El-Tayeb M.A., Antranikian G. // Extremophiles. 2015. V. 19. № 5. P. 961–971.
3. Garg S.K., Singh K.S. // Enz. Eng. 2015. V. 4. № 2. Art. 129.
<https://doi.org/10.4172/2329-6674.1000129>
4. Sharma M., Gat Y., Arya S., Kumar V., Panghal A., Kumar A.A. // Ind. Biotechnol. 2019. V. 15. № 2. P. 69–78.
5. Zhang H., Li H., Lang D.A., Xu H., Zhu H. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2018. V. 93. P. 3627–3637.
6. Zhou, C., Qin, H., Chen X., Zhang Y., Xue Y., Ma Y. // Sci Rep. 2018. V. 8. Art. 16467.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34416-5>
7. Uma G., Babu M.M., Prakash V.S.G., Nisha S.J., Citarasu T. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 36

- № 5. Art. 66.
<https://doi.org/10.1007/s11274-020-02841-2>
8. Danilova I., Sharipova M. // Front Microbiol. 2020. V. 11. P. 1782.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>
 9. Gessesse A., Gashe B.A. // Biotechnol. Lett. 1997. V. 19. P. 479–481.
 10. Nilegaonkar S., Kanekar P., Sarnaik S., Kelkar A.S. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 18. P. 785–789.
 11. Karan R., Singh S.P., Kapoor S., Khare S.K. // N Biotechnol. 2011. V. 28. № 2. P. 136–145.
 12. Ibrahim A.S., Al-Salamah A.A., El-Badawi Y.B., El-Tayeb Mohamed A., Ibrahim S.S. // Biosci. J. 2016. V. 32. № 6. P. 1604–1618.
 13. Rathod M.G., Pathak A.P. // Data in Brief. 2016. V. 8. P. 863–866.
 14. Abdel-Hamed A.R., Abo-Elmatty D.M., Wiegel J., Mesbah N.M. // Extremophiles. 2016. V. 20. P. 885–894.
 15. Kevbrin V., Boltyanskaya Y., Kozjaeva V., Uzun M., Grouzdev D. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2021. V. 71. № 1.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004614>
 16. Erlanger B.F., Kokowsky N., Cohen W. // Arch. Biochem. Biophys. 1961. V. 95. № 2. P. 271–278.
 17. Patel A.R., Mokashe N.U., Chaudhari D.S., Jadhav A.G., Patil U.K. // Biocatal. Agric. Biotechnol. 2019. V. 19. P. 101–122.
 18. Ibrahim A.S.S., Elbadawi Y.B., Tayeb M.A.E., Maary K.S.A., Maany D.A.F., Ibrahim S.S.S., Elagib A.A. // 3 Biotech. 2019. V. 9. № 11. P. 391.
 19. Abu-Khudir R., Salem M.M., Allam N.G., Ali E.M.M. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2019. V. 189. № 1. P. 87–102.
 20. Yildirim V., Baltaci M.O., Ozgencli I., Sisecioglu M., Adiguzel A., Adiguzel G. // J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2017. V. 32. № 1. P. 468–477.
 21. Mokashe N., Chaudhari B., Patil U. // J. Surfactants Deterg. 2017. V. 20. № 6. P. 1377–1393.
 22. Mothe T., Sultanpuram V. // 3 Biotech. 2016. V. 6. № 53.
<https://doi.org/10.1007/s13205-016-0377-y>
 23. Gupta R., Beg Q., Lorenz P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 59. P. 15–32.
 24. Jaouadi N.Z., Jaouadi B., Aghajari N., Bejar S. // Process Biochem. 2012. V. 105. P. 142–151.
 25. Hellmuth H., Dreja M. // Tenside Surfactants Deterg. 2016. V. 53. P. 502–508.
 26. Holmberg K. // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2018. V. 168. P. 169–177.
 27. Shaikh I.K., Dixit P.P., Shaikh T.M. // J. Genet. Eng. Biotechnol. 2018. V. 16. № 2. P. 273–279.

Extracellular Highly Stable Alkaline Peptidases of Alkalophilic Bacteria *Alkalicaulis satelles* G-192T and *Aliidiomarina* sp. P-156 and Their Possible Use in the Composition of Detergents

E. V. Lavrentyeva^{a, b, *}, E. B. Erdynyeva^a, Ya. E. Dunaevskii^c, Yu. V. Boltyanskaya^d, and V. V. Kevbrin^d

^a Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, 670047 Russia

^b Banzarov Buryat State University, Ulan Ude, 670000 Russia

^c Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^d Winogradsky institute of microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

*e-mail: lena_l@mail.ru

Peptidase activity of alkaliphilic aerobic proteolytic bacteria *Alkalicaulis satelles* G-192T and *Aliidiomarina* sp. P-156, isolated from the system of hypersaline alkaline lakes Tanatar (Altai Territory) was studied. Strains G-192 and P-156 710 were shown to hydrolyze *para*-nitroanilide substrates, exhibiting the highest activity hydrolyzing of the aminopeptidase LpNa substrate. Analysis of partially purified peptidase preparations showed that the enzymes were most active and stable in the alkaline pH range from 8.4 to 11. The peptidases of strains G-192 and P-156 were highly stable in NaCl up to 220 and 70 g/L respectively. The results on inhibitor analysis and substrate specificity of the studied extracellular enzymes suggested their classification as metallopeptidases of the aminopeptidase type. The studied peptidases showed significant resistance to the surfactants Triton X-100, SDS and the oxidizing agent H₂O₂. The isolated bacteria that produce peptidases can be used as a source of proteolytic enzymes in the development of new detergents.

Keywords: alkalophilic bacteria, stable alkaline peptidases, biotechnological potential, detergents

УДК 579.222:577.217

МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ α -СУБЪЕДИНИЦЫ БИФЕНИЛ ДИОКСИГЕНАЗЫ ШТАММОВ РОДА *RHODOCOCCLUS* И ОСОБЕННОСТИ ДЕСТРУКЦИИ ХЛОРИРОВАННЫХ- И ГИДРОКСИЛИРОВАННЫХ БИФЕНИЛОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

© 2021 г. Д. О. Егорова^{1,*}, Т. И. Горбунова², Т. Д. Кирьянова²,
М. Г. Первова², Е. Г. Плотникова¹

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

²Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, 620108 Россия

*e-mail: daryao@rambler.ru

Поступила в редакцию 07.06.2021 г.

После доработки 21.06.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

На основе моделирования белковой структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы (BphA1) (КФ 1.14.12.18), ключевого фермента деструкции бифенила и полихлорбифенилов (ПХБ), установлено, что BphA1 *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 (=ВКМ Ас-2623D) имела наибольший уровень сходства с классическими бифенилдиоксигеназами (БДО) штаммов-деструкторов ПХБ рода *Rhodococcus*, структура BphA1 *Rhodococcus wratislaviensis* CH628 — с нафталин диоксигеназой штаммов рода *Rhodococcus*. Структура BphA1 *Rhodococcus ruber* P25 (=ИЭГМ 896) была уникальной, так как не было выявлено белковых молекул с высоким уровнем сходства. Показано, что все исследуемые штаммы, несмотря на различия в строении BphA1, осуществляли диоксигенирование незамещенного цикла в молекулах 3,4-дихлорбифенила (ПХБ 12) монохлорированных и моногидрокси-монохлорированных бифенилов (смесь Р). Уровень деструкции ПХБ 12 и смеси Р составил 95.4–100% при 30°C за 10 сут при начальной концентрации 0.1 г/л. Установлено, что изменение температуры (10–50°C) оказывало наибольшее влияние на активность штамма *R. ruber* P25 (снижение в 3.1–3.9 раза). Штаммы *R. wratislaviensis* CH628 и *R. wratislaviensis* KT112-7 эффективно разлагали ПХБ 12 в пределах 20–40 и 10–30°C соответственно, при уровне деструкции 93.2–100%.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, бифенил диоксигеназа, 3,4-дихлорбифенил, гидроксифенил, температура, деструкция

DOI: 10.31857/S0555109921060027

Ремедиация объектов окружающей среды (грунтов, воды и воздуха) с помощью бактериальных штаммов, обладающих способностью к деградации токсикантов, является актуальной задачей современных биотехнологий. Из-за высокой сорбционной способности наиболее проблемным объектом для микробиологической очистки (восстановления) является почва [1]. В то же время, именно почвогрунт является благоприятной средой обитания бактериальных сообществ, среди которых имеются потенциальные штаммы-деструкторы, адаптированные к определенным классам загрязняющих почву веществ и материалов. Особо пристальное внимание разработчиков новых биотехнологий приковано к проблемам ремедиации природных объектов после их

загрязнения стойкими органическими загрязнителями (СОЗ), основную часть которых составляют соединения хлорароматической природы (<http://www.pops.int>). Наибольший вклад в эту группу хлораренов вносят полихлорбифенилы (ПХБ), значительная доля которых (около 40% от всех произведенных ПХБ) аккумулирована в окружающей среде из-за неправильного обращения с этими материалами [2]. Установленная высокая токсичность ПХБ и их опасность для сложившихся биот подкрепляется длительными периодами полураспада этих хлораренов, достигающих в случае высокохлорированных соединений нескольких десятков лет [3].

Находясь в природных объектах, ПХБ в зависимости от климатических условий могут подвергать-

ся различным окислительным процессам, трансформируясь в первичные продукты окисления — гидроксипроизводные (ПХБ-ОН) [4]. Соединения ПХБ-ОН, обладая более высокой гидрофильностью по сравнению с исходными ПХБ, являются и более доступными для микробов: бактерий, грибов. Но даже самые развитые биотехнологические методы и подходы не могут дать однозначных схем превращений всех ПХБ, попавших в природу, и предположить четкие направления бактериальной деструкции ПХБ и ПХБ-ОН по причине сложного состава технических ПХБ. Таким образом, для более глубокого понимания процессов трансформации ПХБ в окружающей среде, необходимы комплексные исследования, сочетающие методы химической модификации ПХБ в ПХБ-ОН и микробной деструкции данных соединений.

Первичная атака молекулы ПХБ и ПХБ-ОН путем внедрения в молекулу двух гидроксильных групп осуществляется ферментом бифенил-2,3-диоксигеназой (BphA, БДО, КФ 1.14.12.18) [5]. BphA входит в семейство гидроксилирующих диоксигеназ и состоит из трех α -больших (BphA1) и трех β -малых (BphA2) субъединиц, ферредоксина (BphA3) и ферредоксин-оксидоредуктазы (BphA4). За распознавание конгенов ПХБ и связывание с ними отвечает α -субъединица бифенил 2,3-диоксигеназы [6]. В связи с этим особый интерес при изучении возможности разложения ПХБ и ПХБ-ОН аэробными бактериями представляет структура α -субъединицы данного фермента у активных штаммов-деструкторов.

Восстановление территорий, загрязненных ПХБ, осложняется нестабильными температурными условиями в течение вегетационного сезона. Известно, что выход температуры окружающей среды за рамки оптимального диапазона культивирования бактериальных штаммов негативно сказывается на их биодegradативном потенциале [8]. Разложение ПХБ осуществляется психрофильными, мезофильными и термофильными штаммами [8–12]. Температура, при которых описанные штаммы проявляли окислительную активность по отношению ПХБ, составляет 4–60°C. Однако, наиболее высокие показатели отмечены при температурах близких к 30°C [8–11]. Сведения о разложении ПХБ в неоптимальных условиях ограничены.

Цель работы — моделирование первичной, вторичной и третичной структуры α -субъединицы бифенил диоксигеназы штаммов *Rhodococcus ruber* P25, *Rhodococcus wratislaviensis* CH628 и *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7, а также анализ их способности к деструкции 3,4-дихлорбифенила и его химически модифицированных производных при различных температурах.

МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы и условия культивирования. Штаммы рода *Rhodococcus*, использованные в настоящем исследовании, выделены ранее из почв на территории России, загрязненных хлорароматическими соединениями. Штамм *Rhodococcus ruber* P25 выделен из почв в г. Пермь (Россия), депонирован в Коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН (=ИЭГМ 896) [13, 14], *Rhodococcus wratislaviensis* CH628 — из почв г. Чапаевска (Россия) [15, 16], *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 — из почв г. Березники (Россия), депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (=ВКМ Ас-2623D) [17, 18]. Культивирование штаммов проводили в минеральной среде К1 [19] с внесением бифенила в качестве источника углерода (конечная концентрация 0.5 г/л). Оптимальную температуру и пределы сохранения жизнеспособности штаммов определяли при культивировании в диапазоне температур 4–60°C [13].

Ресурсы для моделирования структуры BphA1. Нуклеотидную последовательность α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штаммов *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. wratislaviensis* CH628 получили при анализе результатов полногеномного секвенирования и депонировали в международную базу данных GenBank под номерами MW070531 и MW070532, соответственно. Для штамма *R. ruber* P25 использована нуклеотидная последовательность гена *bphA1*, депонированная ранее в GenBank под номером KP985699.1 [20]. Первичную, вторичную и третичную структуру α -субъединицы БДО моделировали на основе нуклеотидной последовательности гена *bphA1* с применением известных моделей ферментов класса диоксигеназ с использованием программ MEGA X (<https://www.megasoftware.net>), SwissDock (<https://www.swissdock.ch>), SwissModel (<https://www.swissmodel.expasy.org>), UCSF CHIMERA (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>).

Синтез ПХБ 12. Для исследования использовали 3,4-дихлорбифенил (ПХБ 12). Синтез осуществляли по реакции Гомберга–Бахмана–Хейя в присутствии *изо*-амилнитрита [21] из бензола и 3,4-дихлоранилина. Все реагенты квалификации х. ч. (ЗАО “НПО Экрос”, АО “Вектон”, Россия). Для применения в микробиологических экспериментах полученный 3,4-дихлорбифенил очищали от остальных компонентов реакционной смеси путем перегонки в вакууме.

Синтез производных ПХБ 12 (смесь Р). В колбу, снабженную магнитной мешалкой, обратным холодильником и капельной воронкой, вносили 3.36 г (0.06 моль) КОН и 25 мл (25.55 г, 0.42 моль) 2-аминоэтанола. Содержимое колбы нагревали при интенсивном перемешивании до образования мелкодисперсной суспензии. Затем вносили

0.22 г (0.01 моль) ПХБ 12 и кипятили реакционную массу при перемешивании ($\sim 170^\circ\text{C}$) в течение 17 ч. По окончания массу охлаждали до комнатной температуры, вносили разбавленную соляную кислоту до pH 1–2 и экстрагировали толуолом (2×10 мл). Толуольный экстракт сушили CaCl_2 и анализировали методом ГХ-МС. Каждое взаимодействие проводили 3 раза. Для микробиологических исследований толуольный экстракт упаривали на воздухе, остаток высушивали под вакуумом (5 мм рт. ст., $t_{\text{комн}}$) до постоянной массы [22]. Получали смесь Р — смесь двух изомеров моногидроксимонохлорбифенилов (98.42%), остальное — 3- и 4-монохлорбифенилы с суммарным содержанием (1.68%). Все реагенты были квалификации х. ч.

Идентификация и анализ ПХБ 12 и компонентов смеси Р. Анализ и идентификацию осуществляли на газовом хромато-масс-спектрометре “Agilent GC 7890A MS 5975C Inert XLEI/CI” (“Agilent Technologies”, США) с кварцевой капиллярной колонкой HP-5MS (полидиметилсилоксан, 5 мас. % фенильных групп) длиной 30 м, диаметром 0.25 мм, толщиной пленки 0.25 мкм и квадрупольным масс-спектрометрическим детектором. Температура колонки: начальная — 40°C (выдержка 3 мин), программирование со скоростью 10 град./мин до 290°C (выдержка 30 мин), температура испарителя — 250°C , температура источника — 230°C , квадруполь — 150°C , переходной камеры — 280°C , газ-носитель — гелий, 1.0 мл/мин. Сканирование в режиме электронной ионизации (70 эВ) по полному ионному току в диапазоне масс 20–1000 Да.

Биодеструкция ПХБ 12 и смеси Р. Для изучения биодеструкции ПХБ 12 и смеси Р бактериальные культуры (ОП₆₀₀ = 1.5, 1 мл), предварительно выращенные в минеральной среде К1 с добавлением 1 г/л бифенила в качестве источника углерода до середины экспоненциальной фазы, были помещены в стеклянные флаконы (“Sigma-Aldrich”, Германия) объемом 4 мл, закрытые тефлоновыми крышками. В каждый флакон вносили 0.1 г/л ПХБ 12 или смеси Р и инкубировали на круговом шейкере Environmental Shaker-Incubator ES-20/60 (“BioSan”, Латвия) при 120 об./мин в течение 14 сут. Температура культивирования 10, 20, 30, 40 и 50°C . Образцы для анализа отбирали на 0, 1, 3, 7, 10 и 14 сут инкубации. Процесс деструкции останавливали замораживанием. Бактериальный рост контролировали в замороженных образцах по изменению оптической плотности культуры при 600 нм на спектрофотометре UV-Visible BioSpecmini (“Shimadzu”, Япония).

Определение содержания ПХБ 12 и смеси Р при биодеструкции. Во флаконы, содержащие 1 мл бактериальной культуры и ПХБ 12 или смесь Р после биодеструкции, добавляли 0.1 мл 35%-ной соляной кислоты и 0.5 мл гексана. Для лучшего разделения органической и водной фаз флаконы

помещали в центрифугу Sigma 3-16P (“Sigma”, Германия) и центрифугировали содержимое флакона в течение 5 мин при скорости 9168 g. Далее проводили анализ органического слоя в условиях ГХ-ПВД.

Количественную оценку ПХБ и/или ПХБ-ОН проводили на газовом хроматографе “Shimadzu GC 2010” (“Shimadzu”, Япония) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой ZB-5 (длина 30 м, диаметр 0.25 мм), толщина пленки неподвижной фазы составляла 0.25 мкм. Начальная температура колонки составляла 40°C (3 мин) с последующим повышением температуры $10^\circ/\text{мин}$ до конечной температуры 280°C (изотерма 15 мин). Температура испарителя 250°C , детектора — 300°C .

Расчет содержания оставшихся после биодеструкции ПХБ или ПХБ-ОН в каждом исследуемом образце проводили методом внутренней нормализации, рассчитывая вклад отдельных соединений в суммарную площадь пиков. На основании полученных расчетных площадей пиков оценивали содержание исходных ПХБ или ПХБ-ОН после процесса биодеструкции.

Каждый образец был проанализирован не менее четырех раз на газовом хроматографе, средне-квадратическое отклонение составило не более 3%.

Анализ метаболитов. Метаболиты изучали в образцах, отобранных на 0, 1, 3, 7, 10 и 14 сут эксперимента по биодеструкции. Содержимое каждого стеклянного флакона центрифугировали на миницентрифуге MiniSpin (“Eppendorf”, Германия) 10 мин при 13201 g. Для анализа использовали надосадочную жидкость. В качестве стандартов применяли бензойную кислоту (БК), моно- (3-, 4-) и ди- (3,4-) хлорбензойные кислоты (ХБК), 2-гидроксис-3-хлор- и 2-гидроксис-4-хлорбензойные кислоты (“Sigma-Aldrich”, Германия).

Присутствие метаболитов в среде культивирования регистрировали методом ВЭЖХ при использовании хроматографа “LC-20AD Prominence” (“Shimadzu”, Япония) с колонкой C-18 150×4.6 мм (“Sigma-Aldrich”, США) и УФ-детектором “SPD-20A” (“Shimadzu”, Япония) в системе ацетонитрил — 0.1%-ная H_3PO_4 (60 : 40 об./об.). Идентификацию продуктов метаболизма проводили методом сравнения времени удерживания на колонке образовавшихся и стандартных соединений [23].

Установлено, что БК регистрируется при длине волны $\lambda = 205$ нм с временем удерживания $\tau = 4.8$ мин, 3-ХБК, 4-ХБК и 3,4-диХБК — при длине волны $\lambda = 232$ нм в диапазоне времен удерживания 5–8 мин, а моно(хлоргидроксис)бензойные кислоты — при $\lambda = 205$ нм и $\tau = 10$ –15 мин.

Образование (хлор/гидроксис)-2-гидроксис-6-оксо-(хлорфенил)гекса-2,4-диеновых кислот (ГОФДК) определяли на спектрофотометре

UV-Visible BioSpec-mini (“Shimadzu”, Япония) при $\lambda_{\max}$ от 390 до 450 нм [23].

Анализ эффективности биодеструкции. Эффективность деструкции оценивали, определяя уровень деструкции субстрата (%), удельную скорость (сут^{-1}), а также кинетические параметры деструкции путем вычисления уравнения первого приближения зависимости концентрации ПХБ 12 и смеси Р от времени инкубации (3) с учетом коэффициента достоверности аппроксимации (R^2):

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

где D — эффективность деструкции, %; C_t — концентрация субстрата через определенный промежуток времени; C_0 — концентрация субстрата в начальный момент времени;

$$\mu = (\ln C_0 - \ln C_t)/\Delta t, \quad (2)$$

где C_0 — концентрация субстрата (ПХБ12 или смесь Р) в начальный момент времени, мг/л, C_t — концентрация субстрата в конечный момент времени, мг/л, Δt — период деструкции, сут;

$$y = k_1 x^2 + k_2 x + k_3, \quad (3)$$

где y — концентрация ПХБ12 и/или смеси Р, г/л; x — время деструкции; k_1 , k_2 и k_3 — коэффициенты, определяемые экспериментально.

Статистический анализ данных. Все эксперименты проводили не менее чем в трехкратной повторности. Анализ количественных показателей проводили с использованием пакетов программ MS Office и CAKE (<https://www.tessella.com/show-case/computer-assisted-kinetic-evaluation>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы. Для моделирования структуры α -субъединицы БДО штаммов-деструкторов ПХБ *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. wratislaviensis* CH628 и *R. ruber* P25 были использованы нуклеотидные последовательности генов *bphA1*_{KT112-7} (GenBank MW070531), *bphA1*_{CH628} (GenBank MW070532) и *bphA1*_{P25} (GenBank KP985699.1). Филогенетический анализ генов *bphA1*_{KT112-7}, *bphA1*_{CH628} и *bphA1*_{P25} показал, что они принадлежат различным семействам диоксигеназ (рис. 1). В результате дедуктивной трансляции и сравнения с гомологичными аминокислотными последовательностями, представленными в базе данных GenBank, установлено, что *BphA1*_{KT112-7} на 99.64% идентична таковой фермента семейства бифенил-диоксигеназ (КФ 1.14.12.18) штамма-деструктора ПХБ *Rhodococcus aetherivorans* I24 (GenBank AAL61663.2) и находится в группе классических БДО. Дедуктивная аминокислотная последовательность *BphA1*_{CH628} на 100% сходна с первичной структурой α -субъединицы нафталиндиоксигеназы (КФ 1.14.12.12)

штамма-деструктора *Rhodococcus opacus* B4 (GenBank BA47212.1) и располагается в “ветви” нафталиновых диоксигеназ. Как было показано ранее, *BphA1*_{P25} показывает наибольший уровень сходства с ферментами группы фенил-пропионат диоксигеназ (КФ 1.14.12.—) [20].

Анализ вторичной структуры показал, что соотношение α -спиралей и β -тяжей в α -субъединицах БДО штаммов *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. wratislaviensis* CH628 и *R. ruber* P25 составило 1 : 0.89, 1 : 1.06 и 1 : 1.38 соответственно (табл. 1). Таким образом, у штаммов CH628 и P25 большая часть аминокислотной последовательности *BphA1* формирует β -тяжи.

В результате 3D-моделирования установлены третичные структуры *BphA1*_{KT112-7}, *BphA1*_{CH628} и *BphA1*_{P25} (рис. 2). Анализ параметров показал, что наиболее достоверная модель (93–99%) α -субъединицы БДО получена для *BphA1* штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 (табл. 2). При этом наиболее близкой моделью третичной структуры *BphA1*_{KT112-7} является таковая БДО штамма *Rhodococcus jostii* RHA1 [24]. Для *BphA1*_{CH628} также удалось получить модель третичной структуры с высокими показателями достоверности (91–92%). Наиболее близкой является модель α -субъединицы нафталиндиоксигеназы штамма *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (табл. 2) [25]. В то же время создание модели третичной структуры *BphA1*_{P25} было сопряжено с проблемой поиска наиболее близкой третичной структуры фермента семейства диоксигеназ. Анализ баз данных показал, что из описанных моделей максимальный уровень сходства выявляется при сравнении *BphA1*_{P25} с α -субъединицей толуюл-2,3-диоксигеназы штамма *Pseudomonas putida* F1 (табл. 2) [26]. Уровень достоверности полученной третичной структуры *BphA1*_{P25} составил 35–77% при анализе различных параметров. Полученные результаты подтверждают уникальность строения α -субъединицы бифенил-2,3-диоксигеназы штамма *R. ruber* P25.

Анализ деструкции ПХБ 12 штаммами *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. wratislaviensis* CH628 и *R. ruber* P25. Для изучения особенностей деструкции хлорированных бифенилов штаммами *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. wratislaviensis* CH628 и *R. ruber* P25, БДО которых существенно различались, была исследована их активность по отношению к ПХБ 12, в молекуле которого атомы хлора находятся у 3 и 4 атомов углерода в одном ароматическом кольце. Синтез ПХБ 12 был осуществлен по стандартной методике путем конденсации 3,4-дихлоранилина с бензолом в присутствии *изо*-амилнитрита (рис. 3) [21]. Выход целевого продукта ПХБ 12 достигал 10%. Для дальнейших микробиологических исследований ПХБ 12 был очищен от компонентов реакционной смеси до концентрации 98.03%.

Анализ данных, полученных по биотрансформации ПХБ 12, показал, что штаммы KT112-7 и

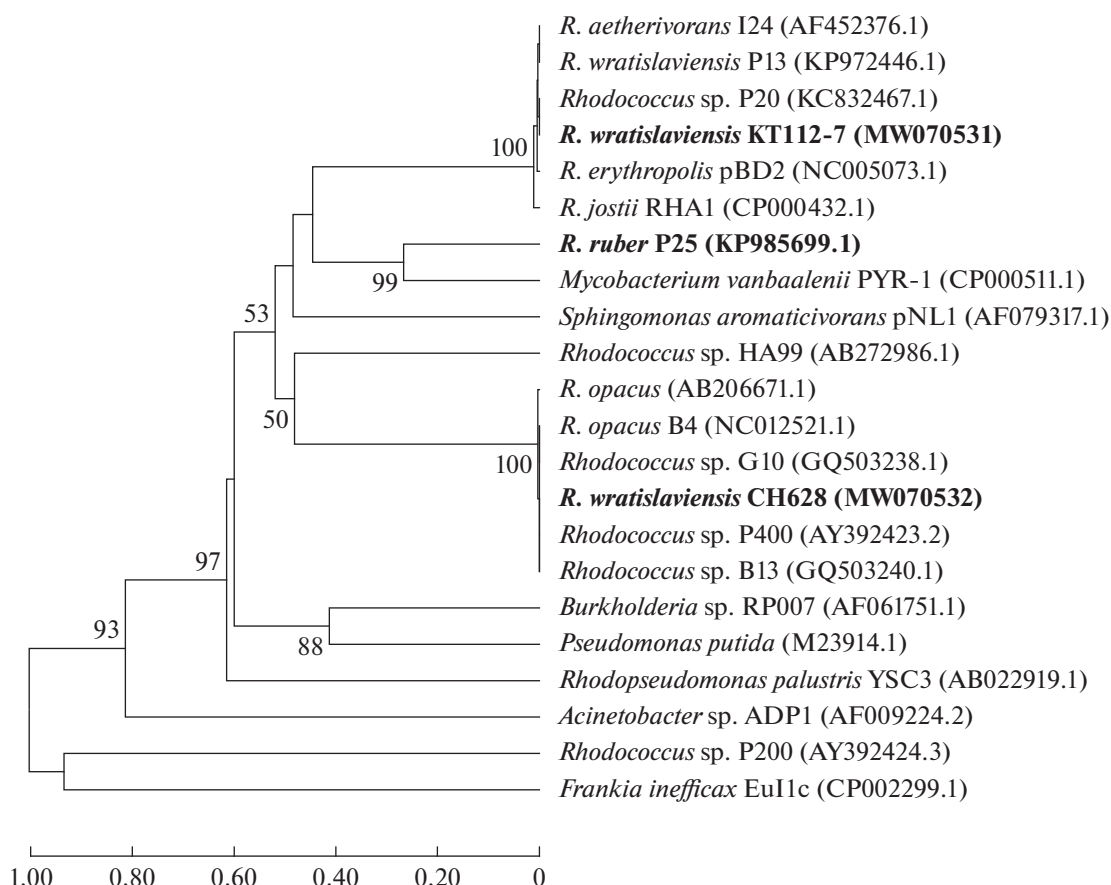


Рис. 1. Дерево сходства генов α -субъединиц гидроксилирующих диоксигеназ ароматических соединений, построенное с использованием метода UPGMA. Достоверность ветвления оценивали на основании “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев. Дерево построено на основании выравнивания последовательностей исследуемых генов и ранее опубликованных в GenBank. На дереве представлены названия штаммов и номера нуклеотидных последовательностей в GenBank (исследуемые в настоящей работе выделены полужирным шрифтом).

CH628 осуществляли его полное разложение за 7 сут, а штамм P25 — за 10 сут культивирования при 30°C. При этом основным метаболитом является 3,4-диХБК (рис. 4). Известно, что термофильный штамм *Bacillus* sp. JF8 разлагал ПХБ 12 также через стадию образования 3,4-диХБК [12]. Помимо хлорбензойной кислоты в среде культивирования всех исследуемых штаммов идентифицирована ГОФДК с длиной волны максимального поглощения 438 нм (ОП = 0.120–0.264 о.е.), что свидетельствовало о расположении атомов хлора в фенольной части молекулы, при этом один из заместителей находится у 9 углеродного атома [27]. Известно, что низкохлорированные конгенеры ПХБ (количество атомов хлора ≤ 3) в присутствии аэробных микроорганизмов преимущественно подвергаются окислительной деградации под действием ферментов класса диоксигеназ с образованием катехолподобных соединений [5]. Очевидно, что для БДО исследуемых штаммов наиболее удобным структурным фрагментом молекулы ПХБ 12 для атаки двух атомов кислорода из акти-

вированной под действием диоксигеназы молекулы кислорода является стерически свободный, незамещенный ароматический цикл (рис. 5). Окисление ПХБ 12 протекало через стадию дигидроксилирования с образованием 3,4-дихлор-2',3'-дигидроксибифенила. Далее следует стандартный для аэробных бактерий *meta*-распад нехлорированного цикла, и образуется замещенная пентадиеновая кислота (**9,10-диCl-ГОФДК**). В результате последующего ферментативного расщепления 9,10-диCl-ГОФДК образуются пентадиеновая и 3,4-дихлорбензойная кислоты (рис. 5) [28].

Возможный альтернативный вариант — взаимодействие атомов кислорода под действием БДО по хлорированному циклу — является менее выгодным из-за стерических препятствий. В результате окисления хлорированного кольца ПХБ 12 образовавшиеся аналоги дихлор-дигидроксибифенила будут характеризоваться расположением всех заместителей в одном ароматическом кольце, а при *meta*-распаде — все заместители будут располагаться

Таблица 1. Вторичная структура α -субъединицы бифенил диоксигеназы

α -спирали	№ аминокислотного остатка в первичной структуре			β -тяжи	№ аминокислотного остатка в первичной структуре		
	KT112-7	CH628	P25		KT112-7	CH628	P25
α 1	3–9	4–16	61–64	β 1	41–45	47–51	5–9
α 2	19–22	25–27	100–115	β 2	54–60	60–66	15–19
α 3	25–36	31–40	137–141	β 3	63–69	69–75	81–85
α 4	46–48	52–54	146–150	β 4	75–79	81–85	88–92
α 5	121–124	127–140	153–159	β 5	94–96	100–102	129–133
α 6	130–132	166–180	197–201	β 6	139–143	105–107	177–179
α 7	158–173	203–212	205–210	β 7	146–150	114–116	186–190
α 8	195–204	215–220	215–220	β 8	180–182	147–151	231–234
α 9	215–221	222–227		β 9	187–192	154–158	238–241
α 10	228–230	236–238		β 10	237–241	187–189	246–252
α 11	257–272	246–248		β 11	248–252	185–199	258–263
α 12	274–284	265–267		β 12	297–300	240–244	
α 13	287–291	270–279		β 13	304–307	250–254	
α 14	338–351	282–288		β 14	312–318	293–298	
α 15	359–374	348–359		β 15	324–333	302–309	
α 16	377–379	368–375		β 16	402–405	318–330	
α 17	410–423			β 17		333–343	
α 18	428–434						

Таблица 2. Параметры модели третичной структуры α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы

Параметр	<i>R. wratislaviensis</i> KT112-7	<i>R. wratislaviensis</i> CH628	<i>R. ruber</i> P25
Площадь поверхности субъединицы, Å ²	17.84 × 10 ³	17.39 × 10 ³	15.20 × 10 ³
Объем субъединицы, Å ³	55.63 × 10 ³	48.20 × 10 ³	32.40 × 10 ³
Наиболее близкий по третичной структуре фермент	BphA1, бифенил 2,3-диоксигеназа (КФ 1.14.12.18)	NDO-R_A, нафталин 1,2-диоксигеназа (КФ 1.14.12.12)	TDO-F, толуол 2,3-диоксигеназа (КФ 1.14.12.11)
Бактериальный штамм с близким ферментом	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 [25]	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB12038 [26]	<i>Pseudomonas putida</i> F1 [27]
Уровень сходства, %	98.65	93.72	44.79
Точность третичной структуры	0.93	0.91	0.77
Оценка качества третичной структуры	–0.06	–0.35	–2.63
Оценка качества четвертичной структуры	0.76	0.82	0.75

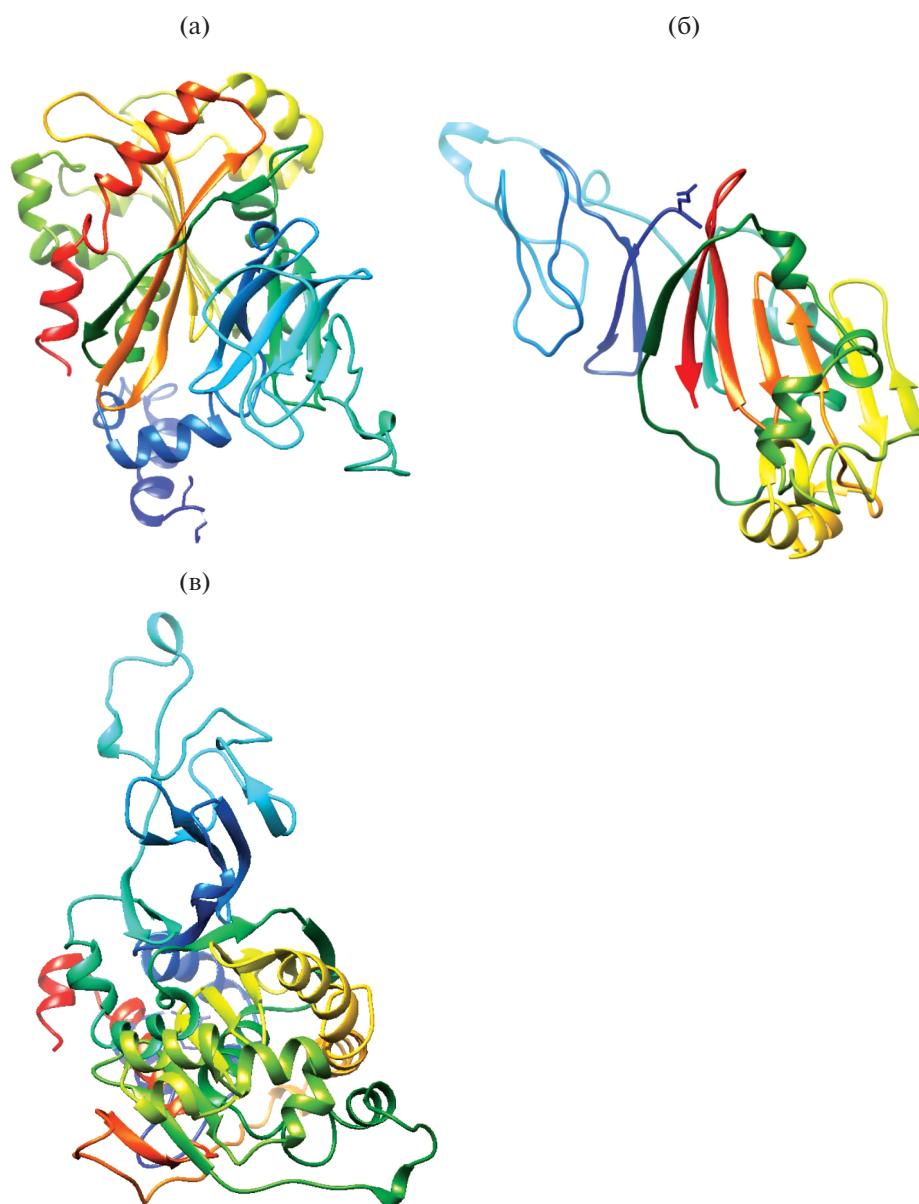


Рис. 2. Третичная структура α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штаммов *R. wratislaviensis* CH628 (а), *R. ruber* P25 (б) и *R. wratislaviensis* KT112-7 (в). Модели построены на основании анализа дедуктивных аминокислотных последовательностей исследуемых ферментов, имеющихся в базах данных с использованием алгоритма программы UCSF CHIMERA. При окрашивании моделей использован режим “rainbow”, при котором окрашивание модели происходит от N-конца цепи до C-конца от синего через радужный спектр до красного с выделением цветом каждого элемента вторичной структуры.

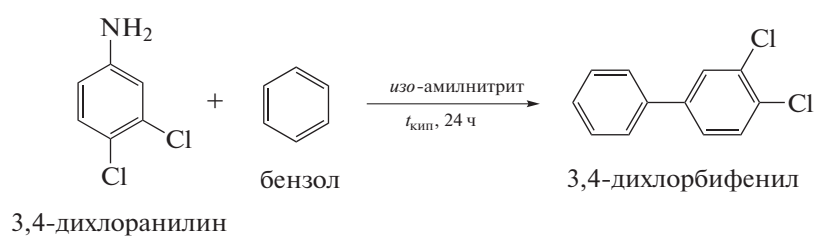


Рис. 3. Схема синтеза ПХБ 12 (3,4-дихлорбифенила).

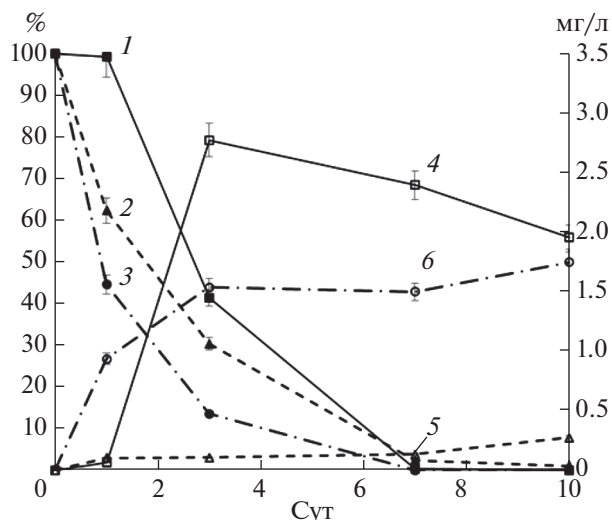


Рис. 4. Деструкция 3,4-дихлорбифенила (%) и образование основного метаболита – 3,4-дихлорбензойной кислоты (мг/л) при 30°C: 1, 4 – *R. wratislaviensis* KT112-7, 2, 5 – *R. ruber* P25, 3, 6 – *R. wratislaviensis* CH628.

в диеноатной части ГОФДК. Последующее гидролитическое расщепление такой молекулы приведет к образованию дихлорпентадиеновой кислоты и БК. Однако в настоящем исследовании БК не была выявлена среди метаболитов, образующихся при разложении ПХБ 12 штаммами *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. wratislaviensis* CH628 и *R. ruber* P25.

Таким образом, накопление в среде 3,4-дихлорбензойной кислоты (рис. 4), но не БК, подтверждает высказанное предположение, что БДО исследуемых штаммов осуществляют окисление незамещенного кольца ПХБ 12.

Биодеструкция смеси Р, полученной при гидроксигировании ПХБ 12. Синтез ПХБ-ОН на основе ПХБ 12 проводили путем взаимодействия конгенера ПХБ со щелочью в среде 2-аминоэтанола (рис. 6) по методике, описанной ранее [22].

По результатам ГХ-МС анализа установлено, что в условиях реакции протекало образование смеси продуктов (смесь Р). В составе смеси Р преобладали целевые продукты – моногидроксимонохлорированные бифенилы. Наиболее вероятно, что ПХБ-ОН были представлены 3-гидроксимонохлорбифенилом и 4-гидроксимонохлорбифенилом при условии *ipso*-атаки гидроксигруппы по связи $C_{Ar}-Cl$ конгенера ПХБ 12. На долю целевых продуктов (ПХБ-ОН) приходилось 98.42% от всех компонентов смеси Р. Характерной особенностью результатов химического синтеза было образование в условиях реакции более низкохлорированных конгенеров ПХБ наряду с формированием изомерных ПХБ-ОН. Полученные результаты свидетельствовали о том, что в составе смеси Р присутствовали 3-хлорбифенил и 4-хлорбифенил (1.68% от всех компонентов смеси). Как было показано, образование более низкохлорированных ПХБ связано с протеканием *in situ* конкурирующей реакции гидродехлорирования, как результата межмолекулярных взаимодействий всех участвующих реагентов [22].

Время трансформации смеси Р штаммами *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. wratislaviensis* CH628 и *R. ruber* P25 при условиях, аналогичных биодеструкции ПХБ 12, увеличивалось (рис. 7). Штаммы *R. wratislaviensis* KT112-7 и *R. wratislaviensis* CH628 осуществляли 100%-ное разложение смеси за 10 сут, тогда как уровень деструкции смеси Р штаммом *R. ruber* P25 за аналогичный период составлял 95.4%. Снижение биodeградативной ак-

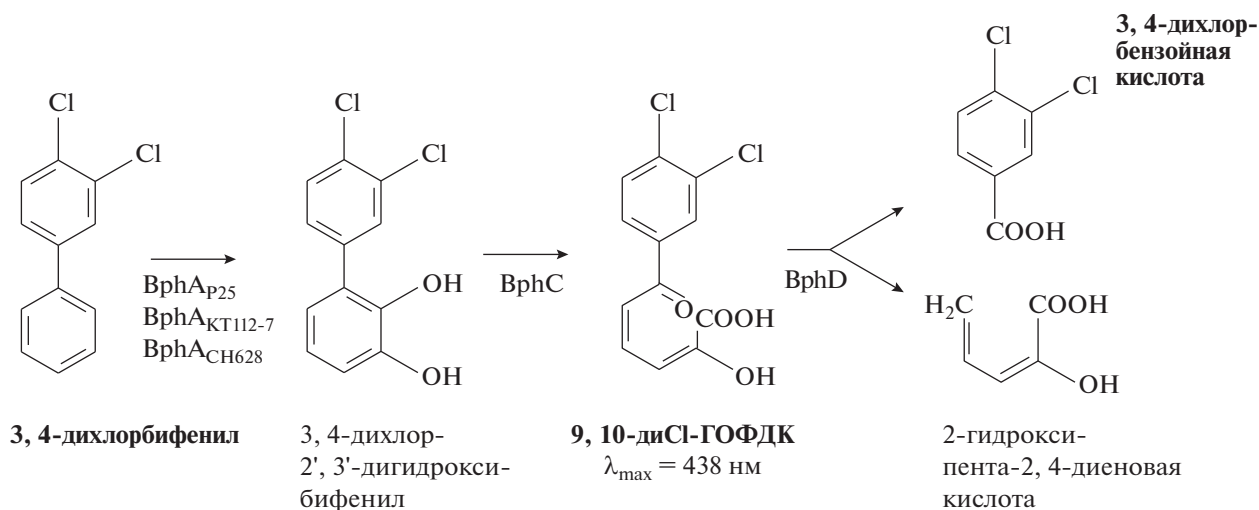


Рис. 5. Схема метаболического пути 3,4-дихлорбифенила у исследуемых штаммов рода *Rhodococcus*.

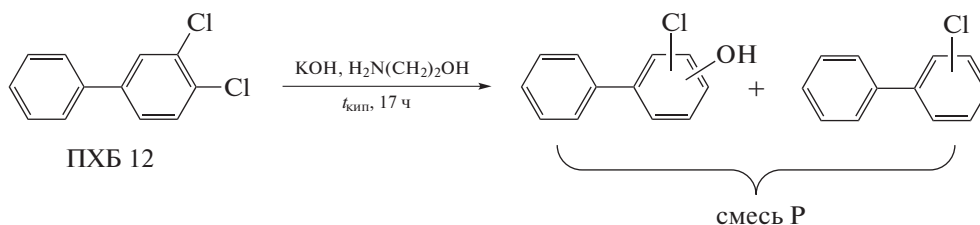


Рис. 6. Схема синтеза смеси Р на основе конгенера ПХБ 12.

тивности может быть обусловлено токсическим эффектом, который оказывают на бактериальные клетки гидроксилированные моноклорбифенилы. Согласно данным [29] концентрация 4-гидрокси-3-хлорбифенила, при которой наблюдалось 50%-ное падение бактериальной люминесценции составляло 1.15 мг/л, а для 3-гидрокси-4-хлорбифенила данный показатель составлял 6.34 мг/л, что в 7–39 раз меньше, чем аналогичный показатель для негидроксилированных хлорбифенилов. Уровень цитотоксичности 100 мг/л 4-гидрокси-3-хлорбифенила, исследованный на специально подготовленных бактериальных клетках, составлял $33.1 \pm 5.5\%$ [30].

Следует отметить, что удельная скорость деструкции смеси Р, по сравнению с аналогичным показателем для штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. wratislaviensis* СН628 и *R. ruber* Р25 ПХБ12, снизилась в 1.2–1.4 раза (табл. 3, 4). Так как основную часть смеси Р составляют гидроксихлорбифенилы, то снижение скорости деструкции исследуемой смеси по сравнению с аналогичным показателем при разложении ПХБ 12, вероятно, обусловлено токсичностью компонентов смеси.

Методом ВЭЖХ при биодеструкции смеси Р в культуральной среде всех трех штаммов были зафиксированы 3-ХБК, 4-ХБК и моногидрокси-моноклорбензойные кислоты, но не обнаруживалась БК (рис. 7). Известно, что основным метаболитом при разложении 4-гидрокси-3-хлорбифенила штаммом *Sphingomonas* sp. N-9 является 4-гидрокси-3-хлорбензойная кислота [30]. Спектрофотометрические исследования показали, что при разложении смеси Р отмечалось присутствие нескольких ГОФДК с максимальной длиной волны поглощения при 436 и 418 нм ($ОП_{436} = 0.112–0.134$ о.е., $ОП_{418} = 0.254–0.351$ о.е. соответственно). Известно, что $\lambda_{\max} = 436$ нм характерна для 9С1-ГОФДК, образующейся при окислении и последующем расщеплении незамещенного цикла молекулы 3-хлорбифенила [27]. Полученные данные позволяют предположить, что БДО штаммов *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. wratislaviensis* СН628 и *R. ruber* Р25 осуществляли окисление компонентов смеси Р (т.е. моноклорбифенилов и моногидрокси-моноклорбифенилов) аналогично ПХБ 12 по незамещенному циклу молекулы (рис. 5, 6).

Таким образом, различия в строении $VphA1_{КТ112-7}$, $VphA1_{СН628}$ и $VphA1_{Р25}$ не оказывали влияния на механизм разложения моно- и дихлорбифенилов, а также моногидрокси-моноклорбифенилов, содержащих заместители в одном кольце молекулы.

Биодеструкция ПХБ 12 и смеси Р при различных температурах. В естественных условиях бактериальные штаммы испытывают существенные перепады температуры окружающей среды. Эффективность биодеструкции зависит от активности штаммов по отношению к ПХБ и их производным в зависимости от температуры. Установлено, что штаммы *R. wratislaviensis* КТ112-7, *R. wratislaviensis* СН628 и *R. ruber* Р25 являются мезофилами, растут в диапазоне температур 7–45°C, с оптимумом для роста при 20–37°C [13]. Деструктивную активность по отношению к ПХБ 12 и смеси Р штаммы проявляли при 10–50°C (табл. 3, 4). Максимальные показатели деструкции отмечены при 30°C. Отклонение температуры в меньшую или большую стороны снижало способности у штамма *R. ruber* Р25 к деструкции как ПХБ 12, так

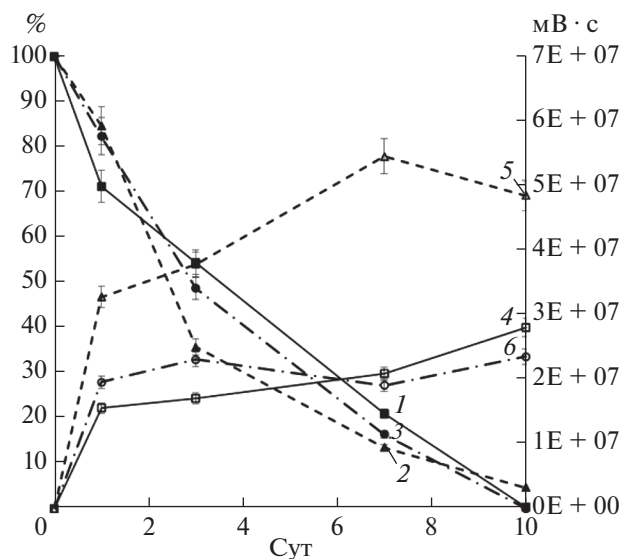
Рис. 7. Деструкция (%) смеси Р и образование замещенных бензойных кислот (мВ·с) при 30°C: 1, 4 – *R. wratislaviensis* КТ112-7, 2, 5 – *R. ruber* Р25, 3, 6 – *R. wratislaviensis* СН628.

Таблица 3. Кинетические параметры разложения ПХБ 12

Штамм	Температура, °C	Деструкция, %	Удельная скорость деструкции, сут ⁻¹	Уравнение деструкции	R ²
КТ112-7	10	98.2	0.444	$y = 1.3524x^2 - 21.996x + 89.36$	0.948
	20	99.6	0.543	$y = 2.411x^2 - 33.301x + 104.02$	0.897
	30	100	0.866	$y = 1.4384x^2 - 25.398x + 109.11$	0.969
	40	65.8	0.107	$y = -0.1321x^2 - 4.9961x + 98.593$	0.992
	50	45.7	0.061	$y = 0.0593x^2 - 4.5872x + 97.084$	0.883
P25	10	27.6	0.023	$y = -0.2447x^2 + 0.2605x + 95.723$	0.864
	20	60.2	0.088	$y = -0.1915x^2 - 3.5901x + 102.12$	0.993
	30	98.9	0.536	$y = 1.6013x^2 - 24.992x + 93.244$	0.979
	40	50.7	0.071	$y = -0.0491x^2 - 5.0386x + 104.97$	0.935
	50	25.4	0.029	$y = 0.0913x^2 - 3.3287x + 99.791$	0.955
СН628	10	83.3	0.172	$y = -0.7691x^2 + 0.2328x + 95.089$	0.952
	20	99.8	0.597	$y = 1.387x^2 - 19.13x + 75.651$	0.615
	30	100	0.765	$y = 2.0062x^2 - 28.101x + 85.845$	0.908
	40	93.2	0.269	$y = -0.5051x^2 - 3.2536x + 93.078$	0.964
	50	75.9	0.143	$y = -0.3675x^2 - 4.2201x + 101.66$	0.994

Таблица 4. Кинетические параметры разложения смеси Р, полученной при гидроксировании ПХБ 12

Штамм	Температура, °C	Деструкция, %	Удельная скорость деструкции, сут ⁻¹	Уравнение деструкции	R ²
КТ112-7	10	59.4	0.091	$y = 0.8622x^2 - 14.116x + 97.83$	0.969
	20	41.4	0.053	$y = 2.411x^2 - 33.901x + 104.02$	0.897
	30	99.6	0.552	$y = 0.5647x^2 - 14.823x + 93.715$	0.981
	40	61.2	0.095	$y = -0.2598x^2 - 3.5541x + 101.73$	0.968
	50	52.1	0.074	$y = 0.039x^2 - 5.8553x + 100.82$	0.976
P25	10	47.8	0.065	$y = -0.9218x^2 + 5.104x + 96.347$	0.922
	20	52.2	0.074	$y = -0.4391x^2 - 1.5687x + 99.368$	0.999
	30	95.4	0.308	$y = 1.3376x^2 - 22.74x + 100.68$	0.979
	40	35.3	0.044	$y = 0.3753x^2 - 7.1846x + 99.995$	0.976
	50	31.4	0.038	$y = 0.5504x^2 - 8.2418x + 98.04$	0.915
СН628	10	8.2	0.009	$y = 1.5772x^2 - 20.967x + 76.694$	0.651
	20	84.3	0.185	$y = 1.6625x^2 - 26.437x + 99.956$	0.993
	30	100	0.691	$y = 0.833x^2 - 18.107x + 99.023$	0.996
	40	63.4	0.101	$y = 0.2574x^2 - 8.0068x + 94.368$	0.925
	50	45.8	0.061	$y = -0.5727x^2 - 0.404x + 115.04$	0.732

и смеси Р. В то же время, снижение температуры до 10°C не приводило к потере активности штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 в отношении ПХБ 12 (табл. 3), тогда как уровень деструкции смеси Р снижался в 1.7–2.4 раза (табл. 4). Повышение температуры культивирования штамма *R. wratislaviensis* КТ112-7 ингибировало процесс разложения как ПХБ 12, так и смеси Р: снижение показателей в 1.5–1.6 раза при 40°C, в 1.9–2.2 раза при 50°C. Штамм *R. wratislaviensis* СН628 эффективно разлагал ПХБ 12 при 20–40°C (табл. 3). Если субстра-

том являлась смесь Р, отклонение температуры культивирования от 30°C как в большую, так и в меньшую стороны приводило к существенному снижению биodeградативной активности штамма СН628 (табл. 4). В литературе присутствует ограниченное количество сведений о разложении ПХБ и ПХБ-ОН при высоких и низких температурах. Известно, что мезофильный штамм-деструктор ПХБ *Burkholderia cepacia* LB400 наиболее активно разлагал смесь ПХБ Арохлор 1242 при 37°C, снижение температуры до 7°C приводило к

ингибированию процесса деструкции в 3.1 раза, а повышение температуры до 50°C – к снижению эффективности деструкции в 1.1 раза [9]. Для психрофильных штаммов *Pseudomonas* sp. Cam-1 и *Hydrogenophaga* sp. IA3-A снижение температуры культивирования с 30–37°C до 5–7°C также вызывало снижение эффективности разложения смесей ПХБ (Арохлор 1221 и Арохлор 1242) в целом, и ПХБ 12, входящего в состав Арохлор 1221, в частности [8, 9]. Микрофлора арктических почв более эффективно разлагает ПХБ 12 в составе Арохлора 1221 при 30°C (100% за 6 недель), чем при 7°C (0–50% за 8 недель) [11]. Аналогичная закономерность описана для психротолерантных антарктических штаммов *Arthrobacter* sp. 74, *Pseudalteromonas* sp. 19 и *Psychrobacter* sp. 15 [10].

Таким образом в результате проведенных исследований установлено, что α -субъединицы бифенил 2,3-диоксигеназы штаммов *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. wratislaviensis* CH628 и *R. ruber* P25 имеют существенные различия в нуклеотидных и аминокислотных последовательностях. Впервые для BphA1_{KT112-7}, BphA1_{CH628} и BphA1_{P25} созданы модели третичной структуры белковой молекулы, подтвердившие принадлежность данных ферментов к различным подсемействам диоксигеназ и указавшим на уникальность строения BphA1_{P25}. Установлено, что штаммы *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. wratislaviensis* CH628 и *R. ruber* P25 эффективно разлагают ПХБ 12 и смесь монохлорбифенилов и моногидрокси-монохлорбифенилов (смесь Р), полученную при химической модификации ПХБ 12. Бифенил диоксигеназы всех трех штаммов осуществляют окисление незамещенного цикла в молекулах ПХБ 12 и компонентах смеси Р. Впервые показано, что штаммы рода *Rhodococcus* осуществляют биодеструкцию хлорированных и гидроксированных бифенилов в диапазоне температур 10–50°C. При этом у штамма *R. wratislaviensis* KT112-7 наиболее эффективно процесс деструкции ПХБ 12 протекал при 10–30°C, а смеси Р – при 30°C. Штамм *R. wratislaviensis* CH628 разлагал ПХБ 12 на 93–100% при 20–40°C, тогда как уровень деструкции смеси Р в том же температурном диапазоне составлял 63–100%. Отклонение температуры культивирования от 30°C приводит к снижению, но не потере активности штамма *R. ruber* P25 к исследуемым субстратам. Полученные данные позволили предположить, что штаммы *R. wratislaviensis* KT112-7, *R. wratislaviensis* CH628 и *R. ruber* P25 могут быть перспективными для использования в технологиях биоремедиации территорий, загрязненных ПХБ, с различными климатическими условиями.

В работе использовали оборудование молекулярно-генетической лаборатории кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского

университета, Центра коллективного пользования “Спектроскопия и анализ органических соединений” (ЦКП “САОС”), а также ЦКП “Исследования материалов и вещества” ПФИЦ УрО РАН.

Работы по химическому синтезу ПХБ 12 и его производных, а также исследования биодеструкции данных соединений штаммами рода *Rhodococcus* при различных температурах выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-29-05016мк).

Моделирование структуры α -субъединицы БДО выполнено в рамках НИОКР АААА-А19-119112290009-1 “Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коршунова Т.Ю., Четвериков С.П., Бакаева М.Д., Кузина Е.В., Рафикова Г.Ф., Четверикова Д.В., Логинов О.Н. // Прикл. биохимия микробиология. 2019. Т. 55. № 4. С. 338–349.
2. Занавескин Л.Н., Аверьянов В.А. // Успехи химии. 1998. Т. 67. № 8. С. 788–800.
3. Sinkkonen S., Paasivirta J. // Chemosphere. 2000. V. 40. P. 943–949.
4. Tehrani R., Van Aken B. // Environ. Sci. Poll. Res. 2014. V. 21. P. 6334–6345. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1742-6>
5. Furukawa K., Fuijehara H.J. // Biosci. Bioeng. 2008. V. 105. P. 433–449. <https://doi.org/10.1263/jbb.105.433>
6. Agulló L., Pieper D.H., Seeger M. // In: Rojo F. (eds) Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Cham, 2019. P. 595–622. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50418-6_30
7. Bajaj S., Singh D.K. // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2015. V. 100. P. 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.02.023>
8. Lambo A.J., Patel T.R. // Curr. Microbiol. 2006. V. 53. P. 48–52. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0194-8>
9. Master E.R., Mohn W.W. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 12. P. 4823–4829.
10. Michaud L., Di Marco G., Bruni V., Lo Giudice A. // Marine Pollut. Bull. 2007. V. 54. P. 1754–1761. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.07.011>
11. Mohn W.W., Westerberg K., Cullen W.R., Reimer K.J. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. № 9. P. 3378–3384.

12. Shimura M., Mukerjee-Dhar G., Kimbara K., Nagato H., Kiyohara H., Hatta T. // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 178. P. 89–93.
13. Plotnikova E.G., Rybkina D.O., Anan'ina L.N., Yastrebova O.V., Demakov V.A. // Russ. J. Ecol. 2006. V. 37. P. 233–240.
<https://doi.org/10.1134/S1067413606040035>
14. Plotnikova E.G., Egorova D.O., Shumkova E.S., Solyanikova I.P., Golovleva L.A. // Microbiology (Mikrobiologiya). 2012. V. 81. P. 143–153.
<https://doi.org/10.1134/S0026261712020117>
15. Egorova D.O., Buzmakov S.A., Nazarova E.A., Andreev D.N., Demakov V.A., Plotnikova E.G. // Water Air Soil Pollut. 2017. V. 228. P. 183–199.
<https://doi.org/10.1007/s11270-017-3344-2>
16. Egorova D.O., Farafonova V.V., Shestakova E.A., Andreev D.N., Maksimov A.S., Vasyanin A.N., Buzmakov C.A., Plotnikova E.G. // Eurasian. Soil. Sci. 2017. V. 50. P. 1217–1224.
<https://doi.org/10.1134/S1064229317100015>
17. Egorova D.O., Korsakova E.S., Demakov V.A., Plotnikova E.G. // Appl. Biochem. Microbiol. 2013. V. 49. P. 244–255.
<https://doi.org/10.1134/S0003683813030071>
18. Egorova D.O., Pervova M.G., Demakov V.A., Plotnikova E.G. // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. P. 252–261.
<https://doi.org/10.1134/S000368381803002X>
19. Зайцев Г.М., Карасевич Ю.Н. // Микробиология. 1981. Т. 50. № 2. С. 423–428.
20. Шумкова Е.С., Егорова Д.О., Боронникова С.В., Плотникова Е.Г. // Молекулярная биология. 2015. Т. 49. № 4. С. 638–648.
21. Mullin M.D., Pochini C.M., McGrindle M.R., Romkes M., Safe S.H., Safe L.M. // Environ. Sci. Technol. 1984. V. 18. P. 468–476.
22. Горбунова Т.И., Первова М.Г., Салоутин В.И., Чупахин О.Н. // Журнал органической химии. 2019. Т. 55. № 7. С. 1089–1092.
<https://doi.org/10.1134/S0514749219070127>
23. Maltseva O.V., Tsoi T.V., Quensen III J.F., Fukuda M., Tiedje J.M. // Biodegradation. 1999. V. 10. P. 363–371.
24. Furusawa Y., Nagarajan V., Tanokura M., Masai E., Fukuda M., Senda T. // J. Mol. Biol. 2004. V. 342. P. 1041–1052.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.062>
25. Gakhar L., Malik Z.A., Allen Ch.C.R., Liqscumb D.A., Larkin M.J., Ramaswamy S. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 21. P. 7222–7231.
<https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7222-7231.2005>
26. Friemann R., Lee K., Brown E.N., Gibson D.T., Eklund H., Ramaswamy S. // Acta Crystallographica sect D. 2009. V. 65. P. 24–33.
<https://doi.org/10.1107/s0907444908036524>
27. Fortin P.D., Lo A. T.-F., Haro M.-A., Kaschabek S., Reineke W., Eltis L.D. // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 2. P. 415–421.
28. Passatore L., Rossetti S., Juwarkar A.A., Massacci A. // J. Hazard. Mater. 2014. V. 278. P. 189–202.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.051>
29. Bhalla R., Tehrani R., Van Aken B. // Microtox. Eco-toxicol. 2016. V. 25. P. 1438–1444.
<https://doi.org/10.1007/s10646-016-1693-z>
30. Mizukami-Murata S., Sakakibara F., Fujita K., Fukuda M., Kuramata M., Takagi K. // Chemosphere. 2016. V. 165. P. 173–182.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.127>

Modeling of the Biphenyl Dioxygenase α -Subunit Structure of *Rhodococcus* Strains and Features of the Destruction of Chlorinated and Hydroxylated Biphenyles at Different Temperatures

D. O. Egorova^{a,*}, T. I. Gorbunova^b, T. D. Kir'yanova^a, M. G. Pervova^b, and E. G. Plotnikova^a

^aInstitute of ecology and genetics of microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia

^bPostovskii Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620108 Russia

*e-mail: daryao@rambler.ru

Based on the modeling of the protein structure of the α -subunit of biphenyl 2,3-dioxygenase (BphA1) (EC 1.14.12.18), the key enzyme for the destruction of biphenyl and polychlorinated biphenyls (PCBs), it was found that BphA1 *Rhodococcus wratislaviensis* KT112-7 (= VKM Ac-2623D) had the highest level of similarity with classical biphenyl dioxygenases (BDOs) of the PCBs-degrader strains of the genus *Rhodococcus*, the structure BphA1 *Rhodococcus wratislaviensis* CH628 – with naphthalene dioxygenase of strains of the genus *Rhodococcus*, and the structure of BphA1 *Rhodococcus ruber* P25 (= IEGM 896) was unique, since no protein molecules with a high level of similarity were identified. It was shown that all the studied strains, despite the differences in the structure of BphA1, carried out dioxygenation of the unsubstituted ring in the molecules of 3,4-dichlorobiphenyl (PCB 12) and monochlorinated and monohydroxy-monochlorinated biphenyls (mixture P). The level of destruction of PCB 12 and mixture P was 95.4–100% at 30°C for 10 days at an initial concentration of 0.1 g/L. It was found that a change in temperature (10–50°C) had the greatest effect on the biodegradative activity of the *R. ruber* P25 strain (a decrease in 3.1–3.9 times). Strains *R. wratislaviensis* CH628 and *R. wratislaviensis* KT112-7 efficiently degraded PCB 12 at temperatures of 20–40°C and 10–30°C, respectively (destruction level 93.2–100%).

Keywords: *Rhodococcus*, biphenyl dioxygenase, 3,4-dichlorobiphenyl, hydroxybiphenyl, temperature, destruction

УДК 579.695;658.567.1

АКТИВНОСТЬ МЕТАНОГЕННЫХ АРХЕЙ ПРИ КОМПСТИРОВАНИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ

© 2021 г. В. В. Миронов¹*, В. В. Потокина¹, Е. А. Бочкова¹,
А. В. Вантеева¹, Н. А. Загустина², С. Н. Паршина¹

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

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

*e-mail: 7390530@gmail.com

Поступила в редакцию 02.06.2021 г.

После доработки 30.06.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

Выделены активные мезофильные и термофильные метаногенные консорциумы из компостируемой при экстремально высокой температуре (75–82°C) смеси избыточного ила биологических очистных сооружений сточных вод молочного производства, овощных и древесных отходов в соотношении 3 : 3 : 4 (об./об.) с высоким содержанием сухого вещества ($27.5 \pm 1.3\%$). Ускоренный метаногенез и наибольший выход метана (31.7 ± 2.9 ммоль л⁻¹) наблюдались при температуре культивирования 55°C. Исследование состава полученных консорциумов методом секвенирования гена 16S рРНК показало наличие метаногенных архей *Methanosarcina thermophila*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Candidatus ‘Methanogranum caenicola’*, *Methanofollis ethanolicus*, а также *Candidatus ‘Methanoplasma termitum’* и *Methanomassiliicoccus luminyensis*. Четыре последние были впервые обнаружены в компостируемых органических отходах. Полученные метаногенные консорциумы были способны осуществлять активный метаногенез и могут быть использованы в биотехнологии метанового сбраживания.

Ключевые слова: органические отходы, компостирование, анаэробная обработка, метаногенные археи

DOI: 10.31857/S0555109921060106

В связи с постоянным увеличением количества бытовых отходов, требующих переработки и утилизации, создающих серьезные экологические проблемы, все большее внимание привлекают исследования по применению методов их биодegradации, направленных на интенсификацию процесса разложения, повышение безопасности процесса для окружающей среды, а также на получение удобрений [1]. Несмотря на это, по-прежнему преобладает захоронение отходов на полигонах. По различным оценкам, коэффициент извлечения свалочного газа (смесь преимущественно метана, углекислого газа и азота), образующегося на традиционных полигонах, составляет менее 20% [2]. Альтернативным и реализуемым решением для сокращения количества захораниваемых биоразлагаемых отходов является механико-биологическая обработка [3], которая уменьшает реакционную способность, а также массу отходов перед дальнейшей утилизацией.

Компостирование является одним из лучших способов биологической переработки органических отходов с точки зрения минимального воз-

действия конечного продукта — компоста, на окружающую среду [4]. Такая технология полностью отвечает принятому на сегодняшний день в национальных и зарубежных разработках курсу на устойчивое развитие [4, 5]. В настоящее время наибольший интерес представляют исследования по переработке твердых коммунальных отходов (ТКО) методами ускорения и оптимизации процесса компостирования. В связи с этим одним из наиболее перспективных способов является применение аэробно-анаэробной технологии твердофазной биодegradации органических отходов, позволяющей производить не только компост, но и биогаз.

Компостирование является экзотермическим процессом микробного окисления, в котором органический субстрат подвергается биодegradации популяцией микроорганизмов в условиях оптимальной влажности и наличия кислорода. На разных стадиях процесса компостирования (мезофильной, термофильной, остывания и созревания) участвует множество микроорганизмов. Идентифицировано более 2000 известных видов бактерий,

не менее 100 видов грибов, а также археи [1]. В процессе компостирования аэробные микроорганизмы преобразуют биоразлагаемые органические вещества в CO_2 , NH_3 , H_2O и стабильное органическое вещество — компост.

Метан является вторым по значимости парниковым газом после углекислоты, при этом до 70% метана в атмосфере образуется за счёт жизнедеятельности микроорганизмов: аэробных и анаэробных бактерий, метаногенных архей, в том числе при деградации различных отходов [6]. Метаногенез осуществляется археями, представителями филума *Euryarchaeota*, среди которых метаногены, использующие водород, представляют самую большую группу. К ацетокластическим метаногенам, использующим в качестве субстрата ацетат, относятся представители двух родов порядка *Methanosarcinales*: *Methanothrix* (сем. *Methanosaetaceae*) и *Methanosarcina* (сем. *Methanosarcinaceae*). Представители рода *Methanothrix* являются строго ацетокластическими, а представители рода *Methanosarcina* способны использовать в качестве субстратов для образования метана не только ацетат и H_2/CO_2 , но и метанол, а также и другие метилированные соединения. Метилированные соединения используют также метилредуцирующие метаногены, не способные диспропорционировать эти субстраты и облигатно зависящие от H_2 и/или формиата, являющихся донорами электронов для восстановления метильных групп до метана. К ним относятся представители порядков *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomassiliicoccales* [7].

Несмотря на то, что при компостировании твердых отходов вначале субстрат полностью аэрируется кислородом воздуха, в его частицах всё же присутствуют анаэробные зоны, которые формируются из-за дефицита кислорода при интенсивном разложении органических веществ [8], в которых активны облигатно анаэробные метаногенные археи. Наружные слои компостных частиц заселяют аэробные метанотрофные бактерии. Деятельность метанотрофных микроорганизмов может способствовать снижению выбросов метана, а создание при компостировании условий, благоприятных для данной группы, по мнению некоторых авторов, может стать одной из стратегий борьбы с образованием метана [9]. Концентрация образованного метана также снижается при перемешивании компоста, так как при этом разрушаются анаэробные зоны и увеличивается содержание кислорода.

При этом показано, что активность метаногенов при компостировании всё же может оставаться более высокой, чем метанотрофов [10]. Следует отметить, что метаногенные археи более чувствительны, по сравнению с бактериями, к различным ингибиторам, таким как летучие жирные кислоты

(ЛЖК) или аммиак. При этом разные виды метаногенов имеют различную степень устойчивости к ингибиторам [11].

Состав метаногенного сообщества компоста разнообразен и меняется на разных стадиях процесса компостирования в зависимости от температуры [9, 12]. В микробном сообществе компоста может иметь место дифференциация метаногенов по экологическим нишам, как это наблюдается в природных сообществах [9]. Было показано, что в микробном сообществе, осуществляющем анаэробную обработку ТКО, в нестрессовых условиях доминируют *Methanosaeta* — ацетокластические метаногены с более высоким сродством к субстрату. При возникновении неблагоприятных условий преимущество получают археи с миксотрофным типом метаболизма (*Methanosarcina*), которые более устойчивы к действию ингибиторов [11]. Кроме того, предполагается, что при разложении твердых отходов гидрогенотрофные метаногены обладают более высокой стрессоустойчивостью, чем ацетокластические [13].

В работе [14] обнаружены метаногенные археи в навозном компосте не только в термофильной фазе (50–60°C), но и в мезофильной и в стадии созревания (28–35°C). Представители порядка *Methanosarcinales* являются одними из наиболее часто обнаруживаемых метаногенов при компостировании [14]. Возможно, что в хорошо аэрируемых компостных субстратах даже при экстремально высоких температурах (75–82°C), сохраняющихся в течение продолжительного времени (от нескольких суток до нескольких недель), создаются анаэробные микрозоны, в которых сохраняют свою жизнедеятельность метаногенные археи, причём не только термофильные, но и мезофильные, и происходит образование метана.

Цель работы — оценка активности метаногенных архей при компостировании органических отходов с высоким содержанием сухого вещества и получение активных метаногенных консорциумов (накопительных культур) при средних и умеренно высоких температурах культивирования на различных субстратах.

МЕТОДИКА

За основу для формирования консорциумов была использована методика получения накопительных культур окисляющего ЛЖК психротолерантного микробного сообщества анаэробного биореактора [15]. Для получения накопительных культур метаногенных архей из компостируемых органических отходов применили предварительное твердофазное сбраживание. Эксперимент состоял из трех этапов: (1) твердофазное сбраживание исследуемого субстрата для компостирования, (2) жидкофазное сбраживание с добавлением пита-

тельной среды и метаногенных субстратов для роста различных метаногенных архей, (3) получения накопительных культур метаногенных архей и их исследование.

Твердофазное сбраживание. Субстрат для сбраживания отбирали из установки для промышленного компостирования “Климатическая камера” (“Грунт Эко”, Московская область, Россия). Субстрат имел следующий состав: смесь избыточного ила биологических очистных сооружений сточных вод молочного производства, овощных и древесных отходов в соотношении 3 : 3 : 4 (по объему). Содержание сухого вещества в субстрате $27.5 \pm 1.3\%$ (по массе). Пробы субстрата были отобраны из бурта объемом 950 м^3 с мембранным светонепроницаемым покрытием и активной аэрацией. До момента отбора пробы субстрат саморазогревался, в течение не менее 7 сут наблюдалась температура $75\text{--}82^\circ\text{C}$. На момент отбора пробы срок компостирования составил 12 сут. Температура субстрата при отборе проб на глубине 200 мм от поверхности бурта была 76.5°C .

Время отбора проб было выбрано исходя из предварительных наблюдений за протеканием активной фазы компостирования. Низкая концентрация кислорода, высокая температура и интенсивное образование летучих дурнопахнущих органических соединений свидетельствовали о возможности одновременного протекания аэробных и анаэробных процессов внутри частиц компостируемого материала. Свободное пространство между буртом и мембранным покрытием было постоянно заполнено газом, выделяющимся при компостировании субстрата. Перед отбором субстрата газоанализатором МАГ-6 П-Т (“Эксис”, Россия) было измерено содержание метана в газе (2.2 ± 0.1 об. %), а также диоксида углерода (10.4 ± 0.1 об. %) и аммиака ($1.0 \pm 0.4 \text{ мг м}^{-3}$).

В лабораторных условиях отобранный субстрат $\sim 100 \text{ г}$ быстро переносили в сывороточные бутылки объемом 500 мл под током азота, герметично закрывали резиновыми пробками, сверху алюминиевыми колпачками и обжимали их на приборе ПОК-1. Флаконы выдерживали в термостате при температуре 28 и 55°C .

Жидкофазное сбраживание. После достижения в пробах концентрации метана более 20.0 об. % (измеренного на хроматографе) проводили следующий этап эксперимента, добавляя во флаконы со сбраживаемой компостной смесью питательные среды и субстраты для роста метаногенных архей по методу [15].

Эксперименты по жидкофазному сбраживанию проводили на модифицированной среде Пфеннига [16] следующего состава (мг/л): NH_4Cl — 330, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 250, CaCl_2 — 168, KCl — 330, KH_2PO_4 — 330. В среду добавляли также 500 мг л^{-1} дрожже-

вого экстракта, $2500 \text{ мг л}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, микроэлементы по Липперту [17] и витамины по Волину [18]. В качестве редуцирующего агента использовали сульфид натрия (0.5 г л^{-1}) и цистеин (0.5 г л^{-1}), рН 6.8–7.0. В качестве метаногенных субстратов использовали стерильные 1.0 М растворы ацетата, метанола или триметиламина (ТМА). Субстраты вносили непосредственно перед засевом по 4 мл на 200 мл среды во флаконы. После добавления среды и субстратов пробы снова ставили на 28 и 55°C соответственно.

Получение накопительных культур. Накопительные культуры получали методом серийных разведений. После накопления метана в газовой фазе бутылей более 25 об. % из флаконов жидкофазного сбраживания отбирали по 2 мл культуры и переносили во флаконы емкостью 120 мл с 18 мл среды того же состава, в которую добавляли по 0.4 мл 1.0 М растворов ацетата, метанола или ТМА (20 ммоль л^{-1}) и последовательно пересевали во флаконы с соответствующим субстратом до 5–7 разведения, перенося каждый раз по 2 мл (10%) культуральной жидкости.

Для культивирования на H_2/CO_2 при приготовлении среды флаконы продували смесью газов H_2/CO_2 (80 : 20).

При достижении концентрации метана в газовой фазе флаконов более 10% проводили второй пересев на те же субстраты и при тех же условиях культивирования (28 и 55°C), но для подавления роста бактерий добавляли раствор антибиотика ванкомицина (100 мг/л^{-1}) в 5–7 разведения.

Анализ концентрации метана. Метан в газовой фазе флаконов определяли методом газоадсорбционной хроматографии на хроматографе Хроматэк-Кристалл 5000.2 (“Хроматэк”, Россия) с 3 м колонкой, заполненной фазой Carbosieve G (“Sigma-Aldrich”, США). Температура колонки, испарителя и детектора — 140, 100 и 150°C соответственно. Расход водорода и воздуха — 15 и 250 мл мин^{-1} соответственно. Расход газа-носителя (аргона) — 15 мл мин^{-1} .

Анализ содержания ЛЖК (ацетат, пропионат, бутират, валерат) и спиртов (этанол). ЛЖК в культуральной жидкости при жидкофазном сбраживании определяли методом газожидкостной хроматографии на хроматографе Хроматэк-Кристалл 5000.2 с пламенно-ионизационным детектором, оснащенным автосамплером ДАЖ-2М (“Хроматэк”, Россия), с колонкой Zebron ZB-WAXplus (“Phenomenex”, США). Длина колонки 30 м, внутренний диаметр 0.25 мм. Температура колонки, испарителя и детектора — 110, 180 и 200°C соответственно. Расходы водорода и воздуха составляли 40 и 400 мл мин^{-1} соответственно. Расход газа-носителя (азота) — 40 мл мин^{-1} .

Микроскопическое исследование накопительных культур. Микроскопические исследования проводили на флуоресцентном микроскопе Axio Lab.A1 FL-LED (“Carl Zeiss”, Германия) с использованием фазово-контрастного объектива при увеличении в 100 раз.

Молекулярно-генетические исследования. Выделение ДНК из биомассы полученных метаногенных консорциумов проводили согласно ранее описанному методу [19]. Для проведения полимеразной цепной реакции фрагментов генов 16S рРНК архей использовалась система праймеров 8fa-a1492r [20]. Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов проводили по методу [21] с помощью набора реактивов BigDyeTerminatorv.3.1 (“Applied Biosystems”, США) на анализаторе ABI-PRIZM 3730 (“Applied Biosystems”, США) согласно инструкциям производителя. Для секвенирования были использованы следующие праймеры архей:

8fa (5'-TCCGGTTGATCCTGCCGG-3'),
A517R (5'-GGTRTTACCGCGGCGGCTGAC-3'),
A680F (5'-CSRGGGTAGGGGYGAAATCC-3'),
A1041F (5'-GAGAGGWGGTGCATGGCC-3'),
Arch915R (5'-GTGCTCCCCGCCAATTCCT-3'),
530F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3'),
1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3').

Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей изучаемых штаммов проводили с помощью программного пакета BLAST [22] и RDP Classifier [23].

Состав сформированного сообщества также анализировали по количеству копий последовательности гена 16S рРНК. Выделение ДНК из образцов осуществлялось с использованием коммерческого набора для выделения ДНК FastDNA SpinKit (“MPBio”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Библиотеки V4 участка гена 16S рРНК для высокопроизводительного секвенирования на системе Illumina MiSeq были приготовлены по схеме, описанной в статье [24]. Для получения ампликонов использовалась следующая система праймеров: прямой праймер (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTXXXXXXZZZZGTGBCAGCMGCCGCGGTAA-3'), состоящий, соответственно, из “5' Illumina Linker Sequence”, “Index 1”, “Heterogeneity Spacer” [25] и 515F праймерной последовательности [26]; обратный праймер (5'-AATGATACGCGACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTXXXXXXZZZZGACTACNVGGGTMCTAATCC-3'), состоящий из “3' Illumina Linker Sequence”, “Index 2”, “Heterogeneity Spacer” и Pro-mod-805R праймерной последовательности [27], соответственно. Для каждого образца ДНК было приготовлено две библиотеки, которые секвенировались параллельно с использованием

набора реагентов MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300-cycles) MS-103-1002 (“Illumina”, США) на секвенаторе MiSeq (“Illumina”, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Статистическая обработка результатов. Эксперименты по твердофазному и жидкофазному сбраживанию проводили в двукратной повторности. Результаты параллельных экспериментов по динамике образования метана и ЛЖК при жидкофазном сбраживании были статистически обработаны. Для определения статистической значимости различий параллельных экспериментов использовали *t*-критерий Стьюдента. Доверительный интервал был выбран с надежностью 90% ($p = 0.1$) [28].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Твердофазное сбраживание. При твердофазном сбраживании компостной смеси в сывороточных бутылках концентрация метана достигала в термофильных пробах 24.1–36.8 (об. %) на 11 сут эксперимента, в мезофильных пробах — 21.5–26.3 об. % на 14 сут. Это указывало на присутствие в компостной смеси активных метаногенных архей. Так как образование метана было зафиксировано при двух температурах культивирования, можно сделать вывод, что в компостной смеси присутствовали как термофильные, так и мезофильные метаногены, причем последние были способны сохранять свою активность и после термофильной стадии компостирования, что также было показано ранее [14].

Жидкофазное сбраживание. При проведении этапа жидкофазного сбраживания при 28°C концентрация метана постепенно возрастала на протяжении всего времени эксперимента в пробах со всеми типами метаногенных субстратов (рис. 1а), достигая максимума к концу культивирования на 25–32 сут. Контролем служили флаконы, куда метаногенные субстраты не добавляли. Из всех исследованных субстратов (добавленных по 20 ммоль л⁻¹), максимальная концентрация метана в мезофильных условиях была на ТМА — 31.5 ± 3.9 ммоль л⁻¹, что на 51% выше по сравнению с контролем (20.9 ± 1.9 ммоль л⁻¹). На метаноле максимальная концентрация метана составила 26.7 ± 4.8 ммоль л⁻¹ (на 28% выше контроля), на ацетате — 29.8 ± 3.8 ммоль л⁻¹ (на 43% выше контроля). В работе [29] при обработке смеси пищевых отходов и избыточного активного ила (50 : 50) концентрация метана после 5–7-суточной лаг-фазы постепенно возрастала на протяжении 30 сут эксперимента, при этом стационарная фаза наблюдалась с 20 сут эксперимента. В настоящей работе в мезофильном режиме лаг-фазы не наблюдали ни на одном метаногенном субстрате: концентрации метана возрастали монотонно. Самая высокая скорость роста во время экспоненциаль-

ной фазы была на ТМА ($4.7 \text{ ммоль л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$), в контроле она составляла $1.5 \text{ ммоль л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$, на метаноле 2.6 и ацетате $3.0 \text{ ммоль л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ (рис. 1а).

При жидкофазном сбраживании при 55°C на ацетате и ТМА наблюдали короткую лаг-фазу в первые сутки, а затем экспоненциальную фазу роста на протяжении следующих 3 сут, когда скорость образования метана составляла $6.8 \text{ ммоль л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ на ацетате и $6.4 \text{ ммоль л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ на ТМА. Скорость образования метана в контроле и на метаноле составила 2.6 и $2.4 \text{ ммоль л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ соответственно (рис. 1б).

В контрольном варианте и опыте с метанолом рост концентрации метана был постепенным, а лаг-фаза отсутствовала так же, как при температуре 28°C . Максимальная концентрация метана в контрольном эксперименте — $17.2 \pm 2.9 \text{ ммоль л}^{-1}$, при внесении метанола — $22.6 \pm 2.6 \text{ ммоль л}^{-1}$ (на 31% выше контроля), ТМА — $29.6 \pm 2.7 \text{ ммоль л}^{-1}$ (на 72% выше контроля) и ацетата — $31.7 \pm 2.9 \text{ ммоль л}^{-1}$ (на 84% выше контроля).

Таким образом, в термофильных условиях образование метана достигало максимума за более короткие сроки, чем в мезофильных. По результатам работ [30, 31] повышенная температура способствовала увеличению скорости гидролиза органических веществ и, соответственно, более быстрому образованию метана и его более высокому выходу.

Самые высокие концентрации метана были зафиксированы как при 28, так и при 55°C в экспериментах, в которых в качестве субстратов для роста метаногенных архей были добавлены ацетат и ТМА (рис. 1а и 1б). Можно предположить, что в исследуемой компостной смеси активны как мезофильные, так и термофильные метаногены семейства *Methanosarcinaceae* [32].

Некоторые метаногены способны использовать в качестве субстратов для образования метана не только ацетат и метилированные соединения, но и смесь газов H_2/CO_2 , поэтому из флаконов с ацетатом в качестве субстрата были сделаны пересевы также на H_2/CO_2 (см. ниже).

Динамика образования ЛЖК при жидкофазном сбраживании. Известно, что ЛЖК являются важнейшими промежуточными продуктами при сбраживании органических веществ. Их низкая концентрация считается показателем стабильности процесса сбраживания, а избыточное накопление с последующим снижением pH является одной из наиболее частых причин дестабилизации анаэробных реакторов. В работе [33] было показано, что при концентрациях ацетата, пропионата и бутирата, равных 4125 (70), 2856 (40) и 3456 (40) мг л^{-1} (ммоль л^{-1}) соответственно, наблюдалась полная дестабилизация процесса сбраживания. По данным [34] добавление 13000 (220.2),

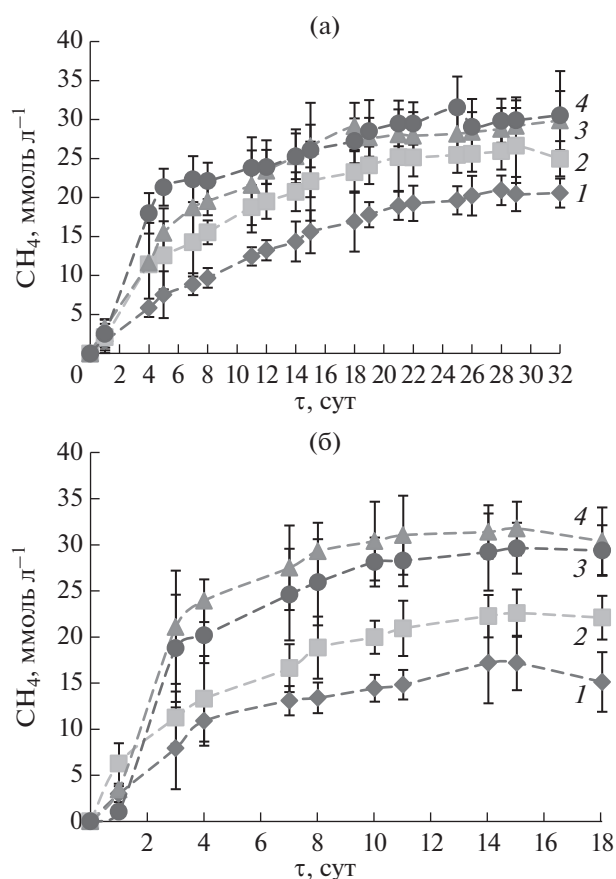


Рис. 1. Динамика образования метана в пробах при температуре 28°C (а), 55°C (б): 1 — контроль; 2 — метанол; 3 — ацетат; 4 — ТМА. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ общая погрешность по результатам двух повторностей.

15000 (172.2) и 3500 (47.9) мг л^{-1} (ммоль л^{-1}) ацетата, бутирата и пропионата соответственно приводило к двукратному снижению выхода метана. В работе [35] наблюдалось снижение роста метаногенных архей при внесении 951 мг л^{-1} (13 ммоль л^{-1}) пропионата.

В настоящей работе наблюдали незначительное образование ЛЖК и спиртов при жидкофазном сбраживании. При температуре 28°C концентрация этанола достигала $0.7\text{--}8.5$, ацетата $4.0\text{--}9.5$ и пропионата $4.9\text{--}7.5 \text{ ммоль л}^{-1}$, при 55°C — этанола $1.8\text{--}4.9$, ацетата $1.9\text{--}5.6$, пропионата $0.5\text{--}1.6 \text{ ммоль л}^{-1}$. Очевидно, столь низкие концентрации не оказывали ингибирующего действия на процесс метаногенеза.

Результаты работы [30] показали, что при совместном сбраживании ТКО с активным илом муниципальных очистных сооружений, в первую очередь, в мезофильных условиях наблюдали образование уксусной кислоты, а в термофильных условиях основной ЛЖК была масляная кислота. В настоящей работе образование бутирата не бы-

Таблица 1. Результаты секвенирования гена 16S рРНК в накопительных культурах метаногенных архей

Субстрат	Температура культивирования, °С	Наиболее близкий вид	Степень сходства, %
ТМА (+ванкомицин)	28	<i>Candidatus 'Methanoplasma termitum'</i>	96
		<i>Candidatus 'Methanogranum caenicola'</i>	100
H ₂ /CO ₂ (+ванкомицин)	28	<i>Methanofollis ethanolicus</i>	98.8
ТМА (+ванкомицин)	55	<i>Methanosarcina thermophila</i>	100
Ацетат	55	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	96
H ₂ /CO ₂ (+ванкомицин)	55	<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	99

ло обнаружено что, по-видимому, связано с различиями сбраживаемых субстратов.

К концу эксперимента концентрации ЛЖК на всех субстратах при двух температурах культивирования достигали следовых значений, что свидетельствовало не только об активном метаногенезе, но и о протекании процессов синтрофного метаболизма, при котором промежуточные продукты разложились до более простых субстратов вследствие их потребления синтрофными бактериями совместно с метаногенами [32].

Известно также, что соотношение С/Н является одним из важных факторов, который влияет на выход и характер распределения ЛЖК в процессе сбраживания исследуемого субстрата. Ацетат, пропионат и бутират образуются из углеводов, а валерат и капронат — при дезаминировании аминокислот, образующихся во время разложения белков [36]. Анализ ЛЖК и спиртов при жидкофазном сбраживании показал, что в основном образовывались только этанол, ацетат и пропионат. По-видимому, исследуемая компостная смесь, содержала большее количество углеводов, чем белков в соотношении С/Н.

Получение и исследование накопительных культур метаногенных архей. В результате первого пересева сброженной культуры при жидкофазном сбраживании на всех субстратах к 28 суткам культивирования концентрация метана во флаконах достигала 10–33 об. % при температуре 28°C и 18–33 об. % при 55°C. Как было описано выше, также был сделан второй пересев накопительных культур с добавлением ванкомицина. Для идентификации архейного состава накопительных культур были проведены молекулярно-генетические исследования, для чего были отобраны пробы из последних разведений второго пересева, в которых наблюдался активный рост, наибольшая концентрация метана и наименьшее морфологическое разнообразие. Результаты секвенирования гена 16S рРНК приведены в табл. 1.

Максимальная концентрация метана в газовой фазе флаконов при 28°C, в которые был внесен ТМА, была достигнута через 49 сут культивирования

в седьмом разведении — 29.7 об. %. В этой накопительной культуре в результате секвенирования гена 16S рРНК были обнаружены представители двух видов архей. Первый филотип принадлежал виду *Candidatus 'Methanogranum caenicola'*, второй филотип имел 96% сходства с *Candidatus 'Methanoplasma termitum'* и, по-видимому, относится к новому виду этого рода-кандидата.

Ca. 'Methanogranum caenicola' был выделен ранее из осадка анаэробного метаногенного реактора [37], перерабатывающего ТКО при температуре 55°C, что еще раз подтвердило способность мезофильных метаногенов выживать при высоких температурах. Обнаружение этой культуры в сообществе находит логическое объяснение, так как исследуемая компостная смесь содержала избыточный ил биологических очистных сооружений сточных вод, прошедших как аэробную, так и анаэробную обработку. Тем не менее, *Ca. 'Methanogranum caenicola'* был впервые обнаружен в компостируемых органических отходах.

При микроскопировании проб из этой накопительной культуры были найдены крупные кокцидные клетки, которые могли принадлежать как одному, так и другому виду, так как для обоих характерна подобная морфология (рис. 2а). *Ca. 'Methanoplasma termitum'* является компонентом кишечной микробиоты термитов, но он был обнаружен также и в образцах почв и осадков приливно-отливной зоны [38]. Известно, что этот вид образует метан в присутствии водорода путем восстановления метанола или монометиламина, но не использует ди- и триметиламин [39]. Образование метана *Ca. 'Methanogranum caenicola'* также зависит от присутствия водорода и метанола [37]. Возможно, что обнаруженные микроорганизмы обладают более гибким метаболизмом, чем считалось ранее, и способны использовать для роста и другие метилированные соединения.

В газовой фазе пробы с субстратом H₂/CO₂ при 28°C максимальная концентрация метана составляла 18.3 об. % на 85 сут культивирования. Результаты секвенирования показали, что в этой пробе присутствует археон *Methanofollis ethanolicus* (99%

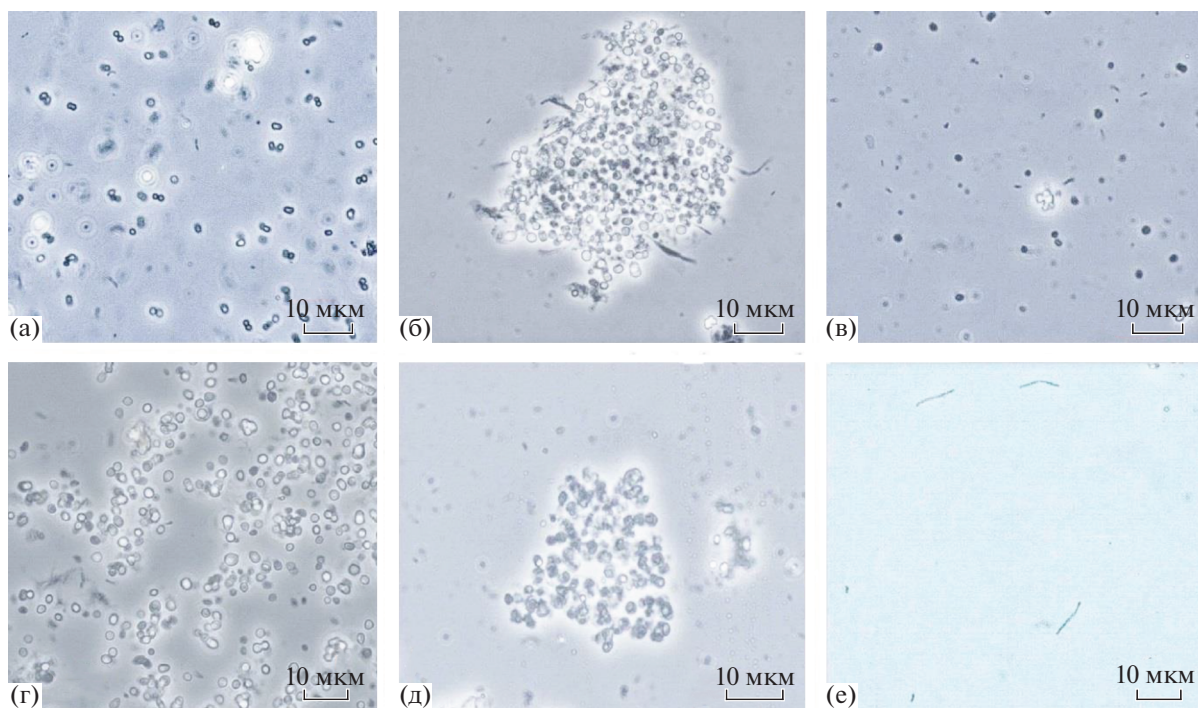


Рис. 2. Морфология клеток накопительных культур, полученных на разных субстратах и при разных температурах: а – ТМА + ванкомицин, 28°C; б, в – H_2/CO_2 + ванкомицин, 28°C; г – ТМА + ванкомицин, 55°C; д – ацетат, 55°C; е – H_2/CO_2 + ванкомицин, 55°C. Масштаб 10 мкм.

сходства). Этот вид метаногенных архей изначально был выделен из ила лотосовых полей [40], но обнаружен также и в сообществах анаэробных биореакторов, где может быть одним из самых значимых продуцентов метана [41]. Этот метаноген использует в качестве субстрата для роста и образования метана этанол, пропанол, бутанол, формиат и H_2/CO_2 . Клетки *M. ethanolicus* имеют форму неправильных (нерегулярных) кокков и встречаются в культуре поодиночке, что соответствовало морфологии клеток, выделенных в настоящей работе (рис. 2б). Обнаруженные в том же образце агрегаты клеток (рис. 2б), вероятно, относятся к другому виду метаногенных архей, который не удалось детектировать в результате секвенирования.

При культивировании при 55°C максимальная концентрация метана была зафиксирована на ТМА на 71 день культивирования и составила 44.8 об. %. В этой пробе присутствовала морфологически однородная культура коккоидных клеток (рис. 2г) – представители вида *Methanosarcina thermophila*. При компостировании органических отходов представители порядка *Methanosarcinales* являются одними из наиболее часто обнаруживаемых метаногенов, активных в том числе на термофильной стадии процесса [12, 42]. Представители рода *Methanosarcina* успешно адаптируются к повышающейся температуре и обнаруживаются в

составе микробного сообщества в течение всего процесса компостирования [42]. Способность использовать разные субстраты для метаногенеза и более высокая устойчивость к ингибиторам, чем у других метаногенных архей, делают их ключевым компонентом метаногенного сообщества, участвующего в обработке органических отходов. Считается, что при анаэробной обработке субстрата с получением биогаза большая часть метана образуется именно благодаря представителям этого рода [11, 43].

Секвенирование накопительной культуры на ацетате при 55°C (максимальная концентрация метана была 30.5 об. %) позволило обнаружить флотип, который имел 96% сходство с *Methanomassiliococcus luminyensis*. Этот вид ассоциирован, главным образом, с кишечной микробиотой человека [44]. Известно, что этот метаноген является мезофильным, для образования метана использует смесь метанола и водорода в качестве субстрата и не растет на остальных типичных для других метаногенов субстратах. Учитывая отдаленную степень родства с ранее описанным видом, можно предположить, что обнаруженный метаноген может быть новым таксоном с иным типом метаболизма. При микроскопировании образца были обнаружены агрегаты коккоидных клеток (рис. 2д).

При культивировании на H_2/CO_2 при 55°C (максимальная концентрация метана 22.8 об. %)

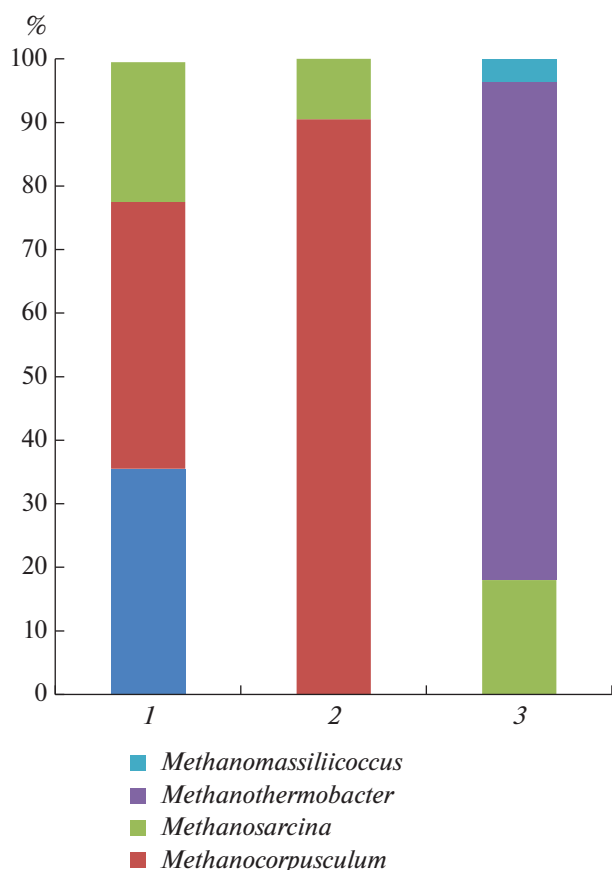


Рис. 3. Состав архейного сообщества консорциумов (относительное количество копий гена 16S рРНК, %) на уровне рода: 1 – метанол + ванкомицин, 28°C; 2 – ацетат + ванкомицин, 28°C; 3 – ацетат, 55°C.

при микроскопировании пробы были обнаружены кокки, реже палочки средней длины (рис. 2е). По данным секвенирования, в этой культуре присутствовал *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (табл. 1) (ранее *Methanothermobacter thermoformicium*) [45]. Представители этого вида были найдены в компостируемых органических отходах [12]. Известно, что *M. thermoautotrophicus* использует в качестве субстрата смесь водорода и углекислого газа, что соответствовало условиям культивирования в настоящей работе. Кроме того, ранее отмечалось, что представители этого вида более устойчи-

вы к повышенным концентрациям ЛЖК, по сравнению с другими метаногенами, а накопление ЛЖК в процессе обработки органических отходов стимулирует сукцессию метаногенного сообщества, в результате которой доминирующим видом метаногенов становится *M. thermoautotrophicus* [46]. Несмотря на то, что этот вид метаногенов ассоциируется прежде всего с условиями обитания при повышенных температурах, было показано, что температурный диапазон, в котором *M. thermoautotrophicus* сохраняет активность, достаточно широкий (40–75°C) [47].

Состав некоторых активных консорциумов был также проанализирован с помощью высокопроизводительного секвенирования прокариотического сообщества и были рассчитаны показатели биоразнообразия микроорганизмов для этих консорциумов. Результаты приведены на рис. 3 и в табл. 2.

Согласно числу ОТЕ, значениям индексов Чао1, Симпсона и Шеннона, анаэробное сообщество, полученное в условиях роста на ацетате при 55°C, характеризовалось видовым разнообразием, было представлено значительным числом микроорганизмов, так как ацетат является легкоусвояемым источником углерода и энергии для многих прокариот, в том числе не метаногенных бактерий. Метанол, по-видимому, являлся субстратом для более узкого круга микроорганизмов, поэтому консорциум, полученный на этом субстрате с добавлением ванкомицина при 28°C, имел самые низкие показатели разнообразия относительно других изученных сообществ. Из полученных результатов также очевидно, что ванкомицин оказывал негативное влияние на биоразнообразие сообществ накопительных культур, так как, по-видимому, подавлял рост многих грамположительных бактерий.

В пробе с метанолом с добавлением ванкомицина при температуре культивирования 28°C (максимальная концентрация метана 12.0 об. %) бактериальное сообщество, в основном, было представлено родами *Macellibacteroides* (68%) и *Aminobacterium* (24%). Метаногенные археи в этой пробе составили 0.4% от всего сообщества накопительной культуры и были представлены родами *Methanocorpusculum* (42% архейного сообще-

Таблица 2. Разнообразие метаногенных архей в консорциумах

Проба	Температура культивирования, °C	Число ОТЕ*	Индекс Чао1**	Индекс Симпсона***	Индекс Шеннона***
Метанол + ванкомицин	28	89	188	0.51	1.07
Ацетат + ванкомицин	28	197	370	0.31	2.03
Ацетат	55	431	945	0.20	2.81

*, ** ОТЕ и индекс Чао1 – показатели многообразия видового богатства. *** Индексы Шеннона и Симпсона характеризуют, как разнообразие видового состава, так и степень равномерности распределения микроорганизмов в сообществе.

ства), *Methanosarcina* (22%) и *Candidatus Methanogranum* (35%). Последний метаноген был также обнаружен в мезофильной пробе на ТМА (сходство 100% с *Candidatus 'Methanogranum caenicola'*), что подтвердило присутствие метаногенных архей этого рода в исследуемой компостной смеси.

На ацетате с добавлением ванкомицина при температуре культивирования 28°C (максимальная концентрация метана 35 об. %) бактериальное сообщество, в основном, представлено родами *Macellibacteroides* (53%), *Desulfovibrio* (15–16%), *Aminobacterium* (9%) и *Succinispira* (7–8%). Археи составили 2–3% от всего сообщества накопительной культуры и представлены двумя родами: *Methanocorpusculum* (90.5% архейного сообщества) и *Methanosarcina* (9.5%).

На данный момент род *Methanocorpusculum* включает в себя четыре вида метаногенных архей: *Methanocorpusculum parvum*, *Methanocorpusculum sinense*, *Methanocorpusculum havaricum* [48] и *Methanocorpusculum labreanurn* [49]. Основными субстратами для роста и образования метана этими археями являются H_2/CO_2 и формиат. В нашем исследовании представители этого рода были обнаружены на метаноле и ацетате. Возможно, эти субстраты не только потреблялись метаногенами, но и окислялись синтрофными бактериями с образованием водорода и углекислого газа, которые и были субстратом для метаногенов рода *Methanocorpusculum*.

Как было описано выше, в пробе при температуре культивирования 55°C, где субстратом был ацетат, был детектирован *Methanomassiliicoccus luminyensis* со сходством 96%. Эта проба была также дополнительно проанализирована с помощью высокопроизводительного секвенирования 16S рРНК прокариотического сообщества накопительной культуры. Бактериальное сообщество этой пробы, в основном, представлено родами *Coprothermobacter* (45%), *Acetomicrobium* (21%) и *Anaerolinea* (10–11%). Археи составили 5% от всего сообщества накопительной культуры, они представлены родами *Methanothermobacter* (на 78.5% архейного сообщества), *Methanosarcina* (18%) и *Methanomassiliicoccus* (3.5%). Известно также, что метаногенные археи рода *Methanothermobacter* используют в качестве субстрата H_2/CO_2 , что подтверждает наше предположение о протекании синтрофных процессов окисления ацетата. Как было сказано выше, присутствие в данной накопительной культуре рода метаногенных архей *Methanomassiliicoccus* подтвердили результаты секвенирования гена 16S рРНК, поэтому мы предполагаем, что обнаруженный в данном исследовании метаноген является новым таксоном с иным типом метаболизма. Применение высокопроизводительного секвенирования позволило уточнить и дополнить данные о составе ме-

таногенного сообщества в накопительных культурах.

Археям-метаногенам в исследованных образцах сопутствовали различные виды бактерий. Некоторые из них важны для роста и активности метаногенов, так как связаны с ними симбиотическими или синтрофными взаимосвязями. О присутствии представителей сульфатредуцирующих бактерий в сообществе компостируемых отходов различного происхождения сообщалось ранее. Активность этих микроорганизмов и детектированных нами *Aminobacteria* и *Anaerolinea* также связана с анаэробными микронеонами, подобными тем, что обнаружены в метаногенных гранулах из анаэробных биореакторов [50, 51]. Что касается рода *Coprothermobacter*, в значительных количествах присутствовавшего в одной из проб, то эти термофильные гидролитики связаны с метаногенами синтрофными взаимосвязями [52]. То же самое касается и *Acetomicrobium*, чья ацетогенная активность стимулирует рост ацетокластических метаногенов. Несомненный интерес представляет факт обнаружения в двух пробах значительных количеств гидролитических бактерий *Macellibacteroides*, которые нередко соседствуют с метаногенами в сообществах биореакторов [53].

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что мезофильные метаногены сохраняли свою жизнеспособность после длительного компостирования органических отходов с высоким содержанием сухого вещества (27.5%) при высоких температурах (75–82°C) и были способны образовывать метан при последующем сбраживании. В компостируемой смеси обнаружена высокая активность как термофильных, так и мезофильных метаногенных архей семейства *Methanosarcinaceae*. Термофильные консорциумы, в которых были обнаружены *Methanosarcina thermophila* и *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, были наиболее активны в образовании метана. В ходе работы были получены накопительные культуры метаногенных архей, содержащие *Methanosarcina thermophila*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Candidatus 'Methanogranum caenicola'*, *Methanofollis ethanolicus*. Также были получены накопительные культуры, в состав которых входили археи, филогенетически близкие к *Candidatus 'Methanoplasma termitum'* и *Methanomassiliicoccus luminyensis*, возможно, представляющие новые таксоны согласно результатам секвенирования. Из выше упомянутых культур четыре последние были впервые обнаружены в компостируемых органических отходах. Результаты высокопроизводительного секвенирования наиболее интересных проб позволили уточнить и дополнить данные о филогенетическом составе микробного сообщества. Полученные активные консорциумы (накопительные культуры) метаногенных архей будут исследованы в дальнейшем с целью их ис-

пользования в биотехнологии метанового сбраживания органических отходов, в том числе компостируемых, для интенсификации и увеличения выхода биогаза.

Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП “Биоинженерия” (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ мк-18-29-25035.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Миронов В., Бочкова Е., Ганнесен А., Вантеева А., Русскова Ю., Ножевникова А. // Микробиология. 2020. Т. 89. № 4. С. 474–487.
2. Xu Q., Jin X., Ma Z., Tao H., Ko Jae Hae. // Biores. Technol. 2014. V. 168. P. 92–96.
3. Di Maria F., Micale C., Sisani L., Rotondi L. // Waste Manag. 2016. V. 55. P. 49–60.
4. Sagdeeva O., Krusir G., Tsykalo A., Shpyrko T., Leuenberger H. // J. Food Science and Technology. 2018. V. 11. № 4. P. 43–49.
5. Onwosi C.O., Igbokwe V.C., Odimba J.N., Eke I.E., Nwankwoala M.O., Iroh I.N., Ezeogu L.I. // J. Environ. Manag. 2017. V. 190. P. 140–157.
6. Conrad R. // Pedosphere. 2020. V. 30. № 1. P. 25–39.
7. Ножевникова А., Миронов В., Бочкова Е., Лутти Ю., Русскова Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 3. С. 211–221.
8. Yang F., Li G., Shi H., Wang Y. // Waste Manag. 2015. V. 36. P. 70–76.
9. Chen R., Wang Y., Wei S., Wang W., Lin X. // FEMS Microbiol. Ecol. 2014. V. 90. № 3. P. 575–586.
10. Ge J., Huang G., Li J., Han L. // Waste Manag. 2018. V. 78. P. 135–143.
11. Capson-Tojo G., Trably E., Rouez M., Crest M., Bernet N., Steyer J.P., Delgenès J.P., Escudé R. // Waste Manag. 2018. V. 76. P. 423–430.
12. Thummes K., Kämpfer P., Jäckel U. // Systematic and Applied Microbiology. 2007. V. 30. № 5. P. 418–429.
13. Yang S., Li L., Peng X., Song L. // Biores. Technol. 2021. V. 320. Part A. P. 124359.
14. Safika S., Aditiawati P., Akhmaloka A. // J. Pure and Applied Microbiology. 2014. V. 8. № 4. P. 2837–2844.
15. Паршина С.Н., Ермакова А.В., Шатилова К.А. // Микробиология 2011. Т. 80. № 1. С. 53–62.
16. Pfennig N. // Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. Suppl. 1965. V. 1. P. 179–189.
17. Pfennig N., Lippert K.D. // Arch. Microbiol. 1966. V. 55. P. 245–246.
18. Wolin E.A., Wolin M.J., Wolfe R.S. // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. P. 2882–2886.
19. Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Марусина А.И., Краченко И.К., Быкова С.А., Колганова Т.В., Гальченко В.Ф. // Микробиология 2002. Т. 71. № 4. С. 500–508.
20. Колганова Т.В., Кузнецов Б.Б., Турова Т.П. // Микробиология 2002. Т. 71. № 2. С. 283–286.
21. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proceedings of the National academy of sciences. 1977. V. 74. № 12. P. 5463–5467.
22. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. // BMC Bioinformatics. 2009. V. 10. P. 421.
23. Chen M.L., Tsen H.Y. // J. Appl. Microbiol. 2002. V. 92. P. 912–919.
24. Gohl D., MacLean A., Hauge A., Becker A., Walek D., Beckman K. // Protocol Exchange 2016. <https://doi.org/10.1038/protex.2016.030>
25. Fadrosch D., Ma B., Gajer P., Sengamalai N., Ott S., Brotman R., Ravel J. // Microbiome. 2014. V. 2. № 1. P. 6.
26. Hugerth L.W., Wefer H.A., Lundin S., Jakobsson H.E., Lindberg M., Rodin S., Engstrand L., Andersson A.F. // Appl. Environ. Microbiol. 2017. V. 80. P. 5116–5123.
27. Меркель А., Тарновецкий И., Подосокорская О., Тоцаков С. // Микробиология 2019. Т. 88. № 6. С. 655–664.
28. Strode P., Brokaw A. Using biointeractive resources to teach Mathematics and Statistics in Biology. P Strode Brokaw. 2015. P. 39
29. Gu J., Liu R., Cheng Y., Stanisavljevic N., Li L., Djatkov D., Peng X., Wang X. // Biores. Technol. 2020. V. 301. Art. № 122765.
30. Arras W., Hussain A., Hausler R., Guiot S.R. // Waste Manag. 2019. V. 87. P. 279–287.
31. Basinas P., Rusín J., Chamrádová K. // Environ. Research. 2021. V. 192. Art. № 110202.
32. Ножевникова А., Русскова Ю., Лутти Ю., Паршина С., Журавлева Е., Никитина А. // Микробиология. 2020. Т. 89. № 2. С. 131–151.
33. Wang Y., Zhang Y., Wang J., Meng L. // Biomass and Bioenergy. 2009. V. 33. № 5. P. 848–853.
34. Dogan T., Ince O., Oz N.A., Ince B.K. // J. Environmental Science and Health. 2005. V. 40. № 3. P. 633–644.
35. Demirel B., Yenigün O. // Environmental Technology. 2002. V. 23. № 10. P. 1179–1187.
36. Rughoonundun H., Mohee R., Holtzapfel M.T. // Biores. Technol. 2012. V. 112. P. 91–97.
37. Iino T., Tamaki H., Tamazawa S., Ueno Y., Ohkuma M., Suzuki K., Igarashi Y., Haruta S. // Microbes Environ. 2013. V. 28. № 2. P. 244–250.
38. De La Cuesta-Zuluaga J., Spector T.D., Youngblut N.D., Ley R.E. // Msystems. 2021. V. 9. № 6(1). Art. № e00939-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00261-19>
39. Lang K., Schuldes J., Klingl A., Poehlein A., Daniel R., Brunea A. // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 1338–1352.
40. Imachi H., Sakai S., Nagai H., Yamaguchi T., Takai K. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 800–805.
41. Karabey B., Daglioglu S. T., Azbar N., Ozdemir G. // J. Environmental Science and Health. 2019. Part A. V. 54. № 13. P. 1348–1355.
42. Yamamoto N., Nakai Y. // Advances in Environmental Microbiology. 2019. V. 6. P. 151–172
43. Kurade M.B., Saha S., Salama E.S., Patil S.M., Govindwar S.P., Jeon B.H. // Biores. Technol. 2019. V. 272. P. 351–359.

44. Dridi B., Fardeau M.L., Ollivier B., Raoult D., Drancourt M. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 1902–1907.
45. Touzel J.-P., Macario E., Nöling J., De Vos W., Zhilina T., Lysenko A. // International J. Systematic Bacteriology. 1992. V. 42. P. 408–411.
46. Lin L., Yu Z., Li Y. // Biores. Technol. 2017. V. 241. P. 1027–1035.
47. Liu C., Mao L., Zheng X., Yuan J., Hu B., Cai Y., Xie H., Peng X., Ding X. // Microbiology Open. 2019. V. 8. № 5. P. Art. № e00715.
48. Zellner G., Stackebrandt E., Messner P., Tindall B., Macario E., Kneifel H., Sleytr U., Winter J. // Arch. Microbiol. 1989. V. 151. P. 381–390.
49. Zhao Y., Boone D., Mah R., Boone J., Xun L. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1989. V. 39. P. 10–13.
50. Zhao Y., Jiang B., Tang X., Liu S. // Science of the Total Environment. 2019. V. 687. P. 50–60.
51. Trego A. C., Galvin E., Sweeney C., Dunning S., Murphy C., Mills S., Nzeteu C., Quince C., Colleen S., Ijaz U., Collins G. // Front. Microbiol. 2020. V. 11. P. 1126.
52. Sasaki K., Morita M., Sasaki D., Nagaoka J., Matsumoto N., Ohmura N., Shinozaki H. // J. Biosci. Bioeng. 2011. V. 112. № 5. P. 469–472.
53. Xu Q., Liu X., Wang D., Liu Y., Wang Q., Ni B. J., Li H. // Biores. Technol. 2019. V. 284. P. 456–465.

Activity of Methanogenic Archaea during Composting of Organic Waste

V. V. Mironov^{a,*}, V. V. Potokina^a, E. A. Botchkova^a, A. V. Vanteeva^a,
N. A. Zagustina^b, and S. N. Parshina^b

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

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

*e-mail: 7390530@gmail.com

Composting at extremely high temperature (75–82°C) of mixture of excessive sludge of biological wastewater treatment facilities of dairy production, vegetable and wood waste in a ratio of 3 : 3 : 4 (by volume) with a high amount of dry substance (27.5%) allowed to isolate active mesophilic and thermophilic methanogenic consortia. Dynamics of methane formation at liquid phase fermentation of studied mixture was investigated. Accelerated methanogenesis and the highest yield of methane ($31.7 \pm 2.9 \text{ mmol L}^{-1}$) were observed at culturing at 55°C. Analysis of volatile fatty acid production at liquid phase fermentation showed that their amount was low ($<10 \text{ mmol L}^{-1}$). Such amount could not inhibit methanogenesis regardless of the applied substrates and temperature conditions. 16S rRNA sequencing of the received consortia showed the presence of methanogenic archaea *Methanosarcina thermophila*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Candidatus* ‘Methanogranum caenicola’, *Methanofollis ethanolicus*. Consortia also included archaea that represent putative new taxa phylogenetically close to *Candidatus* ‘Methanoplasma termitum’ and *Methanomassiliicoccus luminyensis*. Of the above mentioned methanogenic archaea, the least four were found in composting organic waste for the first time. Received consortia are able to conduct active methanogenesis and can be applied as an inoculum at anaerobic treatment of organic wastes, including composting wastes, in order to intensify and increase the yield of biogas.

Keywords: organic waste, composting, anaerobic treatment, methanogenic archaea

УДК 581.1:632.937

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ *Bacillus subtilis* И СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ НА СОСТОЯНИЕ ПРО-/АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ЗАЩИТНЫХ БЕЛКОВ У РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕМ ФИТОФТОРОЗА И НЕДОСТАТКЕ ВЛАГИ

© 2021 г. Л. Г. Яруллина¹, *, В. О. Цветков², Г. Ф. Бурханова¹, Е. А. Черепанова¹, А. В. Сорокань¹, Е. А. Заикина¹, И. С. Марданшин³, Ж. Н. Калацкая⁴, Н. В. Балюк⁴

¹Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

²Башкирский государственный университет, Уфа, 450076 Россия

³Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства — обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450059 Россия

⁴Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, 220072 Беларусь

*e-mail: yarullina@bk.ru

Поступила в редакцию 12.05.2021 г.

После доработки 21.06.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

Исследовано влияние бактерий *Bacillus subtilis* в сочетании с салициловой (СК) и жасмоновой (ЖАК) кислотами на состояние про-/антиоксидантной системы (содержание пероксида водорода, активность каталазы, пероксидазы, супероксиддисмутазы), содержание пролина, транскрипционную активность генов PR-1, PR-6 и PR-9 и изменение протеома листьев в связи с развитием устойчивости картофеля к возбудителю фитофтороза — оомицету *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary при недостатке влаги. Растения, выращенные из микроклубней сорта Ранняя Роза, опрыскивали суспензией *B. subtilis* (10^8 кл./мл) и смесью бактерий с СК (10^{-6} М), ЖАК (10^{-7} М), СК + ЖАК. Через 3 сут после обработки растения инфицировали *P. infestans* (10^5 спор/мл) и культивировали в условиях искусственно создаваемой почвенной засухи путем сокращения полива. При достижении влажности почвы $40 \pm 5\%$ от полной влагоемкости (7 сут после инфицирования) в растениях оценивали биохимические параметры. Выявлено снижение степени развития *P. infestans* на листьях при обработке *B. subtilis* в сочетании с СК и ЖАК. Механизм активации защитных систем растений картофеля бактериями рода *Bacillus* и сигнальными молекулами в условиях засухи был связан с накоплением H_2O_2 , повышением активности антиоксидантных ферментов и экспрессии генов PR-белков. В протеоме листьев картофеля обнаружены различия в присутствии 19 полипептидов в диапазоне pI от 4.0 до 9.0 с молекулярными массами от 30 до 125 кДа. Обработка *B. subtilis* в сочетании только с ЖАК наиболее существенно изменяла спектр белков, как у здоровых, так и у инфицированных растений. Выявленные различия в активации синтеза защитных белков под влиянием бактерий *B. subtilis* и сигнальных молекул позволяют предположить наличие дифференциальных путей формирования устойчивости к *P. infestans* у растений картофеля с их участием.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, *Bacillus subtilis*, салициловая кислота, жасмоновая кислота, пероксид водорода, антиоксидантные ферменты, пролин, экспрессия генов, PR-белки, протеом, системная устойчивость

DOI: 10.31857/S0555109921060131

Повышение устойчивости растений к патогенам и неблагоприятным агроклиматическим условиям является актуальной задачей растениеводства, поскольку в естественных условиях возделываемые культуры одновременно или последовательно подвергаются воздействию стрессовых факторов различной природы. В этой связи наиболее перспек-

тивными представляются микробиологические подходы, основанные на использовании потенциала растений и почвенных микроорганизмов. Основой биобезопасных препаратов для защиты растений от биотических и абиотических стрессов являются стимулирующие рост растений бактерии (СРРБ) [1]. В этом отношении особенно

привлекательны высокоэффективные бактерии рода *Bacillus*, способные длительное время сохранять жизнеспособность. Среди абиотических факторов, формирующих продуктивность растений, наиболее важным является наличие воды. Рост и развитие картофеля, а также урожайность, сильно зависят от влажности почвы, и эта зависимость выражена гораздо сильнее, чем у других видов сельскохозяйственных культур [2]. Известно, что ризобактерии могут значительно повысить засухоустойчивость растений [3].

Особенностью СРРБ является их способность воздействовать на рост растений непосредственно за счет синтеза различных метаболитов гормональной и сигнальной природы, таких как ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая, салициловая (СК) и жасмоновая (ЖАК) кислоты [4]. Считается, что обработка растений СРРБ способствует развитию индуцированной системной устойчивости (ИСУ), опосредованной действием жасмоновой кислоты, маркером развития которой является индукция экспрессии защитного белка PR-6. Однако показано, что формирование устойчивости пшеницы к патогенам под действием бактерий рода *Bacillus* может развиваться и через салицилатный сигнальный по типу системной приобретенной устойчивости (СПУ), маркером развития которой служит индукция экспрессии защитного белка PR-1 [5].

Показано, что экзогенно применяемая салициловая кислота, помимо повышения устойчивости к патогенам, повышает устойчивость растений к ряду абиотических стрессов, аналогичные данные были получены при обработке жасмонатом [6]. Таким образом, значительный интерес представляет выяснение механизмов индуцирования устойчивости растений к патогенам и абиотическим стрессам под действием бактерий рода *Bacillus* в комплексе с сигнальными молекулами.

Цель работы – изучение особенности формирования защитного ответа у растений картофеля бактериями *Bacillus subtilis* в сочетании с сигнальными молекулами, связанного с состоянием проантиоксидантной системы и экспрессией генов патоген-индуцируемых белков, в ответ на инфицирование *Phytophthora infestans* при недостатке влаги.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В опытах использовали растения картофеля *Solanum tuberosum* (Чишминская опытная станция Башкирского НИИ сельского хозяйства, Уфа, Россия), выращенные из микроклубней восприимчивого сорта Ранняя роза. Клубни высаживали в емкости с грунтом (“TerraVita”, Норд Палп, торф верховой разной степени разложения, очищенный речной песок, перлит,

комплексные минеральные удобрения, биогумус, pH 6.0–6.5) на глубину 3–4 см. Растения выращивали на светоплощадке с фотопериодом 16 ч (освещенность 8000–10000 люкс) при температуре 20–22°C.

Бактерии *B. subtilis* 26Д из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Уфа, Россия) культивировали в среде LB (Lysogeny Broth) в течение 24 ч, затем суспензию разбавляли дистиллированной водой до необходимой концентрации.

Для заражения растений использовался *P. infestans* из коллекции лаборатории биохимии иммунитета растений Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Уфа, Россия). Патоген выращивали на картофельном агаре с декстрозой в течение 7 сут после повторного выделения из инфицированных мини-клубней картофеля для восстановления агрессивности патогена. Поверхность колоний изолята *P. infestans* заливали дистиллированной водой и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Концентрацию спорангиев оценивали с помощью камеры Фукса–Розенталя, суспензию спор разводили до титра 1×10^5 спор/мл.

Обработка растений. На 15 сут после прорастания растений часть из них опрыскивали суспензией из расчета 5 мл на 1 растение бактерий *B. subtilis* 26Д (10^8 клеток / мл) и смесью бактерий с СК (10^{-6} М), ЖАК (10^{-7} М) или СК (10^{-6} М) + ЖАК (10^{-7} М) [7]. В контроле опрыскивали 5 мл дистиллированной воды на 1 растение. На 3 сут после инокуляции *B. subtilis* 26Д растения опрыскивали 5 мл 1×10^5 спор/мл суспензии *P. infestans*. В качестве контрольных использовали растения, не инокулированные бактериями и не инфицированные фитопфторой.

Дефицит влаги создавали за счет сокращения полива. При появлении видимых симптомов засухи (увядание растений) через 7 сут после заражения *P. infestans* (влажность почвы $40\% \pm 5$ от полной влагоемкости) [7] определяли активность ферментов, содержание H_2O_2 и пролина в листьях. Часть листьев каждого растения замораживали в жидком азоте и хранили при $-70^\circ C$ для выделения РНК и белков. О развитии болезни судили по проценту пораженной площади от общей площади листовой пластинки (степень поражения) на 7 сут после заражения растений *P. infestans*. Листья фотографировали, полученные изображения анализировали в компьютерной программе ImageJ (“NIH”, США).

Определение содержания H_2O_2 . Для определения содержания H_2O_2 методом, описанным в работе [8] с модификациями, листья гомогенизировали в ступке при 4°C в 25 мМ фосфатном буфере

(ФБ), pH 6.2, в соотношении 1 : 3, и центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g и 4°C с использованием микроцентрифуги 5415R ("Eppendorf", Германия). Супернатант использовали для определения содержания H_2O_2 с использованием ксиленолового оранжевого. Реагент содержал 0.074% соли Мора ($Fe_2(NH_4)_2SO_4$, чистота 99.997%) в 5.81% серной кислоте и 0.009% ксиленолового оранжевого в 1.82%-ном сорбите (в соотношении 1 : 100). Реакционную смесь инкубировали 40 мин при комнатной температуре, затем измеряли оптическую плотность при 560 нм с использованием люминесцентной спектрометрической ячейки Perkin Elmer LS 55 (США) против холостого опыта, содержащего воду вместо образца. Концентрацию пероксида водорода определяли по предварительно построенной калибровочной кривой.

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД). Активность СОД (КФ 1.15.1.1.) измеряли описанным методом [9] с некоторыми модификациями. Листья гомогенизировали при 4°C в 50 мМ ТрисHCl-буфере (pH 7.4) в соотношении 1 : 10 и экстрагировали в течение 30 мин. Перед анализом растительные экстракты центрифугировали 10 мин при 10000 g и 4°C на центрифуге 5415R ("Eppendorf", Германия) и отбирали супернатант для измерения активности СОД. К 2 мл реагента 1 (0.1 мМ ЭДТА с 0.5 мМ феназинметосульфата и 0.6 мМ нитросинего тетразолия в 0.15 М-ном Na-фосфатном буфере, pH 7.8) добавляли 100 мкл реагента 2 (150 мМ Трис-буфер, pH 8.0 с 1.25 мМ ЭДТА и 0.1 мМ НАДН) и 100 мкл надосадочной жидкости образца, хорошо перемешивали и сразу же измеряли в люминесцентной спектрометрической ячейке Perkin Elmer LS 55 (США) при 540 нм. Затем через 10 мин было проведено повторное измерение. Разницу в оптической плотности использовали для расчета процента блокирования восстановления нитросинего тетразолия. За единицу активности принимали $U = (D_{10} - D_0)/D_0 \times 100\%$, где D_0 — оптическая плотность в момент приготовления смеси, D_{10} — оптическая плотность через 10 мин. Активность СОД выражали в единицах/мг белка.

Определение активности каталазы (КАТ). Для определения активности каталазы (КФ 1.11.1.6) методом [10] с модификациями растительную ткань гомогенизировали при 4°C в 50 мМ ФБ (pH 7.8) в соотношении 1 : 10. После центрифугирования при 10000 g и 4°C на микроцентрифуге 5415R (Eppendorf, Германия) супернатант использовали для анализа активности фермента. Реакцию инициировали добавлением надосадочной жидкости к 65 мМ пероксида водорода в 50 мМ растворе ФБ (pH 7.8), смесь выдерживали при комнатной температуре в течение двух минут. Реакцию останавливали добавлением 32.4 мМ молибдата аммония. В контрольную пробу вместо супернатанта

добавляли дистиллированную воду. Интенсивность проявленной окраски измеряли на Perkin Elmer LS 55 (США) при 410 нм. Активность каталазы рассчитывали по формуле: $U = (A_k - A_0)/(KVT)$, где A_k и A_0 — абсорбция контрольных (содержащих воду вместо образца) и опытных образцов, соответственно, V — объем пробы, 0.1 мл, T — время инкубации, 600 с, K — коэффициент молярного поглощения H_2O_2 , равный 22.2×10^3 моль⁻¹ см⁻¹. Активность КАТ выражали в единицах/мг белка.

Определение активности пероксидазы (ПО). Для определения активности пероксидазы (КФ 1.11.1.7) методом описанным в работе [11] с модификациями листья гомогенизировали при 4°C в 10 мМ ФБ, pH 6.2. Соотношение массы образца листьев к объему ФБ составляло 1 : 3. Экстракт центрифугировали 20 мин при 10000 g при +4°C на центрифуге 5415R ("Eppendorf", Германия). Пероксидазную активность супернатанта определяли микрометодом окисления субстрата 20 мМ орто-фенилендиамина 10 мМ пероксидом водорода, развитие окраски останавливали 4 н. H_2SO_4 . Оптическую плотность раствора измеряли при 490 нм на приборе Perkin Elmer LS 55 (США). За единицу активности фермента принимали изменение оптической плотности раствора за 1 мин. Активность ПО выражали в ед./мг белка.

Определение содержания белка. Содержание белка в образцах определяли по методу Брэдфорд, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта [12]. Поглощение измеряли при 595 нм.

Определение содержания пролина. Навеску растений заливали 2.5 мл стерильной дистиллированной воды. Пробирки помещали в водяную баню, которую затем доводили до кипения, после чего пробирки вынимали и охлаждали. К 2 мл холодного образца добавляли 2 мл реагента нингидрина и 2 мл ледяной уксусной кислоты, помещали на водяную баню и кипятили в течение часа, затем охлаждали. Оптическую плотность продуктов реакции измеряли на спектрофотометре при 522 нм.

Определение транскрипционной активности генов PR-белков. РНК выделяли из растений с помощью тризола ("Molecular Research Center, Inc.", США). Навеску листьев гомогенизировали в жидком азоте. Для получения кДНК на основе мРНК исследуемых образцов проводили реакцию обратной транскрипции с использованием обратной транскриптазы M-MuLV согласно протоколу поставщика. Анализ накопления транскриптов генов PR-1 (номер GenBank AY050221), PR-6 (номер GenBank JX683427) и PR-9 (номер GenBank M21334) проводили с помощью количественной ПЦР в реальном времени. кДНК разводили в пять раз и использовали непосредственно

в качестве матрицы для количественной ПЦР (qPCR). Количественная ПЦР проводилась методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием N', N'-диметил-N-(4-((E)-(3-метил-1,3-бензотиазол-2-илиден) метил)-1-фенилхинолин-1-иум-2-ил) -N-пропилпропан-1,3-диамина (SYBR GreenI) ("Synthol", Россия) на приборе CFX Connect Real-Time System ("Bio-Rad", США). Программа qPCR: 50°C в течение 2 мин; 95°C – 10 мин; 40 циклов при 95°C в течение 15 с и при 60°C в течение 1 мин. Каждую количественную ПЦР проводили в трех повторностях. После заключительного цикла ПЦР был проведен анализ кривой плавления для определения специфики реакции (при 95°C в течение 15 с, 60°C в течение 1 мин и 95°C в течение 15 с). Эффективность каждой пары праймеров была определена с использованием серии 10-кратных разведений кДНК для надежного определения кратных изменений. Измерения транскрипционной активности гена (оценка количества копий мРНК для каждого гена) проводили относительно эталонного гена *St_act* ("ген домашнего хозяйства", актин, номер GenBank X55749) с использованием программного обеспечения "CFX Connect Real-Time System" ("Bio-Rad", США). Анализ данных проводили с помощью программного пакета Lasergene от "DNASTAR, Inc." (США). Праймеры, использованные в работе, приведены в табл. 1, дополнительные материалы.

Двумерный электрофорез. 450 мг листьев гомогенизировали в жидком азоте, ресуспендировали в 1 мл буферного раствора (0.7 М сахароза, 0.5 Nерес-КОН, pH 7.5, 0.1 М KCl, 2% меркаптоэтанол, 1 мМ ЭГТА, 1 мМ ФМСФ, 0.1 мМ ортованадат натрия) и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Белки экстрагировали фенольным раствором по методике [13]. К 1 мл фенола, насыщенного трис-НCl, добавляли 1 мл образца белка, полученную смесь инкубировали при –20°C в течение 30 мин, затем центрифугировали в течение 30 мин при 3000 g. Белки из фенольной фазы осаждали четырехкратным объемом 0.1 М ацетата аммония в этаноле при –20°C в течение 10 ч.

Полученный осадок трижды промывали ацетатом аммония и растворяли в лизис-буфере (8 М мочевины, 2 М тиомочевина, 1% ЧАПС, 30 мМ дитиотреитол (ДТТ), 20 мМ Трис, 0.3%-ный раствор амфолитов).

Изоэлектрическое фокусирование белков проводили на приборе Protean IEF ("Bio-Rad", США). Для разделения белков по изоэлектрической точке использовали готовые 7-сантиметровые стрипы ("Bio-Rad", США), диапазон pH 3–10. Перед фокусировкой проводили пассивную регидратацию в течение 12 ч при 20°C. Фокусировку проводили при напряжении 4000 В (20000 В ч) в течение 22 ч, затем напряжение поддерживали на уровне 500 В

до конца процесса. После изоэлектрического фокусирования стрипы выдерживали в течение 15 мин последовательно в растворах 2%-ного ДТТ и 2.5% йодацетамида в буферных растворах с 25% глицерина, затем промывали в 25 мМ трис-глицериновом буфере, pH 8.3.

Электрофорез проводили в 10%-ном ПААГ с Na-ДДС. Полоски и белки-маркеры на фильтровальной бумаге помещали на полиакриламидный гель и проливали 1%-ным раствором агарозы в трис-глицериновом буферном растворе. Электрофорез проводили при напряжении 90–120 В, гели стабилизировали в 50%-ном этаноле в течение 10 мин, затем окрашивали 0.1%-ным раствором Кумасси G-250. Изображения гелей анализировали в компьютерной программе ImageJ ("NIH", США).

Статистическая обработка. Эксперименты включали 5 биологических повторностей для биохимических показателей и 15 – для транскрипционной активности. На гистограммах показаны выборочные средние и их 95%-ные доверительные интервалы. Различия исследуемых параметров анализировали с помощью теста Краскела–Уоллиса в программе Statistica 8 (Statsoft, США). Для выявления условий опыта, в наибольшей степени влияющих на спектр белков листьев, проводили факторный анализ (анализ главных компонент). На диаграмме рассеяния показаны главные компоненты ("фактор 1", "фактор 2"), описывающие дисперсию значений содержания отдельных белков (интенсивности пятен на электрофореграммах) в различных вариантах опыта. Для определения степени сходства спектров белков листьев в различных вариантах опыта проводили кластерный анализ данных о содержании отдельных белков (евклидово расстояние, метод объединения групп – UPGMA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние бактерий *Bacillus subtilis* и сигнальных молекул на инфицирование растений картофеля *P. infestans* и содержание H_2O_2 . Сравнительный анализ степени пораженности фитофторозом листьев восприимчивого сорта картофеля при недостатке влаги выявил различия в скорости роста оомицета *P. infestans* в вариантах с инокуляцией бактериями и сигнальными молекулами (рис. 1а). Так, в отсутствие обработки степень пораженности составила 64%, предварительная обработка *B. subtilis*, в том числе в сочетании с СК и ЖАК, снижала пораженность листьев на 15–30%. Предобработка *B. subtilis* в сочетании с ЖАК оказала наиболее эффективное защитное действие (рис. 1–4). Ранее было показано, что обработка ЖАК и *B. subtilis* 26Д снижала развитие *P. infestans* на клубнях картофеля [14].

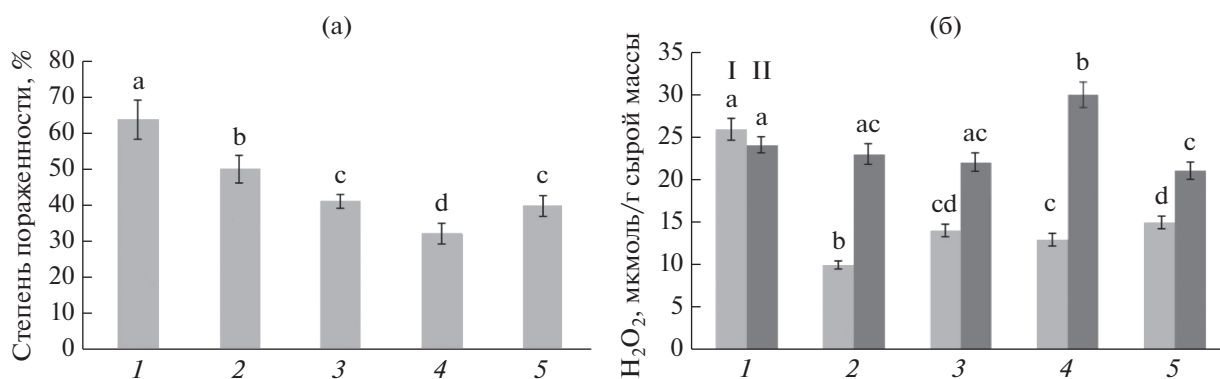


Рис. 1. Влияние обработки *B. subtilis* и сигнальными молекулами на степень развития симптомов фитофтороза (%), вызванных *P. infestans*, на листьях картофеля в условиях засухи (а) и на содержание H_2O_2 в листьях (б): 1 – контроль; 2 – *B. subtilis*; 3 – *B. subtilis* + СК; 4 – *B. subtilis* + ЖАК; 5 – *B. subtilis* + СК + ЖАК. I – незараженные, II – зараженные *P. infestans* растения. Достоверно различающиеся значения обозначены разными буквами.

Повышение устойчивости картофеля к *P. infestans* под влиянием комплекса *Bacillus* spp. с сигнальными молекулами может быть связано с изменением концентрации H_2O_2 в тканях растений [15]. Исследования показали, что концентрация H_2O_2 в обработанных растениях в условиях засухи была ниже, чем в необработанных (рис. 16). Это может быть связано с защитным действием метаболитов *B. subtilis*. Известно, что под действием *Bacillus subtilis* повышалась активность антиоксидантных ферментов и уровень пролина в растениях [16]. В то же время у растений, обработанных бактериями и сигнальными молекулами, при заражении *P. infestans* в условиях засухи уровень пероксида водорода в листьях заметно увеличивался, особенно при обработке *B. subtilis* + ЖАК (рис. 16). H_2O_2 можно рассматривать как наиболее важную молекулу, участвующую в передаче внутриклеточных сигналов, которые регулируют экспрессию генов и активность защитных систем [17], включая увеличение концентрации ионов кальция в цитозоле, что играет важную роль в передаче сигнальной информации в геном растения. Было показано, что H_2O_2 участвует в активации экспрессии генов стрессовых белков [15]. Вероятно, сочетание представителей рода *Bacillus* с сигнальными молекулами усиливает генерацию АФК и передачу сигналов, запускающих другие защитные механизмы, предотвращающие развитие патогенов.

Изменение активности антиоксидантных ферментов и содержания пролина в листьях картофеля при обработке *B. subtilis* в сочетании с СК и ЖАК. Изменение концентрации H_2O_2 в тканях растений в процессе патогенеза может происходить в результате многих метаболических процессов, но в большей степени это происходит в результате изменения активности антиоксидантных ферментов [18].

Одним из важных ферментов антиоксидантной системы растений, участвующих в утилизации активных форм кислорода (АФК), является СОД. При заражении растений *P. infestans* наблюдалось повышение активности СОД (рис. 2а), обработка бактериями усиливала этот эффект. Однако обработка бактериями в сочетании с СК или ЖАК, наоборот, приводила к снижению активности СОД у инфицированных растений. У незараженных растений на фоне засухи достоверное повышение активности СОД выявлено в варианте с обработкой растений бактериями в сочетании с СК, ЖАК или одновременно СК и ЖАК. Таким образом, использование бактерий *B. subtilis* 26Д стимулирует активность СОД у инфицированных и неинфицированных растений картофеля в условиях засухи. Известно, что активность СОД может изменяться разнонаправленно в зависимости от интенсивности и продолжительности воздействия стрессового фактора [19]. Снижение активности СОД при стрессе способствует дальнейшему увеличению продукции АФК и развитию окислительного повреждения клеток и тканей растений [20]. Следовательно, эффективное функционирование СОД во многом определяется функционированием других компонентов защитных систем, в частности, утилизирующих пероксид водорода (каталазы, пероксидазы, ферменты аскорбат-глутатионового цикла).

Каталаза является важнейшим антиоксидантным ферментом [21]. Исследования показали, что у растений, инфицированных *P. infestans*, в условиях засухи наблюдалось снижение активности каталазы (рис. 2б). У инфицированных растений, обработанных только бактериями или в сочетании с СК или ЖАК, активность каталазы значительно увеличивалась. Более того, в вариантах с обработкой *B. subtilis* + СК и *B. subtilis* + ЖАК повышение активности КАТ происходило и у незараженных растений на фоне засухи.

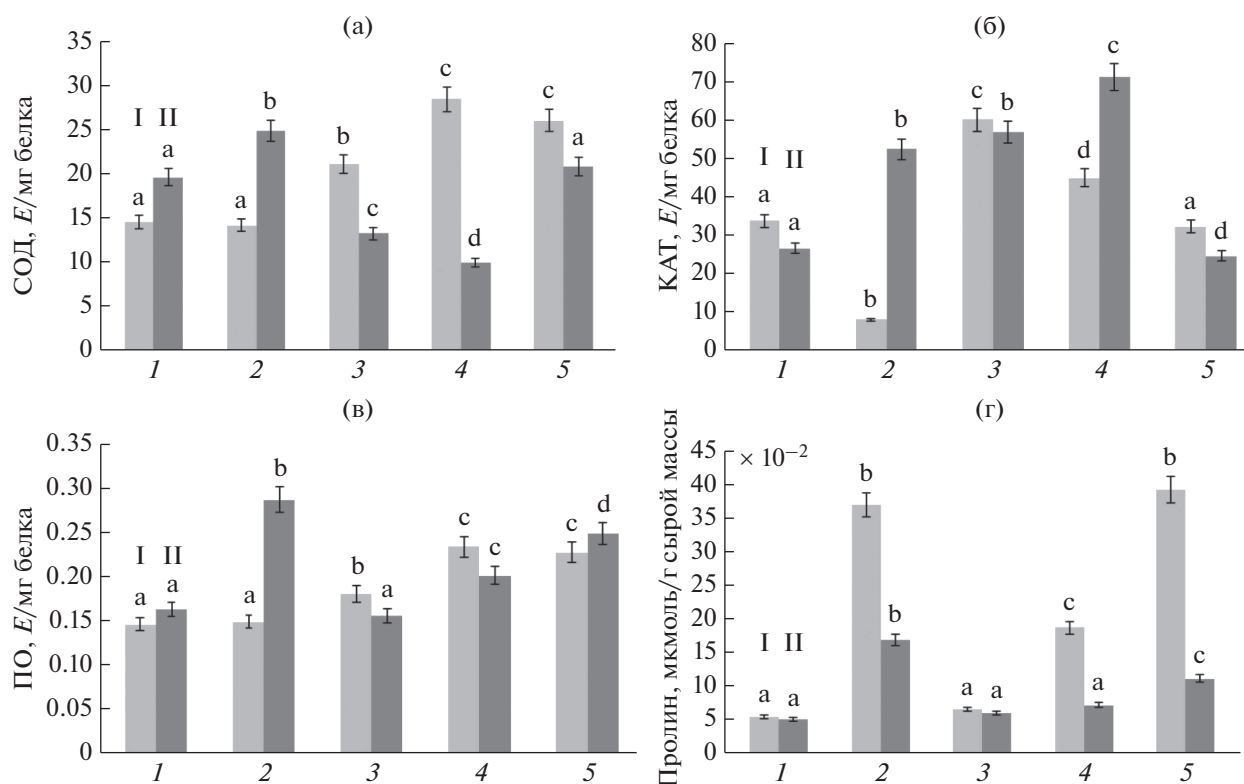


Рис. 2. Влияние обработки *B. subtilis* и сигнальными молекулами на активность СОД (а), каталазы (б), пероксидазы (в) и содержание пролина (г) в листьях картофеля: 1 – контроль; 2 – *B. subtilis*; 3 – *B. subtilis* + СК; 4 – *B. subtilis* + ЖАК; 5 – *B. subtilis* + СК + ЖАК. I – незараженные, II – зараженные *P. infestans* растения. Достоверно различающиеся значения обозначены разными буквами.

Активность каталазы может значительно изменяться при участии сигнальных молекул. H_2O_2 является не только сигнальной молекулой, но и субстратом каталазы. В то же время, ее влияние на активность каталазы у растений неоднозначно. Так, в проростках пшеницы H_2O_2 , в зависимости от концентрации, ингибировала [22] или стимулировала [23] активность каталазы. Салициловая кислота также обладает способностью ингибировать каталазу [24], что является одним из механизмов развития реакции сверхчувствительности. Ингибирование фермента под действием СК может приводить к дальнейшей активации экспрессии гена каталазы и усилению синтеза фермента [25].

Пероксидаза – фермент, участвующий как в генерации, так и в утилизации H_2O_2 [11]. Известно, что обширное мультигенное семейство классических пероксидаз растений класса III, входящих в семейство защитных белков семейства PR-9, участвует в укреплении клеточных стенок за счет окислительных реакций, катализирующих процессы полимеризации фенольных соединений в лигнин клеточных стенок, повышая их устойчивость к разрушению фитопатогенами. Активность пероксидазы увеличивалась у незараженных расте-

ний на фоне засухи только в вариантах с обработкой *B. subtilis* в сочетании с сигнальными молекулами (рис. 2в). Однако при заражении растений *P. infestans* значительное увеличение активности пероксидазы происходило у растений, обработанных только *B. subtilis*, а также в сочетании с ЖАК и СК + ЖАК (рис. 2в). Ранее было показано, что сочетание *B. subtilis* 26Д и СК способствовало активации пероксидазы у инфицированных *P. infestans* растений картофеля в условиях оптимальной влажности [26]. В то же время у инфицированных растений, обработанных *B. subtilis* 26Д и ЖАК, активность фермента значительно не изменялась. Вероятно, регуляция содержания H_2O_2 в растениях картофеля под действием бактерий *B. subtilis* в сочетании с сигнальными молекулами на фоне засухи может происходить разными путями: через активацию СОД, снижение активности каталазы и в результате модулирующего воздействия на активность пероксидазы. Баланс между синтезом и инактивацией АФК имеет решающее значение для поддержания метаболизма растений и повышения их устойчивости к стрессовым факторам различной природы [27].

Исследования выявили антистрессовый эффект обработки бактериями *B. subtilis* 26Д расте-

ний картофеля в условиях засухи. Так, в растениях, обработанных *B. subtilis*, уровень пролина в листьях незараженных растений увеличивался в несколько раз (рис. 2г). Сочетание бактерий с ЖАК, но особенно с СК, снижало стимулирующее действие *B. subtilis* на уровень пролина в неинфицированных растениях. Однако, в варианте *B. subtilis* 26Д + СК + ЖАК содержание пролина было сопоставимо с уровнем у растений, обработанных бактериями. Аналогичная тенденция влияния сочетания бактерий и сигнальных молекул на уровень пролина сохранялась и в инфицированных растениях (рис. 2г).

Известно, что пролин играет роль осмопротектора при засухе, накапливаясь в цитозоле растительных клеток [28]. Защитный эффект пролина обусловлен его участием в стабилизации мембран, структуры белковых молекул и снижении уровня АФК. Также пролин, сочетающий функции антистрессового метаболита и соединения, задействованного в регуляции клеточных процессов, является одним из индикаторов активации системной защиты растений, выполняя сигнальную функцию при взаимодействии растений с патогенами [29]. Показано значительное накопление пролина в растениях при инокуляции эндодифитными бактериями *Bacillus subtilis*, что положительно коррелировало с устойчивостью к болезням [30].

Влияние бактерий *B. subtilis* и сигнальных молекул на транскрипционную активность генов PR-белков в растениях картофеля при заражении *P. infestans*. Системная устойчивость растений к болезням, являющаяся неспецифической, основана на экспрессии многих защитных генов [31]. Как видно на рис. 3, инфицирование и обработка *B. subtilis*, особенно в сочетании с сигнальными молекулами, стимулировали накопление транскриптов генов PR-1 (секретируемый антимикробный белок), PR-6 (ингибиторы протеиназ) и PR-9 (пероксидаза) в растениях картофеля. Так, ген PR-1 наиболее интенсивно экспрессировался у растений, обработанных бактериями в сочетании с СК. Обработка *B. subtilis* в сочетании с ЖАК приводила к значительному увеличению уровня транскрипции гена PR-6 у неинфицированных и инфицированных растений по сравнению с контролем.

Следует обратить внимание, что обработка бактериями *B. subtilis* в отсутствие сигнальных молекул оказывала значительное влияние на повышение уровня экспрессии PR-1 и PR-6 у незараженных растений в условиях засухи. Комбинация бактерий с СК и ЖАК в данном случае имела, как правило, меньший, а в некоторых случаях даже отрицательный эффект, например, экспрессия PR-6 снижалась в присутствии СК. У инфицированных растений, обработанных бактериями в сочетании с

СК или ЖАК, значительно повышалась экспрессия PR-белков. В неинфицированных растениях экспрессия PR-9 увеличивалась при обработке *B. subtilis* как в отсутствие, так и в комбинации с СК или ЖАК, но комбинированный эффект СК и ЖАК вызывал большее увеличение экспрессии PR-9. Ранее было показано, что ЖАК может нейтрализовать способность *B. subtilis* 26Д стимулировать транскрипционную активность гена PR-9 в условиях нормальной влажности [26]. Супрессивный эффект совместной обработки *B. subtilis* 26Д + ЖАК выражался в снижении транскрипции генов PR-2, PR-3 и PR-9 в растениях пшеницы по сравнению с растениями, обработанными только *B. subtilis* 26Д или ЖАК. Следовательно, совместное влияние засухи и заражения патогеном приводит к дополнительным изменениям транскрипционной активности PR-генов растений по сравнению с инфицированными растениями, выращенными в нормальных условиях.

Вероятно, сочетание бактерий *B. subtilis* 26Д с сигнальными молекулами усиливает генерацию H_2O_2 и передачу сигналов, запускающих работу защитных механизмов, которые повышают устойчивость растений к стрессовым факторам биотической и абиотической природы за счет индукции транскрипционной активности генов защитных белков.

Возможно, что способствуя генерации активных форм кислорода (АФК), бактерии рода *Bacillus* вызывают передачу сигналов, запускающих другие защитные механизмы. Было показано, что обработка растений *Bacillus subtilis* способствует ИСУ, опосредованной действием ЖАК. Однако формирование устойчивости пшеницы к патогенам под влиянием бактерий рода *Bacillus* также может развиваться через салицилатный сигнальный путь по типу системной СПУ [5]. Среди изученных генов PR-белков, определяющих развитие СПУ, ген PR-1 регулируется СК-зависимым сигнальным каскадом [32]. Ответы на СК зависят от регуляторного белка, называемого ассоциированным с патогеном — 1 NPR-1. Его синтез активируется через окислительно-восстановительные пути посредством накопления СК. Белок NPR-1 переносится в ядро, где действует через факторы транскрипции, не связываясь непосредственно с ДНК. Воздействие эндодифитных бактерий приводит к усилению биосинтеза ЖАК и развитию ИСУ, маркером которой является экспрессия гена PR-6 (ингибитор протеазы) [33]. Долгое время считалось, что СК- и ЖАК-опосредованные сигнальные пути обладают антагонистическим действием [34]. Однако разделение сигнальных путей является весьма условным. Появляются новые данные об альтернативных индукторах и участниках формирования устойчивости растений к стрессу [6].

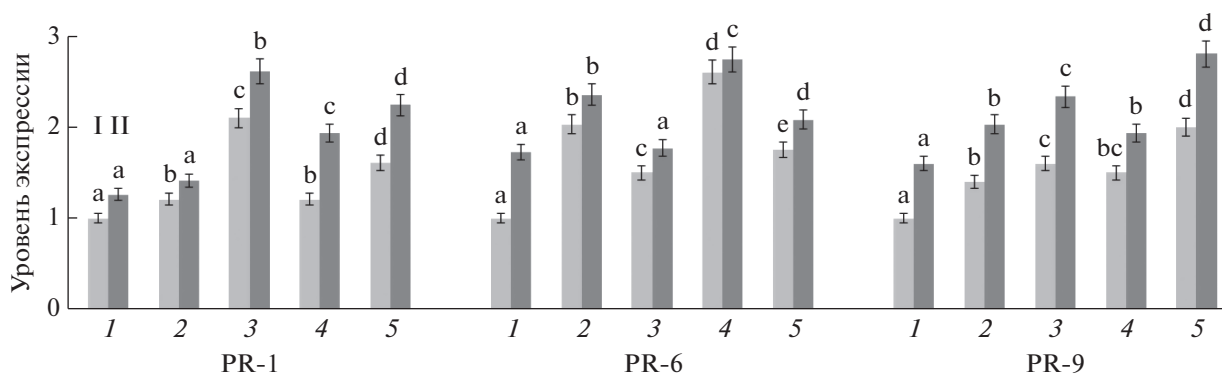


Рис. 3. Влияние обработки *B. subtilis* и сигнальными молекулами на транскрипционную активность генов PR-белков. 1 – контроль (без заражения); 2 – *B. subtilis*; 3 – *B. subtilis* + СК; 4 – *B. subtilis* + ЖАК; 5 – *B. subtilis* + СК + ЖАК. I – незараженные, II – зараженные *P. infestans* растения. Достоверно различающиеся значения обозначены разными буквами.

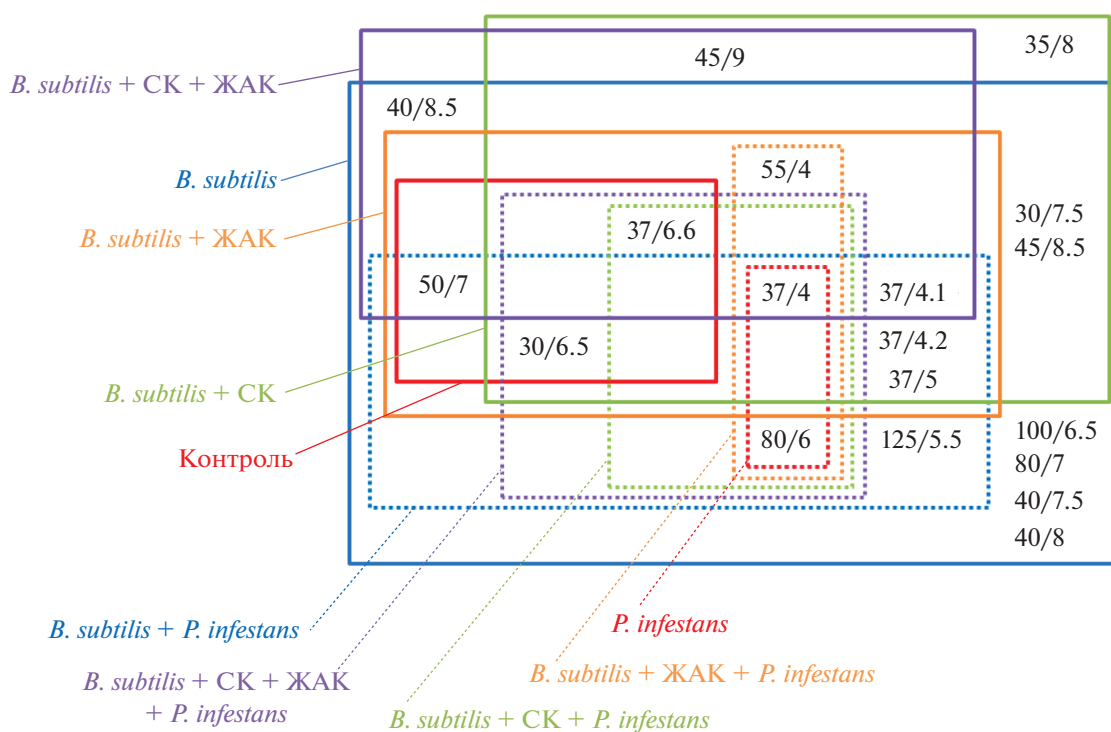


Рис. 4. Присутствие различных белков (молекулярная масса (кДа)/pI) в листьях картофеля в различных вариантах опыта.

Влияние бактерий *Bacillus subtilis* и сигнальных молекул на протеом листьев картофеля при заражении *P. infestans*. Одним из способов выявления специфичности изменений экспрессии генов под влиянием заражения растений патогенами или воздействия сигнальных молекул и метаболитов эндофитных бактерий может быть исследование протеома. Методом двумерного электрофореза белков листьев *S. tuberosum* идентифицировано 19 белков, наличие которых в листьях различалось в зависимости от варианта опыта (рис. 4).

Наибольшее количество белков наблюдалось в листьях растений, обработанных *B. subtilis*, четыре белка (Mr/pI 100/6.5, 80/7, 40/7.5, 40/8) присутствовали только в этом варианте опыта. Белок с Mr/pI 35/8 наблюдался только при обработке *B. subtilis* + СК в отсутствие ЖАК, белок с Mr/pI 45/9 наблюдался как в отсутствие, так и в присутствии ЖАК. Белок с Mr/pI 40/8.5 присутствовал только в растениях, обработанных *B. subtilis*, и растениях, обработанных *B. subtilis* вместе с двумя сигнальными молекулами. При заражении *P. in-*

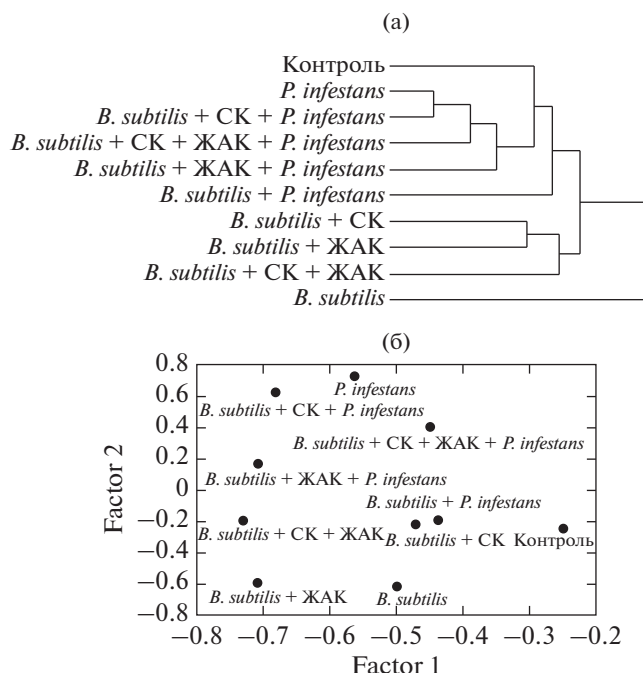


Рис. 5. Кластерный анализ вариантов опыта в соответствии с присутствием различных белков в листьях (а). Анализ главных компонент дисперсии содержания белков в листьях (б).

festans наибольшее количество белков также наблюдалось при обработке *B. subtilis* при отсутствии сигнальных молекул. Белок с Mr/pI – 55/4, который присутствовал во всех неинфицированных растениях, наблюдался во время заражения только при обработке *B. subtilis* + ЖАК. Белок с Mr/pI – 50/7 в инфицированных растениях присутствовал только при обработке *B. subtilis* без СК и ЖАК.

В результате кластерного анализа все растения, инфицированные *P. infestans*, а также неинфицированные и необработанные, оказались наиболее близкими по спектру синтезируемых белков (рис. 5а). Среди этих вариантов наиболее существенные различия наблюдались у инфицированных растений, обработанных *B. subtilis*. Растения, обработанные *B. subtilis* с СК или ЖАК, или их смесью, образовывали другую группу со схожими спектрами белков. Наибольшие различия в спектре белков наблюдали у неинфицированных растений, обработанных *B. subtilis* в отсутствие СК и ЖАК. Таким образом, обработка *B. subtilis* в отсутствие сигнальных молекул существенно изменяла спектр растительных белков, что особенно выражено у незараженных растений. Можно предположить, что инфицирование *P. infestans* и обработка сигнальными молекулами активирует защитные механизмы растений, предотвращая изменения в спектре белков, вызываемые симбиотическими бактериями.

Наибольшие изменения в спектре белков у инфицированных растений, обработанных *B. subtilis* в смеси с сигнальными молекулами, были вызваны ЖАК: растения, обработанные СК или смесью СК и ЖАК, в меньшей степени отличались от контрольных зараженных растений. Как известно, жасмонаты регулируют процессы развития растений и адаптации к внешним биотическим и абиотическим стрессорам [35].

Следует отметить, что во всех вариантах обработки, за исключением контроля, наблюдали присутствие белка хлоропластов, вовлеченного в генерацию АФК (oxygen-evolving enhancer protein 1). Наибольшее содержание этого белка отмечалось в обработанных *B. subtilis* незараженных и зараженных растениях, а также в зараженных растениях, обработанных *B. subtilis* + ЖАК. Известно, что окислительный взрыв является сигналом для реакции сверхчувствительности (СВЧ), которая тесно связана с эффективным ответом растений на инфицирование патогеном. Имеются данные о взаимосвязи белка окислительного взрыва RPH1 с устойчивостью растений к *Phytophthora brassicae* [36].

Результаты факторного анализа (рис. 5б) показывают корреляцию обработки ЖАК с первым компонентом дисперсии (варианты опыта с обработкой ЖАК расположены преимущественно в левой части диаграммы), а инфицирования *P. infestans* — со вторым компонентом (варианты с инфицированием преимущественно в верхней части). Таким образом, обработка ЖАК и инфицирование *P. infestans*, по-видимому, являются основными параметрами, вызывающими изменения в спектре растительных белков. В целом можно сделать вывод, что инфицирование возбудителем фитофтороза, обработка эндофитными бактериями и сигнальными молекулами вызывают сложные ответные реакции у растений, в которые вовлечены множество защитных белков.

Таким образом, полученные результаты исследований показывают, что механизм активации защитных систем растений картофеля эндофитными бактериями рода *Bacillus* и сигнальными молекулами — СК и ЖАК — опосредуется накоплением пероксида водорода и повышением активности ферментов, регулирующих его уровень, а также PR-белками. Развитие защитных реакций при засухе приводит к значительным изменениям спектра и относительного содержания отдельных белков, как у здоровых, так и у инфицированных растений. Выявленные различия в активации транскрипционной активности генов PR-белков под влиянием бактерий *B. subtilis* и сигнальных молекул позволяют предположить наличие дифференциальных путей формирования устойчивости к *P. infestans* у растений картофеля с их участием.

Работа выполнялась частично по теме госзадания (№ гос. регистрации АААА-А21-121011990120-7), а также при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-516-00005, на оборудовании Центра коллективного пользования “Биомика” (Отделение биохимических исследований и нанобиотехнологии Регионального центра коллективного пользования “Агидель”) и Уникальной научной установки “Кодинк”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Verma P., Yadav A.N., Kumar V., Singh D.P., Saxena A.K. // Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives. / Eds. D.P. Singh, H.B. Singh, R. Prabha. Singapore: Springer, 2017. P. 543–580.
2. Burton W.G. // American Potato Journal. 1981. V. 58. P. 3–14.
3. Coleman-Derr D., Tringe S.G. // Front Microbiol. 2014. V. 5. P. 283. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00283>
4. Berg G. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 84. P. 11–18. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
5. Burkhanova G.F., Veselova S.V., Sorokan' A.V., Blagova D.K., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. № 3. P. 346–352. <https://doi.org/10.18699/VJ19.561>
6. Chanda B., Xia Y., Mandal M.K., Sekine K.T., Gao Q.M., Selote D. // Nat. Genet. 2011. V. 43. P. 421–427. <https://doi.org/10.1038/ng.798>
7. Batool T., Ali S., Seleiman M.F., Naveed N.H., Ali A., Ahmed K., Abid M., Rizwan M., Shahid M.R., Alotaibi M., Al-Ashkar I., Mubushar M. // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. P. 169–175. <https://doi.org/10.1002/sml.200400053>
8. Jiang Z.Y., Woollard A.C.S., Wolff S.P. // FEBS Lett. 1990. V. 268. P. 69–71.
9. Bonnet M., Camares O., Veisseire P. // J. Experimental Botany. 2000. V. 51. P. 945–953.
10. Hadwan M.H., Abed H.N. // Data in Brief. 2016. V. 6. P. 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.12.012>
11. Fornera S., Walde P. // Analytical Biochemistry. 2010. V. 407. № 2. P. 293–295. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.034>
12. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254
13. Vincent D., Wheatley M., Cramer G. // Electrophoresis. 2006. V. 27. P. 1853–1865. <https://doi.org/10.1002/elps.200500698>
14. Yarullina L.G., Kasimova R.I., Ibragimov R.I., Akhatova A.R., Umarov I.A., Maksimov I.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. V. 52. № 1. P. 71–78. <https://doi.org/10.1134/S0003683816010154>
15. Pfannschmidt T., Bräutigam K., Wagner R., Dietzel L., Schröter Y. // Ann. Bot. 2009. V. 103. P. 599–607. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn081>
16. Lastochkina O.V., Aliniaiefard S., Seifikalhor M., Yuldashev R., Pusenkova L., Garipova S. // Wheat Production in Changing Environments. Responses, Adaptation and Tolerance. / Eds. M. Hasanuzzaman, K. Nahar, A. Hossain. Singapore: Springer, 2019. P. 579–614.
17. Galvez-Valdivieso G., Fryer M.J., Lawson T., Slattery K., Truman W., Smirnov N., Asami T., Davies W.J., Jones A.M., Baker N.R. // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 2143–2162. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.061507>
18. Smirnov N., Arnaud D. // New Phytologist. 2019. V. 221. № 3. P. 1197–1214. <https://doi.org/10.1111/nph.15488>
19. Rizhsky L., Liang H., Mittler R. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 38921–38925. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304987200>
20. Jiang Y., Huang B. // Crop Sci. 2001. V. 41. № 2. P. 436–442. <https://doi.org/10.2135/cropsci2001.412436x>
21. Pradedova E.V., Isheeva O.D., Salyaev R.K. // Russ. J. Plant Physiol. 2011. V. 58. № 1. P. 36–44. <https://doi.org/10.1134/S1021443711010110>
22. Bakalova S., Nikolova A., Wedera D. // J. Plant Physiol. 2004. V. 30. P. 64–77. <https://doi.org/10.1556/AAgr.56.2008.2.1>
23. Luna C.M., Pastori G.M., Driscoll S., Groten K., Bernard S., Foyer C.H. // J. Experimental Botany. 2005. V. 56. № 411. P. 417–423. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri039>
24. Rakhmankulova Z.F., Fedyaev V.V., Rakhmatulina S.R., Ivanov C.P., Gilvanova I.R., Usmanov I.Y. // Russ. J. Plant Physiol. 2010. V. 57. № 6. P. 778–783.
25. Guan L.M., Scandalios J.G. // Free Radic Biol Med. 2000. V. 28. № 8. P. 1182–1190.
26. Maksimov I.V., Abizgildina P.P., Sorokan A.V., Burkhanova G.F. // Applied Biochemistry and Microbiology. 2014. V. 50. № 2. P. 173–178. <https://doi.org/10.1134/S0003683814020136>
27. Sathiyamurthy B., Dama G., Balasubramanian A., Vvs S. // World J. Pharmaceutical Research. 2015. V. 4. № 2. P. 927–939.
28. Pireivatloum J., Qasimov N., Maralian H. // Afr. J. Biotech. 2010. V. 9. P. 36–40.
29. Fabro G., Kovács I., Pavet V., Szabados L., Alvarez M.E. // Mol. Plant Microb. Interact. 2004. V. 17. № 4. P. 343–350.
30. Lastochkina O., Seifikalhor M., Aliniaiefard S., Baymiev A., Pusenkova L., Garipova S., Kulabuhova D., Maksimov I. // Plants (Basel). 2019. V. 8. № 4. Article 97. <https://doi.org/10.3390/plants8040097>
31. Kuluev B., Mikhaylova E., Ermoshin A., Veselova S., Tugbaeva A., Gumerova G., Gainullina K., Zaikina E. // J. Plant Physiol. 2019. V. 242. Article 153033. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153033>
32. Gimenez-Ibanez S., Solano R. // Front. Plant Sci.. 2013. V. 4. № 72. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00072>
33. Durrant W.E., Dong X. // Annu. Rev. Phytopathol. 2004. V. 42. P. 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803>
34. Koornneef A., Pieterse C.M.J. // Plant Physiol. 2008. V. 146. P. 839–844. <https://doi.org/10.1104/pp.107.112029>
35. Glazebrook J. // Annu. Rev. Phytopathol. 2005. V. 43. P. 205–227. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923>
36. Belhaj K., Lin B., Mauch F. // The Plant J. 2009. V. 58. № 2. P. 278–298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03779.x>

Effect of *Bacillus subtilis* Bacteria and Signaling Molecules on the State of the Pro-/Antioxidant System and Expression of Protective Protein Genes in Potato Plants in the Infection of Phytophthora

L. G. Yarullina^{a,*}, V. O. Tsvetkov^b, G. F. Burkhanova^a, E. A. Cherepanova^a, A. V. Sorokan^a, E. A. Zaikina^a, I. S. Mardanshin^c, J. N. Kalatskaya^d, and N. V. Balyuk^d

^a Institute of Biochemistry and Genetics — a separate structural unit of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

^b Bashkir State University, Ufa, 450076 Russia

^c Bashkir Research Institute of Agriculture — a separate structural unit of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450059 Russia

^d Institute of Experimental Botany named after V.F. Kuprevich, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Belarus

*e-mail: yarullina@bk.ru

The effect of *Bacillus subtilis* bacteria in combination with salicylic (SA) and jasmonic (JA) acids on the state of the pro-/antioxidant system (the content of hydrogen peroxide and proline, the activity of catalase, peroxidase, superoxide dismutase), the transcriptional activity of the genes PR-1, PR-6 and PR-9 and changes in the leaf proteome in connection with the development of potato resistance to the causative agent of late blight — oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary with a lack of moisture were studied. Plants grown from microtubers were sprayed with a suspension of *B. subtilis* (10^8 cells/ml) and a mixture of bacteria with SA (10^{-6} M), JA (10^{-7} M), SA + JA. 3 days after treatment, the plants were infected with *P. infestans* (10^5 spores/ml) and cultivated under artificial soil drought conditions by reducing irrigation. When soil moisture reached $40 \pm 5\%$ of full moisture capacity (7 days after infection), biochemical parameters were assessed in plants. A decrease in the degree of *P. infestans* development on leaves was revealed when treated with *B. subtilis* in combination with SA and JA. The mechanism of activation of the defense systems of potato plants by bacteria of the genus *Bacillus* and signaling molecules under drought conditions was associated with the accumulation of H_2O_2 , an increase in the activity of antioxidant enzymes, and the expression of PR-protein genes. In the proteome of potato leaves, differences were found in the presence of 19 polypeptides in the pI range from 4.0 to 9.0 and with molecular weights from 30 to 125 kDa. Treatment with *B. subtilis* in combination with JA most significantly changed the spectrum of proteins in both healthy and infected plants. The revealed differences in the activation of the synthesis of protective proteins under the influence of *B. subtilis* bacteria and signaling molecules suggest the existence of differential pathways for the formation of resistance to *P. infestans* in potato plants with their participation.

Keywords: *Solanum tuberosum*, *Phytophthora infestans*, *Bacillus subtilis*, salicylic acid, jasmonic acid, hydrogen peroxide, antioxidant enzymes, proline, gene expression, PR proteins, proteome, systemic resistance

УДК 577.13:581.1

АФК-ЗАВИСИМОЕ СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ 24-ЭПИКАСТАСТЕРОНА И ЕГО МОНОСАЛИЦИЛАТА НА ПРОРОСТКИ ПШЕНИЦЫ ПРИ ГИПЕРТЕРМИИ

© 2021 г. Р. П. Литвиновская¹, М. А. Шкляревский²,
Ю. Е. Колупаев²*, А. И. Кокорев², В. А. Хрипач¹

¹Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220141 Республика Беларусь

²Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева, Харьков, 62483 Украина

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

Поступила в редакцию 28.04.2021 г.

После доработки 28.06.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

Проведено сравнение влияния 24-эпикастастерона (ЭК) и его конъюгата с остатком салициловой кислоты (2-моносалицилата ЭК – МСЭК) на теплоустойчивость проростков пшеницы. Обработка проростков МСЭК в концентрациях 20 и 50 нМ вызывала более существенное повышение их теплоустойчивости по сравнению с действием ЭК, салициловой кислоты (СК), а также смеси ЭК и СК в указанных концентрациях. Под влиянием ЭК и МСЭК отмечалось транзитное повышение содержания пероксида водорода в корнях проростков, при этом эффект МСЭК был более существенным. Обработка проростков МСЭК вызывала более заметное повышение в корнях активности антиоксидантных ферментов (каталазы и гваяколпероксидазы) по сравнению с действием ЭК. Влияние ЭК и его салицилата на показатели про-/антиоксидантного равновесия в клетках корней и теплоустойчивость проростков устранялось их обработкой антиоксидантом диметилтиомочевинной и ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом. Сделано заключение об АФК-опосредованном действии исследуемых соединений на стресс-протекторные системы корней проростков. Более существенное защитное действие МСЭК по сравнению с ЭК могло быть связано с постепенным высвобождением из конъюгата СК и ЭК и функциональным взаимодействием сигнальных путей брассиностероидов и СК.

Ключевые слова: брассиностероиды, 24-эпикастастерон, салициловая кислота, 2-моносалицилат 24-эпикастастерона, активные формы кислорода, антиоксидантная система, теплоустойчивость, *Triticum aestivum*

DOI: 10.31857/S055510992106009X

Брассиностероиды (БС) играют значительную роль в регуляции функций растительного организма как в оптимальных, так и в неблагоприятных условиях [1]. В настоящее время накоплены экспериментальные данные, которые свидетельствуют в пользу представлений о том, что модификация сигнальных путей БС экзогенными воздействиями может быть одним из стратегических направлений решения проблемы адаптации культурных растений [2–4].

БС находятся в тесных функциональных связях практически со всеми компонентами гормональной системы растений [3]. Так, показано, что стимуляция БС ростовых процессов включает в себя их синергическое взаимодействие с гиббереллинами и ауксинами [5]. Не менее важное значение имеет взаимодействие БС со стрессовыми фитогормонами, в частности с абсцизовой (АБК) и салициловой (СК) кислотами. Установлено, на-

пример, что индуцирование 24-эпибрассинолидом (ЭБ) устойчивости проростков пшеницы к действию кадмия, которое сопровождалось значительным усилением синтеза дегидрина с молекулярной массой (ММ) 28 кДа, было опосредовано образованием АБК [6].

Достаточно давно были получены данные, указывающие на возможное участие СК в реализации влияния БС на соле- и теплоустойчивость растений арабидопсиса. Так, экзогенный ЭБ почти не оказывал влияния на резистентность растений генотипа *npr1-1* – мутантов по ключевому гену салицилатного сигналинга [7]. Также установлена более высокая чувствительность к гипертермии мутантов *npr1-1* по сравнению с растениями арабидопсиса дикого типа. В то же время обнаружено подавление синтеза СК при усиленной в присутствии БС экспрессии гена *NPR1* [8]. Имеющиеся сведения указывают на наличие как

положительного, так и отрицательного перекрестного взаимодействия между БС и СК. Например, при заражении корней риса *Pythium graminicola* БС действовали как факторы вирулентности за счет отрицательного взаимодействия с СК [9]. С другой стороны, при действии абиотических стрессоров зарегистрированы эффекты усиления защитного действия БС и СК при совместном использовании двух фитогормонов. В частности, комбинация ЭБ и СК оказывала более заметное защитное действие на растения рапса при их обработке токсическими дозами свинца, что выражалось в усиленном накоплении антиоксидантов липидной фазы и хелаторов металлов [10]. Усиление защитного влияния обработки ЭБ при ее комбинировании с обработкой СК показано и в условиях солевого стресса [11]. При одновременном действии двух фитогормонов у растений рапса, подвергнутых солевому стрессу, отмечались более высокие показатели содержания пролина, активности нитратредуктазы и карбоангидразы, фиксации CO_2 по сравнению с растениями, обработанными одним из фитогормонов.

Ранее сообщалось о синтезе конъюгатов БС с СК с помощью реакций ЭБ и 24-эпикастестерона (ЭК) с ангидридом 2-*O*-бензилсалициловой кислоты с последующим гидронолизом *O*-бензильных групп [12]. Полученные таким образом конъюгаты ЭБ и ЭК с СК оказывали более заметное влияние на выживание проростков проса после потенциально летального прогрева и в условиях солевого стресса не только по сравнению с исходными БС, но и по сравнению со смесью БС с СК, взятых в оптимальных концентрациях [12]. Под влиянием конъюгатов БС с СК отмечалось более заметное смягчение проявления окислительного стресса, определяемого по содержанию продуктов перексидного окисления липидов (ПОЛ), после повреждающего действия гипертермии и засоления.

Известно, что АФК, образующиеся с участием НАДФН-оксидазы при действии БС на растения, участвуют в реализации их сигнальных и защитных эффектов [13–15]. С другой стороны, АФК, которые генерируются с помощью пероксидазы и НАДФН-оксидазы, задействованы в сигналинге СК [16]. Однако влияние конъюгатов БС с СК на редокс-гомеостаз растительных клеток и значение его изменений для реализации стресс-протекторного действия таких производных БС до сих пор не исследовано.

В последнее время появились сведения о различиях в физиологической активности лактон(ЭБ) и кетон-(ЭК) содержащих БС [17]. В частности, показано, что обработка стареющих листьев ячменя ЭК более эффективно по сравнению с действием ЭБ предотвращала развитие окислительного стресса [18]. Обработка растений рапса ЭК способствовала повышению в них

активности пероксидазы, в то время как при действии ЭБ такой эффект почти не проявлялся [17]. В целом физиологические (стресс-протекторные) эффекты кетонсодержащих БС изучены значительно слабее, чем лактонсодержащих БС.

Цель работы – сравнительное изучение влияния ЭК и его 2-моносалицилата (МСЭК) на теплоустойчивость проростков пшеницы, образование в них АФК и состояние их антиоксидантной системы.

МЕТОДИКА

Зерновки пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Досконала обеззараживали 6%-ным пероксидом водорода в течение 30 мин и проращивали в темноте в течение 4 сут при температуре около 20°C на водопроводной воде, очищенной с использованием системы водоподготовки, включающей в себя фильтр механической очистки, угольный фильтр и полупроницаемую обратноосмотическую мембрану с размером ячеек 1 нм. Затем в среду инкубации корней добавляли ЭК или МСЭК в концентрациях диапазона 5–200 нМ, время воздействия 24 ч. В отдельных вариантах опытов проростки в течение 24 ч инкубировали на растворах СК (20 или 50 нМ) либо смеси ЭК с СК в соответствующих концентрациях. Время инкубации проростков на растворах физиологически активных соединений, вызывающее наиболее заметное повышение их выживания после повреждающего нагрева, было выбрано на основании предварительных опытов (результаты не приводятся).

При изучении влияния сквенджера пероксида водорода диметилтиомочевина (ДМТМ) [19] и ингибитора НАДФН-оксидазы имидазола [20] на теплоустойчивость проростков и биохимические показатели проростки инкубировали на растворах 26 ч. При оценке совместного действия ДМТМ и имидазола с ЭК или МСЭК указанные соединения добавляли в среду инкубации корней за 2 ч до начала обработки БС. Концентрации ДМТМ и имидазола и время экспозиции, вызывающие наиболее существенные модификации физиологических эффектов, выбраны на основании предварительных опытов.

Биохимические показатели определяли в корнях проростков, поскольку они более чувствительны к воздействиям экзогенных соединений и теплового стресса [21]. Во время инкубации проростков на исследуемых растворах определяли содержание в корнях пероксида водорода и активность антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и гваяколпероксидазы.

По окончании инкубации на растворах ЭК, МСЭК и исследуемых ингибиторов проростки подвергали повреждающему прогреву в водяном

ультратермостате при температуре 45°C в течение 10 мин [21]. Затем их переносили на 24 ч на очищенную водопроводную воду и определяли содержание продуктов пероксидного окисления липидов (ПОЛ). Часть проростков после прогрева выдерживали в течение трех суток при температуре около 20°C и освещении 6000 лк для оценки выживания.

Для определения содержания H_2O_2 корни на холоде гомогенизировали в 5% трихлоруксусной кислоте, центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин при температуре не выше 4°C на центрифуге MPW 350R (MPW MedInstruments, Польша) и в супернатанте определяли концентрацию H_2O_2 с помощью ферротрицианидного метода [22].

Для определения активности антиоксидантных ферментов навески свежесрезанных корней гомогенизировали на подносах со льдом в 0.15 М К, Na-фосфатном буфере (pH 7.6), содержащем ЭДТА (0.1 мМ) и дитиотрейтол (1 мМ) [23]. Для анализа использовали супернатант после центрифугирования гомогената при 8000 g в течение 10 мин при 4°C. Активность цитозольной супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) определяли при pH 7.6, используя метод, основанный на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анионы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия НАДН и феназинметосульфата. Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) анализировали при pH 7.0 по количеству пероксида водорода, разложившегося за единицу времени. Активность гваяколпероксидазы определяли при pH 6.2, используя в качестве донора водорода гваякол, в качестве субстрата — пероксид водорода. Активность СОД выражали в усл. ед./г сырой массы · мин, каталазы — в мкмоль H_2O_2 /г сырой массы · мин, пероксидазы — в усл. ед./г сырой массы · мин.

Для определения содержания продуктов ПОЛ растительный материал гомогенизировали в реакционной среде, содержащей 0.25%-ную 2-тиобарбитуровую кислоту в 10%-ной трихлоруксусной кислоте [24]. После этого пробы кипятили в течение 30 мин, охлаждали и центрифугировали 15 мин при 10000 g. В супернатанте определяли продукты ПОЛ, реагирующие с 2-тиобарбитуровой кислотой (преимущественно малоновый диальдегид — МДА), измеряя оптическую плотность при длинах волн 532 нм (максимум светопоглощения МДА) и 600 нм (для поправки на неспецифическое поглощение).

Опыты проводили в 4 кратной биологической повторности и каждый опыт воспроизводили независимо 3 раза. На рисунках приведены средние величины и их стандартные ошибки. Достоверность различий при $P \leq 0.05$ определяли с использованием дисперсионного анализа.

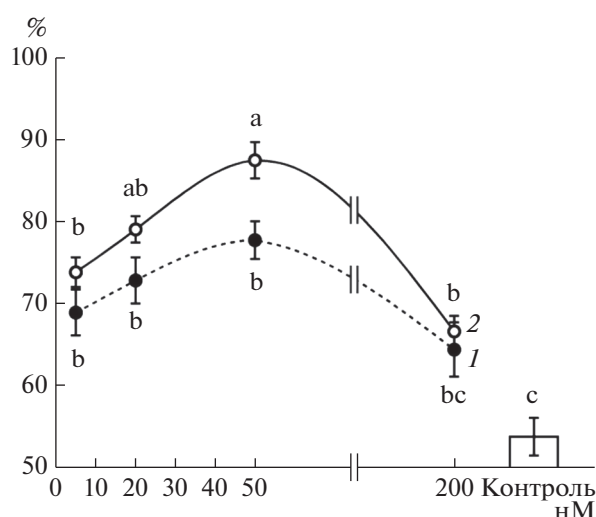


Рис. 1. Зависимость влияния концентрации ЭК и его конъюгата с салициловой кислотой (МСЭК) на выживание проростков пшеницы (%) после повреждающего прогрева. 1 — ЭК; 2 — МСЭК. Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обработка проростков ЭК в концентрациях диапазона 5–200 нМ вызывала повышение их теплоустойчивости (рис. 1). При этом наиболее заметный защитный эффект наблюдали под влиянием ЭК в концентрации 20 и, особенно, 50 нМ. Влияние МСЭК на выживание проростков пшеницы после теплового стресса было более существенным по сравнению с ЭК, по крайней мере, при использовании концентрации, вызывающей наибольший защитный эффект — 50 нМ.

В отдельных сериях экспериментов сравнивали влияние МСЭК с действием СК и смеси ЭК и СК в соответствующих концентрациях. Обработка проростков СК, также как и ЭК, повышала их выживание после повреждающего прогрева (рис. 2). Защитный эффект смесей СК и ЭК в концентрациях 20 и 50 нМ был немного выше, чем действие каждого соединения в отдельности, однако это различие не было достоверным при $P \leq 0.05$. В то же время протекторное действие МСЭК в концентрации 50 нМ существенно превышало эффект смеси СК и ЭК в такой же концентрации.

Как уже отмечалось, сигнальные и стресс-протекторные эффекты БС могут быть опосредованы образованием АФК, зависимым от НАДФН-оксидазы [14]. Значение АФК в реализации протекторного действия МСЭК до сих пор не исследовалось. В настоящей работе эффект повышения содержания пероксида водорода в корнях проростков пшеницы под влиянием как ЭК, так и МСЭК был транзиторным с максимумом через 2 ч после начала обработки. При этом обработка МСЭК вызы-

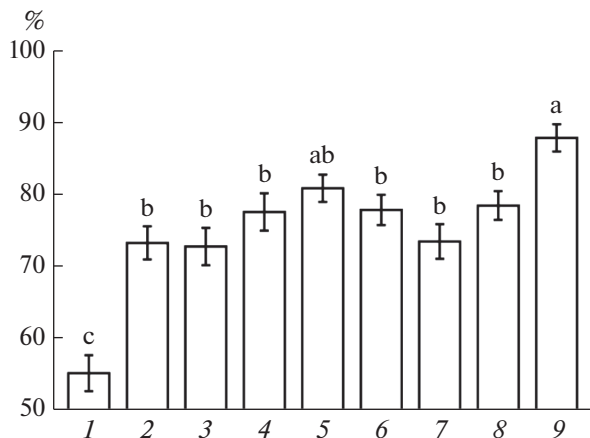


Рис. 2. Сравнение влияния ЭК, МСЭК и смеси ЭК с СК на выживание проростков пшеницы (%) после повреждающего прогрева: 1 – контроль; 2 – ЭК (20 нМ); 3 – СК (20 нМ); 4 – ЭК (20 нМ) + СК (20 нМ); 5 – МСЭК (20 нМ); 6 – ЭК (50 нМ); 7 – СК (50 нМ); 8 – ЭК 50 (нМ) + СК (50 нМ); 9 – МСЭК (50 нМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

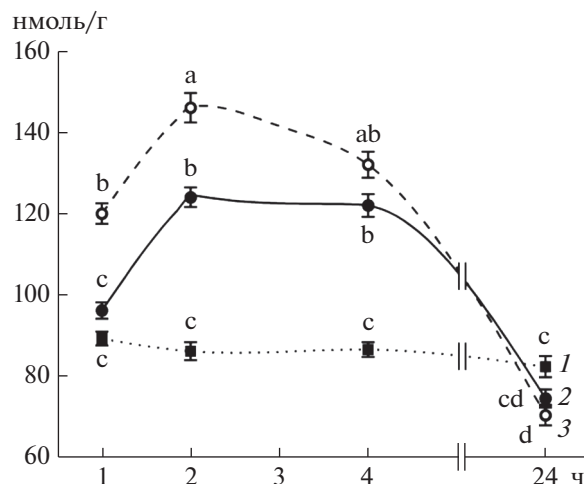


Рис. 3. Динамика содержания пероксида водорода (нмоль/г сырой массы) в корнях проростков пшеницы при действии ЭК и МСЭК: 1 – контроль; 2 – ЭК (50 нМ); 3 – МСЭК (50 нМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

вала более заметное повышение содержания H_2O_2 по сравнению с действием ЭК (рис. 3). В то же время через 24 ч экспозиции содержание пероксида водорода в корнях в вариантах с ЭК и особенно с МСЭК становилось ниже, чем в контроле, что указывает на более сбалансированную работу системы генерации и обезвреживания АФК в органах растений, обработанных БС.

Обработка корней проростков скавенджером пероксида водорода ДМТМ и ингибитором НАДФН-оксидазы имидазолом вызывала снижение в них содержания H_2O_2 (рис. 4). При этом как ДМТМ, так и имидазол, почти полностью устраняли эффекты повышения содержания H_2O_2 в корнях проростков, обработанных ЭК и МСЭК (рис. 4). Можно полагать, что усиление образования АФК под влиянием как ЭК, так и МСЭК, связано с повышением активности НАДФН-оксидазы.

Для выяснения значения АФК как сигнальных посредников в повышении теплоустойчивости проростков под действием ЭК и МСЭК изучали влияние ДМТМ и ингибитора НАДФН-оксидазы имидазола на проявление стресс-протекторных эффектов БС. Через сутки после прогрева в корнях проростков увеличивалось содержание продукта ПОЛ МДА (рис. 5а). Обработка ЭК и МСЭК уменьшала проявление эффекта окислительного стресса. ДМТМ не влияла на проявление процесса ПОЛ, но заметно уменьшала протекторные эффекты ЭК и МСЭК. При обработке имидазолом содержание МДА в корнях проростков почти не изменялось, но при этом ингибитор НАДФН-ок-

сидазы устранял вызываемое действием ЭК и МСЭК уменьшение накопления продуктов ПОЛ.

Данные по влиянию БС и антагонистов АФК на показатель окислительного стресса согласуются с изменением выживания проростков после теплового стресса. Обработка ДМТМ и имидазолом сама по себе существенно не влияла на теплоустойчивость проростков (рис. 5б). При этом защитные эффекты как ЭК, так и МСЭК,

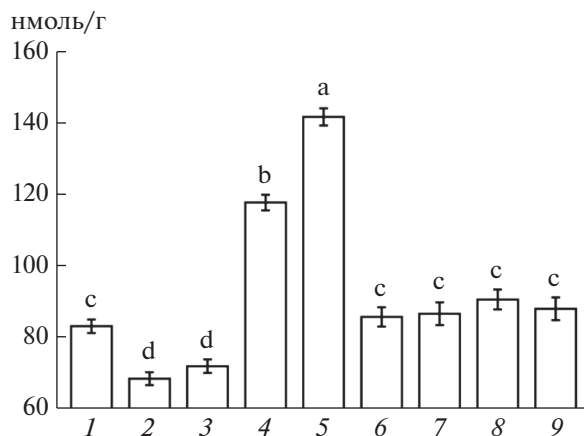


Рис. 4. Модификация влияния ЭК и МСЭК на содержание пероксида водорода в корнях проростков пшеницы обработкой ДМТМ и имидазолом: 1 – контроль; 2 – ДМТМ (150 мкМ); 3 – имидазол (10 мкМ); 4 – ЭК (50 нМ); 5 – МСЭК (50 нМ); 6 – ЭК (50 нМ) + ДМТМ (150 мкМ); 7 – МСЭК (50 нМ) + ДМТМ (150 мкМ); 8 – ЭК (50 нМ) + имидазол (10 мкМ); 9 – МСЭК (50 нМ) + имидазол (10 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

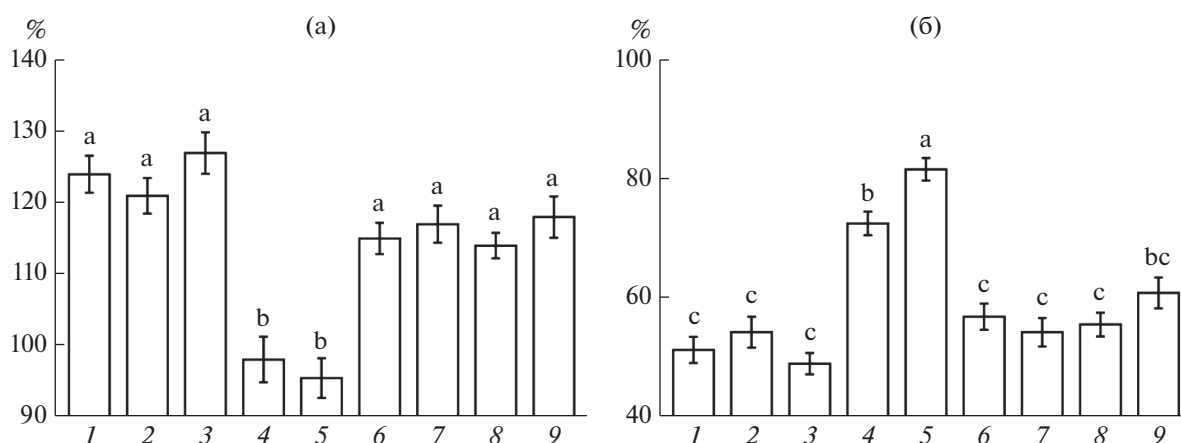


Рис. 5. Содержание МДА (% к контролю без прогрева) в корнях (а) и выживание (%) проростков пшеницы (б) после повреждающего прогрева: 1 – контроль; 2 – ДМТМ (150 мкМ); 3 – имидазол (10 мкМ); 4 – ЭК (50 нМ); 5 – МСЭК (50 нМ); 6 – ЭК (50 нМ) + ДМТМ (150 мкМ); 7 – МСЭК (50 нМ) + ДМТМ (150 мкМ); 8 – ЭК (50 нМ) + имидазол (10 мкМ); 9 – МСЭК (50 нМ) + имидазол (10 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

не проявлялись в присутствии ДМТМ. Ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол также устранял стресс-протекторное действие ЭК и МСЭК.

Смягчение проявления вызываемого прогревом эффекта окислительного стресса при обработке проростков ЭК и его салицилатом указывает на возможность активации антиоксидантной системы под влиянием как ЭК, так и его производного с СК. В связи с этим сравнили влияние ЭК и МСЭК на динамику активности антиоксидантных ферментов в корнях проростков пшеницы при их инкубации на среде с этими соединениями. Активность СОД в корнях в условиях наших экспериментов повышалась через 4 ч после начала воздействия обоих БС (рис. 6а). Однако через 24 ч значения активности СОД в этих вариантах приближались к величине контроля.

Активность каталазы через 4 ч инкубации достоверно (при $P \leq 0.05$) превышала значения в контроле только в варианте с МСЭК. Через 24 ч от начала инкубации в вариантах с обоими БС отмечались более высокие значения активности фермента. При этом эффект МСЭК оказался более заметным (рис. 6б).

Активность гваяколпероксидазы превышала соответствующие значения в контроле в вариантах с обоими БС через 4 ч инкубации (рис. 6в). Через 24 ч величина активности фермента в варианте с МСЭК также превышала соответствующие значения контроля, а в варианте с ЭК активность гваяколпероксидазы достоверно от него не отличалась.

В целом, полученные результаты указывают на более существенные изменения редокс-гомеостаза (содержания пероксида водорода и активности антиоксидантных ферментов) в корнях проростков пшеницы, обработанных МСЭК, по сравнению с эффектами природного ЭК.

Для выяснения возможного значения пероксида водорода как сигнального посредника в изменениях активности антиоксидантных ферментов исследовали влияние ЭК и МСЭК в присутствии ДМТМ и имидазола на активность в корнях каталазы и гваяколпероксидазы – ферментов, активность которых более заметно изменялась в присутствии БС (рис. 6).

Установлено, что ДМТМ и имидазол не оказывали влияния на активность каталазы (рис. 7а). При этом указанные ингибиторы почти полностью устраняли вызываемое ЭК и МСЭК увеличение активности фермента.

Также обработка ДМТМ и имидазолом не влияла на активность гваяколпероксидазы (рис. 7б). В то же время указанные ингибиторы нивелировали увеличение активности фермента, вызываемое МСЭК. В случае с ЭК ввиду слабых отличий активности гваяколпероксидазы от величин контроля, зафиксировать достоверные изменения его действия при обработке проростков ДМТМ и имидазолом не представлялось возможным.

Как уже отмечалось, к настоящему времени известно, что многие физиологические эффекты как БС, так и СК могут реализоваться с участием АФК. В экспериментах с отрезками coleoptiles пшеницы показано устранение стресс-протекторного действия экзогенных БС (ЭК и ЭК) и СК в присутствии антиоксидантов и ингибиторов НАДФН-оксидазы [14, 16]. Идентичные эффекты получены в настоящей работе на примере интактных проростков пшеницы при изучении действия на них ЭК и его салицилата. Таким образом, можно полагать, что, по крайней мере, одной из причин повышения теплоустойчивости проростков под влиянием ЭК и МСЭК является активация антиоксидантной системы, благодаря чему про-

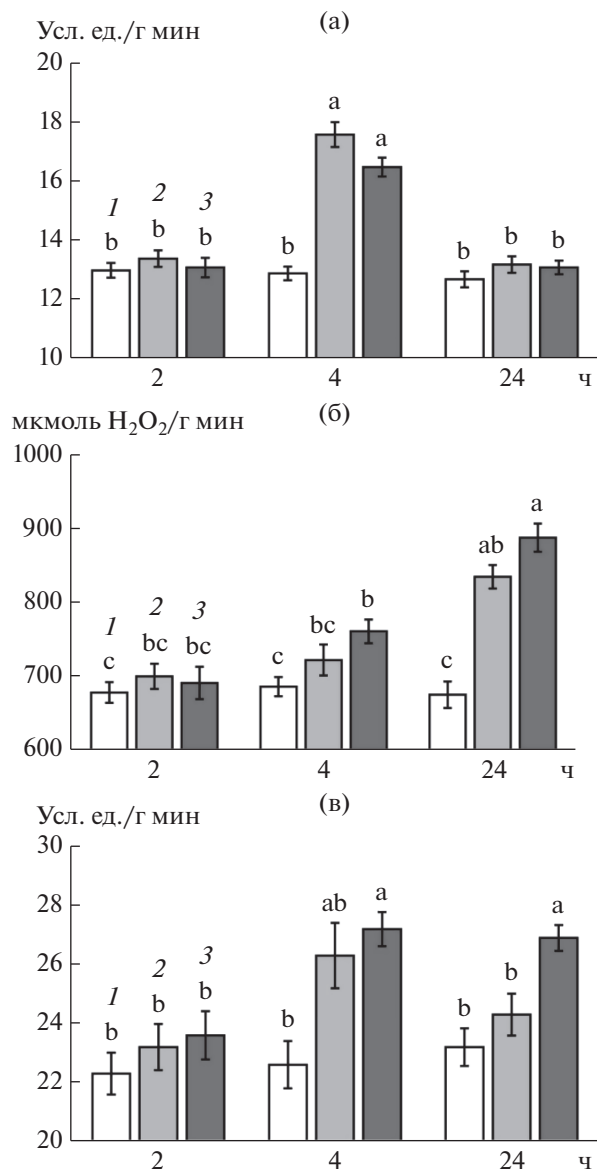


Рис. 6. Динамика активности СОД (а, усл. ед./г сырой массы мин), каталазы (б, мкмоль H_2O_2 /г сырой массы мин) и гваяколпероксидазы (в, усл. ед./г сырой массы мин) в корнях проростков пшеницы при действии ЭК и МСЭК: 1 – контроль; 2 – ЭК (50 нМ); 3 – МСЭК (50 нМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

ростки оказываются “праймированными” – подготовленными к действию стрессора.

Примечательно, что смесь ЭК и СК в оптимальных концентрациях оказывала заметное положительное влияние на теплоустойчивость проростков пшеницы (рис. 2). Однако ее влияние уступало эффекту МСЭК. Можно предположить, что в случае с МСЭК происходило “мягкое” постепенное высвобождение СК из конъюгата за счет гидролиза эфирной связи. При этом СК в низких концентрациях, возможно, выступает в

роли посредника в реализации эффекта ЭК. Как отмечалось, имеются данные, свидетельствующие о роли основного транскрипционного регулятора передачи сигналов СК белка NPR1 (non-expressor of pathogenesis related) в реализации эффектов БС [7]. Также есть сведения об усилении под влиянием БС экспрессии гена белка транскрипционного фактора WRKY70, который в сигнальных путях находится ниже NPR1 и, в свою очередь, участвует в салицилат-индуцированной экспрессии генов некоторых PR-белков [25]. С другой стороны, сообщается, что БС могут и подавлять синтез СК [8]. Возможно, что поступление свободной СК из МСЭК способствует проявлению влияния БС на экспрессию генов, причастных к формированию устойчивости к тепловому стрессу. Естественно, что для подтверждения этого предположения необходимы специальные исследования. Примечательно, что в ряде работ обнаружено сходство влияния БС и СК на теплоустойчивость растений и экспрессию генов антиоксидантных ферментов [26, 27].

Переход белка NPR1 в активное (мономерное) состояние, вероятно, происходит с участием тиоредоксинов и требует изменений редокс-гомеостаза – накопления определенного пула восстановителей [28]. Не исключено, что эти процессы могут усиливаться в присутствии БС. С другой стороны, имеются сведения, что в сети сигналинга СК помимо NPR1 принимают участие транскрипционные факторы WRKY и ряд MAP-киназ (mitogen-activated protein kinase), в том числе MPK3, MPK4 и MPK6 [29, 30], экспрессия которых считается важной для устойчивости растений к абиотическим стрессорам различной природы.

Таким образом, по крайней мере, в умеренных концентрациях возможно синергическое влияние БС и СК на функционирование стресс-протекторных систем, обеспечивающих устойчивость растений к действию абиотических стрессоров. При этом, как показывают наши экспериментальные данные, реализация эффектов МСЭК включает в себя изменения редокс-гомеостаза, в частности, транзиторное усиление зависимого от НАДФН-оксидазы синтеза АФК с последующим повышением активности антиоксидантных ферментов. Однако вопрос о том, как связаны между собой изменения окислительно-восстановительного баланса и сигнальной сети БС и СК, включающей в себя упомянутые выше регуляторные белки, пока остается открытым.

* * *

Итак, полученные результаты показали значительное индуцирование теплоустойчивости проростков пшеницы обработкой ЭК и МСЭК. Следует отметить, что стресс-протекторное действие ЭК, который является кетонсодержащим БС, по силе не уступает эффектам, обнаруженным ранее

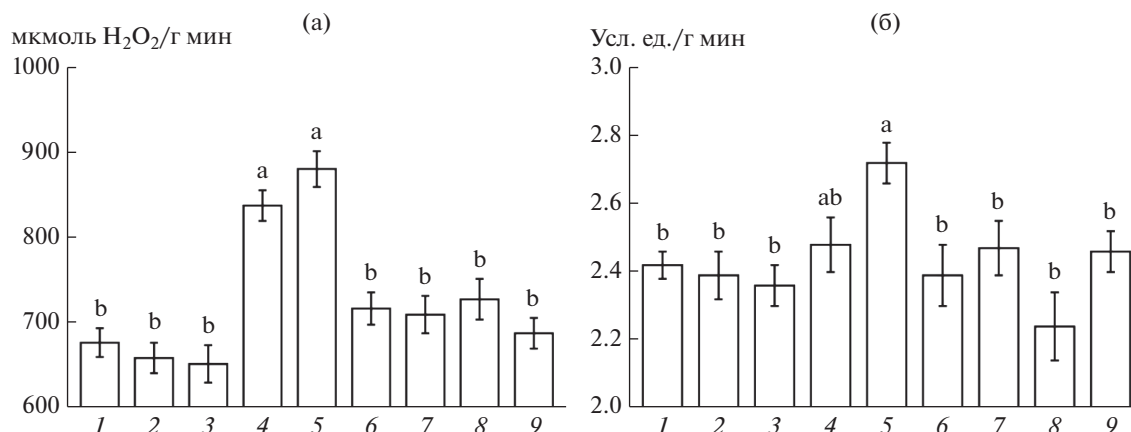


Рис. 7. Влияние ЭК, МСЭК, ДМТМ и имидазола на активность каталазы (а, мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{г}$ сырой массы мин) и гваяколпероксидазы (б, усл. ед./г сырой массы мин) в корнях проростков пшеницы: 1 – контроль; 2 – ДМТМ (150 мкМ); 3 – имидазол (10 мкМ); 4 – ЭК (50 нМ); 5 – МСЭК (50 нМ); 6 – ЭК (50 нМ) + ДМТМ (150 мкМ); 7 – МСЭК (50 нМ) + ДМТМ (150 мкМ); 8 – ЭК (50 нМ) + имидазол (10 мкМ); 9 – МСЭК (50 нМ) + имидазол (10 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при $P \leq 0.05$.

в идентичных экспериментальных условиях для ЭБ – лактонсодержащего БС [31]. Оба БС уменьшали интенсивность вызываемого нагревом процесса ПОЛ и в целом способствовали активации ферментативной антиоксидантной системы. При этом ЭБ [31] вызывал более существенное по сравнению ЭК (рис. 6а) повышение активности СОД в корнях проростков пшеницы. В то же время при обработке ЭК наблюдали повышение активности каталазы и гваяколпероксидазы (рис. 6), а после воздействия ЭБ активность каталазы не изменялась, а гваяколпероксидазы, наоборот, снижалась [31]. Похожие различия влияния ЭБ и ЭК на активность антиоксидантных ферментов показаны и у растений рапса [17]. В связи с этим есть основания констатировать наличие некоторых специфических особенностей влияния лактон- и кетонсодержащих БС на ферментативную антиоксидантную систему растений.

Проведенные исследования показали и различия физиологических эффектов природного БС (ЭК) и его салицилата БС (МСЭК). При обработке МСЭК отмечалось более существенное повышение выживания проростков пшеницы после повреждающего нагрева, чем при обработке обычным ЭК (рис. 1). Более того, обработка оказалась более эффективной по сравнению с действием смеси СК и ЭК (рис. 2). Под влиянием МСЭК происходило более существенное по сравнению с эффектом ЭК транзитное увеличение содержания пероксида водорода в корнях проростков и последующее повышение активности каталазы и гваяколпероксидазы (рис. 3, 6). При этом сквенджер пероксида водорода ДМТМ и ингибитор НАДФН-оксидазы имидазол, устраняющие индуцированный ЭК и МСЭК эффект повышения содержания пероксида водорода в корнях проростков, снимали и стресс-протекторное дей-

ствие БС (рис. 4, 5). Таким образом, пероксид водорода, по-видимому, является сигнальным посредником в реализации действия обычных БС и их конъюгатов с СК. Необходимо отметить, что для СК, как и для БС, в экспериментах с растениями разных видов показано, что в физиологических концентрациях эти фитогормоны способствуют повышению активности антиоксидантных ферментов и снижению интенсивности ПОЛ [16, 32]. Более существенное стресс-протекторное действие МСЭК по сравнению с ЭК, а также смесью ЭК и СК, может быть связано с участием СК в качестве посредника при передаче в генетический аппарат сигнала, индуцируемого действием ЭК. Можно предположить, что эффект синергизма в действии ЭК и СК реализуется в результате постепенного высвобождения СК из конъюгата и ее присутствия в клетках в низких концентрациях. Однако это предположение требует в дальнейшем непосредственной экспериментальной проверки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahanger M.A., Ashraf M., Bajguz A., Ahmad P. // J. Plant Growth Regul. 2018. V. 37. P. 1007–1024.
2. Anwar A., Liu Y., Dong R., Bai L., Yu X., Li Y. // Biol. Res. 2018. V. 51. Art. 46. doi.org/https://doi.org/10.1186/s40659-018-0195-2
3. Gruszka D. // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. № 5. P. 8740–8774.
4. Безрукова М.В., Кудоярова Г.Р., Лубянова А.Р., Масленникова Д.Р., Шакирова Ф.М. // Физиология растений. 2021. Т. 68. № 2. С. 161–169.
5. Bajguz A., Hayat S. // Plant Physiol. Biochem. 2009. V. 47. P. 1–8.
6. Аллагулова Ч.Р., Масленникова Д.Р., Авальбаев А.М., Фёдорова К.А., Юлдашев Р.А., Шакирова Ф.М. // Физиология растений. 2015. Т. 62. № 4. С. 499–505.
7. Divi U.K., Rahman T., Krishna P. // BMC Plant Biology. 2010. V. 10. P. 151–164.

8. Banerjee A., Roychoudhury A. // J. Plant Growth Regul. 2018. V. 37. P. 1025–1032.
9. Vleesschauwer D.D., Buyten E.V., Satoh K., Balidion J., Mauleon R., Choi I.-R., Vera-Cruz C., Kikuchi S., Hofte M. // Plant Physiol. 2012. V. 158. № 4. P. 1833–1846.
10. Kohli S.K., Handa N., Sharma A., Gautam V., Arora S., Bhardwaj R., Alyemeni M.N., Wijaya L., Ahmad P. // Protoplasma. 2018. V. 255. P. 11–24.
11. Hayat S., Maheshwari P., Wani A.S., Irfan M., Alyemeni M.N., Ahmad A. // Plant Physiol. Biochem. 2012. V. 53. P. 61–68.
12. Litvinovskaya R.P., Vayner A.A., Zhylitskaya H.A., Kolupaev Yu.E., Savachka A.P., Khripach V.A. // Chem. Nat. Compd. 2016. V. 52. № 3. P. 452–457.
13. Nie W.F., Wang M.-M., Xia X.-J., Zhou Y.-H., Shi K., Chen Z., Yu J.Q. // Plant Cell Environ. 2013. V. 36. № 4. P. 789–803.
14. Колупаев Ю.Е., Вайнер А.А., Ястреб Т.О., Обозный А.И., Хрипач В.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 6. С. 593–598.
15. Zhou J., Wang J., Li X., Xia X.-J., Zhou Y.-H., Shi K., Chen Z., Yu J.-Q. // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. № 15. P. 4371–4383.
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. Коломейчук Л.В., Данилова Е.Д., Хрипач В.А., Жабинский В.Н., Кузнецов В.В., Ефимова М.В. // Физиология растений. 2021. Т. 68. № 3. С. 297–307.
18. Ковтун И.С., Кухаренко Н.Е., Кузнецов В.В., Хрипач В.А., Ефимова М.В. // Физиология растений. 2021. Т. 68. № 3. С. 268–278.
19. Sung M., Hsu Y., Hsu Y. // Mar. Biotechnol. 2009. V. 11. № 2. P. 199–209.
20. Hung K.T., Hsu Y.T., Kao C.H. // Physiol. Plant. 2006. V. 127. № 2. P. 293–303.
21. Колупаев Ю.Е., Обозный А.И., Швиденко Н.В. // Физиология растений. 2013. Т. 60. № 2. С. 221–229.
22. Sagisaka S. // Plant Physiol. 1976. V. 57. № 2. P. 308–309.
23. Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Обозный А.И., Рябчун Н.И., Кириченко В.В. // Физиология растений. 2016. Т. 63. № 3. С. 346–358.
24. Фазлиева Э.Р., Киселева И.С., Жуйкова Т.В. // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 3. С. 369–375.
25. Bali S., Poonam, Gautam V., Kaur P., Khanna K., Kaur R., Vig A.P., Ohri P., Bhardwaj R. // Salicylic Acid: A Multifaceted Hormone / Eds. R. Nazar, N. Iqbal, N.A. Khan. Singapore: Springer Nature Pte, 2017. P. 201–219.
26. Nawaz F., Naeem M., Zulfiqar B., Akram A., Ashraf M.Y., Raheel M., Shabbir R.N., Hussain R.A., Anwar I., Aurangzaib M. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2017. V. 24. № 19. P. 15959–15975.
27. Vardhini B.V. // Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress: Biochemical and Molecular Perspectives. / Eds. A. Roychoudhury, D.K. Tripathi. John Wiley & Sons Inc., 2020. P. 389–412.
28. Tada Y., Spoel S.H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. // Science. 2008. V. 321. № 5891. P. 952–956.
29. Тарчевский И.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 4. С. 374–382.
30. Pedranzani H., Vigliocco A. // Mechanisms Behind Phytohormonal Signalling and Crop Abiotic Stress Tolerance. / Eds. V.P. Singh, S. Singh, S.M. Prasad S.M. N.Y.: Nova Science Publishers, 2017. P. 329–370.
31. Karpets Yu.V., Shkliarevskiy M.A., Khripach V.A., Kolupaev Yu.E. // Cereal Res. Commun. 2021. V. 49. № 2. P. 207–216.
<https://doi.org/10.1007/s42976-020-00090-5>
32. Нечаева Т.Л., Николаева Т.Н., Загоскина Н.В. // Известия РАН. Серия биологическая. 2020. № 4. С. 385–392.

ROS-Dependent Stress-Protective Effects of 24-Epicastasterone and Its Monosalicylate on Wheat Seedlings under Hyperthermia

R. P. Litvinovskaya^a, M. A. Shkliarevskiy^b, Yu. E. Kolupaev^{b,*}, A. I. Kokorev^b, and V. A. Khripach^a

^a Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220141 Belarus

^b Dokuchaev Kharkiv National Agrarian University, Kharkiv, 62483 Ukraine

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

The effect of 24-epicastasterone (EC) and its conjugate with the residue of salicylic acid (2-monosalicylate EC – MSEC) on the heat resistance of wheat seedlings was compared. The treatment of seedlings with MSEC at concentrations of 20 and 50 nM caused a more significant increase in their heat resistance compared to the action of EC, salicylic acid (SA), and their mixtures at the indicated concentrations. Under the influence of both compounds, a transient increase in the content of hydrogen peroxide in seedlings' roots was noted, but the effect of MSEC was more significant. The treatment of seedlings with MSEC caused a more noticeable increase in the activity of antioxidant enzymes (catalase and guaiacol peroxidase) in roots as compared with the action of EC. The effect of EC and its salicylate on the indicators of pro/antioxidant balance in roots cells and heat resistance of seedlings was eliminated by treatment with the antioxidant dimethylthiourea and the NADPH oxidase inhibitor imidazole. A conclusion was made about the ROS-mediated action of both the studied compounds on roots seedlings' stress-protective systems. A more significant protective effect of MSEC in comparison with EC may be associated with the gradual release of SA from the conjugate and the functional interaction of signaling pathways of brassinosteroids and SA.

Keywords: brassinosteroids, 24-epicastasterone, salicylic acid, 2-monosalicylate 24-epicastasterone, reactive oxygen species, antioxidant system, heat resistance, *Triticum aestivum*

УДК 543.645:57.083.3

РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИБИОТИКА КЛИНАФЛОКСАЦИНА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ КОНТРОЛЯ МЁДА

© 2021 г. Е. А. Зверева¹, Д. В. Сотников¹, К. А. Беличенко¹, О. Д. Гендриксон¹,
И. А. Шанин¹, 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 07.05.2021 г.

После доработки 25.06.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

Для экспрессного контроля качества и безопасности продуктов питания разработана иммунохроматографическая тест-система, обеспечивающая выявление антибиотика клинафлорксацина. В тест-системе реализован непрямой формат конкурентного иммуноанализа, в котором с немодифицированными специфическими поликлональными антителами взаимодействуют антибиотик, потенциально содержащийся в тестируемой пробе, и конъюгат антибиотик-белок, иммобилизованный на рабочей мембране тест-полоски. Выявление образующихся на мембране иммунных комплексов происходит с помощью конъюгата антивидовых антител и наночастиц золота. Определены условия проведения иммунохроматографии, обеспечивающие достижение минимального предела обнаружения. Продолжительность анализа составляет 20 мин, пределы обнаружения клинафлорксацина при инструментальной и визуальной детекции — 0.3 и 10 нг/мл соответственно. Изучена селективность тест-системы по отношению к антибиотикам из класса фторхинолонов. Для контроля контаминации мёда клинафлорксацином и структурно близкими фторхинолонами установлен оптимальный режим пробоподготовки и подтверждена эффективность разработанной тест-системы.

Ключевые слова: биоаналитические системы, иммунохроматография, контроль качества продуктов питания, мёд, антибиотики, клинафлорксацин

DOI: 10.31857/S0555109921060143

Тенденцией последних десятилетий является увеличение объемов техногенных соединений, попадающих в окружающую среду в результате хозяйственной деятельности человека и представляющих угрозу для здоровья. Среди токсичных техногенных контаминантов особый интерес представляют антибиотики, негативно влияющие на ряд физиологических процессов, а также обуславливающие распространение антибиотикорезистентных штаммов патогенных микроорганизмов [1, 2]. Из-за этих угроз предпринимаются меры по контролю схем медицинского применения антибиотиков и ограничению их использования в животноводстве. Однако в связи с регулярно выявляемыми нарушениями нормативных требований для эффективной защиты населения необходим массовый контроль антибиотиков в потребительской продукции, прежде всего — в продуктах питания. Такой контроль должен включать как первичное скрининговое тестирование недорогими аналитическими средствами непосредственно в местах отбора проб, так и последующую подтвер-

ждающую идентификацию контаминанта в специализированных лабораториях [3, 4].

Показана эффективность иммунохимических методов для скринингового контроля антибиотиков, а для подтверждающего анализа — методов газовой и жидкостной хроматографии. Однако, несмотря на наличие ряда коммерчески доступных иммуноаналитических систем для выявления и оценки содержания антибиотиков, разработка новых методик по-прежнему остается востребованной задачей. Эта востребованность обусловлена несколькими факторами: ростом числа контролируемых соединений, тенденцией к методическому упрощению и повышению производительности скринингового тестирования, необходимостью сочетать иммуноанализ с предельно простой пробоподготовкой, вплоть до простого разведения исходных проб и использования необработанных экстрактов, что требует высокочувствительного выявления иммунных комплексов на последующих стадиях [4–9].

Дополнительные сложности в разработке и практическом применении методов иммунохимического выявления и оценки содержания антибиотиков связаны с их значительным структурным разнообразием, возможностью присутствия в тестируемой пробе нескольких соединений из одного и того же класса антибиотиков с минимальными структурными отличиями, но с разной токсичностью, и, соответственно, с разными уровнями предельно допустимого содержания [10, 11]. Распространенные в настоящее время и поддерживаемые наличием промышленных технологий виды иммуноанализа — иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохроматографический анализ (ИХА) и др. — предполагают регистрацию одного интегрального сигнала, отражающего общее количество образовавшихся комплексов антиген-антитело, но не содержание в пробе конкретных иммунохимически активных соединений [10, 12]. Адекватное принятие решения о безопасности продукции на основании этого параметра требует детального учета специфичности антител, их перекрестной реактивности (ПР) по отношению к различным структурным аналогам целевого аналита, продуктам его модификации и частичной деструкции. Наличие нескольких антител к соединениям одного класса, отличающихся по ПР, существенно расширяет возможные варианты реализации иммуноанализа и повышает информативность результатов, получаемых при его проведении [7, 10, 13].

Среди различных классов антибиотиков задача поиска антител и разработки иммуноаналитических систем с разными спектрами ПР особенно важна для фторхинолонов. Группа фторхинолонов включает несколько десятков используемых антибиотиков, характеризующихся широким спектром токсических эффектов и поэтому контролируемых в продуктах питания [14, 15]. При этом нормативные требования ограничивают как суммарное содержание всех фторхинолонов, так и уровни нескольких конкретных соединений, причем их перечни, установленные в разных странах, неодинаковы [16–19]. В рамках данного исследования были оценены возможности антител, полученных против клинафлоксацина — одного из представителей фторхинолонов с циклопропильным радикалом в первом положении хинолонового ядра. Для разработки и характеристики был выбран ИХА — иммунохимический метод, активно применяемый для скринингового контроля вследствие минимальных требований к дополнительным реагентам и оборудованию. Нанесение иммунореагентов на тест-полоску для ИХА до проведения анализа сводит процедуру тестирования к погружению этой полоски в один или несколько растворов и последующей визуальной оценке наличия или инструментальной оценке интенсивности формирующихся на тест-полоске окрашенных зон [20, 21]. Аprobация тест-системы состояла в изу-

чении возможностей ее применения для контроля меда — важного элемента здорового питания с децентрализованным производством и широким спектром контролируемых токсичных контаминант [22, 23].

Цель работы — создание иммунохроматографической тест-системы для экспрессного выявления антибиотика клинафлоксацина и его ближайших структурных аналогов, а также апробация данной тест-системы для контроля контаминации меда.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали клинафлоксацин (**КЛИ**), гареноксацин (**ГАР**), гатифлоксацин (**ГАТ**), данофлоксацин (**ДАН**), дифлоксацин (**ДИФ**), левофлоксацин (**ЛЕВ**), ломефлоксацин (**ЛОМ**), марбофлоксацин (**МАР**), моксифлоксацин (**МОКС**), наdifлоксацин (**НАД**), налидиксовую кислоту (**НАЛ**), оксолиниевую кислоту (**ОКСО**), орбифлоксацин (**ОРБ**), пазуфлоксацин (**ПАЗ**), пефлоксацин (**ПЕФ**), пипемидовая кислота (**ПИП**), руфлоксацин (**РУФ**), сарафлоксацин (**САР**), тосуфлоксацин (**ТОС**), флюмеквин (**ФЛЮ**), ципрофлоксацин (**ЦИП**), эноксацин (**ЭНО**), энрофлоксацин (**ЭНРО**), бычий сывороточный альбумин (**БСА**), овальбумин (**ОВА**), боргидрид натрия, глутаровый альдегид, детергент Triton X-100, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и триэтиламин — все производства “Sigma-Aldrich”, (США), золотохлористоводородную кислоту (“Fluka”, США), антитела козы против иммуноглобулинов кролика (**АКоКр**), антитела кролика против иммуноглобулинов козы (**АКрКо**) (“Arista Biologicals”, США), антитела против иммуноглобулинов кролика, меченные пероксидазой (“Jackson ImmunoResearch”, Великобритания). Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щелочи и органические растворители) были аналитической или химической чистоты.

Растворы для синтеза наночастиц золота (**НЧЗ**) и межмолекулярных конъюгатов готовили на воде, деионизированной с помощью установки Milli-Q (“Millipore”, США). Исходные растворы фторхинолонов готовили в метаноле (“Fluka”, США). ИФА проводили в 96-луночных полистироловых микропланшетах Costar 9018 (“Corning Costar”, США).

Получение поликлональных антител. Кроличьи поликлональные антитела против КЛИ (**ПАт КЛИ**) были получены в соответствии с методиками, представленными в [24]. Для иммунизации использовали самцов кроликов породы “Калифорнийский кролик” в возрасте 3 мес. Животных иммунизировали с интервалом 2 нед. свежеприготовленной эмульсией белкового конъюгата с полным адъювантом Фрейнда для первой иммунизации и с неполным адъювантом Фрейнда для последующих, смешивая компоненты в отношении 1 : 1 по

объему. Забор крови проводили из краевой вены уха с помощью вакуумных пробирок с гелем и активатором свертывания. Сыворотку отделяли центрифугированием и выделяли фракцию IgG осаждением насыщенным раствором сульфата аммония при 4°C. Полученную фракцию растворяли в 50 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 100 мМ NaCl (ФБС), смешивали с глицерином 1 : 1 и хранили при –20°C.

Синтез конъюгата клинофлораксина с овальбумином (КЛИ-ОВА). Конъюгат синтезировали в соответствии с методикой [25]. В колбу при перемешивании вносили 8 мл деионизированной воды, 5 мг ОВА, 2.2 мг КЛИ, 20 мкл триэтиламина и 23 мкл глутарового альдегида. Смесь инкубировали в темноте при постоянном перемешивании и комнатной температуре в течение часа, вносили 0.5 мл 0.22%-ного раствора боргидрида натрия и инкубировали еще 30 мин. Полученный конъюгат диализовали против ФБС и хранили при –20°C.

Конкурентный ИФА клинофлораксина. В лунки микропланшета вносили по 100 мкл конъюгата КЛИ–ОВА в концентрации 1 мкг/мл в ФБС и проводили сорбцию в течение 16 ч при 4°C. После этого микропланшет четырехкратно промывали ФБС, содержащим 0.05% детергента Тритон Х-100 (ФБСТ), вносили в лунки по 50 мкл раствора КЛИ (от 10 мкг/мл до 0.01 нг/мл) в ФБСТ и добавляли по 50 мкл ПАт КЛИ в разведении 1 : 100 000. Микропланшет инкубировали в течение 60 мин при 37°C, четырехкратно промывали ФБСТ и вносили в лунки по 100 мкл антител против иммуноглобулинов кролика, меченных пероксидазой, в разведении 1 : 5000. После часовой инкубации при 37°C микропланшет четырехкратно промывали ФБСТ и определяли активность пероксидазной метки. Для этого во все лунки вносили по 100 мкл субстратного раствора (0.42 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и 1.8 мМ H₂O₂ в 0.1 М цитратном буфере, pH 4.0), инкубировали при комнатной температуре и останавливали реакцию добавлением 1 М H₂SO₄ (50 мкл на лунку). Оптическую плотность (ОП) продукта реакции измеряли при 450 нм с использованием микропланшетного фотометра Zenyth 3100 ("Anthos Labtec Instruments", Австрия).

Синтез наночастиц золота. Синтез НЧЗ проводили в соответствии с методикой, описанной в работе [26]. В коническую колбу с обратным холодильником вносили 48.75 мл деионизированной воды, 0.5 мл 1%-ного раствора золотохлористоводородной кислоты, доводили до кипения и добавляли 0.75 мл 1%-ного раствора цитрата натрия. Полученную смесь кипятили при перемешивании в течение 25 мин и охлаждали. Препараты НЧЗ хранили при 4°C.

Синтез конъюгатов НЧЗ с антителами. В соответствии с методикой [27] для определения концентрации ПАт, используемой при конъюгировании

с НЧЗ, готовили серию водных растворов ПАт КЛИ и АКоКр (от 200 до 0.5 мкг/мл). В эппендорфах смешивали 1 мл НЧЗ (ОП₅₂₀ = 1.0), 100 мкл каждого раствора антител и инкубировали 20 мин при перемешивании. После этого вносили в эппендорфы по 100 мкл 10%-ного раствора хлорида натрия, инкубировали 10 мин и измеряли ОП₅₂₀. Для конъюгирования с НЧЗ были выбраны концентрации ПАт КЛИ 6 мкг/мл и АКоКр 8 мкг/мл.

Перед проведением конъюгирования антитела диализовали против 10 мМ трис-НСl буфера, pH 8.5, в течение 2 ч при 4°C. Раствор НЧЗ с ОП₅₂₀ = 1.0 доводили до pH 8.5 с помощью 0.1 М карбоната калия, смешивали с антителами, инкубировали при комнатной температуре и перемешивании в течение 45 мин. После этого в смесь вносили БСА до конечной концентрации 0.25% и инкубировали 15 мин. Конъюгаты осаждали центрифугированием при 8500 g в течение 15 мин при 4°C и ресуспендировали в 10 мМ трис-буфере, pH 8.5, содержащем 1% БСА, 1% сахарозы и 0.1% азида натрия (ТБСА). Полученные конъюгаты хранили при 4°C.

Изготовление иммунохроматографических тест-полосок. Для производства тест-полосок использовались нитроцеллюлозная мембрана CNPC с размером пор 15 мкм (CNPC-SS12), мембрана под образец GFB-R4, стекловолоконная мембрана PT-R7 и адсорбционная мембрана AP045 ("Advanced Microdevices", Индия), а также нитроцеллюлозная мембрана HF090 ("Millipore", США).

Тест-полоски для прямой схемы ИХА. Аналитическую зону тест-полоски формировали нанесением конъюгата КЛИ-ОВА (0.5 мг/мл), контрольную зону – АКоКр (0.15 мг/мл). Конъюгат ПАт КЛИ-НЧЗ в ТБСА, содержащем 0.05% Твин-20 (ТТБСА), наносили на мембрану PT-R7 в разведении, соответствующем ОП₅₂₀ = 2.0.

Тест-полоски для непрямой схемы ИХА (полной). Аналитическую зону тест-полоски формировали нанесением конъюгата КЛИ-ОВА (0.5 мг/мл), контрольную зону – АКрКо (0.15 мг/мл). Конъюгат АКоКр-НЧЗ в ТТБСА наносили на мембрану PT-R7 в разведении, соответствующем ОП₅₂₀ = 2.0.

Тест-полоски для непрямой схемы ИХА (укороченной). Аналитическую зону тест-полоски формировали нанесением конъюгата КЛИ-ОВА (0.6 мг/мл), контрольную зону – АКрКо (0.25 мг/мл). В данную комплектацию мембрана под образец и стекловолоконная мембрана не входят.

После нанесения иммунореагентов с помощью автоматического диспенсера IsoFlow ("Imagene Technology", США) нитроцеллюлозную мембрану сушили 24 ч при комнатной температуре и 5 ч при 37°C. Высушенный и склеенный мембранный комплекс нарезали на тест-полоски шириной 3.0 мм с помощью автоматического гильотинного нарезчика Index Cutter-1 ("A-Point Technologies", США).

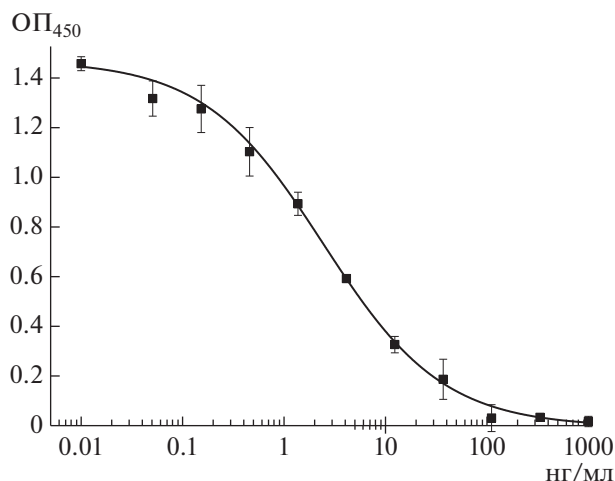


Рис. 1. Калибровочный график определения КЛИ методом ИФА.

Проведение ИХА. Прямая схема анализа. В лунку микропланшета вносили 100 мкл тестируемой пробы (растворы КЛИ разной концентрации в ФБСТ) и погружали тест-полоску в вертикальном положении. Через 15 мин контролировали результат анализа.

Непрямая схема анализа (полная). В лунку микропланшета вносили 50 мкл тестируемой пробы (растворы КЛИ разной концентрации в ФБСТ) и 50 мкл ПАТ КЛИ в разведении 1 : 4000 в ФБСТ, инкубировали 5 мин, погружали тест-полоску в вертикальном положении и контролировали результат анализа через 15 мин.

Непрямая схема анализа (укороченная). В лунку микропланшета вносили 25 мкл пробы (растворы КЛИ разной концентрации в ФБСТ или экстракты мёда) и 25 мкл ПАТ КЛИ в разведении 1 : 4000 в ФБСТ, инкубировали 5 мин и погружали тест-полоску в вертикальном положении. После 5 мин инкубации тест-полоску переносили в лунку с 40 мкл раствора АКоКр-НЧЗ с ОП₅₂₀ = 2.0 и контролировали результат через 15 мин.

Регистрацию результатов ИХА проводили с помощью сканера CanoScan LiDE 90 (“Canon”, Япония). Оценку интенсивности окрашивания аналитических зон проводили, обрабатывая изображения с помощью программы TotalLab (“Nonlinear Dynamics”, Великобритания).

Приготовление экстрактов меда. Экстракты получали по схемам, изложенным в табл. 2. Схема № 4 соответствовала рекомендациям производителей тест-систем RIDASCREEN ELISA (“R-Biopharm”, Германия).

Приготовление проб мёда с известным содержанием КЛИ. Для оценки полноты определения содержания КЛИ методом “добавлено — выявлено” к 1.0 г мёда добавляли стандартный раствор КЛИ в таком объеме, чтобы содержание КЛИ в экстракте составили 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 нг/мл.

Обработка результатов ИФА и ИХА. Для аппроксимации полученных концентрационных зависимостей использовали программу Origin 8.5.1 (“OriginLab”, США) и четырехпараметрическую сигмоидную функцию $y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D$. В качестве предела обнаружения (для ИХА — инструментальный предел обнаружения) рассматривали концентрацию КЛИ, вызывающую 10%-ное ингибирование аналитического сигнала.

Специфичность ИХА оценивали по величине процента перекрестного реагирования (ПР) с другими представителями фторхинолонов, исходя из концентраций, вызывающих 50%-ное ингибирование аналитического сигнала (IC₅₀):

$$\text{ПР (фторхинолон) \%} = \frac{\text{IC}_{50}(\text{КЛИ})}{\text{IC}_{50}(\text{фторхинолон})}.$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика специфических иммунореагентов. Поликлональные кроличьи антитела против КЛИ в сочетании с конъюгатом КЛИ-ОВА тестировали методом ИФА и отбирали антитела, характеризовавшиеся минимальным пределом обнаружения КЛИ. Согласно полученной в ИФА концентрационной зависимости аналитического сигнала (ОП₄₅₀) для лучшего препарата (рис. 1), предел обнаружения КЛИ составил 0.6 нг/мл, что свидетельствовало о возможности использования антител для разработки чувствительного иммунохроматографического анализа.

В качестве маркера в ИХА использовали наночастицы золота, которые синтезировали, восстанавливая цитратом натрия золотохлористоводородную кислоту [26]. Размерные характеристики НЧЗ определяли с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Наночастицы имели сферическую форму и средний диаметр, равный 30 нм.

Были синтезированы конъюгаты с НЧЗ специфических ПАТ КЛИ, а также антител козы против иммуноглобулинов кролика (АКоКр). Концентрацию антител для конъюгирования определяли на основании флоккуляционных кривых — зависимостей оптической плотности конъюгата от концентрации антител в растворе с высокой ионной силой [27]. Выбранные концентрации, соответствовавшие выходу флоккуляционных кривых на плато, то есть стабилизации коллоида белком при его потенциальной монослойной иммобилизации, составляли 6 мкг/мл для ПАТ КЛИ и 8 мкг/мл для АКоКр.

Реализация прямой схемы конкурентного ИХА клинафлоксацина. Показано, что конкурентное взаимодействие ПАТ КЛИ, конъюгированных с НЧЗ, со свободным КЛИ пробы и КЛИ-ОВА, иммобилизованным в аналитической зоне тест-полоски, отсутствовало — аналитическая зона окрашивалась независимо от концентрации КЛИ.

Таблица 1. Оптимизация непрямой схемы ИХА клинафлоксацина

Оптимизируемый параметр	Интервал изменений параметра	Оптимальное значение параметра
Концентрация КЛИ-ОВА в аналитической зоне	0.3–1.0 мг/мл	0.6 мг/мл
Разведение ПАТ КЛИ	1 : 1000–1 : 5000	1 : 2000
Концентрация конъюгата АКоКр-НЧЗ	ОП ₅₂₀ = 1.0–4.0	ОП ₅₂₀ = 2.0
Продолжительность предынкубации	2–8 мин	5 мин

При этом конъюгат ПАТ КЛИ-НЧЗ хорошо взаимодействовал со свободным КЛИ и иммобилизованным КЛИ-ОВА в ИФА. Таким образом, в условиях проведения прямой схемы ИХА влияние КЛИ, содержащегося в пробе, на аналитический сигнал было недостаточным для выявления КЛИ. Поэтому схема прямого ИХА не использовалась в последующей работе.

Реализация непрямой схемы конкурентного ИХА клинафлоксацина. В отличие от прямого взаимодействия меченых антител и антигенных препаратов, данная схема предполагала использование конъюгата АКоКр-НЧЗ, который реагировал со специфическим комплексом, образованным в аналитической зоне (конъюгат КЛИ-ОВА + ПАТ КЛИ), и обеспечивал возможность визуализации этого комплекса.

В тест-системе, в которой все иммунореагенты были нанесены на тест-полоску, достаточного для определения КЛИ количества детектируемых комплексов не образовывалось. Аналитическая зона слабо окрашивалась в первые минуты, после чего окраска исчезала независимо от концентрации антигена. Это могло быть связано с нестабильностью иммунных комплексов, образующихся в предложенной динамической системе.

Конкурентная детекция КЛИ была возможна только при использовании укороченных тест-полосок, в которых отсутствовали стекловолоконная мембрана и мембрана под образец. На первом этапе анализа КЛИ, содержащийся в пробе, взаимодействовал со специфическими ПАТ, после чего в смесь вносили тест-полоску для связывания непрореагировавших (незаблокированных антигеном) ПАТ в аналитической зоне. На заключительном этапе тест-полоску переносили в раствор конъюгата АКоКр-НЧЗ и инкубировали для формирования на рабочей мембране окрашенных иммунных комплексов.

В данной системе для формирования контрольной зоны использовали поликлональные антитела кролика против иммуноглобулинов козы (АКрКо), которые эффективно связывали АКоКр-НЧЗ. В аналитической зоне тест-полоски был иммобилизован конъюгат КЛИ-ОВА.

Оптимизация условий проведения ИХА была направлена на достижение минимального предела определения КЛИ. Для этого варьировали концентрацию конъюгата КЛИ-ОВА в аналитической

зоне, концентрацию специфических антител, продолжительность инкубации (см. табл. 1). Низкий предел обнаружения КЛИ в сочетании с интенсивным окрашиванием аналитической и контрольной зон достигались при нанесении АКрКо в концентрации 0.2 мг/мл, КЛИ-ОВА в концентрации 0.6 мг/мл и использовании ПАТ КЛИ в разведении 1 : 2000. Выбранная концентрация конъюгата АКоКр-НЧЗ, соответствовавшая ОП₅₂₀ = 2.0, обеспечивала минимальный расход конъюгата для количественно воспроизводимых значений интенсивности окрашивания обеих зон.

Были протестированы два вида рабочих мембран – CNPC-SS12 и Millipore HF090. В дальнейшей работе использовали мембрану CNPC-SS12, поскольку на ней аналитическая зона окрашивалась более равномерно.

Проведена оптимизация продолжительности стадий анализа. Показано, что 5-минутная предынкубация ПАТ КЛИ и пробы перед контактом с тест-полоской достаточна для образования стабильного иммунного комплекса в аналитической зоне. Сокращение этой стадии приводило к снижению интенсивности окрашивания аналитической зоны и ухудшению чувствительности.

Таким образом, минимальная выявляемая концентрация КЛИ достигалась при продолжительности

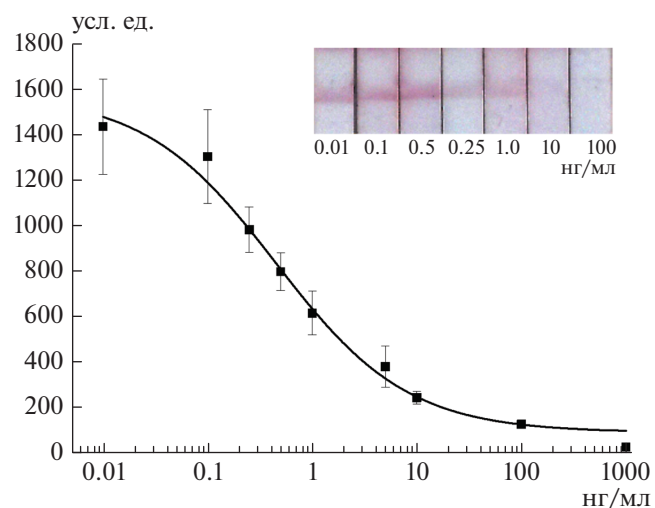
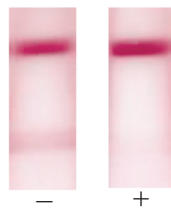
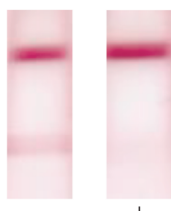
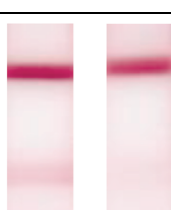
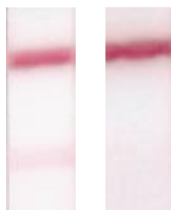
**Рис. 2.** Калибровочный график ИХА КЛИ (непрямая схема) в ФБСТ ($n = 3$).

Таблица 2. Иммунохроматографическое определение клинафлоксацина в мёде при различной пробоподготовке

Схемы пробоподготовки для 1 г мёда		Результаты тестирования отрицательной (“–”) и положительной (“+”, 10 нг/мл КЛИ) проб мёда
1.	Перемешивание 10 мин с 2 мл ФБСТ	 – +
2.	Перемешивание 10 мин с 4 мл ФБСТ	 – +
3.	Перемешивание 10 мин с 9 мл ФБСТ	 – +
4.	Перемешивание 10 мин с 2 мл воды и 2 мл этилацетата, центрифугирование 10 мин при 3000 g. Верхняя фракция отбирается, выпаривается при 60°C и перерастворяется в ФБСТ	 – +

сти анализа 20 мин, включавшего предынкубацию Пат КЛИ и пробы (5 мин), инкубации тест-полоски с этой смесью (5 мин) и с АКоКр-НЧЗ (10 мин). Калибровочная кривая ИХА (рис. 2) характеризовалась пределами обнаружения КЛИ при инструментальной и визуальной детекции, равными 0.3 и 10 нг/мл, соответственно.

Специфичность тест-системы. Тестирование разработанной иммунохроматографической системы для определения других фторхинолонов позволило выделить следующие группы по степени перекрестной реактивности:

– высокая (ПР > 40%): ПЕФ – 54%, ПИП – 51%, ЭНРО – 50%, ГАР – 41%, ДАН – 41%;

– средняя (от 10 до 40%): ГАТ – 23%, НАД – 22%, МОКС – 20%, РУФ – 18%, ЛОМ – 17%, МАР – 14%, САР – 12%, ОРБ – 12%, ЭНО – 11%;

– низкая (менее 10%): ФЛЮ – 8%, ОКСО – 7%, ЛЕВ – 5%, НАЛ – 5%, ПАЗ – 3%, ЦИП – 2%.

Для двух фторхинолонов (ТОС, ДИФ) достоверное влияние на связывание в изученных диапазонах концентраций не наблюдалось, то есть ПР не превышала 0.1%.

Отметим, что для всех фторхинолонов, содержащих циклопропильный радикал в первом положении хинолонового ядра, кроме ципрофлоксацина, величина ПР составляла не менее 20%, что позволило рассматривать разработанную тест-систему как средство интегрального выявления данной подгруппы фторхинолонов, включавшей КЛИ, ЭНРО, ГАР, ДАН, ГАТ и МОКС.

Определение КЛИ в мёде. Существующие методики пробоподготовки при иммунодетекции антибиотиков разных классов в мёде можно разделить на две основные группы: разбавление бу-

Таблица 3. Степень выявления клинафлоксацина в мёде методом ИХА

Введено, нг/мл	Определено по калибровочному графику			
	в ФБСТ		в разбавленном (1 : 2) мёде	
	нг/мл	%	нг/мл	%
0.5	1.1	220	0.6	120
1.0	1.3	130	0.9	90
2.0	2.5	120	1.9	95
5.0	5.7	114	4.9	98

ферными растворами [28, 29] и экстракция органическими растворителями [30, 31].

Для выбора методики, эффективно сочетающейся с возможностями разработанной тест-системы, были рассмотрены варианты разбавления проб мёда ФБСТ в объемных соотношениях 1 : 2 (экстракт № 1), 1 : 4 (экстракт № 2) и 1 : 9 (экстракт № 3), а также экстракции аналита этилацетатом по методике, рекомендованной производителями иммуноферментных тест-систем на фторхинолоны RIDASCREEN ELISA (“R-Biopharm”, Германия) (экстракт № 4). Показано, что разработанная тест-система позволяла определять КЛИ в полученных экстрактах в интервале от 0.5 до 10 нг/мл (табл. 2).

Одна из основных характеристик ИХА — экспрессность. Поэтому была подобрана методика, которая позволяла проводить пробоподготовку быстро и эффективно, с использованием минимального числа стадий, а именно — разбавление проб мёда в ФБСТ в соотношении 1 : 2 (экстракт № 1, рис. 3). Дальнейшее уменьшение количества ФБСТ, вносимого в пробу, было нецелесообразно, поскольку в таких случаях разбавленный мёд сохранял

высокую вязкость, что затрудняло движение пробы по рабочей мембране тест-полоски.

При оценке степени выявления КЛИ в тестируемых пробах были сопоставлены результаты, полученные с использованием двух калибровочных кривых — в ФБСТ и в разбавленном в соотношении 1 : 2 мёде. Как следует из табл. 3, оба подхода давали приемлемые результаты. Хотя получение калибровочной кривой в ФБСТ облегчало процесс тестирования, более точные величины наблюдались при работе со второй калибровочной кривой, отражавшей особенности матрикса проб.

Таким образом, впервые разработана методика иммунохроматографического определения антибиотика клинафлоксацина, одного из потенциальных контаминантов мёда. Методика характеризовалась пределами инструментального обнаружения 0.3 нг/мл и визуальной детекции 10 нг/мл, существенно более низкими по сравнению с нормативными требованиями для фторхинолонов — до 100 нг/мл [16–19]. Широкая специфичность тест-системы позволяет использовать ее для выявления ряда фторхинолоновых антибиотиков — КЛИ, ЭНРО, ГАР, ДАН, ГАТ и МОКС.

Авторы выражают благодарность А.А. Рязанову (ФИЦ Биотехнологии РАН) за помощь в характеристике специфичности тест-системы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-76-10033).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bengtsson-Palme J., Kristiansson E., Larsson D.G.J. // FEMS Microbiol. Rev. 2018. V. 42. № 1. P. 80–68.
2. Kraemer S.A., Ramachandran A., Perron G.G. // Microorganisms. 2019. V. 7. № 6. Article 180. <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/6/180>
3. Chen J., Ying G.G., Deng W.J. // J. Agric. Food Chem. 2019. V. 67. № 27. P. 7569–7586.
4. Ahmed S., Ning J.N., Peng D.P., Chen T., Ahmad I., Ali A., Lei Z.X., Shabbir M.A., Cheng G.Y., Yuan Z.H. // Food Agric. Immunol. 2020. V. 31. № 1. P. 268–290.
5. Wang Q., Zhao W.M. // Sens. Actuators B. 2018. V. 269. P. 238–256.

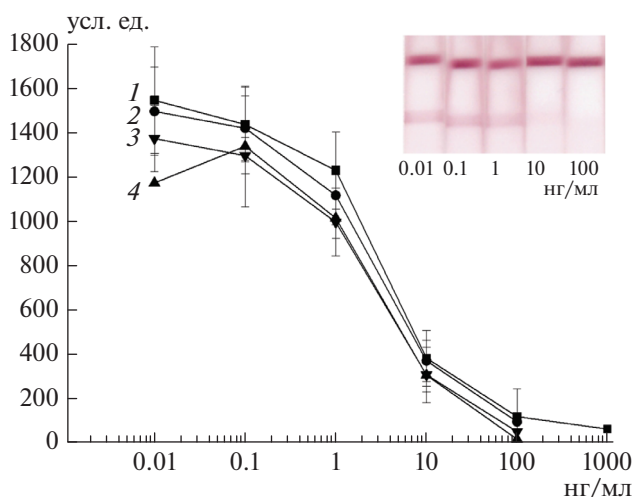


Рис. 3. Иммунохроматографическое определение КЛИ (непрямая схема) в экстрактах мёда. Калибровочные графики в ФБСТ (1), экстрактах № 1 (2), № 2 (3) и № 3 (4).

6. Anfossi L., Di Nardo F., Cavallera S., Giovannoli C., Baggiani C. // *Biosensors* (Basel). 2018. V. 9. № 1. Article 2. <https://www.mdpi.com/2079-6374/9/1/2>
7. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2014. V. 55. P. 81–93.
8. Bishop J.D., Hsieh H.V., Gasperino D.J., Weigl B.H. // *Lab on Chip*. 2019. V. 19. № 15. P. 2486–2499.
9. Liu L., Yang D., Liu G. // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 136. P. 60–75.
10. Li Y.F., Sun Y.M., Ross C.B., Lei H.T., Gee S., Hammock B.D., Wang H., Wang Z., Sun X., Shen Y.D., Yang J.Y., Xu Z.L. // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2017. V. 88. P. 25–40.
11. Majdinasab M., Mishra R.K., Tang X., Marty J.L. // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2020. V. 127. Article 115883. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993620301126>
12. Wild D. *The Immunoassay Handbook. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*. 4th Ed. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science. 2013. P. 29–242.
13. Shanin I.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Godjevargova T., Eremin S. A. // *Bulgar. Chem. Commun.* 2019. V. 51. Special Issue D. P. 27–31.
14. Filloux C., Geniaux H., Buxeraud J. // *Actual. Pharmaceut.* 2019. V. 58. № 588. P. 53–55.
15. Drlica K., Hiasa H., Kerns R., Malik M., Mustaev A., Zhao X.L. // *Curr. Topics Med. Chem.* 2009. V. 9. № 11. P. 998–981.
16. Технический регламент Таможенного Союза “О безопасности пищевой продукции” ТР ТС 021/2011. М.: Центрмг, 2021. 261 с.
17. *Evaluation of Certain Contaminants in Food; Technical Report Series*; Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2011. P. 153–316.
18. *Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods CX/MRL (2-2018)*; FAO/WHO. Codex Alimentarius, International Food Standards: Rome, Italy, 2018. P. 1–46.
19. *Chinese National Food Safety Standard for Maximum Levels of Contaminants in Foods* (GB 2762-2017). Beijing: National Health and Family Planning Commission, National Medical Products Administration of China. 2017. P. 1–19.
20. Pohanka M. // *Int. J. Anal. Chem.* 2021. V. 2021. Article 6685619. <https://www.hindawi.com/journals/ijac/2021/6685619/>
21. Parolo C., Sena-Torralba A., Bergua J.F., Calucho E., Fuentes-Chust C., Hu L.M., Rivas L., Alvarez-Diduk R., Nguyen E.P., Cinti S., Quesada-Gonzalez D., Merkoci A. // *Nature Prot.* 2020. V. 15. № 12. P. 3816–3788.
22. Zhang Y., Li X.Q., Li H.M., Zhang Q.H., Gao Y., Li X.J. // *TrAC Trends Anal. Chem.* 2019. V. 110. P. 356–344.
23. Fakhlaei R., Selamat J., Khatib A., Razis A.F.A., Sukor R., Ahmad S., Babadi A.A. // *Foods*. 2020. V. 9. № 11. Article 1538. <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/11/1538>
24. Byzova N.A., Smirnova N.I., Zherdev A.V., Eremin S.A., Shanin I.A., Lei H.T., Sun Y., Dzantiev B.B. // *Talanta*. 2014. V. 119. P. 125–132.
25. Шанин И.А., Зверева Е.А., Ерёмин С.А., Свиридов О.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 5. С. 513–520.
26. Frens G. // *Nat. Phys. Sci.* 1973. V. 241. P. 20–22.
27. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B. // *Talanta*. 2010. V. 81. № 3. P. 843–848.
28. Wang Z., Hu S., Bao H., Xing K., Liu J., Xia J., Lai W., Peng J. // *J. Sci. Food Agric.* 2021. V. 101. № 2. P. 684–692.
29. Guo L., Wu X., Liu L., Kuang H., Xu C. // *Biotechnol. J.* 2020. V. 15. № 1. Article 1900174. <https://doi.org/10.1002/biot.201900174>
30. Zhao L., Li J., Li Y., Wang T., Jin X., Wang K., Rahman E., Xing Y., Ji B., Zhou F. // *Food Chem.* 2017. V. 229. P. 439–444.
31. Wang S., Liu J., Yong W., Chen Q., Zhang L., Dong Y., Su H., Tan T. // *Talanta*. 2015. V. 131. P. 562–569.

Development of an Immunochromatographic Test System for Detecting Antibiotic Clinafloxacin and Its Application for Honey Control

E. A. Zvereva^a, D. V. Sotnikov^a, K. A. Belichenko^a, O. D. Hendrickson^a,
I. A. Shanin^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*

For rapid control of food quality and safety, an immunochromatographic test system has been developed to detect the antibiotic clinafloxacin. The test system implements an indirect competitive immunoassay format, in which an antibiotic potentially contained in the tested sample and an antibiotic-protein conjugate immobilized on the working membrane of the test strip interact with unmodified specific polyclonal antibodies. The detection of immune complexes formed on the membrane occurs using a conjugate of anti-species antibodies and gold nanoparticles. The conditions for immunochromatography, which ensure the minimum detection limit, have been determined. The time of the assay is 20 min, the detection limits of clinafloxacin for instrumental and visual detection are 0.3 ng/mL and 10 ng/mL, respectively. The selectivity of the test system in relation to antibiotics from the class of fluoroquinolones has been studied. To control the contamination of honey with clinafloxacin and structurally related fluoroquinolones, an optimal sample preparation mode was established and the effectiveness of the developed test system was confirmed.

Keywords: bioanalytical systems, immunochromatography, food quality control, honey, antibiotics, clinafloxacin

УДК 577.112:616

ПРОТЕОМНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БИОМАРКЕРОВ НЕМЯСНЫХ КОМПОНЕНТОВ В МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ

© 2021 г. Л. И. Ковалёв¹ *, М. А. Ковалёва¹, Л. А. Новикова¹, И. М. Чернуха²

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр

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

²Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук, Москва, 109316 Россия

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

Поступила в редакцию 07.06.2021 г.

После доработки 30.06.2021 г.

Принята к публикации 02.07.2021 г.

При анализе эталонных и коммерческих образцов мясной продукции (вареной и консервированной) классическим методом двумерного электрофореза по О’Фарреллу идентифицировано 10 производных белков или их фрагментов, которые являлись компонентами сои, молока, яиц, тыквы и подсолнечника. Именно они могут быть биоиндикаторами в незаявленных добавках при разработке более экспрессных и чувствительных методов контроля качества.

Ключевые слова: контроль состава мясной продукции, биоиндикаторы немышечных добавок, протеомика

DOI: 10.31857/S0555109921060076

В процессе изготовления различных видов мясной продукции в некоторых случаях используется, целый ряд белковых добавок немышечного происхождения, включающих белки яиц, молока и продуктов растительного происхождения сои, пшеницы, риса, овса, тыквы и др.

Состав коммерческого продукта всегда официально регламентирован соответствующими государственными стандартами или техническими условиями производителя. В них устанавливается предельное содержание всех компонентов, включая немышечного происхождения, присутствие или превышение уровня которых можно рассматривать как фальсификацию или нарушение условий производства.

Контроль качества таких пищевых продуктов подразумевает использование методов, позволяющих выявить специфические компоненты немышечного происхождения и оценить их качественное и количественное содержание в изготовленной продукции.

В настоящее время основная часть таких белковых добавок проходит этапы дополнительной подготовки, что в итоге приводит к потере ими части аминокислотной последовательности, а дальнейшая термообработка (вареные колбасы до 90°C, а консервы до 115°C и давлении 0.23 МПа) в присутствии посолочно-нитритной смеси может

вызвать и термохимические модификации в сохранных аминокислотных структурах добавок, что еще более затрудняет выбор биоиндикаторов для контроля.

Одна из таких наиболее распространенных растительных добавок — добавка из соевых бобов. Как правило, в настоящее время они используются в виде соевого изолята или текстурата в виду большей технологичности. В то же время, соя, как и многие другие немышечные добавки (пшеничная мука, молоко, яйцо и продукты их переработки) входит в перечень аллергенов, присутствие которых в продукции должно строго контролироваться и выноситься на этикетку согласно ТР ТС 022/2011 (“Пищевая продукция в части ее маркировки”) [1].

Попытки использовать соевые белки как мишени ненормативных добавок предпринимались неоднократно, в частности для β-конглицинина [2], разных видов глицининов [3], ингибиторов трипсина типа Баумана-Бирка и Кунитца [4]. Такие разработки методов контроля ненормативных добавок в мясную продукцию продолжают и сейчас. В настоящее время существуют два наиболее конкурирующих метода по производительности и цене — это “скорострельная”, она же панорамная, протеомика — “shotgun” [5] и иммуноферментный анализ [6]. Для панорамной протеомики важны значения m/z (коэффициент отношения

массы к заряду — mass-to-charge ratio) с подтверждением аминокислотной последовательности соответствующих триптических пептидов, а для иммуноферментного анализа приоритетным является то, какая часть белка осталась сохранной и может служить в качестве мишени для антител.

Классический двумерный электрофорез по О'Фарреллу не самый производительный метод в качестве контроля качества таких образцов, но он позволяет идентифицировать именно сохраненные чужеродные белки и/или их фрагменты в мясной продукции, хотя разработка количественных характеристик требует применения более тонких методов исследования [7].

Цель работы — выявление и идентификация белков/фрагментов мышечного происхождения в двух типах термообработанной мясной продукции (вареных колбасах и консервах типа тушеного мяса), как биоиндикаторов для определения ее соответствия маркировке и разработки более быстрых, экономичных и производительных методов контроля.

МЕТОДИКА

Образцы мясной продукции были представлены двумя видами: колбасы вареные “Докторская” и “Любительская” и консервированной продукцией “Говядина тушеная” и “Свинина тушеная” с более жестким режимом термообработки.

Из всего количества исследованных образцов вареных колбас ($n = 40$), три образца были изготовлены на базе экспериментального производства ФНЦ пищевых систем (Россия), при строгом контроле рецептуры и количества закладываемого мясного сырья, и они рассматривались как эталон. Остальные были закуплены в торговых сетях РФ и стран СНГ. В некоторых образцах помимо говядины и свинины было декларировано наличие мяса птицы, говядины, соевых добавок, сывороточных белков молока и пшеничной клетчатки, муки тывкы.

Вторая партия образцов ($n = 15$) представляла консервированную продукцию из свинины и говядины с более жестким режимом термообработки. Три образца были произведены на базе ФНЦ пищевых систем, при строгом контроле качества закладываемого мясного сырья, и они также рассматривались как эталон. Остальные были закуплены в торговых сетях РФ, СНГ и ЕС. В двух образцах было декларировано наличие соевых белков.

В качестве основной протеомной технологии применяли двумерный электрофорез (ДЭ) по О'Фарреллу с изоэлектрофокусированием в амфолиновом (IEF-PAGE) градиенте pH, как описано ранее [8]. Детекцию белков на двумерных электрофореграммах проводили окрашиванием

кумасси голубым R-250 (CBB R-250) и далее последовательно азотнокислым серебром [9].

Для идентификации белков отдельные фракции вырезали из сухих ДЭ, измельчали вырезанные фрагменты и проводили их трипсинолиз, как описано ранее [10]. Далее соответствующие наборы пептидов изучали методами MALDI-TOF MS и MS/MS масс-спектрометрии на MALDI — время-пролетном масс-спектрометре Ultraflex (“Bruker”, Германия) с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне масс 500–8000 Да с калибровкой их по известным пикам аутолиза трипсина. Полученные масс-спектры (“пептидные отпечатки”) расшифровывали с помощью традиционных биоинформационных технологий.

Биоинформационный анализ масс-спектрометрических “пептидных отпечатков” с помощью программы Mascot и других биоинформационных технологий. Анализ полученных масс-спектров триптических пептидов выполняли с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint (“Matrix Science”, США), с точностью определения массы MH^+ равной 0.01%, осуществляя поиск по базам данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI). При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального государственного учреждения “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”.

При сравнительном анализе протеомных профилей представленных образцов использовали информационные модули “Белки скелетной мышцы коров (*Bos taurus*)” и “Белки скелетной мышцы свиньи (*Sus scrofa*)”, базы данных “Протеомика мышечных органов” (<http://mp.inbi.ras.ru>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нарушение рецептуры мясной продукции при ее анализе ДЭ по О'Фарреллу отражается в виде появления атипичных фракций белков, которые, как правило, сразу видны на двумерных электрофореграммах при анализе коммерческой продукции (рис. 1).

Вареные колбасы. При сравнительном анализе эталонных образцов и вареных колбас с декларируемым на этикетке присутствием белковых добавок не мышечного происхождения выявляется соответствующая панель потенциальных биомаркеров. Все белки, детектируемые в эталонных образцах, были идентифицированы и оказались белками свинины и/или говядины, за исключением фракции практически полноразмерного овотрансферрина (№ 1), которая и является биомаркером количества белков яиц, используемых при приго-

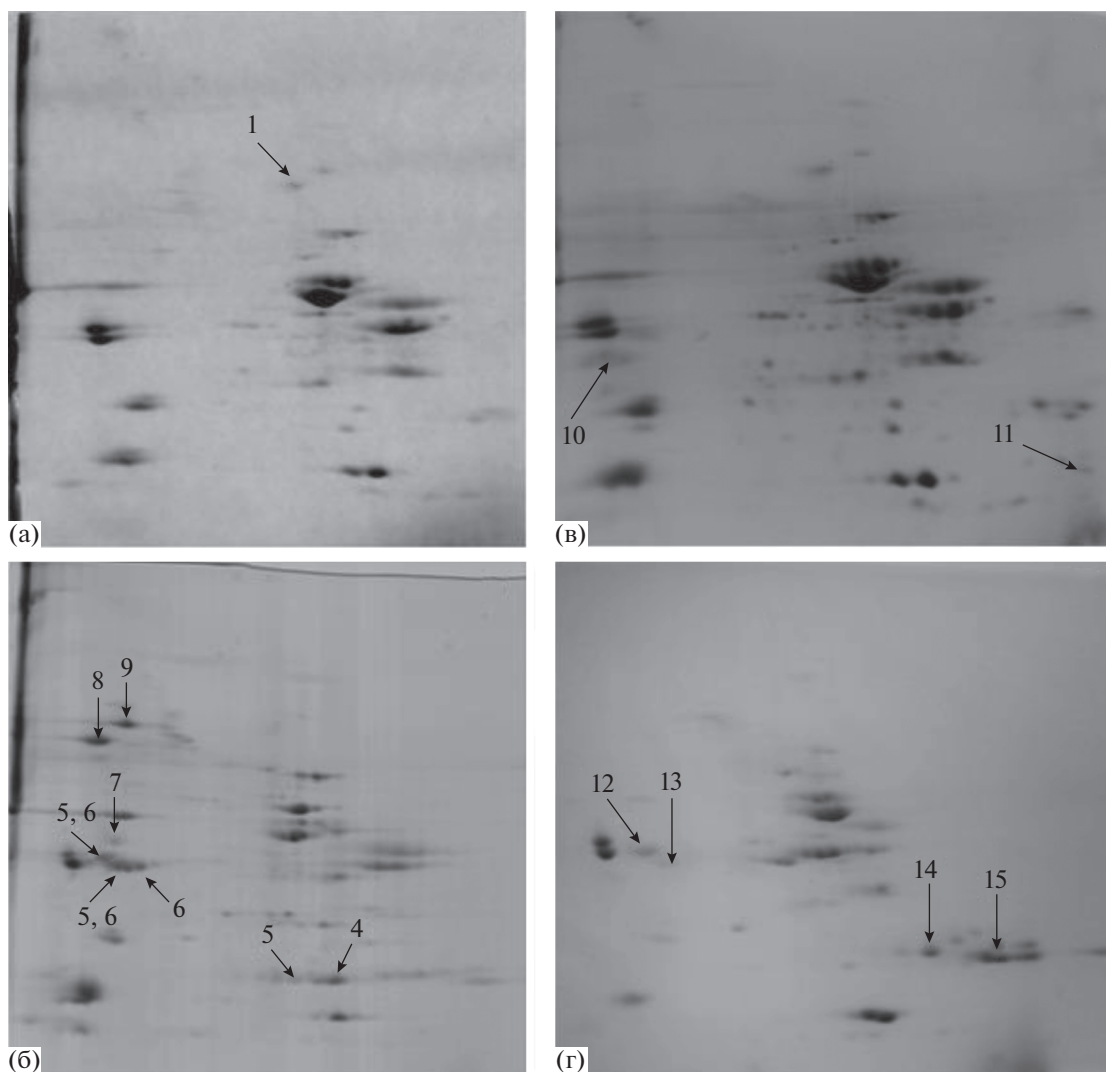


Рис. 1. Двумерные электрофореграммы белков вареных колбас: а – эталонный образец по рецептуре докторской колбасы, б – с декларируемыми добавками немусочного происхождения сои, в – с превышением добавки молока, г – с декларируемыми добавками муки тыквы есть в методике. Нумерация фракций согласно табл. 1.

товлении эталонных образцов указанных вареных колбас. Овотрансферрин достаточно устойчив к термообработке. Масс-спектрометрическая идентификация показала, что сохранным остается крупный фрагмент аминокислотной последовательности (а.п.) с 44 по 673 позицию из 705.

Другой тип животных добавок, часто используемый при производстве таких типов колбас, – белки молока. При соблюдении требований ГОСТ/ТУ в силу малого количества добавки молочного сырья обычно не детектируется на ДЭ. Однако производитель может завышать количество добавляемого молока для повышения уровня общего белка в продукции, что в ряде случаев наблюдалось и в коммерческой продукции разных производителей. Появляются дополнительные фракции, которые по результатам масс-спектро-

метрической идентификации оказались фрагментами двух белков молока: казеина каппа, продукта гена *CSN3* – с 25 по 105 позицию из 190 а.о. и казеина *CSN2*, в котором детектируются две фракции, идентифицированные как фрагменты а.п. 64-224 и 121-224 из 224 а.о.

Широко используются в производстве вареных колбас растительные добавки. Наиболее распространенная добавка – это производные соевых белков. На рис. 1б показано присутствие 6 фракций соевых белков (в образце с декларируемым производителем наличием сои), которые оказались фрагментами (табл. 1) четырех белков сои – продуктами 4 генов, в виде мономорфных или смесовых фракций: глицина A1aBx (*Gyl*) – а.п. 321–425 из 495; глицина A1aB1b мутантная субъединица (*Gyl*) – 36–259 из 386, глицина

Таблица 1. Выявленные масс-спектрометрическими методами маркеры не мышечного происхождения в мясной продукции

№	Наименование белка (<i>символ гена</i>)	Коэффициент отношения массы к заряду (<i>m/z</i>) выявленных триптических пептидов в порядке возрастания масс		Выявленные сохранные фрагменты аминокислотной последовательности белков в мясной продукции
Вареные колбасы				
Маркеры яичных белков (<i>Gallus gallus</i>)				
1	Овотрансферрин (<i>TRFE</i>)	831.4; 912.5; 1066.5; 1307.6; 1330.7; 1443.8; 1515.8; 1651.8; 1745.9; 1893.0; 2055.0; 2569.3; 2953.5;	888.4; 1046.5; 1226.1; 1328.7; 1429.7; 1454.8; 1533.8; 1694.8; 1830.1; 1959.0; 2377.2; 2633.3; 3284.6	44–673 275–421 266–421
2	Овотрансферрин (<i>TRFE</i>)	1066.5; 1694.8; 1745.9; 2055.0	1328.7; 1893.0;	275–421
3	Овотрансферрин (<i>TRFE</i>)	1066.5; 1429.7; 1830.1; 2055.0;	1694.9; 1745.9; 1893.0; 2569.3	266–421
Маркеры соевых белков (<i>Glycine max</i>)				
4	Глицинин A1aBx (<i>GYI</i>)	588.3; 1101.6; 1424.9; 2619.3; 4853.4	978.5; 1148.6; 1568.9; 3912.0;	321–425
5	Глицинин A1aB1b мутантная субъединица (<i>GyI</i>)	711.4; 1039.6; 2340.2; 3140.5; 3901.9;	1029.5; 1899.9; 2432.3; 3461.6; 4800.3	36–259
6	Глицинин G2 (<i>GY2</i>)	1039.6; 1278.7; 3217.6;	1098.6; 1930.9; 3794.9	33–256
7	Глицинин (<i>A3B4</i>)	1325.6; 2622.4; 2340.2; 947.4; 3042.2;	2287.1; 2728.3; 4580.0	79–236

Таблица 1. Продолжение

№	Наименование белка (<i>символ гена</i>)	Коэффициент отношения массы к заряду (<i>m/z</i>) выявленных триптических пептидов в порядке возрастания масс		Выявленные сохранные фрагменты аминокислотной последовательности белков в мясной продукции
8	Субъединица α β -конглицинина (<i>CG-4</i>)	563.3; 1182.6; 1533.8; 1770.0; 2323.2; 2700.4; 3008.3; 3371.7; 3712.6; 4227.2	954.5; 1078.5; 1617.9; 2017.9; 2552.2; 2991.5; 3224.5; 3684.8; 3831.0;	24–522
9	Субъединица α' β -конглицинина (<i>CG-4</i>)	563.3; 938.5; 1141.6; 1510.8; 1652.9; 2136.0; 2761.5; 3074.5; 3655.8; 3820.0; 4272.2	872.4; 1078.5; 1222.7; 1533.8; 1740.8; 2449.1; 2935.3; 3114.6; 3770.0; 4188.9;	1–559
Маркеры белков молока (<i>Bos Taurus</i>)				
10	Казеин каппа (<i>CSN3</i>)	970.5; 1979.1;	1250.7; 4990.1	25–105
11	Казеин CSN2 (<i>CSN2</i>)	741.4; 829.5; 1136.6; 2908.6;	779.5; 1012.5; 2185.2; 5355.9	121–224 64–224
Маркеры белков семян тыквы (<i>Cucurbita pepo</i>)				
12	Субъединица β 11S глобулина (<i>LOC111464525</i>) *gi 112677	643.4; 750.5; 973.5; 1429.8; 1463.8; 2430.2; 2717.3;	687.4; 903.4; 1219.7; 1437.8; 1532.8; 2673.3; 3556.8	47–282
13	Субъединица β 11S глобулина (<i>LOC111464525</i>) *gi 112677	817.4; 1151.6; 1392.7; 1453.9; 1870.1; 1893.9; 2767.3; 3589.9	1001.5; 1320.7; 1425.7; 1542.7; 1893.9; 2350.2; 2911.3;	306–465 317–468 348–468

Таблица 1. Окончание

№	Наименование белка (<i>символ гена</i>)	Коэффициент отношения массы к заряду (m/z) выявленных триптических пептидов в порядке возрастания масс		Выявленные сохранные фрагменты аминокислотной последовательности белков в мясной продукции
14	Белок 2 подобный запасному белку хранения 11S глобулину (<i>LOC101217162</i>) *gi 449468676	610.4; 838.4; 2469.0;	804.4; 1126.5; 3204.5	291–412
15	Субъединица β - подобная 11S глобулину 1 (<i>LOC111464083</i>) *gi 659093215	1162.6; 1376.7; 1713.0; 3112.7	1320.7; 1528.7; 2383.2;	257–475
Консервированная мясная продукция				
Маркеры соевых белков				
16	Глицинин сои АЗВ4 (<i>A3B4</i>)	853.4; 1397.8; 2061.0	1255.6; 542.8;	361–499
17	Глицинин G1 (<i>GYI</i>)	1148.5; 1449.6	1424.9;	401–435
Маркеры белков подсолнечника (<i>Helianthus annuus</i>)				
18	Запасной G3 белок 11S глобулина (<i>LOC110881169</i>) *XP_021985214.1	760.3; 1639.9; 2106.1;	945.9; 1770.9; 2759.4	308–475

* Запись в NCBI Protein.

G2 (*GY2*) – 33–256, глицинина (*A3B4*) – 79–236, субъединица α β -конглицинина (*CG-4*) – 24–522 из 543 и субъединица α' β -конглицинина (*CG-1*) в виде полноразмерного белка. Продукты гена *GYI* были идентифицированы в двух транскрипционных вариантах, что при количественных методах оценки может давать завышение количества сои в образце. Эти фракции были выявлены и в некоторых образцах коммерческой продукции разных производителей в варьирующих количествах, но не декларируемых в составе.

Одиннадцать фракций белков тыквы/тыквенной муки было идентифицировано в образце национального продукта из стран СНГ. Они оказались разными фрагментами N- (47–282) и С-конца (306–468) субъединицы β 11S глобулина (480 а.о), одна фракция – запасным белком 2 подобным 11S глобулину (11S globulin seed storage protein 2-like), фрагмент 291–412 из 465 и фрагмент 257–475 из 511 а.о. субъединицы β , подобной 11S глобулину. Геном тыквы еще недостаточно аннотирован в международных базах данных и представлен только в виде конкретных локусов,

но соответствующие фрагменты-мишени аминокислотной последовательности уже представлены в базе данных NCBI Protein под соответствующими записями.

Консервированная мясная продукция. Сравнительный анализ белкового состава консервов типа “говядина/свинина тушеная” с контролируемой закладкой сырья и декларируемой добавкой белков немышечного происхождения также позволил выявить панель потенциальных биомаркеров этих добавок, но детекция таких фракций оказалась более затруднительной (рис. 2). Более жесткий режим стерилизации консервов приводит к образованию большого количества фрагментов мышечных белков, а термохимические модификации вызывают у многих белков формирование характерных треков одноименных белков [11], различающихся по pI за счет блокады или исчезновения части, как правило, щелочных заряженных групп, что вносит свой вклад в протеомный профиль этого вида продукции. На этом фоне затруднительно детектировать чужеродные фракции. Но, тем не менее,

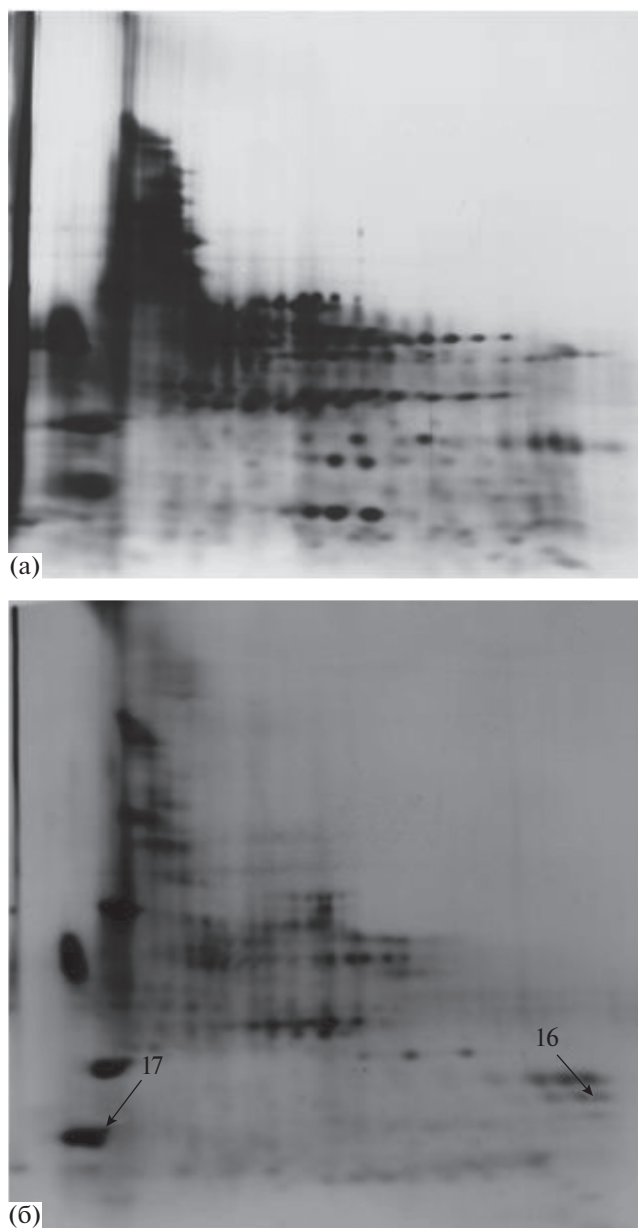


Рис. 2. Двумерные электрофореграммы белков консервированной мясной продукции: а – эталонный образец, б – с декларируемыми добавками не мышечного происхождения. Нумерация фракций согласно табл. 1.

фрагменты соевых глицининов были идентифицированы. Эти фракции идентифицируются как смесь растительных и мышечных белков. Растительный компонент оказался фрагментами глицинина G1 (*GYI*) – 401–435 и глицинина (*A3B4*) – 361–499. Молекулярная масса выявленных фрагментов составляла 17–18 кДа, что должно соответствовать фрагментам длиной около 140 а.о. Продукт гена *A3B4* соответствует этому параметру, а *GYI* нет.

При масс-спектрометрии детектируются только триптические пептиды из короткого (наиболее термохимически устойчивого) сегмента, а остальные, очевидно меняют массу вследствие термохимических модификаций и не опознаются поисковой программой.

И в консервах тушеной говядины производства стран ЕС (Франция) было детектировано наличие фрагмента 308–475 запасного G3 белка 11S глобулина из подсолнечника. Наличие такой добавки возможно за счет добавки нерафинированного подсолнечного масла, но оно не указано в составе продукта, и, следовательно, также является нарушением регламента. Только эта часть белка является наиболее устойчивой к термохимическому воздействию и может выступать в роли маркера присутствия муки из семян подсолнечника.

Сводные результаты масс-спектрометрической идентификации сохранных немускельных добавок (фрагментов аминокислотных последовательностей и m/z триптических пептидов) представлены в табл. 1.

В целом, полученные результаты показали, что спектр биоиндикаторов контроля внесения незаявленных добавок в мясную продукцию достаточно ограничен. После термообработки достоверно детектируется только овотрансферрин/его фрагмент, два вида казеинов молока (с преобладанием продукта гена CSN3), четыре производных глицининов и конглицининов сои (равнозначно представленных), а для тыквы и подсолнечника три производных белков/фрагментов 11S глобулина.

Полученные результаты позволяют существенно сузить и детализировать круг маркеров таких добавок в мясную продукцию для улучшения способов контроля ее соответствия заявленному составу, а также для предотвращения введения потребителя в заблуждение.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahsan N., Prasad Rao R.S., Gruppiso Ph.A., Ramratnam Bh., Salomon A.R. // J. Proteomics. 2016. V. 30. № 143. P. 15–23.
2. 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.
3. 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.
4. Xi J., Shi Q. // Food Anal. Methods. 2016. V. 9. № 11. P. 2998–3005.
5. Jira W., Münch S. // Food Chemistry. 2019. V. 275. P. 214–223.

6. Смирнова Н.И., Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 4. С. 401–406.
7. Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Ковалева М.А., Иванов А.В., Еремина Л.С., Садыхов Э.Г. // Прикл. биохимия и микробиология, 2014. № 5. С. 453–465.
8. Ковалев Л.И., Шишкин С.С., Ковалева М.А., Иванов А.В., Вострикова Н.Л., Чернуха И.М. // Все о мясе. 2013. № 3. С. 32–34.
9. Ковалев Л.И., Ковалева М.А., Ковалев П.Л., Серебрякова М.В., Мошковский С.А., Шишкин С.С. // Биохимия. 2006. Т. 71. № 4. С. 554–560.
10. Zvereva E.A., Kovalev L.I., Ivanov A.V., Kovaleva M.A., Zherdev A.V., Shishkin S.S., Lisitsyn A.B., Chernukha I.M., Dzantiev B.B. // Meat Science. 2015. V. 105. P. 46–52.
11. Чернуха И.М., Федулова Л.В., Котенкова Е.А., Шишкин С.С., Ковалев Л.И., Машенцева Н.Г., Клабукова Д.Л. // Биофармацевтический журн. 2016. Т. 8. № 6. С. 38–44.

Proteomic Identification of Proteins-Potential Biomarkers of Non-Meat Components in Meat Products

L. I. Kovalev^{a,*}, M. A. Kovaleva^a, L. A. Novikova^b, and I. M. Chernukha^b

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

^b *Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS, Moscow, 109316 Russia*

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

Reference and commercial samples of meat products (boiled and canned) were analyzed using classical two-dimensional electrophoresis by O'Farrell. We identified 10 different protein products or their fragments on the final stage of the procedure, which are turned to be a components of soy, milk, egg, pumpkin and sunflower. They can be used as the targets of undeclared additives to develop more rapid and sensitive quality control methods, such as shotgun proteomic or immunofluorescence assay.

Keywords: control of the composition of meat products, targets of non-muscle supplements, proteomics