

СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 4, 2021

Динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами перехватывают пероксинитрит и защищают гемоглобин от окислительной модификации <i>О. В. Космачевская, Э. И. Насыбуллина, К. Б. Шумаев, Л. В. Чумкина, Л. И. Арабова, Н. В. Яглова, С. С. Обернихин, А. Ф. Топунов</i>	315
CRISPR-интерференция аденилатциклазы <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Н. И. Надолинская, М. В. Замахеев, М. С. Шумков, Д. К. Армянинова, Д. С. Карпов, А. В. Гончаренко</i>	326
Участие липополисахарида и неспецифических поринов <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> в рецепции псевдотуберкулезного диагностического бактериофага <i>Л. Г. Дудина, О. Д. Новикова, О. Ю. Портнягина, В. А. Хоменко, И. В. Коньшев, А. А. Бывалов</i>	332
Оптимизация анаэробной продукции пировиноградной кислоты из глюкозы рекомбинантными штаммами <i>Escherichia coli</i> С нарушенной способностью к брожению за счет форсированного гидролиза АТФ <i>А. Ю. Скороходова, А. Ю. Гулевич, В. Г. Дебабов</i>	342
Закисление культуральной среды продуктами метаболизма глюкозы препятствует синтезу внеклеточной гетерологичной α -амилазы бактериями <i>Bacillus subtilis</i> 168 <i>А. В. Качан, А. Н. Евтушенков</i>	353
Характеристика и функциональные свойства лактобацилл, выделенных из кефирных грибков <i>А. В. Бегунова, О. С. Савинова, К. В. Моисеенко, О. А. Глазунова, И. В. Рожкова, Т. В. Фёдорова</i>	362
Влияние иммобилизации микромицета <i>Aspergillus ochraceus</i> ВКМ-F4104D на полимерных носителях на образование фибринолитической протеазы-активатора протеина с плазмы крови <i>С. К. Комаревцев, С. Н. Тиморшина, М. Р. Леонтьева, С. В. Шабунин, Е. С. Лобакова, А. А. Осмоловский</i>	374
Химическое выщелачивание коллективных сульфидных концентратов раствором сульфата трехвалентного железа <i>М. И. Муравьев, А. Е. Панюшкина, В. С. Меламуд, А. Г. Булаев, Н. В. Фомченко</i>	380
Влияние феруловой кислоты на рост колоний и размножение клеток эндофитного штамма бактерий <i>Bacillus subtilis</i> 26Д <i>Е. Р. Сарварова, Р. М. Хайруллин, И. В. Максимов</i>	388
Изучение взаимодействия ризосферных бактерий с неризобияльными эндофитными бактериями растений гороха (<i>Pisum sativum</i> L.), перемещающимися из их корней в прикорневую зону <i>Л. Е. Макарова, Ю. А. Маркова, А. С. Мориц, М. С. Карпова, А. В. Сидоров, Н. А. Соколова</i>	394
Влияние аллельных вариантов ароматической алкогольдегидрогеназы CAD ^{im} на микроморфологические и химические показатели тканей у яровой мягкой пшеницы <i>Triticum aestivum</i> L. <i>А. А. Коновалов, Е. В. Карпова, И. К. Шундрин, Е. П. Размахнин, И. В. Ельцов, Н. П. Гончаров</i>	402

CONTENTS

Vol. 57, No. 4, 2021

Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione Ligands Intercept Peroxynitrite and Protect Hemoglobin Against Oxidative Modification <i>O. V. Kosmachevskaya, E. I. Nasybullina, K. B. Shumaev, L. V. Chumikina, L. I. Arabova, N. V. Yaglova, S. S. Obernikhin, and A. F. Topunov</i>	315
CRISPR Interference of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Adenylate Cyclase <i>N. I. Nadolinskaia, M. V. Zamakhaev, M. S. Shumkov, D. K. Armianinova, D. S. Karpov, and A. V. Goncharenko</i>	326
Lipopolysaccharide and Non-Specific Porins of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> are Involved in the Reception of the Pseudotuberculous Diagnostic Bacteriophage <i>L. G. Dudina, O. D. Novikova, O. Yu. Portnyagina, V. A. Chomenko, I. V. Konyshev, and A. A. Byvalov</i>	332
Optimization of Anaerobic Production of Pyruvic Acid from Glucose by Recombinant <i>Escherichia coli</i> Strains with Impaired Fermentation Ability Through Enforced ATP Hydrolysis <i>A. Yu. Skorokhodova, A. Yu. Gulevich, and V. G. Debabov</i>	342
Acidification of Culture Medium by Products of Glucose Metabolism Inhibit Synthesis of Heterologous Extracellular α -Amylase by <i>Bacillus subtilis</i> 168 <i>A. V. Kachan and A. N. Evtushenkov</i>	353
Characterization and Functional Properties of Lactobacilli Isolated from Kefir Grains <i>A. V. Begunova, O. S. Savinova, K. V. Moiseenko, O. A. Glazunova, I. V. Rozhkova, and T. V. Fedorova</i>	362
Immobilization on Polymeric Carriers Effect on the Production of Fibrinolytic Protease-Activator of Blood Plasma Protein C by <i>Aspergillus ochraceus</i> VKM-F4104D <i>S. K. Komarevtsev, S. N. Timorshina, M. R. Leontieva, S. V. Shabunin, E. S. Lobakova, and A. A. Osmolovskiy</i>	374
Ferric Leaching of Bulk Sulfidic Concentrates with Biologically Generated Solution <i>M. I. Muravyov, A. E. Panyushkina, V. S. Melamud, A. G. Bulaev, and N. V. Fomchenko</i>	380
Ferulic Acid Activate the Reproduction and Mobility of the Endophytic Strain <i>Bacillus subtilis</i> 26D Cells <i>E. R. Sarvarova, R. M. Khairullin, and I. V. Maksimov</i>	388
Study of the Interaction of Rhizosphere Bacteria with Non-Rhizobial Endophytic Bacteria of Pea Plants (<i>Pisum sativum</i> L.), Moving from Their Roots to the Root Zone <i>L. E. Makarova, Yu. A. Markova, A. S. Morits, M. S. Karepova, A. V. Sidorov, and N. A. Sokolova</i>	394
Inheritance and Properties of Allelic Variants of CAD ^{im} <i>Triticum aestivum</i> L. <i>A. A. Kononov, E. V. Karpova, I. K. Shundrina, E. P. Razmakhnin, I. V. Eltsov, and N. P. Goncharov</i>	402

УДК 577.122:547.963.4

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ГЛУТАТИОНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ ПЕРЕХВАТЫВАЮТ ПЕРОКСИНИТРИТ И ЗАЩИЩАЮТ ГЕМОГЛОБИН ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ

© 2021 г. О. В. Космачевская¹, Э. И. Насыбуллина¹, К. Б. Шумаев¹,
Л. В. Чумикина¹, Л. И. Арапова¹, Н. В. Яглова², С. С. Обернихин², А. Ф. Топунов¹ *

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

²ФГБНУ НИИ морфологии человека, Москва, 117418 Россия

*e-mail: aftpunov@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.01.2021 г.

После доработки 15.02.2021 г.

Принята к публикации 22.02.2021 г.

Динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами (GS-ДНКЖ) являются физиологической формой оксида азота (NO), которая депонирует и переносит NO в организме. Эти комплексы могут действовать как антиоксиданты и антирадикальные агенты. Показано, что GS-ДНКЖ защищают молекулу гемоглобина (Hb) от окислительной модификации пероксинитритом. Они препятствуют образованию карбонильных производных Hb, окислению триптофановых и тирозиновых остатков, деградации гемовой группы, а также образованию межбелковых сшивок. Также эти комплексы ингибируют окисление дигидрородамина пероксинитритом, образующимся при декомпозиции 3-морфолинсиндонимины. В некоторых случаях антиоксидантное действие GS-ДНКЖ сопоставимо с таковым восстановленного глутатиона. Полученные результаты позволяют считать GS-ДНКЖ перехватчиками пероксинитрита и протекторами гемоглобина.

Ключевые слова: гемоглобин, динитрозильные комплексы железа, пероксинитрит, глутатион, окислительная модификация, карбонильные производные

DOI: 10.31857/S0555109921040097

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) представляют собой физиологическую форму оксида азота (NO) в организме [1–3]. Формирование этих комплексов было зарегистрировано в организме человека, животных, растений и бактерий. В зависимости от того, какое соединение служит лигандом ДНКЖ, они могут быть связанными с белками или с низкомолекулярными веществами. В живых системах лигандами низкомолекулярных ДНКЖ, как правило, являются тиолсодержащие соединения: цистеин и глутатион [2–4]. ДНКЖ с тиольными лигандами функционируют в живых организмах в качестве доноров NO, NO⁺ и Fe–(NO)₂ [2, 3, 5].

Низкомолекулярные ДНКЖ с тиольными лигандами имеют общую формулу [(RS⁻)₂Fe⁺(NO⁺)₂] и существуют в живых организмах в равновесии с белок-связанными ДНКЖ, которые формируются при участии тиольных и некоторых других групп белков [2, 3]. Это равновесие определяется редокс-условиями, а именно состоянием системы глутатиона. Снижение пула восстановленного глутатиона (GSH) сдвигает равновесие в сторону более

стабильных связанных с белками комплексов. По мере окисления SH-групп комплексы постепенно димеризуются с образованием биядерных ДНКЖ, которые более устойчивы к окислению [2, 3]. Биядерные ДНКЖ в присутствии высокой концентрации GSH снова переходят в мономерную форму.

В различных системах *in vitro* и *in vivo* было показано, что NO может действовать и как антиоксидант, и как прооксидант. Прооксидантное действие NO проявляется в его способности образовывать пероксинитрит (ONOO⁻) в диффузно-контролируемой реакции с супероксидом [6, 7]. При распаде ONOO⁻ образуются гидроксильный радикал (*OH) и диоксид азота (NO₂[•]), которые в значительной степени определяют его токсические свойства [8, 9].

В крови источником супероксидного анион-радикала являются клетки иммунной системы — макрофаги, которые в ответ на появление патогенных микроорганизмов производят его в больших количествах [10]. Супероксид может образо-

вываться и в самих эритроцитах в условиях гипоксии, когда при низком pO_2 гемоглобин (Hb) активно отдает кислород [11]. В свою очередь NO может проникать в эритроцит с помощью свободной диффузии или продуцироваться внутри самой клетки в реакции восстановления деоксигенированным Hb ионов нитрита [12], а также NO-синтазой эритроцитов [13].

Антиоксидантные свойства NO проявляются в его способности перехватывать свободные радикалы: $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, Tyr^{\cdot} , RS^{\cdot} , NO_2^{\cdot} , ROO^{\cdot} . В реакции NO с алкоксильными и алкилпероксильными радикалами образуются нитрозированные и нитрованные липиды. Благодаря этому обрываются цепные реакции перекисного окисления липидов [14]. Метаболиты NO – ДНКЖ также проявляют антиоксидантные свойства. Ранее было показано, что низкомолекулярные ДНКЖ с глутатионовыми лигандами (GS-ДНКЖ) перехватывают супероксидный радикал [15–17] и восстанавливают оксоферрильную форму миоглобина ($Mb-Fe^{IV} = O$) до нетоксичной метформы [18], а ДНКЖ, связанные с гемоглобином, защищают его тиольные группы от окисления [15, 16]. В этих экспериментах в качестве инициаторов окисления использовали пероксид водорода и гидропероксид *трет*-бутила. Кроме того, GS-ДНКЖ защищают эритроциты от HOCI-индуцированного гемолиза [19]. В ходе взаимодействия ДНКЖ с органическими свободными радикалами происходит необратимая деструкция комплексов и образование интермедиатов – нитроорганических соединений [18].

Основной мишенью пероксинитрита в эритроцитах является Hb [20]. Реакция NO с Hb конкурирует с реакцией NO с $O_2^{\cdot-}$ [10]. При этом в результате взаимодействия ONOO⁻ с гемоглобином происходит его окислительная модификация [7], которая сопровождается образованием карбонильных производных, дисульфидных и дитиозино-вых сшивок, а также окислением железа в гемовой группе до состояния оксоферрила, образованием радикалов на порфирине и разрывом порфиринового кольца.

Цель работы – изучение влияния GS-ДНКЖ на образование карбонильных производных, дисульфидных и дитиозино-вых сшивок, а также на окисление железа в гемовой группе до состояния оксоферрила, образование радикалов на порфирине и разрыв порфиринового кольца в Hb под действием пероксинитрита.

МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реактивы: метгемоглобин из эритроцитов быка; 3-морфолиносиндонимин (SIN-1), дигидрородамин, восстановленный глутатион (GSH), пиридин, дитио-

нит Na, диэтилен-триаминопентауксусная кислота (ДТПА), трихлоруксусная кислота (ТХУ), диметилсульфоксид (ДМСО), 2,4-динитрофенилгидразин (2,4-ДНФГ), ПААГ, Na-ДДС, Трис, HEPES, $NaNO_2$, $FeSO_4$, – “Sigma-Aldrich” (USA); 3Н-нафтол[2,1-b]пиран-*s*-карбоновая кислота (ThioGlo1) – “Calbiochem” (США); 4-гидрокси-(2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил (4-гидрокси-ТЕМПО) – “Oxis” (США).

ДНКЖ с глутатионовыми лигандами получали, смешивая растворы $FeSO_4$ и GSH в молярном соотношении 1 : 2 в сосуде Тунберга в атмосфере NO [15–17]. Концентрацию ДНКЖ рассчитывали по интегральной интенсивности сигнала электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) комплексов, используя в качестве стандарта спиновую метку 4-гидрокси-ТЕМПО. Препараты ДНКЖ хранили при температуре жидкого азота ($-196^\circ C$).

Пероксинитрит синтезировали по методике, описанной в работе [21], быстро смешивая 0.6 М раствор $NaNO_2$ и 0.6 М раствор H_2O_2 в 0.7 М HCl, и стабилизировали 0.9 М NaOH. Непрореагировавший H_2O_2 удаляли, добавляя порошкообразный MnO_2 , после чего раствор фильтровали. Концентрацию ONOO⁻ определяли по характерной полосе поглощения при 302 нм ($\epsilon = 1.67 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Определение белковых карбониллов. Количественную оценку карбонильных производных Hb проводили по методу [22] в модификации Ю.В. Абаленихиной и М.А. Фоминой [23]. Суть метода заключалась в том, что карбонильные группы (альдо- и кето-) образуют ковалентные аддукты с 2,4-ДНФГ, которые регистрируются спектрофотометрически (*E*) при 13 различных длинах волн. Количество образовавшихся 2,4-динитрофенилгидразонов рассчитывали по формуле:

$S_{OMB} = S_1 + S_2$, где S_1 – альдегидные группы, S_2 – кетонные группы.

$$S_1 = (E_{230} + E_{254}) \times 12 + (E_{254} + E_{270}) \times 8 + (E_{270} + E_{280}) \times 5 + (E_{280} + E_{356}) \times 38 + (E_{356} + E_{363}) \times 3.5 + (E_{428} + E_{520}) \times 46,$$

$$S_2 = (E_{363} + E_{370}) \times 3.5 + (E_{370} + E_{428}) \times 29 + (E_{430} + E_{434}) \times 2 + (E_{520} + E_{535}) \times 7.5.$$

Образцы готовили следующим способом. К 0.1 мл 0.15 мМ раствора Hb в 20 мМ К-фосфатном буфере (pH 6.8) добавляли пероксинитрит до конечных концентраций 0.4, 0.6, 1.0, 1.6, 2.6, 4.2 мМ и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением метионина до конечной концентрации 25 мМ. GS-ДНКЖ и GSH добавляли к раствору Hb в молярном соотношении 3 : 1 и 6 : 1 соответственно. Для изучения влияния металлов на ход реакции к растворам белка добавляли комплексон железа – ДТПА до конечной концентрации 2.5 мМ.

К раствору белка добавляли 0.5 мл раствора 2,4-ДНФГ в 2 М HCl и инкубировали в течение часа. Белок осаждали добавлением 0.5 мл 20%-ного раствора ТХУ. Через 10 мин образцы центрифугировали при 3000 g 15 мин. Для удаления несвязавшегося 2,4-ДНФГ осадок белка трижды отмывали 0.4 мл смеси этилового спирта и этилацетата (1 : 1). Полученный осадок подсушивали на воздухе и перед измерением растворяли в 1 мл 8 М раствора мочевины.

Спектры оптического поглощения регистрировали на UV-VIS спектрофотометре Cary 300 ("VarianBio", США) при комнатной температуре в кювете с длиной оптического пути 1 см при скорости сканирования 600 нм/мин. Перед измерением образцы разбавляли в 5 раз.

Определение содержания гемовой группы. Концентрацию гема в растворе Hb определяли с помощью пиридингемохромного метода [24]. К 15 мкл каждого образца Hb, приготовленных как описано в пункте 1 данного раздела, добавляли 135 мкл воды и 450 мкл 30%-ного щелочного раствора пиридина. Непосредственно перед измерением раствор восстанавливали дитионитом натрия. Оптическое поглощение восстановленного комплекса гема с пиридином измеряли при 556 и 539 нм. Расчет концентрации гема осуществляли по разнице $A_{556} - A_{539}$, учитывая, что $E_{556-539} = 4.3 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Определение SH-групп в низкомолекулярных и белковых тиолах. Количественную оценку свободных SH-групп проводили с помощью тиол-специфичного реагента ThioGlo1, который образует флуоресцирующий аддукт [25]. Для анализа восстановленных белковых SH-групп образцы готовили следующим образом: к 5 мкл раствора Hb (0.03 мМ), приготовленного как описано выше, добавляли 5 мкл 0.25 мМ ThioGlo1 в ДМСО и инкубировали 4 мин. Затем 10 мкл полученного раствора вносили в спектрофлуориметрическую кювету, содержащую 490 мкл 20 мМ К-фосфатного буфера (pH 6.8).

Флуоресценцию регистрировали на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 PC (Япония) при высокой чувствительности (по обозначению прибора), ширине щели возбуждающего и испускающего света 3 и 5 нм соответственно. Длина волны возбуждающего света составляла 379 нм, испускающего — 500 нм.

Определение состояния триптофановых и тирозиновых остатков. Состояние триптофановых и тирозиновых остатков в молекуле Hb изучали с помощью флуоресцентной спектроскопии. Образцы белка были приготовлены, как описано в пункте "Определение белковых карбониллов". Для селективного возбуждения автофлуоресценции триптофана использовали длину волны 295 нм. Флуоресценцию регистрировали при 330 нм. Спектрофотометрическую детекцию 3,3'-дитиро-

зинов осуществляли при длине волны возбуждения 325 нм и испускания 400 нм [26]. Образцы Hb перед измерением разбавляли в 25 раз при измерении флуоресценции триптофана и 12.5 раз при измерении флуоресценции дитирозинов. Регистрацию флуоресценции проводили в кварцевых оптических кюветках с длиной оптического пути 1 см на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 PC (Япония) при высокой чувствительности и средней скорости сканирования. Ширина щели возбуждающего света составляла 10 нм, поглощающего — 5 нм.

Электрофорез в ПААГ с Na-ДДС. Электрофорез проводили в блоках 13%-ного ПААГ размером $15 \times 15 \times 2$ мм по методу Лэммли [27]. Образцы гемоглобина, приготовленные как описано в разделе "Определение белковых карбониллов", предварительно диализовали в 20 мМ К-фосфатном буфере (pH 6.8) для отделения низкомолекулярных тиолов (GSH и GS-ДНКЖ), а затем добавляли буфер для образцов в соотношении 1 : 1, прогревали в течение 5 мин при 95°C и наносили на гель. Буфер для образцов был приготовлен на основе 0.1 М трис-HCl буфера (pH 6.8) с 4% Na-ДДС, 0.2% бромфенолового синего и 20% глицерина. Для создания восстановительных условий в буфер добавляли 3% дитиотреитола. На гель наносили по 15 мкл раствора белка. В качестве электродного буфера использовали 0.2 М Трис-глициноновый буфер, pH 8.3, содержащий 0.1% ДДС.

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

Окисление дигидрородамина пероксинитритом. Способность GS-ДНКЖ перехватывать пероксинитрит изучали в реакции окисления дигидрородамина пероксинитритом, образующимся при распаде SIN-1 [28]. При окислении дигидрородамина образуется родамин с максимумом поглощения при 500 нм. GSH или GS-ДНКЖ вносили в реакционную смесь через 5 с после начала реакции. Состав реакционной смеси: 0.4 мМ дигидрородамина, 0.4 мМ SIN-1, 0.08 мМ GSH или GS-ДНКЖ. Кинетику восстановления записывали в 1 мм кювете в течение 10 мин при комнатной температуре на UV-VIS спектрофотометре Cary 300 ("VarianBio", США).

Все эксперименты были выполнены не менее чем в трех повторностях. На графиках представлены средние величины. Статистическая обработка данных проводилась исходя из 3–4 аналитических повторностей в режиме Excel. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

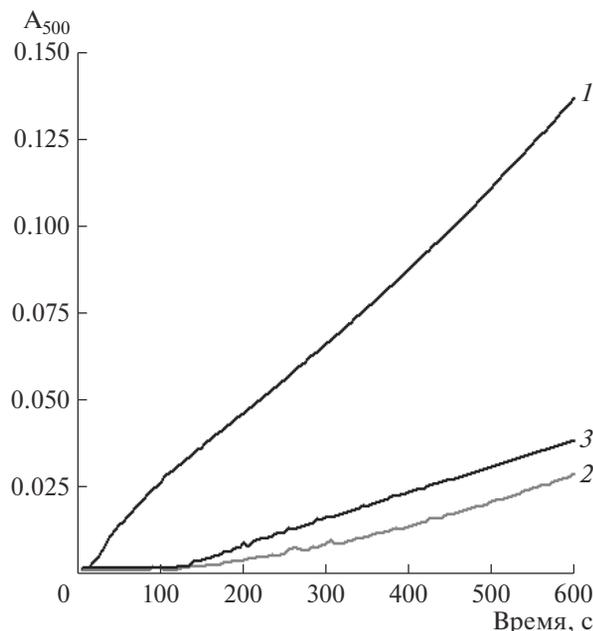


Рис. 1. Кинетика окисления дигидрородамина пероксинитритом, образующимся при декомпозиции SIN-1 (1), а также при внесении GSH (2) или GS-ДНКЖ (3): 1 — контроль, состав реакционной смеси (см. Методика).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

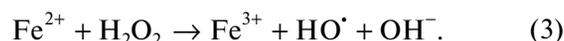
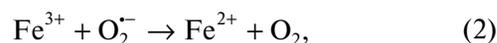
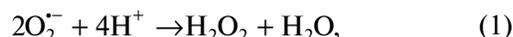
Влияние ДНКЖ на окисление дигидрородамина пероксинитритом. Способность GS-ДНКЖ перехватывать ONOO⁻ была исследована в экспериментах по окислению дигидрородамина пероксинитритом, образующимся в ходе декомпозиции SIN-1. Поскольку при спонтанном распаде SIN-1 в присутствии кислорода одновременно образуются O₂⁻ и NO, это вещество часто используют для моделирования образования ONOO⁻ в живых системах [28]. На рис. 1 представлены кинетики окисления дигидрородамина пероксинитритом. Как видно, GS-ДНКЖ ингибировали реакцию окисления. Еще в большей степени препятствовал окислению дигидрородамина GSH, что подтвердило его способность выступать в качестве эффективной ловушки пероксинитрита.

Образование карбонильных производных гемоглобина. Ранее нами было показано, что пероксинитрит может взаимодействовать с ДНКЖ, связанным с Hb [15]. Таким образом, способность низкомолекулярных (GS-ДНКЖ) и белковых ДНКЖ перехватывать пероксинитрит послужила предпосылкой для проведения исследований по окислительной модификации гемоглобина.

Карбонильные производные представляют собой необратимую стабильную форму неспецифического окисления аминокислотных остатков. ДНКЖ оказывали выраженное ингибирующее действие на образование карбонил в присут-

ствии пероксинитрита. Они защищали белок в широком диапазоне концентраций ONOO⁻ от 0.38 до 4.20 мМ, что соответствовало молярному соотношению Hb : ONOO⁻ от 1 : 2.5 до 1 : 28 (для тетрамера) (рис. 2а). При низких концентрациях пероксинитрита GSH стимулировал формирование карбонильных производных Hb, но начиная с концентрации 2.6 мМ — ингибировал (рис. 2а). Эти результаты показывают, что протекторное действие GS-ДНКЖ обусловлено не только их глутатионовыми лигандами.

Кривые, отражающие зависимость образования карбонильных производных от концентрации окислителя, в присутствии GS-ДНКЖ имели двухфазный характер: при низких концентрациях ONOO⁻ образование карбонильных производных происходило медленно, а начиная с концентрации 1.6 мМ — интенсивно. Вероятно, это связано с высвобождением железа из распавшихся ДНКЖ, которое далее участвовало в генерации свободных радикалов в реакциях Фентона и Габера-Вайса:



Для проверки этого предположения были поставлены эксперименты в присутствии ДТПА, который образует с ионами свободного железа комплекс, не участвующий в реакциях Фентона и Габера-Вайса. Как в контроле, так и в варианте с GSH этот хелатор практически полностью ингибировал образование карбонил (рис. 2).

Напротив, введение ДТПА в реакционную среду, содержащую GS-ДНКЖ, незначительно стимулировало формирование карбонильных производных (рис. 2б). Скорее всего, этот эффект обусловлен трансформацией глутатионовых ДНКЖ в комплексы, содержащие ДТПА в качестве лигандов.

Дегградация гемовой группы гемоглобина. Основной мишенью действия ONOO⁻ на гемопротеиды является гемовая группа. Дегградации гема предшествует стадия образования оксоферрил-формы (гем-Fe^{IV}=O), в образовании которой ключевую роль играет гемовое железо, катализирующее разрыв O—O связи в комплексе гем-Fe^{III}-ONOO⁻ [29].

В экспериментах GSH и GS-ДНКЖ препятствовали разрушению гемовой группы (рис. 3). В контрольном варианте доля разрушенного гема прямо зависела от концентрации окислителя (рис. 3а). При концентрации ONOO⁻ 4.2 мМ разрушалось 50% гемов, в то время как в присутствии GS-ДНКЖ (в соотношении 1:3) — только 25% (рис. 3а). GSH также оказывал протекторное действие на гемовую группу, однако оно было менее выражено, чем у GS-ДНКЖ (рис. 3а). Во всех ва-

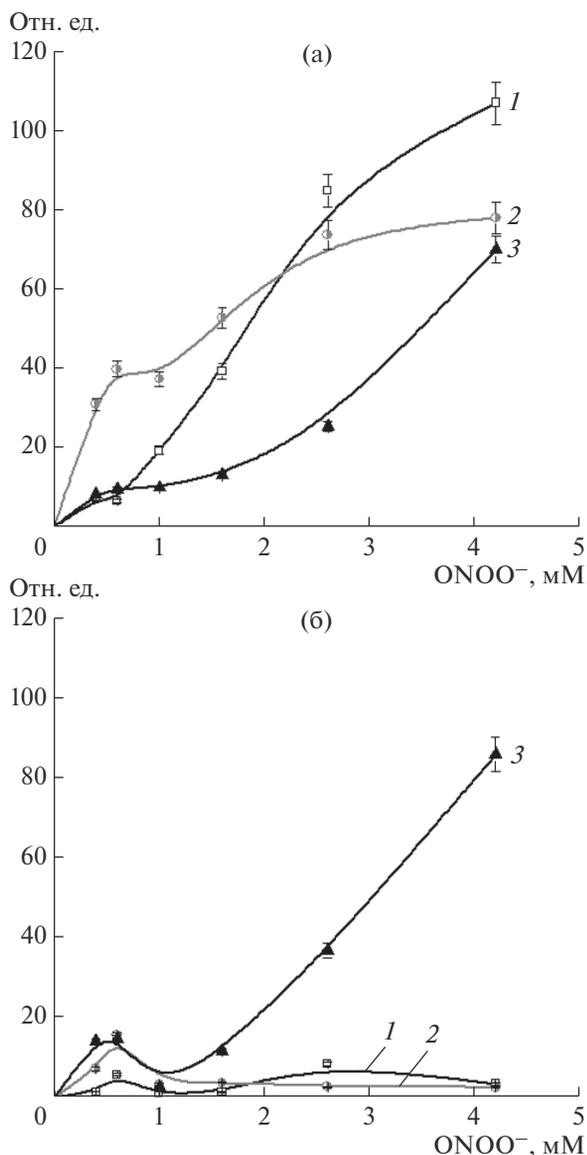


Рис. 2. Образование карбонильных производных (отн. ед.) гемоглобина под действием пероксинитрита без ДТПА (а) и в его присутствии (б). Варианты опыта: 1 – Hb, 2 – Hb + GSH, 3 – Hb + GS-ДНКЖ. (Состав реакционной смеси (мМ): Hb – 0.15, GS-ДНКЖ – 0.5, GSH – 1.0, ДТПА – 2.0).

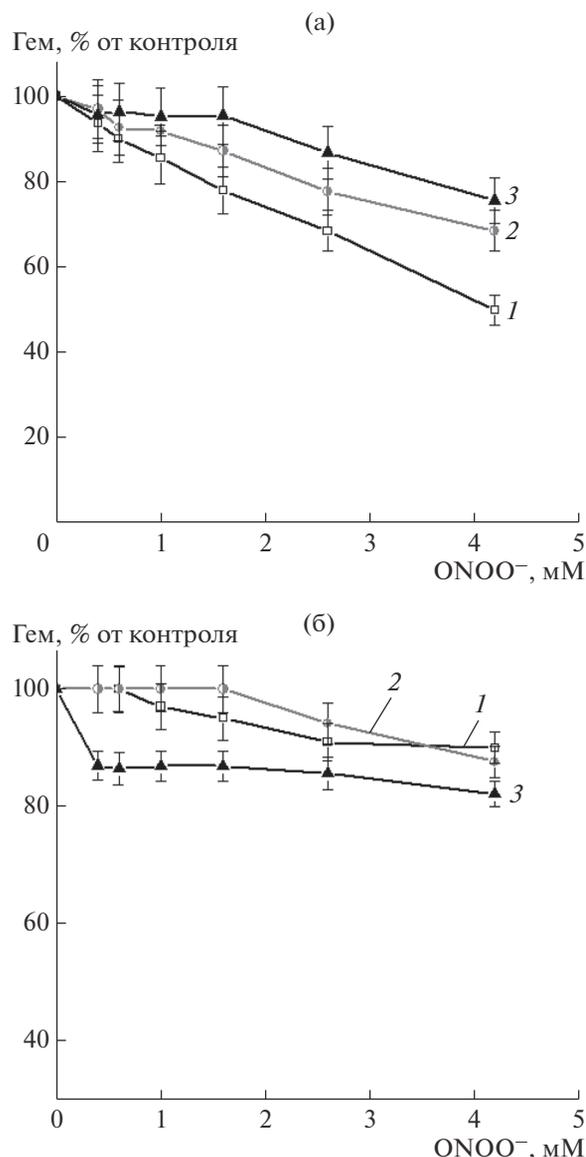


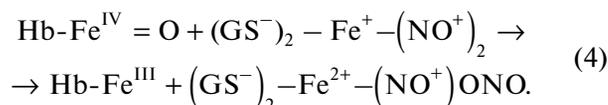
Рис. 3. Разрушение гемовой группы гемоглобина под действием пероксинитрита без ДТПА (а) и в его присутствии (б). Варианты опыта: 1 – Hb; 2 – Hb + GSH; 3 – Hb + GS-ДНКЖ. Состав реакционной смеси как на рис. 2.

риантах добавление ДТПА в реакционную среду препятствовало распаду гемовой группы, что указывало на участие примесных ионов железа в окислительной деструкции гема (рис. 3б).

Защитное действие GSH по отношению к гему можно объяснить его способностью восстанавливать Hb-Fe^{IV} = O и радикалы Cys-93β, образуемые в результате внутримолекулярного переноса электронов, на оксоферрил-форму [30].

Защитное действие GS-ДНКЖ может быть связано с различными аспектами их функциони-

рования. В работе [18] был предложен механизм защитного действия GS-ДНКЖ, заключающийся в формировании при взаимодействии этих комплексов с оксоферильной формой гемоглобина промежуточного интермедиата, который далее может распадаться или регенерироваться до исходных ДНКЖ (4).



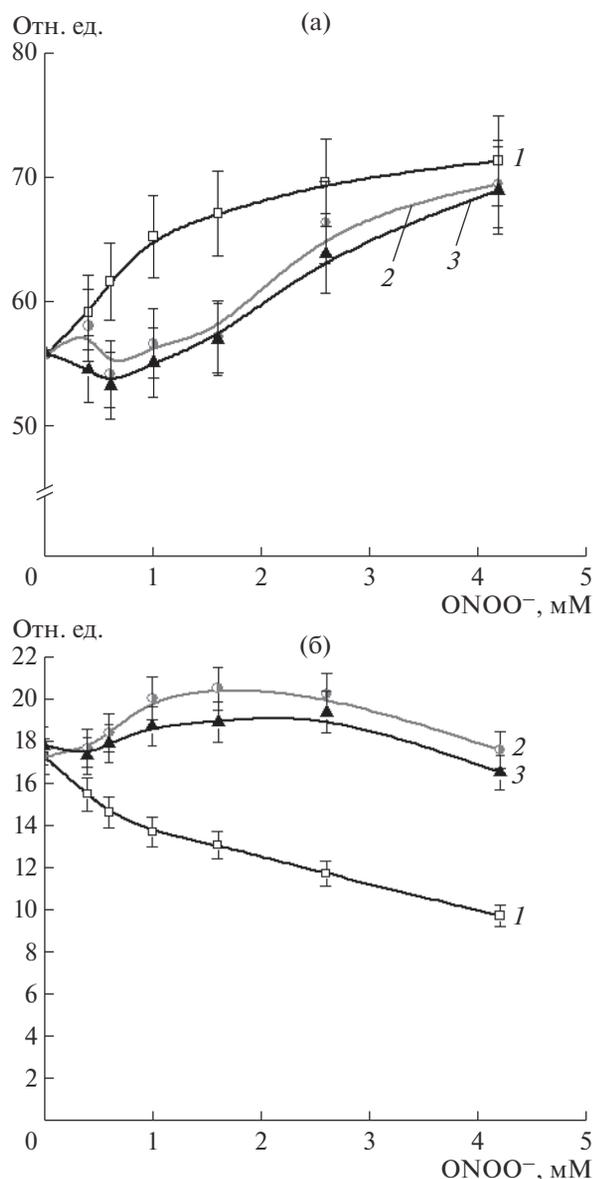


Рис. 4. Образование дитиросинов (а) в Hb под действием пероксинитрита, изменение флуоресценции триптофановых остатков Hb под действием пероксинитрита (б). Интенсивность флуоресценции, отн. ед. Варианты опыта: 1 – Hb; 2 – Hb + GSH; 3 – Hb + GS-ДНКЖ. Состав реакционной смеси как на рис. 2.

GS-ДНКЖ могут непосредственно реагировать с пероксинитритом. В этом случае может возникать интермедиат, содержащий связанный ONOO⁻, и происходит окисление глутатионовых лигандов. Вместе с тем, антиоксидантное действие ДНКЖ может быть обусловлено восстановлением радикалов порфирина и оксоферрильной формы Hb оксидом азота, выделяющимся из ДНКЖ [18, 31].

Окисление триптофановых и тирозиновых остатков в гемоглобине. При взаимодействии Hb с пероксинитритом продуцируются свободные радикалы

тирозина, триптофана и цистеина. В качестве окислителя выступает гидроксильный радикал и диоксид азота [8, 32], а также оксоферрильная форма гема [32]. При этом в реакции одноэлектронного окисления остатков тирозина формируются феноксильные радикалы [32, 33], судьба которых может быть различной. С одной стороны, в реакции двух феноксильных радикалов образуется димер 3,3'-дитиросин [26]. С другой стороны, в реакции остатков тирозина и комплексов гемового железа с пероксинитритом (Fe^{III}-ONOO⁻) образуется 3-нитротирозин [34]. 3-нитротирозин также образуется в реакции феноксильного радикала тирозина с NO₂[•] или NO, в последнем случае через такой интермедиат, как нитротирозин [35, 36]. Наличие металлсвязывающих центров в белке ускоряет реакцию нитрования тирозина [20, 37]. Предполагается, что переходные металлы, в том числе железо гема, катализируют гетеролитический распад ONOO⁻ с образованием нитронииум-катиона (NO₂⁺), являющегося сильным нитрующим агентом [34, 37].

Было проведено спектрофлуориметрическое исследование тирозиновых остатков Hb после обработки пероксинитритом. В контрольном варианте флуоресценция возрастала с увеличением концентрации ONOO⁻ (рис. 4а), что могло происходить благодаря образованию 3,3'-дитиросина, который характеризуется максимумом испускания флуоресценции при 400 нм [26]. GSH и GS-ДНКЖ ингибировали образование дитиросинов примерно в равной степени (рис. 4а).

Этот факт объясняется действием глутатиона, который является эффективным перехватчиком NO₂[•] ($k = 5.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) [38]. К тому же GSH может непосредственно восстанавливать пероксинитрит и радикалы тирозина [39]. Глутатион восстанавливает пероксинитрит по одноэлектронному механизму, образуя тиольный радикал (GS[•]), восстанавливающий кислород до супероксида. Последний реагирует с NO₂[•] с образованием пероксинитрата (O₂NOOH/O₂NOO⁻), не взаимодействующего с тирозином [40]. Действие GS-ДНКЖ можно объяснить образованием 3-нитротирозина. При этом нельзя исключить участие железа в катализе реакции нитрования [37]. Вместе с тем, хотя нитрование тирозина является кинетически более предпочтительным, чем образование его димеров, оба эти процесса могут происходить одновременно [36].

Известно, что нитрозильные комплексы с переходными металлами, в том числе ДНКЖ с нетиольными лигандами, могут трансформироваться в интермедиаты, содержащие связанный пероксинитрит [41–43]. Установлено, что эти интермедиаты способны вызывать нитрование ароматических

молекул. Подобные нестабильные промежуточные комплексы могут формироваться и при взаимодействии ONOO^- с GS-ДНКЖ. В реакции пероксинитрита с NO-лигандами ДНКЖ может образовываться нитрозилпероксинитрит (ONOONO) [44]:



Известно также, что нитрозилпероксинитрит может участвовать в нитровании дофамина [45].

Еще одной аминокислотой, являющейся мишенью действия пероксинитрита, является триптофан [46]. В молекуле Hb есть шесть остатков триптофана, из которых в первую очередь окисляется Trp15 β , тогда как окисление Trp37 β происходит при нарушении нативной структуры белка [47].

На следующем этапе была изучена зависимость интенсивности испускания флуоресценции триптофана при 327 нм от концентрации ONOO^- . В контрольном варианте интенсивность флуоресценции дозозависимо уменьшалась (рис. 4б), что свидетельствовало об окислении или нитровании триптофановых остатков. В присутствии GSH и GS-ДНКЖ происходило незначительное возрастание флуоресценции относительно исходного уровня (рис. 4б), но начиная с концентрации ONOO^- 1.6 мМ флуоресценция снижалась. Это можно объяснить тем, что при определенных концентрациях окислителя белок претерпевает конформационные перестройки, затрагивающее окружение остатка триптофана, что сказывается на автофлуоресценции.

Кроме этого, возможно образование нитро триптофана в реакции пероксинитрита с триптофаном. Эта реакция может происходить с участием пероксиазотистой кислоты или активированного интермедиата ONOON^* , образующегося из транс-пероксиазотистой кислоты, причем переходные металлы стимулируют нитрование триптофана [48]. Предполагают, что аналогично тирозину, интермедиатом в процессе нитрования триптофана является свободный радикал этой аминокислоты – триптофанил-радикал [49]. На важную роль гемовой группы в этих процессах указывает тот факт, что остатки 6- и 4-нитро триптофанов обнаружены при обработке пероксинитритом окси- и метгемоглобина, но не апогемоглобина.

Окисление тиоловых групп гемоглобина. Известно, что в Hb тирозиновые радикалы могут окислять остатки цистеина в реакции внутримолекулярного переноса электрона [33]. При этом образуются тиольные эдикалы. Гемоглобин человека содержит два цистеина в бета-субъединицах тетрамера (Cys-93 β), наиболее восприимчивых к окислению.

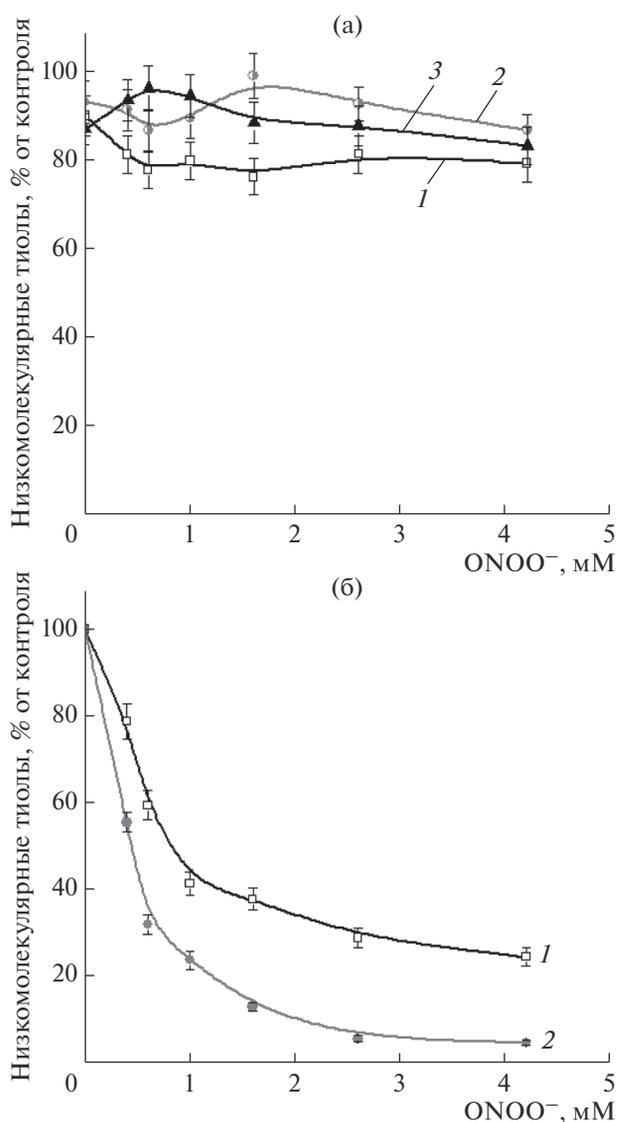


Рис. 5. Окисление пероксинитритом SH-групп гемоглобина (% к контролю), освобожденного от низкомолекулярных тиолов (GSH и GS-ДНКЖ) с помощью диализа (а), и низкомолекулярных тиолов (% к контролю) в растворе гемоглобина (б). Варианты опыта: 1 – Hb; 2 – Hb + GSH; 3 – Hb + GS-ДНКЖ.

В проведенных экспериментах заметного окисления SH-групп Hb под действием ONOO^- не происходило (рис. 5а). Незначительное (~20%) уменьшение интенсивности флуоресценции тиольного аддукта с ThioGlo1 было только в контроле (рис. 5а). Однако наблюдалось пероксинитрит-зависимое окисление низкомолекулярных тиолов (GSH и GS-ДНКЖ) в реакционной смеси с Hb (рис. 5б). Это может быть объяснено тем, что эти вещества, перехватывая ONOO^- , защищают SH-группы Hb от окисления.

Как известно, низкомолекулярные тиолы подвергаются окислению пероксинитритом по одно- и

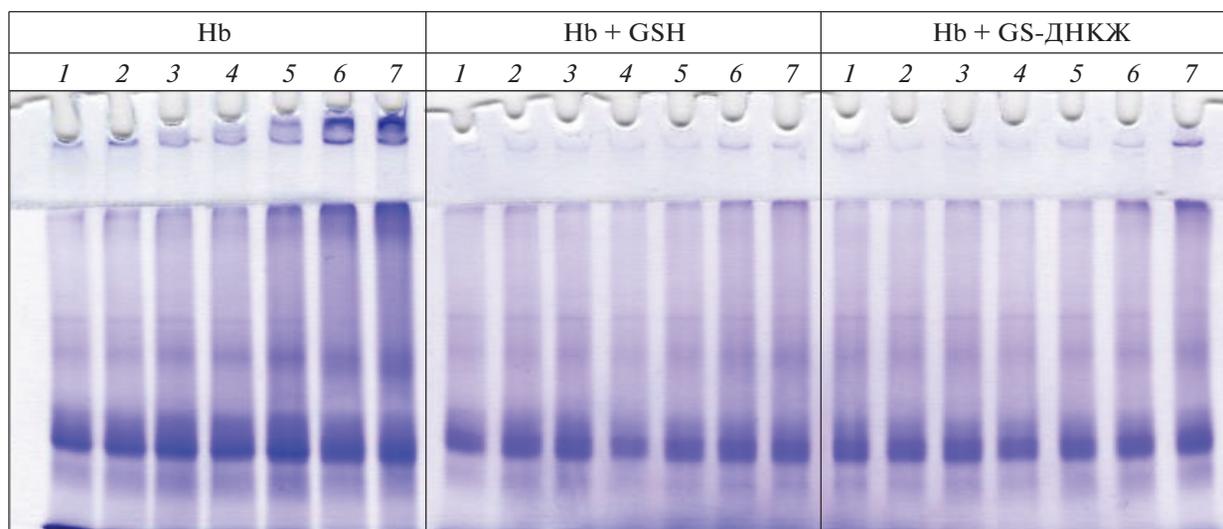


Рис. 6. Электрофорез гемоглобина в 13%-ном ПААГ с ДТТ при разной концентрации пероксинитрита в реакционной смеси: 1 – 0; 2 – 0.4; 3 – 0.6; 4 – 1.0; 5 – 1.6; 6 – 2.6; 7 – 4.2 мМ. Варианты опыта: Hb, Hb + GSH; Hb + GS-ДНКЖ. Состав реакционной смеси как на рис. 2.

двухэлектронному механизму [50, 51]. Окисление по двухэлектронному механизму включает нуклеофильную атаку тиола протонированной формой пероксинитрита (ONOOH). В результате образуются нитрит и сульфеновая кислота (R-SOH), которая может вступать в реакцию с другим тиолом с образованием дисульфида (R-SS-R). По одноэлектронному механизму реагируют пероксиазотистая кислота и производные от нее свободные радикалы ($\cdot\text{OH}$ и NO_2). В реакции с тиолат-анионом образуются тиильные радикалы (R-S^\cdot), которые инициируют зависимую от кислорода радикальную цепную реакцию [52]. Тиильные радикалы также рекомбинируют с другими R-S^\cdot или NO_2 с образованием дисульфидов или нитротииолов RS-NO_2 [51].

Образование межбелковых сшивок. Окисление белков пероксинитритом приводит к возникновению межмолекулярных ковалентных связей (сшивок) и формированию агрегатов белка. Это может происходить из-за образования радикалов аминокислотных остатков (тирозина, цистеина, триптофана) в результате окисления оксоферрильной формой гема и различными свободными радикалами [29, 36].

Образование межсубъединичных сшивок и агрегатов Hb под действием ONOO^- регистрировали с помощью денатурирующего электрофореза в 13% ПААГ с Na-ДДС в восстановительных условиях. Анализ электрофореграмм показал, что в контрольном варианте во всем диапазоне концентраций ONOO^- происходило дозозависимое образование высокомолекулярных агрегатов Hb (рис. 6). При этом агрегация была настолько сильной, что часть белка не проникала в концентрирующий

гель. В присутствии GSH и GS-ДНКЖ видимая агрегация происходила при концентрации ONOO^- 2.6 мМ и 4.2 мМ и в гораздо меньшей степени, чем в контрольном образце (рис. 6). Эти результаты согласуются с данными по окислению остатков тирозина, триптофана и цистеина (см. выше).

Таким образом, полученные результаты показали, что GS-ДНКЖ, так же, как и GSH, препятствуют образованию межбелковых сшивок, что еще раз подтверждает способность ДНКЖ выступать в роли антиоксидантов, предотвращающих агрегацию субъединиц Hb под действием активных форм кислорода и азота [16].

Продукция пероксинитрита усиливается при многих патологических состояниях (воспаления, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания) [6]. Пероксинитрит, образованный макрофагами в сосудистом русле, транспортируется в эритроцит простой диффузией или с помощью мембранного белка полосы 3 (Band3), достигая значительных концентраций внутри клетки [53]. Гемоглобин является эффективной ловушкой пероксинитрита. Расчеты показали, что 80% пероксинитрита реагирует с Hb, который катализирует его изомеризацию в нитрат [29]. Быстрой элиминации пероксинитрита в эритроците способствуют высокая концентрация Hb (около 5 мМ) и высокая константа скорости реакции второго порядка ($k = 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) [29, 53]. В результате этой реакции может происходить окислительная модификация гемоглобина.

В условиях гипоксии повреждающее действие пероксинитрита усиливается высокими уровнями

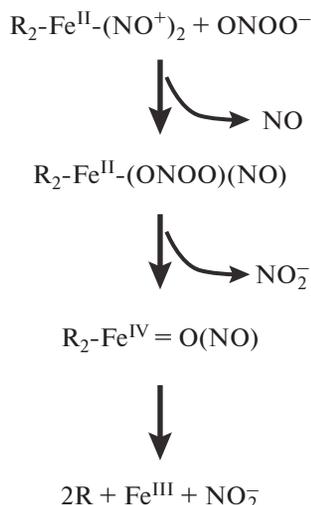


Рис. 7. Трансформация пероксинитрита в нитрит-анион, катализируемая GS-ДНКЖ.

ми CO_2 , который катализирует образование свободнорадикальных продуктов из пероксинитрита. В тоже время гипоксия благоприятствует формированию в эритроцитах ДНКЖ, которые могут не только служить формой транспорта NO за пределы клетки, но и оказывать протекторное [15, 16] и модулирующее действие на белки [4, 54]. Поскольку в эритроцитах высокая концентрация глутатиона (около 5 мМ) в них вероятно образование GS-ДНКЖ.

Взаимодействие тиолсодержащих ДНКЖ с пероксинитритом было исследовано в работах [16, 55]. Было показано, что пероксинитрит окисляет GS-ДНКЖ по двухэлектронному механизму с константой скорости третьего порядка $k = (1.8 \pm 0.3) \times 10^7 \text{ M}^{-2} \text{ c}^{-1}$ [55]. В ходе этой реакции образуются интермедиаты – комплексы, содержащие связанный с железом пероксинитрит ((GS)₂-Fe-(ONOO)(NO) (рис. 7) [16, 42, 55], или нитрозилпероксинитрит, как показано в реакции 5. Эти интермедиаты нестабильны и распадаются с высвобождением нерадикальных продуктов (NO_2^- , NO_3^-) (рис. 7) или участвуют в нитровании биомолекул, чаще всего остатков тирозина [34, 42]. Глутатионовые лиганды, входящие в состав упомянутых выше интермедиатов, окисляются по двухэлектронному механизму без образования тиольных радикалов [18]. Это выгодно отличает GS-ДНКЖ от глутатиона, который в реакции с ONOO^- дает широкий спектр свободнорадикальных продуктов [51]:



Антиоксидантные свойства ДНКЖ на первый взгляд кажутся парадоксальными, поскольку комплексы содержат редокс-активное двухвалентное железо, которое в реакции с пероксидами образует гидроксильный радикал, окисляющий белки, мембранные липиды и нуклеиновые кислоты. Однако к настоящему времени доказана способность низкомолекулярных ДНКЖ с тиольными лигандами купировать свободнорадикальные реакции и защищать липиды и белки от окислительного повреждения [15–19]. Полученные в нашей работе результаты являются еще одним подтверждением этой способности ДНКЖ.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что низкомолекулярные GS-ДНКЖ перехватывают пероксинитрит и защищают гемоглобин от окислительной модификации. Это объясняет показанное в работах [56, 57] кардиопротекторное действие GS-ДНКЖ в условиях ишемии, в том числе при искусственном кровообращении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hsiao H.Y., Chung C.W., Santos J.H., Villaflores O.B., Lu T.T. // Dalton Trans. 2019. V. 48. P. 9431–9453.
2. Vanin A.F. // Nitric Oxide. 2016. V. 54. P. 15–29.
3. Vanin A.F. Dinitrosyl Iron Complexes as a “Working Form” of Nitric Oxide in Living Organisms // Cambridge Scholars Publishing. 2019. 265 p.
4. Lewandowska H., Brzóška K., Meczyńska-Wielgosz S., Rumianek K., Wójciuk G., Kruszewski M. // Postepy Biochem. 2010. V. 56. P. 298–304.
5. Vanin A.F., Tronov V.A., Borodulin R.R. // Cell Biochem. Biophys. 2021. V. 79. № 1. P. 93–102.
6. Pacher P.L., Beckman J.S., Liaudet L. // Physiol. Rev. 2007. V. 87. P. 315–424.
7. Su J., Groves J.T. // Inorg. Chem. 2010. V. 49. № 14. P. 6317–6329.
8. Bartesaghi S., Radi R. // Redox Biology. 2018. V. 14. P. 618–625.
9. Abalenikhina Yu.V., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 6. P. 611–623.
10. Prolo C., Alvarez M.N., Ríos N., Peluffo G., Radi R., Romero N. // Free Radic. Biol. Med. 2015. V. 87. P. 346–355.
11. Balagopalakrishna C., Manoharan P.T., Abugo O.O., Rifkind J.M. // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 6393–6398.
12. Huang Z., Shiva S., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P., Ringwood L.A., Irby C.E., Huang K.T., Ho C., Hogg N., Schechter A.N., Gladwin M.T. // J. Clin. Invest. 2005. V. 115. № 8. P. 2099–2107.

13. Cortese-Krott M.M., Kelm M. // *Redox Biol.* 2014. V. 2. P. 251–258.
14. Padmaja S., Huie R.E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. V. 195. P. 539–544.
15. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhenkov V.A., Lobysheva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F. // *Nitric Oxide.* 2008. V. 18. P. 37–46.
16. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. // *Methods Enzymol.* 2008. V. 436. P. 445–461.
17. Shumaev K.B., Dudylina A.L., Ivanova M.V., Pugachenko I.S., Ruuge E.K. // *Biofactors.* 2018. V. 44. № 3. P. 237–244.
18. Shumaev K.B., Petrova N.E., Zabbarova I.V., Vanin A.F., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K. // *Biochemistry (Moscow).* 2004. V. 69. № 5. P. 569–574.
19. Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V., Grigoryeva D.V., Panasenkov O.M., Vanin A.F., Topunov A.F., Terekhova M.S., Sokolov A.V., Cherenkevich S.N., Ruuge E.K. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. V. 2019. e2798154.
<https://doi.org/10.1155/2019/2798154>
20. Pietraforte D., Salzano A.M., Marino G., Minetti M. // *Amino Acids.* 2003. V. 25. № 3–4. P. 341–350.
21. Beckman J.S. // *Methods Enzymol.* 1994. V. 233. P. 229–240.
22. Schmorak J., Lewin M. // *Anal. Chem.* 1961. V. 33. P. 1403–1405.
23. Абаленихина Ю.В., Фомина М.А. // *Казанский медицинский журн.* 2014. Т. 95. № 4. С. 553–557.
24. Riggs A. // *Methods Enzymol.* 1981. V. 76. P. 5–29.
25. Hoff S., Larsen F.H., Andersen M.L., Lund M.N. // *Analyst.* 2013. V. 138. P. 2096–2103.
26. Davies K.J., Delsignore M.E. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 20. P. 9908–9913.
27. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
28. Singh R.J., Hogg N., Joseph J., Konorev E., Kalyanaraman B. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1999. V. 361. № 2. P. 331–339.
29. Romero N., Radi R., Linares E., Augusto O., Detweiler C.D., Mason R.P., Denicola A. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 45. P. 44049–44057.
30. Augusto O., Lopez de Menezes S., Linares E., Romero N., Radi R., Denicola A. // *Biochemistry.* 2002. V. 41. P. 14323–14328.
31. Gorbunov N.V., Osipov A.N., Day B.W., Zayas-Rivera B., Kagan V.E., Elsayed N.M. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. P. 6689–6699.
32. Radi R. // *Acc. Chem. Res.* 2012. V. 46. P. 550–559.
33. Bhattacharjee S., Deterding L.J., Jiang J., Bonini M.G., Tomer K.B., Ramirez D.C., Mason R.P. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. № 44. P. 13493–13501.
34. Schopfer M.P., Mondal B., Lee D.-H., Sarjeant A.A.N., Karlin K.D. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. № 32. P. 11304–11305.
35. Gunther M.R., Sturgeon B.E., Mason R.P. // *Toxicology.* 2002. V. 177. № 1. P. 1–9.
36. Radi R. // *Acc. Chem. Res.* 2013. V. 46. № 2. P. 550–559.
37. Campolo N., Bartesaghi S., Radi R. // *Redox Rep.* 2014. V. 19. № 6. P. 221–231.
38. Ford E., Hughes M.N., Wardman P. // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 32. P. 1314–1323.
39. Folkes L.K., Trujillo M., Bartesaghi S., Radi R., Wardman P. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2011. V. 506. P. 242–249.
40. Kirsch M., Lehnig M., Korth H.G., Sustmann R., de Groot H. // *Chem. Eur. J.* 2001. V. 7. № 15. P. 3313–3320.
41. Kalita A., Kumar P., Mondal B. // *Inorg. Chem.* 2013. V. 52. № 19. P. 10897–10903.
42. Tran N.G., Kalyvas H., Skodje K.M., Hayashi T., Moënne-Loccoz P., Callan P.E., Shearer J., Kirschenbaum L.J., Kim E. // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. V. 133. № 5. P. 1184–1187.
43. Mondal B., Saha S., Borah D., Mazumdar R., Mondal B. // *Inorg. Chem.* 2019. V. 58. № 2. P. 1234–1240.
44. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Chumikina, L.V., Topunov A.F. // *Natural Product Communications.* 2016. V. 11. № 8. P. 1189–1192.
45. Nappi A.J., Vass E. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 14. P. 11214–11222.
46. Pietraforte D., Minetti M. // *Biochem. J.* 1997. V. 321. P. 734–750.
47. Jia Y., Buehler P.W., Boykins R.A., Venable R.M., Alayash A.I. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 4894–4907.
48. Alvarez B., Rubbo H., Kirk M., Barnes S., Freeman B.A., Radi R. // *Chem. Res. Toxicol.* 1996. V. 9. № 2. P. 390–396.
49. Nuriel T., Hansler A., Gross S.S. // *J. Proteomics.* 2011. V. 74. № 11. P. 2300–2312.
50. Quijano R., Alvarez B., Gatti R.M., Augusto O., Radi R. // *Biochem. J.* 1997. V. 322. P. 167–173.
51. Balazy M., Kaminski P.M., Mao K., Tan J., Wolin M.S. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 48. P. 32009–32015.
52. Karoui H., Hogg N., Kalyanaraman B. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1996. V. 330. P. 115–124.
53. Denicola A., Souza J.M., Radi R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 3566–3571.
54. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Novikova N.N., Topunov A.F. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020. V. 56. № 5. P. 512–520.
55. Lobysheva I.I., Serezhenkov V.A., Vanin A.F. // *Biochemistry (Moscow).* 1999. V. 64. № 2. P. 153–158.
56. Kapelko V.I., Lakomkin V.L., Abramov A.A., Lukoshkova E.V., Undrovina N.A., Khapchaev A.Y., Shirinsky V.P. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. V. 2017. e9456163.
<https://doi.org/10.1155/2017/9456163>
57. Pisarenko O., Studneva I., Timoshin A., Veselova O. // *Pflügers Arch.* 2019. V. 471. P. 583–593.

Dinitrosyl Iron Complexes with Glutathione Ligands Intercept Peroxynitrite and Protect Hemoglobin Against Oxidative Modification

O. V. Kosmachevskaya^a, E. I. Nasybullina^a, K. B. Shumaev^a, L. V. Chumikina^a,
L. I. Arabova^a, N. V. Yaglova^b, S. S. Obernikhin^b, and A. F. Topunov^{a, *}

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

^b*Research Institute of Human Morphology, Moscow, 117418 Russia*

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

Dinitrosyl iron complexes with glutathione ligands (GS-DNICs) are a physiological form of NO, which is stored and transported in the organism. In addition, these complexes can act as antioxidants and anti-radical agents. It was shown that GS-DNICs protect hemoglobin (Hb) against oxidative modification with peroxynitrite. They prevent the formation of carbonyl Hb derivatives, the oxidation of tryptophan and tyrosine residues, the degradation of the heme group, as well as the formation of inter-protein cross-links. These complexes also inhibit the oxidation of dihydrorhodamine with peroxynitrite, formed by the 3-morpholinolinosydonimine decomposition. In some cases, the antioxidant effect of GS-DNICs is comparable to that of reduced glutathione. The results obtained allow to consider GS-DNICs as peroxynitrite interceptors and Hb protectors.

Keywords: hemoglobin, dinitrosyl iron complexes, peroxynitrite, glutathione, oxidative modification, carbonyl derivatives

УДК 577.21,579.25

CRISPR-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ *Mycobacterium tuberculosis*

© 2021 г. Н. И. Надолинская¹, *, М. В. Замахеев¹, М. С. Шумков¹,
Д. К. Армянинова¹, Д. С. Карпов², А. В. Гончаренко¹

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

²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: nioriss@gmail.com

Поступила в редакцию 25.12.2020 г.

После доработки 20.01.2021 г.

Принята к публикации 22.02.2021 г.

В работе описана модификация вектора pRH2521 системы pRH2502/pRH2521, используемой для CRISPR-dCas9-опосредованной РНК-интерференции микобактерий. Введенная модификация обеспечивала повышение эффективности клонирования спейсеров направляющих РНК. Способность измененной системы pRH2502/pRH2521 подавлять транскрипцию определенных генов проверена на примере генов аденилатциклаз *Mycobacterium tuberculosis*. Полученные результаты выявили ограничения использования системы pRH2502/pRH2521 для CRISPR-интерференции, связанные с вероятностью нахождения участка PAM в области промотора подавляемого гена.

Ключевые слова: CRISPR, CRISPRi, туберкулез, микобактерии, аденилатциклазы

DOI: 10.31857/S0555109921040127

Несмотря на усилия медицинского и научного сообщества, туберкулез (ТБ) остается основной причиной смерти среди инфекционных заболеваний. По данным ВОЗ, он ежедневно уносит жизни около 4000 человек [1], что сопоставимо с количеством ежедневных смертей от COVID-19 в пик пандемии коронавирусной инфекции в 2020 г. Функции почти четверти из 4000 генов *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) остаются неизвестными, хотя 5% из них предположительно значимы для роста [2] и могут быть потенциальными мишенями при разработке противотуберкулезных препаратов и вакцин. Технология CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – многофункциональный инструмент геномной инженерии [3], созданный из бактериальной системы приобретенной устойчивости к фагам и плазмидам. CRISPR-ассоциированная нуклеаза образует комплекс с направляющей РНК (gRNA), предназначенной для распознавания интересующей целевой последовательности (протоспейсера) и расположенного рядом участка (мотива) PAM (protospacer adjacent motif), состоящего из 2–6 пар оснований ДНК. Результатом узнавания и связывания комплекса gRNA и CRISPR-ассоциированной нуклеазы с целевой последовательностью

является ее двухцепочечный разрыв. В процессе репарации разрыва возможно направленное редактирование последовательности ДНК. Позже метод был адаптирован для направленного подавления экспрессии генов без изменения последовательности ДНК. Специфичное подавление транскрипции с использованием CRISPR было названо CRISPR-интерференцией (CRISPRi) [4–6].

Для осуществления CRISPR-Cas9 интерференции нуклеаза Cas9 была лишена эндонуклеазной активности путем замены двух аминокислот (D10A и H841A) в никазных доменах RuvC и HNH исходного белка [5]. Поскольку ДНК-связывающая активность dCas9 не была затронута, комплекс этой нуклеазы с направляющей РНК может обратимо связывать ДНК-мишень, вследствие чего происходит блокировка транскрипции целевых генов. Наличие индуцибельного промотора делает регуляцию системы CRISPRi более тонкой и точной [7]. В результате CRISPRi-опосредованная репрессия генов может достигать 99% и приводить к фенотипическим изменениям, сходным с нокаутингом гена [8]. Такой подход позволяет изучать функции неизвестных генов, не прибегая к длительному и сложному получению делеций.

Оптимизированная для микобактерий система CRISPR-dCas9-опосредованной РНК-интерференции [9] включает вектор для экспрессии dCas9 pRH2502 и вектор pRH2521 для клонирования спейсеров, кодирующих направляющую РНК для нацеливания на интересующий ген. Авторы работы [9] продемонстрировали подавление экспрессии нескольких генов *Mtb* и возможность модуляции степени ингибирования транскрипции. Ключевым моментом, влияющим на эффективность подавления экспрессии, оказалась близость протоспейсера к промоторному участку.

Методически CRISPR-интерференция с помощью системы pRH2502/pRH2521 включает следующие этапы. Первый — это клонирование подобранных направляющих РНК в вектор pRH2521, затем последовательная трансформация в *Mtb* вектора pRH2502 с dCas9 (получение клеток *Mtb*-pRH2502), трансформация вектора с pRH2521-gRNA в *Mtb*-pRH2502 (получение клеток *Mtb*-pRH2502/pRH2521-gRNA). Далее следует индукция CRISPR-интерференции и анализ результатов с помощью ПЦР в реальном времени. Оказалось, что эффективность клонирования спейсеров направляющей РНК в вектор pRH2521 довольно низка. В связи с этим, нами была поставлена задача улучшения эффективности клонирования путем модификации вектора pRH2521. Модифицированная система была использована для оценки возможности подавления с ее помощью транскрипции генов аденилатциклаз (АС) микобактерий, представляющих значительный научный интерес с позиций их влияния на физиологию *Mtb*.

Циклический 3', 5'-АМР (сАМР) является одним из наиболее широко распространённых вторичных мессенджеров бактерий, архей и эукариот [10].

У микобактерий АС, осуществляющие синтез сАМР, кодируются необычно большим количеством различных генов. При этом передача сигналов сАМР у *Mtb* не связана с классической системой катаболитной репрессии, характерной для многих бактерий [11]. Уровень сАМР у туберкулезной палочки практически не зависит от количества глюкозы в среде культивирования и регулирует иные метаболические пути, а также взаимодействие патогена с хозяином [12].

Ранее нами было показано [13], что гиперэкспрессия гена АС Rv2212 препятствует переходу *Mtb* в покоящееся состояние. Клетки, гиперэкспрессирующие АС Rv2212, демонстрировали значительно более высокую скорость роста в легких и селезенке инфицированных мышей по сравнению с контрольным штаммом и в отличие от контрольного штамма приводили к гибели ТБ-устойчивых мышей [13]. Вклад остальных генов АС в вирулентность *Mtb* в настоящее время неизвестен.

Цель работы — модификация системы pRH2502/pRH2521, используемой для CRISPR-dCas9-опосредованной РНК-интерференции микобактерий, и оценка ее возможностей для CRISPR-интерференции генов АС Rv2212, Rv1320с, Rv1319с, Rv1318с.

МЕТОДИКА

Векторы для экспрессии dCas9 и sgRNA. С целью создания системы для CRISPR/Cas-нокдауна были приобретены векторы (“Addgene”, Великобритания), оптимизированные для работы с микобактериями [9]: плаزمида pRH2502, несущая dCas9Spu из *Streptococcus pyogenes*, и плазмиды для направляющих РНК для Cas9 pRH2521.

Модификация вектора pRH2521 для оптимизации клонирования спейсеров направляющих РНК. Для получения вектора pRH2521-α с плазмиды pCRCT был амплифицирован ген α-пептида β-галактозидазы lacZα. ПЦР-продукт гидролизовали по BbsI-сайтам и клонировали в вектор pRH2521, предварительно гидролизованный BbsI. В результате была создана плаزمиды, позволяющая отбирать колонии бактерий, содержащие вставку спейсеров, с помощью бело-голубой селекции в присутствии субстрата β-галактозидазы X-Gal. Колонии клеток, несущих пустой вектор pRH2521-α, окрашивались в синий цвет, а колонии бактерий, содержащие вставку спейсеров, теряли α-пептид и в присутствии хромогенного субстрата β-галактозидазы X-Gal не имели синего окрашивания. Названия и последовательности праймеров приведены в табл. 1, сайт BbsI выделен жирным шрифтом.

Подбор спейсеров направляющих РНК для генов аденилатциклаз *Mtb*. Для подбора спейсеров gRNA использовали ресурс <http://grna.ctegd.uga.edu/>, в который по просьбе авторов настоящей работы был внесен геном *Mtb*. Были подобраны направляющие для нокдауна выбранных генов АС с использованием эндонуклеазы Cas9. Последовательности спейсеров направляющих РНК приведены в табл. 1.

Подавление экспрессии генов оперона Rv1320с, Rv1319с, Rv1318с осуществляли с помощью одной общей направляющей gRNA.

Клонирование спейсеров направляющих РНК для генов аденилатциклаз *Mtb*. Спейсеры направляющих РНК подбирали по принципу максимальной близости к старту транскрипции, насколько это позволяло наличие в целевой области РАМ-мотива (рис. 1).

Для клонирования спейсеров направляющих РНК был проведён дизайн олигонуклеотидов, которые, отжигаясь друг на друга, образовывали липкие концы, совместимые с липкими концами

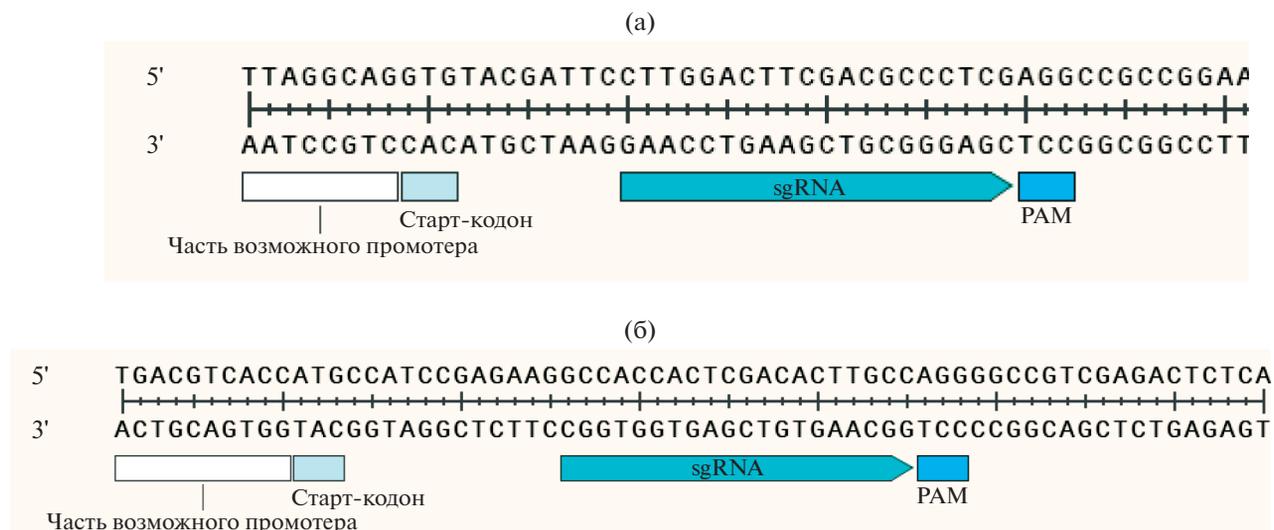


Рис. 1. Взаимное расположение элементов интерференции генов *Rv2212* (а) и *Rv1320c* (б).

вектора pRH2521- α , образующиеся после его гидролиза эндонуклеазой рестрикции BbsI (рис. 2).

Бактериальные штаммы, среды, условия культивирования. В исследовании использованы бактериальные штаммы *Escherichia coli* DH5 α и *M. tuberculosis* H37Rv.

Клетки *E. coli* DH5 α выращивали в среде Лурия-Бертани (LB) с добавлением антибиотиков, когда

это было необходимо (50 мкг/мл канамицина (Km) и/или 50 мкг/мл гигромицина (Hg)). *Mtb* культивировали в средах Миддлбука 7H9/7H10 с добавлением ростовой добавки OADC (“Himedia”, Индия) и 0.025% тилоксапола и, при необходимости, антибиотиков (20 мкг/мл Km и/или 25 мкг/мл Hg). Культивирование микобактерий проводили в соответствии с рекомендациями Т. Пэриш [14].

Таблица 1. Олигонуклеотиды и праймеры, использованные в исследовании

Название	Последовательность	Аmplифицируемый участок
UpBbsLacZ α	ATTTCTACGGGAATGTCTTCTCAG CCGCTACAGGGCGCGTCCCAT	Ген α -пептида β -галактозидазы
LowBbsLacZ α	AGTAGAAAAACGAGTCTTCTGGAA AGCGGGCAGTGAGCGCAA	
gRNA <i>Rv2212</i>	CTTGGACTTCGACGCCCTCG	Направляющая РНК для гена <i>Rv2212</i>
gRNA <i>Rv1320c</i>	GCCACCACTCGACACTTGCC	Направляющая РНК для гена <i>Rv1320c</i>
UpRT2212	GCGGGCCGGCTTGCTCACCTACCT	Ген <i>Rv2212</i>
LowRT2212	CGGCGTTCGGCTTGACCATCTCT	
UpRT1320	CCGCATTGGGTGTCGTTTCG	Ген <i>Rv1320c</i>
LowRT1320	TGAGCCAGTAGGTGCCCAGTATGA	
UpRT1319	CCGACGGGCGCAACACCTT	Ген <i>Rv1319c</i>
LowRT1319	ACGCCCGCCGATATCCCACAGAA	
UpRT1318	TCCCGAAGACAAGGCACTGG	Ген <i>Rv1318c</i>
LowRT1318	CCTGGCACTCGGGCATTTTCGT T	

Векторы системы CRISPRi трансформировали в *Mtb* последовательно (pRH2502, затем pRH2521- α -gRNA) методом электропорации, которую проводили на приборе Gene Pulser Xcell (“Bio-Rad”, США) согласно протоколу [14].

После электропорации *Mtb* вектором pRH2502 через 4 нед. были получены единичные колонии на среде с Km. Клетки с плазмидой pRH2502 были выращены в жидкой среде и трансформированы плазмидами pRH2521- α -gRNA. Через 4 нед. на среде с Km и Hg были получены колонии, содержащие пару векторов pRH2502/pRH2521- α -gRNA. Далее трансформанты подращивали на жидкой среде 2–3 нед., после чего синтез направляющих РНК и экспрессию dCas9 индуцировали добавлением тетрациклина в концентрации 20 нг/мл.

Подготовка образцов для ПЦР в реальном времени. После 24 ч индукции клеточную биомассу собирали и с помощью коммерческого набора RNeasy Mini Kit (“Qiagen”, Германия) выделяли тотальную РНК, которую затем очищали от примесей ДНК путём обработки ДНКазой I Ambion DNase I RNase free (“Thermo Scientific”, США), не содержащей РНКаз. Удаление примесей ДНК подтверждали ПЦР. Подготовленные образцы РНК служили матрицей для синтеза кДНК с использованием рассеянной затравки. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени.

ПЦР в реальном времени. Для проведения ПЦР в реальном времени использовали наборы iQ SYBR Green Supermix Sample (“Bio-Rad”, США). Реакции осуществляли с использованием прибора “Mini Opticon Real-time PCR System” (“Applied Biosystems”, США) согласно протоколу производителя. В качестве референсного гена использовали ген *16S* рРНК. Эксперименты проводили в трех технических повторах. Специфические праймеры, использованные в реакции, представлены в табл. 1.

Обработку результатов qRT-PCR проводили с использованием программы LinRegPCR v. 2017.0 (Heart Failure Research Center, Нидерланды), анализ полученных данных осуществляли методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Модификация вектора pRH2521 для оптимизации клонирования спейсеров направляющих РНК. Двухплазмидная система pRH2521/pRH2502 исходно была разработана для CRISPR-интерференции (CRISPR-нокдауна) генов микобактерий [9]; соответствующие модификации и свойства векторов описаны выше. Однако, оказалось, что эффективность клонирования спейсеров направляющей РНК в сайты рестрикции *BbsI* вектора

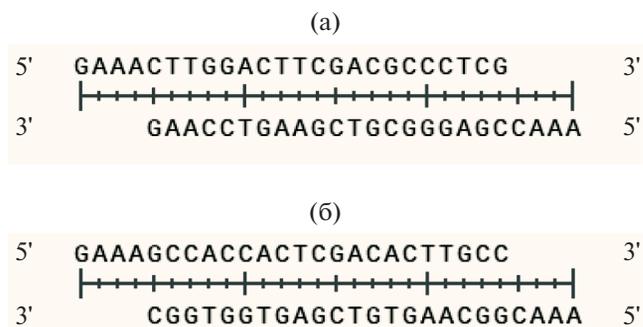


Рис. 2. Спейсер направляющей РНК для подавления экспрессии гена *Rv2212* (а) и генов оперона *Rv1320c-Rv1319c-Rv1318c* (б).

pRH2521 была низкой, менее 10%, что затрудняло отбор клонов, несущих плазмиду со спейсерами. Для облегчения задачи клонирования спейсеров направляющей РНК в вектор pRH2521 по сайтам *BbsI* нами был клонирован ген α -пептида β -галактозидазы *lacZ α* . В результате колонии клеток, несущих пустой вектор pRH2521- α , окрашивались в синий цвет, а колонии бактерий, содержащих вектор со вставкой спейсеров, теряли α -пептид и в присутствии X-Gal – хромогенного субстрата β -галактозидазы – не имели синей окраски. Такая модификация вектора pRH2521 позволила легко отбирать целевые клоны с помощью бело-синей селекции.

Оценка эффективности подавления транскрипции генов *Rv2212*, *Rv1318*, *Rv1319*, *Rv1320* с помощью системы pRH2502/pRH2521- α CRISPRi. В результате проведения CRISPRi с помощью системы pRH2502/pRH2521- α удалось добиться подавления экспрессии гена *Rv2212* на 43% (рис. 3). Гены *Rv1320c*, *Rv1319c*, *Rv1318c* находятся в составе единого оперона и транскрибируются в направлении от *Rv1320c* к *Rv1318c*. Транскрипцию генов оперона *Rv1320-Rv1319-Rv1318* с помощью выбранной направляющей РНК подавить не удалось. Такой результат, видимо, связан с низким уровнем экспрессии исследуемого оперона в условиях *in vitro*. Нельзя исключать, что экспрессия оперона в условиях инфицированных макрофагов будет выше и, соответственно, можно будет добиться подавления экспрессии выбранных генов, а также наблюдать фенотипические эффекты такого подавления.

Авторы системы pRH2502/pRH2521 сообщали о подавлении уровня экспрессии от 10–50% и до 80–90%. Это было сделано на генах *inhA*, *dfrA*, *wag31* и *ftsZ*, первые два из которых представляют собой мишени для изониазида и метотрексата соответственно [15, 16], а два других участвуют в формировании морфологии клеток [17, 18]. Специфика выбора мишеней интерференции позволила кроме

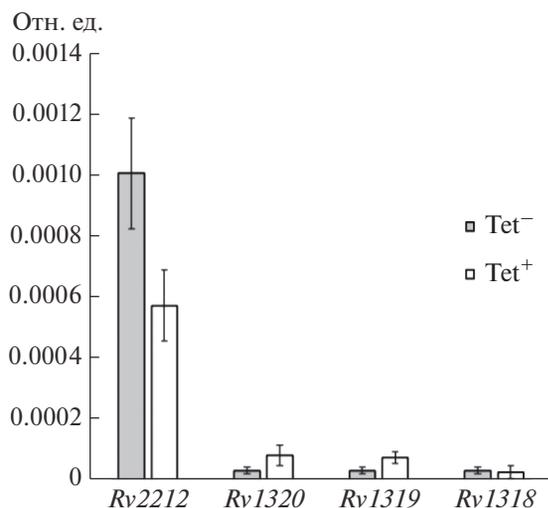


Рис. 3. Относительная экспрессия (отн. ед.) генов аденилатциклаза *Rv2212* и оперона *Rv1320c-Rv1319c-Rv1318c* в условиях активации системы *pRH2502/pRH2521-α* при индукции тетрациклином (Tet^+). В качестве контроля использован уровень экспрессии в отсутствие индукции тетрациклином (Tet^-). Представлены средние значения \pm стандартное отклонение.

детекции подавления экспрессии наблюдать фенотипические проявления работы CRISPRi.

Более эффективное снижение генной экспрессии, возможно, могло бы быть достигнуто при выборе в качестве протоспейсера участка ДНК, комплементарного промоторной области анализируемых генов, однако для ингибируемых генов аденилатциклаза расположение промотора требует уточнения. Другим ограничением метода явилась необходимость присутствия в непосредственной близости от протоспейсера определенного РАМ (NGG). В экспериментах Сингха с соавт. [9] были исследованы разные варианты мишеней (захватывающие 35 элемент промотора, участок 5'-нетранслируемой области между сайтом начала транскрипции и кодоном инициации трансляции и последовательность на 5'-конце белок-кодирующей области ДНК). По результатам исследования авторы сделали вывод о важности выбора протоспейсера вблизи промоторной области. К сожалению, найти подходящие направляющие РНК в функционально различных участках матрицы оказывается возможным не для всех генов. Аналогичным образом, не для всех генов известна область промотора. И, кроме того, в узкой области желаемого места отжига направляющей РНК далеко не всегда можно обнаружить РАМ, что также является ограничением метода и, по-видимому, одной из причин неудачного подавления оперона *Rv1320-Rv1319-Rv1318*.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что проведенная модификация вектора

pRH2521 для оптимизации клонирования спейсеров направляющих РНК позволяет легко осуществлять селекцию целевых клонов. Система *pRH2502/pRH2521-α* может быть эффективно использована для CRISPR-интерференции, но с ограничениями, которые определяются возможностью нахождения РАМ в области картированного промотора.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global Tuberculosis Report. World Health Organization, 2020. Geneva.
2. Zhang Y., Ioerger T., Huttenhower C., Long J., Sasseti C., Sacchettini J. et al. // *PLoS Pathog.* 2012. V. 8. № 9. e1002946.
3. Zhang F., Wen Y., Guo X. // *Human Molecular Genetics.* 2014. V. 23. № R 1. P. R40–R46.
4. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. // *Science (New York).* 2012. V. 337. № 6096. P. 816–821.
5. Qi L., Larson M., Gilbert L., Doudna J., Weissman J., Arkin A., Lim W. // *Cell.* 2013. V. 152. № 5. P. 1173–1183.
6. Larson M., Gilbert L., Wang X., Lim A., Weissman J., Qi L. // *Nat. Protoc.* 2013. V. 8. P. 2180–2196.
7. Ehrt S., Schnappinger D. // *Future Microbiol.* 2006. V. 1. № 2. P. 177–184.
8. Cleto S., Jensen J., Wendisch V., Lu T. // *ACS Synthetic Biology.* 2016. V. 5. № 5. P. 375–385.
9. Singh A., Carrette X. et al. // *Nucleic Acids Research* 2016. V. 44. № 18. P. e143.
10. Botsford J., Harman J. // *Microbiol. Rev.* 1992. V. 56. № 1. P. 100–122.
11. De Carvalho L., Fischer S., Marrero J., Nathan C., Ehrt S., Rhee K. // *Chem. Biol.* 2010. V. 17. № 10. P. 1122–1131.
12. Bai G., Schaak D., McDonough K. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2009. V. 55. № 1. P. 68–73.
13. Shleeva M., Kondratieva T., Demina G., Rubakova E., Goncharenko A., Apt A., Kaprelyants A. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017. V. 7. № 370.
14. *Mycobacteria Protocols.* / Ed. T. Parish, D. Roberts. N.Y.: Media Springer Science + Business, 2015. 103 p.
15. Larsen M., Vilchèze C. et al. // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 46. № 2. P. 453–66.
16. White E., Ross L., Cunningham A., Escuyer V. // *FEMS Microbiol Lett.* 2004. V. 232. № 1. P. 101–105.
17. Kang C., Nyayapathy S., Lee J., Suh J., Husson R. // *Microbiology (Reading).* 2008. V. 154. (Pt 3). P. 725–735.
18. Dziadek J., Rutherford S., Madiraju M., Atkinson M., Rajagopalan M. // *Microbiology (Reading).* 2003. V. 149. (Pt 6). P. 1593–1603.

CRISPR Interference of *Mycobacterium tuberculosis* Adenylate Cyclase**N. I. Nadolinskaia^{a, *}, M. V. Zamakhaev^a, M. S. Shumkov^a, D. K. Armianinova^a,
D. S. Karpov^b, and A. V. Goncharenko^a**^a*Bach Institute of biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology"
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*^b*Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia***e-mail: nioriss@gmail.com*

This work describes a modification of the pRH2521 vector of the pRH2502/pRH2521 system for CRISPR-dCas9-mediated RNA interference. The modification provided an increase of the cloning efficiency of guide RNA spacers. The ability of the modified pRH2502/pRH2521 system to suppress the transcription of certain genes was evaluated using the genes of *Mycobacterium tuberculosis* adenylate cyclases. The results revealed the limitations of using the pRH2502/pRH2521 system for CRISPR interference associated with the probability of finding PAM in the gene promoter region.

Keywords: CRISPR, CRISPRi, tuberculosis, mycobacteria, adenylate cyclase

УДК 579.842.23

УЧАСТИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА И НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОРИНОВ *Yersinia pseudotuberculosis* В РЕЦЕПЦИИ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗНОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА

© 2021 г. Л. Г. Дудина^{1,2}, О. Д. Новикова^{3, *}, О. Ю. Портнягина³,
В. А. Хоменко³, И. В. Коньшев^{1,2}, А. А. Бывалов^{1,2, **}

¹Вятский государственный университет, Киров, 610000 Россия

²Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, 167982 Россия

³Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН им. Г.Б. Елякова, Владивосток, 690022 Россия

*e-mail: novolga_05@mail.ru

**e-mail: byvalov@nextmail.ru

Поступила в редакцию 27.08.2020 г.

После доработки 02.02.2021 г.

Принята к публикации 22.02.2021 г.

Роль компонентов наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* в адсорбции псевдотуберкулезного диагностического бактериофага (ПДБ) оценивали с помощью двух модельных систем взаимодействия “бактериофаг-антиген”, в которых целевые антигены находились или в растворе, или на поверхности полистирольных микросфер. Показано, что неспецифические порины наружной мембраны OmpF и OmpC псевдотуберкулезного микроба участвовали в рецепции ПДБ наряду с липополисахаридом. Выявлена существенная роль конформации молекулы поринов при взаимодействии с ПДБ. Обнаружено, что O-антиген *Y. pseudotuberculosis* не только не участвует в рецепции ПДБ, но и препятствует ей, экранируя рецепторный участок кора липополисахарида иерсиний, полностью доступный у клеток *Y. pestis* для контакта с бактериофагом.

Ключевые слова: бактериофаг, порины, липополисахарид, рецептор, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*

DOI: 10.31857/S0555109921040048

Одной из наиболее острых проблем современной медицины является появление и широкое распространение резистентных к антибиотикам штаммов возбудителей многих инфекционных заболеваний, в том числе и патогенных представителей рода *Yersinia*, включая *Yersinia pseudotuberculosis* [1]. Альтернативным и/или дополнительным подходом к решению проблем диагностики, лечения и профилактики инфекций, вызываемых такими штаммами бактерий, признано использование специфических бактериофагов [2, 3]. Выяснение механизмов взаимодействия в системе “бактериальная клетка – фаговая частица” определяет перспективу применения тех или иных бактериофагов в качестве лекарственных и диагностических средств.

Известно, что взаимодействие белков адсорбционного аппарата бактериофага с рецепторными структурами на поверхности бактериальной клетки необходимо для “конформационного” запуска фаговой инфекции [4]. Ключевой характери-

стикой инфицирующей активности бактериофага является его способность к высокоаффинному взаимодействию с некоторыми консервативными молекулярными структурами, выраженными на поверхности бактериальной клетки [5]. Прикрепление фага к бактериальной поверхности может происходить с помощью как одного, так и двух рецепторов, первичного и вторичного [6, 7]. В последнем случае взаимодействие фага с соответствующим ему первичным рецептором приводит к образованию промежуточного комплекса, который может затем разрушиться. Отделение бактериофага от клетки сохраняет его способность вновь адсорбироваться на клеточной поверхности. Взаимодействие фага со вторичным рецептором приводит к необратимой адсорбции, в результате чего происходит конформационная перестройка белков капсида, создающая условия для эжекции ДНК в клетку.

Частицы многих фагов, специфичных в отношении энтеробактерий, прикрепляются к клет-

кам возбудителя, как правило, посредством рецептор-связывающих белков, расположенных на хвосте фага (или “белков хвоста”). Так, фаг *Yersinia enterocolitica* фYeO3-12 распознает специфичный рецептор на поверхности бактериальной клетки с помощью хвостовых фибрилл, образованных белком gp17 [8], а фаг *Escherichia coli* λ c126, равно как и все прочие штаммы фага λ , связывается с бактериальной клеткой за счет взаимодействия белка J, расположенного на конце хвоста [9].

Первичными рецепторами фагов грамотрицательных бактерий могут быть жгутики, пили и, чаще всего, вариабельная часть (О-антиген) липополисахарида (ЛПС) [4, 10]. Кроме того, в качестве фаговых рецепторов могут выступать различные белки наружной мембраны (НМ) бактерий, в том числе транспортеры и порины [11, 12]. Так, например белок *E. coli* FhuA, транспортер ионов железа и некоторых антибиотиков, служит рецептором для фагов T1, T5 и ϕ 80 [13]. Рецептором для фага λ c126 *E. coli* является мальтодекстрин-специфичный порин LamB. Эволюционные изменения в пределах гена *J*, кодирующего белок распознавания рецептора организма-хозяина, привели к тому, что в условиях снижения экспрессии LamB, у λ c126 фага сформировалась способность связываться с новым рецептором, неспецифическим порином OmpF [9]. Порин OmpA *E. coli* является рецептором для фагов K3, M1, Oх2, TuII, RB32, PST [14], а OmpF порин *E. coli* взаимодействует с фагами K20, RB69, SV76, RB51, T2 [15, 16]. Установлено, что фаг Yер-phi использует для рецепции, наряду с ЛПС, белки НМ Ail и OmpF *Yersinia pestis* [17]. Вирулентные для *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium* фаги Gifsy-1 и Gifsy-2 используют в качестве рецептора OmpC порин НМ бактерии, в то же время, эти фаги не взаимодействуют с OmpC порином *E. coli*, несмотря на 83%-ную идентичность аминокислотной последовательности этих белков. Видимо, наиболее значимыми для рецепции фагов являются участки, соответствующие вариабельным наружным петлям поринов [18].

До сих пор недостаточно известно о структуре фаговых рецепторов псевдотуберкулезного микроба, и практически не исследованы механизмы взаимодействия фаговых частиц с этими бактериями. Лишь небольшое число бактериофагов, активных в отношении *Y. pseudotuberculosis*, охарактеризовано в той или иной мере и используется в исследовательской работе. Так, для фага YpsP-PST (семейство *Myoviridae*) показана способность лизировать клетки большинства штаммов *Y. pseudotuberculosis* наряду с клетками *Y. pestis* [19]. Рецептор этого фага расположен на участке НерII/НерIII кора

ЛПС [20]. Похожий рецептор Нер (II)-Нер (I) (Glc)-Kdo (Ko)-LA идентифицирован для фага A1122, специфичного к *Y. pestis*, который инфицирует также клетки *Y. pseudotuberculosis*, выращенные при температуре 37°C [21]. Для бактериофага wR1-37, способного инфицировать штамм YeO3-R1 *Y. enterocolitica*, выявлен специфический рецептор на О-антигене *Y. pseudotuberculosis* O:9 [22].

В литературе, доступной в настоящее время, нет информации о применении идентифицированных псевдотуберкулезных бактериофагов для лечения этого заболевания у людей. Сфера применения псевдотуберкулезного диагностического бактериофага (ПДБ), производимого ФКУЗ РосНИПЧИ “Микроб” (Россия), ограничена диагностическими мероприятиями. О механизмах адсорбции этого бактериофага известно мало, показано лишь участие в его рецепции полисахаридной составляющей НМ бактерий [23]. Участие поверхностных белковых антигенов бактерий *Y. pseudotuberculosis* в рецепции ПДБ остается пока не изученным. Как правило, способы определения участия того или иного поверхностного антигена бактерий в рецепции фагов ограничены конструированием и использованием соответствующих штаммов-нокаутов или оценкой уровня инактивации литической активности фагов отдельными компонентами микробной клетки при их совместной инкубации в жидкой фазе. Вместе с тем известны и другие методические подходы, которые заключаются в определении адгезивных свойств различных биообъектов, в том числе бактериальных антигенов, по отношению к неорганическим субстратам [24, 25]. Появляются работы по идентификации и количественному определению целевых биомолекул, содержащих структуры, комплементарные модельным соединениям, иммобилизованным на поверхности субстратов различного химического состава, в частности, на основе полистирола [26, 27].

Цель работы – оценка значимости OmpF, OmpC поринов и ЛПС *Y. pseudotuberculosis* в рецепции ПДБ с использованием двух методических подходов, один из которых основан на взаимодействии бактериофаг-антиген в жидкой реакционной среде, а другой, предложенный в работе, предполагает проведение реакции в гетерогенной системе с использованием антигенов, адсорбированных на полистирольных микросферах.

МЕТОДИКА

Штаммы бактерий. *Y. pseudotuberculosis* серотипа 1b (№ 474) и вакцинный штамм *Y. pestis* EV получены из коллекции Федерального казенного учреждения здравоохранения Российский науч-

но-исследовательский противочумный институт “Микроб” (ФКУЗ РосНИПЧИ “Микроб”, Россия).

Бактериофаг. Псевдотуберкулезный диагностический бактериофаг ПДБ (производства ФКУЗ РосНИПЧИ “Микроб”), известен как бактериофаг d’Herelle-m или YpsP-G [28, 29]. Этот бактериофаг отнесен к семейству *Podoviridae* (порядок *Caudovirales*) [30], его геном секвенирован (GenBank accession no. JQ965703). Фаг не является высоко-специфичным и способен лизировать многие штаммы *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* [19, 31].

Использованные в работе препараты фага получали из глубинной культуры *Y. pseudotuberculosis* 1b, зараженной суспензией ПДБ, которую получали из отдельной бляшки при высеве коммерческого препарата. Совместную инкубацию микробных клеток (200 млн/мл) и частиц фага (0.4 млн/мл) проводили в течение 18–20 ч при 37°C. После низкоскоростного центрифугирования фаг выделяли из надосадочной жидкости с помощью полиэтиленгликоля ПЭГ-8000 [32]. Дополнительную очистку и последующее концентрирование суспензии фага проводили с помощью ультрафильтров “Amicon Ultra-15, 30 кДа” (“Merck”, Германия).

Определение титра бактериофага. Определение проводили методом Грация [33]. В пробирке смешивали 100 мкл раствора, содержащего бактериофаг, и 100 мкл суспензии клеток *Y. pseudotuberculosis* (1×10^9 /мл), выращенных при температуре 37°C в течение ночи на плотной питательной среде БТН-агаре (“Биотехновация”, Россия). Смесь инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре для адсорбции бактериофага на поверхности бактериальных клеток, после чего в пробирку приливали по 3 мл 1.5%-ного БТН-агара, предварительно расплавленного и охлажденного до температуры 47°C. Содержимое пробирок перемешивали интенсивным вращением в руках и выливали на чашку Петри с плотной питательной средой – предварительно подсушенным 3%-ным БТН-агаром. Чашки выдерживали в течение 18–24 ч при температуре 37°C, после чего осуществляли подсчет количества бляшек.

Антигенные препараты. В работе использовали следующие антигенные препараты.

1. ЛПС иерсиний. Препараты ЛПС выделяли по методу Вестфала с помощью водно-фенольной экстракции [34] из бактериальных культур, выращенных в жидкой питательной среде на основе сылянокислотного гидролизата казеина: *Y. pseudotuberculosis* 1b – при температуре 10 и 37°C, *Y. pestis* EV – при температуре 27°C. Далее они именуется как ЛПС 10, ЛПС 37 и ЛПС EV соответственно.

2. ЛПС *E. coli* 055:B5. Коммерческий препарат (“Difco”, США). Иммунохимическую активность использованных в работе препаратов ЛПС, оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА), сенсибилизируя дно лунок планшета исследуемым антигеном в концентрации 10 мкг/мл [35]. Оптическая плотность продукта ферментативной реакции (ОП₄₉₂), характеризующая взаимодействие “антиген–антитело”, для препаратов ЛПС 10, ЛПС 37, ЛПС EV, ЛПС *E. coli* при использовании моноклональных антител к O-антигену *Y. pseudotuberculosis* составила 1.85, 0.62, 0.18, 0.13, а при использовании моноклональных антител к белковому эпитопу НМ энтеробактерий – 0.19, 0.23, 0.27, 0.30 соответственно. Эти данные свидетельствуют о минимальном содержании белковых примесей во всех четырех препаратах ЛПС и о низком уровне (или отсутствии) перекрестных реакций между ЛПС EV и ЛПС *E. coli* и O-антигеном ЛПС *Y. pseudotuberculosis*

3. Порины энтеробактерий. Для получения поринов OmpF и OmpC биомассу клеток *Y. pseudotuberculosis* выращивали при температурах 6–8 и 37°C соответственно. Препараты названных поринов выделяли по методике, описанной в статье [36]. OmpF порин *E. coli* получали по методу Гаравито [37]. Степень очистки полученных образцов порина анализировали с помощью электрофореза по методу Лэммли [38] в вертикальных пластинах (9 × 2 × 0.1 см) в 12–25%-ном ПААГ в присутствии 0.1%-ного ДДС-Na. В качестве маркеров использовали набор окрашенных белков фирмы “Fermentas” (Литва) с молекулярными массами от 11 до 130 кДа. Белки, разделенные в геле, окрашивали раствором Кумасси R-250 в 10%-ной уксусной кислоте и 45%-ном этаноле. По данным электрофореза, использованные в эксперименте образцы белков представляли собой гомогенные препараты. До начала использования в эксперименте образцы хранили при температуре 4–6°C в забуференном физиологическом растворе (ЗФР), pH 7.2–7.4, с 0.1%-ным ДДС-Na.

4. Рекомбинантный OmpF порин *Y. pseudotuberculosis*. Экспрессию рекомбинантного OmpF (OmpF_{рек}) порина *Y. pseudotuberculosis*, экстракцию его из телец включения и рефолдинг тримера порина проводили в соответствии с процедурой, в деталях описанной в работе [39]. По данным электрофореза в ПААГ с ДДС-Na, полученный образец OmpF_{рек} имел подвижность, совпадающую с подвижностью тримера OmpF порина, выделенного из наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis*. По данным оптической спектроскопии (кругового дихроизма и собственной белковой флуоресценции) пространственная структура OmpF_{рек} была подобна

таковой изолированного тримера порина, но имела несколько меньшую компактность белковой молекулы [39]. Содержание ЛПС в образцах OmpF_{рек} определяли с помощью набора для количественного определения эндотоксина *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) (“Thermo Scientific”, США) в соответствии с протоколом производителя.

Иммунохимическую активность использованных в работе препаратов поринов оценивали методом ИФА, как и для ЛПС [35]. Значения ОП₄₉₂ для препаратов OmpF, OmpF_{рек}, OmpF *E. coli* с поливалентной антисывороткой к OmpF *Y. pseudotuberculosis* оказались равными 1.85, 1.68, 0.87, для препарата OmpC с поливалентной антисывороткой к OmpC *Y. pseudotuberculosis* – 1.55. Кроме того, методом проточной цитофлуориметрии было показано, что поликлональная антисыворотка к поринам *Y. pseudotuberculosis* достаточно эффективно взаимодействуют и с интактными микробными клетками, что подтверждает поверхностную локализацию этих белков в бактериальной НМ.

Инактивация бактериофага антигенами в растворе. Предварительно препараты поринов переводили в ЗФР с 0.01%-ным ДДС-Na, поскольку, известно, что ДДС-Na в данной концентрации не оказывает заметного цитотоксического действия по отношению к живым клеткам в течение короткого времени наблюдения (3 ч) [40]. Препараты ЛПС иерсиний, хранившиеся при температуре –70°C, после размораживания подвергали низкоскоростному центрифугированию (13000 g, 15 мин), надосадочную жидкость переводили в ЗФР с 0.01%-ным ДДС-Na. Лиофильно высушенный препарат ЛПС *E. coli* растворяли в ЗФР с 0.01% ДДС-Na. В качестве контроля использовали препарат БСА (“Sigma Aldrich”, США) в указанном буфере. Бактериофаг суспендировали в буфере SM (0.58% NaCl, 0.2% MgSO₄·7 H₂O, 0.05 M трис-NCl, pH 7.5) до конечной концентрации 8×10^5 бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл. Затем смешивали 100 мкл раствора антигенов (или БСА) в концентрации 1 мг/мл с 20 мкл суспензии бактериофага и инкубировали на термошейкере Thermo Shaker PST-60HL-4 (“BIOSAN”, Латвия) при 500 об./мин в течение 3 ч при температуре 37°C. По окончании инкубации суспензии разбавляли 1 : 100 в буфере SM и полученные разведения высевали по методике определения титра бактериофага.

Сенсибилизация микросфер Сенсибилизация микросфер препаратами ЛПС. В качестве сенситинов использовали препараты ЛПС, выделенные из биомассы клеток *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при температуре 10 и 37°C (далее ЛПС 10 и ЛПС 37), и из клеток *Y. pestis* EV, культивиру-

ванных при 27°C (далее ЛПС EV). Каждый из трех препаратов разводили карбонат-бикарбонатным буфером (КББ), pH 9.5, до конечной концентрации ЛПС 1.5 мг/мл, после чего инкубировали на термошейкере при 37°C (250 об./мин) в течение 1 ч. Растворы центрифугировали (13000g, 15 мин), затем супернатанты объемом 340 мкл переносили в сухие пробирки и добавляли к ним по 40 мкл суспензии полистирольных микросфер диаметром 1 мкм (“Polyscience”, США). Полученные смеси инкубировали на термошейкере в указанном выше режиме в течение 1 ч, после чего выдерживали их в течение ночи при 4°C. Затем микросферы отмывали ЗФР (3 раза по 1 мл) и добавляли в каждую пробирку по 1 мл 1%-ного раствора БСА в ЗФР. Начиная с этого момента, готовили таким же образом контрольные микросферы, обработанные только БСА, добавляя к 1 мл 1%-ного раствора БСА 40 мкл исходного препарата микросфер. Все образцы инкубировали на термошейкере при 37°C (250 об./мин) в течение 1 ч, после чего однократно отмывали 1 мл ЗФР. К осадку микросфер приливали 250 мкл ЗФР, тщательно ресуспендировали и добавляли в каждую пробирку азид натрия до конечной концентрации 0.01%. Препараты хранили при температуре 4–6°C.

Сенсибилизация микросфер препаратами поринов. В качестве сенситинов использовали препараты поринов OmpC и OmpF, выделенные из клеток *Y. pseudotuberculosis*, а также порин OmpF из клеток *E. coli*. Все три препарата предварительно диализовали против КББ с использованием центрифужных концентраторов “Amicon Ultra-4 10K” (“Merck”, “Millipore”, Германия). После заключительного центрифугирования (5000g, 15 мин) 250 мкл диализата с концентрацией белка ~300 мкг/мл переносили в чистую пробирку и добавляли 40 мкл суспензии полистирольных микросфер диаметром 1 мкм (“Polyscience”, США). Дальнейшая последовательность операций идентична той, что использовалась для сенсибилизации микросфер препаратами ЛПС (см. выше).

Адсорбция бактериофага на сенсибилизированные микросферы. Микросферы, сенсибилизированные исследуемыми антигенами и БСА, а также контрольные, несенсибилизированные микросферы в расчетной конечной концентрации 7.2×10^6 /мл, суспендировали в ЗФР до концентрации, соответствующей оптической плотности 1.2, измеренной на спектрофотометре SmartSpec Plus (“BioRad”, США) при длине волны 600 нм. Затем смешивали 100 мкл суспензии тех или иных микросфер и 20 мкл разведенного в буфере SM бактериофага с концентрацией 8×10^5 БОЕ/мл. Смесь инкубировали на термошейкере Thermo Shaker PST-60HL-4 (“Biosan”, Латвия) при

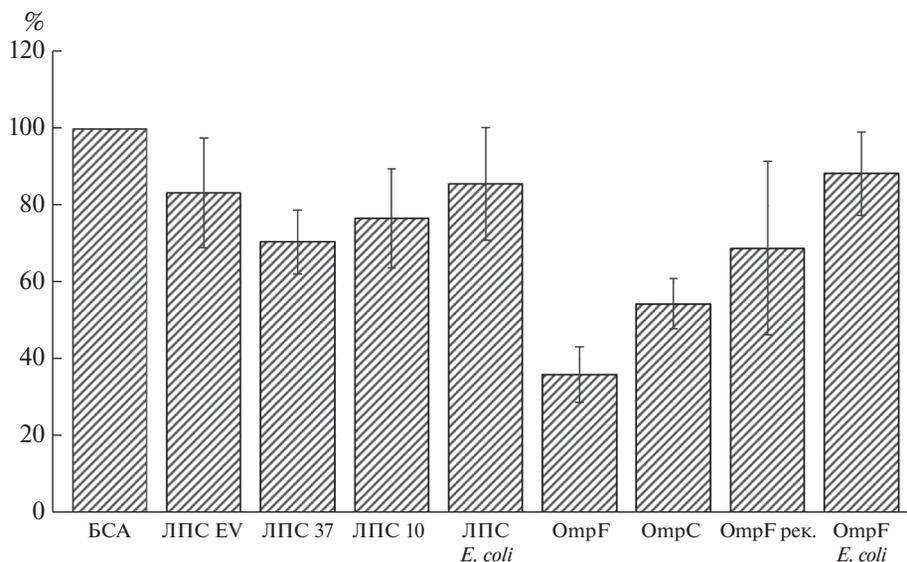


Рис. 1. Связывание ПДБ с антигенами в растворе (%). БСА – бычий сывороточный альбумин; ЛПС EV – ЛПС, выделенный из клеток *Y. pestis* штамма EV, выращенных при температуре 27°C; ЛПС 37, ЛПС 10 – ЛПС, выделенные из клеток *Y. pseudotuberculosis* серотипа 1 b, выращенных при температурах 10 и 37°C соответственно; ЛПС *E. coli* – ЛПС, выделенный из клеток *E. coli* 055:B5; OmpF и OmpC – соответственно порины OmpF и OmpC *Y. pseudotuberculosis*; OmpF_{рек.} – рекомбинантный порин OmpF *Y. pseudotuberculosis*; OmpF *E. coli* – порин OmpF *E. coli*.

500 об./мин в течение 3 ч при температуре 37°C. После этого микросферы осаждали на центрифуге Centrifuge 5424 (“Eppendorf”, Германия) при 13000 g в течение 10 мин, надосадочные жидкости разбавляли 1 : 100 буфером SM и высевали на чашки Петри по методике определения титра бактериофага.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения значимости отдельных бактериальных антигенов в адгезивности фагов используют метод, основанный на определении количества фаговых частиц, адсорбированных на живых (реже инактивированных) бактериальных клетках, различающихся способностью экспрессировать исследуемый антиген. С этой же целью применяют метод, основанный на способности антигена связывать фаг в растворе, что препятствует последующей адсорбции таких фаговых частиц на поверхности микробной клетки [41]. В настоящей работе для изучения процессов адгезии бактериофагов предлагается новый подход, основанный на использовании полистирольных микросфер с адсорбированными на поверхности целевыми бактериальными антигенами.

Ранее нами были разработаны простые и эффективные методики иммобилизации ЛПС [42] и поринов [43] на поверхности полистирольных микросфер. Схема их приготовления в качестве обязательной стадии включала инкубацию микросфер, sensibilizированных тем или иным анти-

геном, в растворе с заведомо избыточной концентрацией БСА с целью блокирования оставшихся свободными участков полистирола. В качестве контроля использовали микросферы, покрытые БСА. Снижение титра фага в надосадочной жидкости после совместной инкубации и центрифугирования суспензии sensibilizированных микросфер и фага по сравнению с контролем расценивалось как участие соответствующего антигена-сенситина в адгезии бактериофага.

На первом этапе работы было исследовано влияние поверхностных бактериальных антигенов (ЛПС и неспецифических поринов), находящихся в растворе, на литическую активность ПДБ. Под литической (бляшкообразующей) активностью здесь понимается способность фага вызывать лизис культуры референс-штамма, которая выражается в количестве бляшек, образовавшихся после высева методом Грация [33]. В этих экспериментах снижение литической активности (или титра) бактериофага квалифицировали как результат его связывания с исследуемыми антигенами в процессе их совместной инкубации. В связи с тем, что в данной работе БСА использовали в качестве нейтрального белка в контрольных препаратах микросфер, в опытах по определению связывания бактериофага с антигенами в растворе его добавляли и в контрольный раствор.

Использованные в работе препараты ЛПС иерсиний показали слабо выраженную способность связывать ПДБ в растворе (рис. 1). Для этой группы антигенных препаратов число оставших-

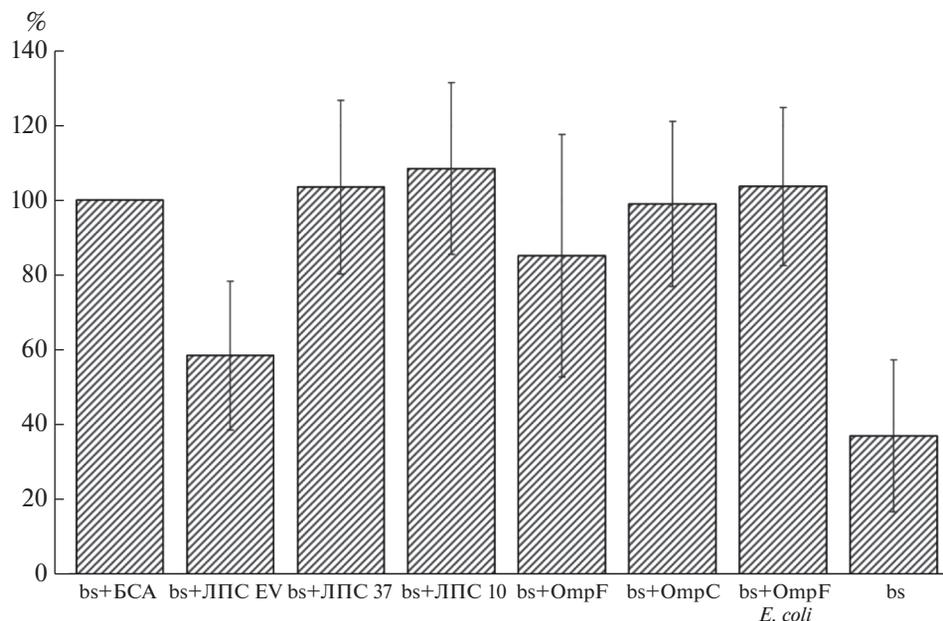


Рис. 2. Адсорбция ПДБ на сенсibilизированные антигенами микрокапсулы (%). bs + БСА – микрокапсулы, покрытые БСА; bs + ЛПС EV – микрокапсулы, покрытые ЛПС, выделенным из клеток *Y. pestis* штамма EV, выращенных при температуре 27°C; bs + ЛПС 37, bs + ЛПС 10 – микрокапсулы, покрытые ЛПС, выделенным из клеток *Y. pseudotuberculosis* серотипа 1 b, выращенных при температурах 10 и 37°C соответственно; bs + OmpF и bs + OmpC – микрокапсулы, покрытые соответственно поринами OmpF и OmpC *Y. pseudotuberculosis*; bs + OmpF *E. coli* – микрокапсулы, покрытые порином OmpF *E. coli*; bs – микрокапсулы интактные.

ся частиц бактериофага, способных к литической активности, составило 70–85%. Напротив, порины, выделенные из НМ клеток *Y. pseudotuberculosis*, продемонстрировали наибольший ингибирующий эффект в отношении бляшкообразующей активности исследуемого фага. Так, значения показателя БОЕ для суспензий фага, инкубированных с OmpF и OmpC белками, составили соответственно 35.9 и 54.4% от значения этого показателя для контрольной суспензии фага с БСА (рис. 1). Способность снижать литическую активность бактериофага проявил также рекомбинантный белок, OmpF_{рек} псевдотуберкулезного микроба, экспрессируемый в клетках *E. coli*, но в меньшей степени, чем OmpF порин, полученный из бактерий *Y. pseudotuberculosis*. В отличие от поринов иерсиний, OmpF порин, выделенный из клеток *E. coli*, подобно ЛПС из этих же бактерий, не оказывал существенного влияния на оцениваемую активность (рис. 1).

Результаты опытов второго этапа работы (определение уровня адсорбции бактериофага на полистирольных микрокапсулах, сенсibilизированных исследуемыми антигенными препаратами) представлены на рис. 2. Обнаружено, что интактные, (“голые”) полистирольные микрокапсулы хорошо адсорбировали не только различные сенситины (ЛПС, порины, БСА), но и частицы собственно

бактериофага. Так, если принять количество не связавшегося бактериофага в надосадочной жидкости контрольных микрокапсул, покрытых БСА, за 100%, то доля частиц фага, не связавшихся с интактными микрокапсулами, составила 36.9% от этого количества.

Из числа микрокапсул, сенсibilизированных исследуемыми антигенами, наибольшую способность к адсорбции ПДБ (41.5%) показали микрокапсулы, покрытые ЛПС из клеток *Y. pestis* штамма EV. Некоторую способность к адсорбции ПДБ показали микрокапсулы, сенсibilизированные OmpF порином, выделенным из клеток *Y. pseudotuberculosis*, которые в среднем, адсорбировали 14.8% фаговых частиц. Обнаружено, что микрокапсулы, покрытые OmpC из *Y. pseudotuberculosis* и OmpF из *E. coli*, не адсорбировали ПДБ, так же как и микрокапсулы, сенсibilизированные ЛПС из клеток *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при температурах 10 и 37°C, т.е. из бактерий “гладких” и “шероховатых” колоний соответственно.

Сравнительная оценка результатов использования двух модельных систем, включающих бактериофаг и антигены НМ бактерий (в растворе и на микрокапсулах) позволила сделать некоторые выводы об особенностях процесса адгезии бактериофага ПДБ на поверхности бактерий *Y. pseudotuberculosis* и выявить как общие закономерности,

так и некоторые различия в процессе взаимодействия антигенов с ПДБ. Первый из использованных подходов ранее уже применялся для этих целей [41]. Второй подход, рецепция в гетерогенной системе, с нашей точки зрения, дает более наглядное представление о взаимодействии фаговых частиц с бактериями, поскольку микросферы сходны по размерам с микробной клеткой.

В растворе все использованные препараты ЛПС по сравнению с белковыми антигенами показали менее выраженную способность к взаимодействию с частицами бактериофага. Это может быть связано с тем, что в водных растворах молекулы ЛПС способны с течением времени к самосборке и агрегации, что приводит к образованию молекулярных агрегатов различных форм и размеров [44] и соответствующему снижению доступности рецепторов для взаимодействия с фаговыми частицами. Неожиданно противоречивые результаты для этих антигенов были получены в случае взаимодействия фаг-антиген в гетерогенной системе. Так, микросферы, сенсibilизированные препаратами ЛПС, выделенными из клеток *Y. pseudotuberculosis*, как из “гладких”, так и “шероховатых” колоний микроорганизма, вообще не адгезировали частицы фага, в то время как ЛПС *Y. pestis* штамма EV, иммобилизованный на микросферах, адсорбировал более 40% ПДБ (рис. 2).

Полученные результаты могут быть объяснены следующим образом. Во-первых, ПДБ не является строго видоспецифическим фагом и способен, в частности, с высокой степенью эффективности лизировать клетки *Y. pestis* вакцинного штамма EV. Во-вторых, рецептор для этого фага, как было показано нами ранее, расположен скорее на коровой части молекулы ЛПС псевдотуберкулезного микроба [23]. Это согласуется с данными литературы, свидетельствующими о том, что рецепторы многих бактериофагов, специфичных в отношении иерсиний, локализованы именно в этой части молекулы ЛПС [20]. Кроме того, подтверждением такому объяснению служит и тот факт, что ЛПС *Y. pestis*, в отличие от ЛПС *Y. pseudotuberculosis*, полностью лишен О-антигена, а коровые области ЛПС двух близкородственных микробов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* имеют высокую степень гомологии [45]. Именно этим можно объяснить наблюдаемый высокий уровень адсорбции фага при использовании микросфер, покрытых ЛПС *Y. pestis*.

Вместе с тем, следует отметить, что некоторые бактериофаги в качестве рецепторов используют также О-антиген граммотрицательных бактерий [46, 47]. Белки “хвоста” таких фагов, обладающие ферментативной активностью, могут гидролизовать или деацилировать О-антиген с последующим взаимодействием с вторичными рецепторами [6].

Однако полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о том, что во взаимодействии бактерий *Y. pseudotuberculosis* с ПДБ О-антиген не только не участвует в рецепции специфического фага, но и препятствует ей, экранируя рецепторный участок кора иерсиний, полностью доступный для контакта с ПДБ у клеток *Y. pestis*. Именно этим можно объяснить наблюдаемый высокий уровень адсорбции фага при использовании микросфер, покрытых ЛПС *Y. pestis*. Дополнительным косвенным подтверждением такого вывода может служить также некоторое снижение литической активности фага препаратами ЛПС из клеток *Y. pseudotuberculosis*, культивированных при 10°C по сравнению с ЛПС из бактерий, выращенных при 37°C (рис. 1), поскольку известно, что при понижении температуры культивирования *Y. pseudotuberculosis* увеличивается длина полисахаридных цепей ЛПС [48]. Вышеизложенное полностью соотносится с результатами ранее опубликованных результатов о влиянии О-антигена на рецепцию иерсиниозных бактериофагов микробными клетками [23, 49, 50].

Таким образом, совокупность приведенных данных литературы и представленных выше результатов эксперимента дает основание утверждать, что коровая область ЛПС двух указанных видов патогенных иерсиний, *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, содержит рецепторы бактериофага ПДБ, скорее всего, близкие или идентичные по структуре.

Порины OmpF и OmpC *Y. pseudotuberculosis* также показали способность участвовать в адсорбции ПДБ. OmpF порин, продуцируемый бактериальными клетками при пониженных температурах культивирования [51, 52], обнаружил большую способность к взаимодействию с ПДБ по сравнению с OmpC порином, биосинтез которого доминировал при температуре 37°C. При этом взаимодействие бактериофага с OmpF в растворе оказалось более выраженным нежели с антигеном, нанесенным на микросферы (рис. 1 и 2). OmpF порин, выделенный из клеток *E. coli*, не проявил способности связывать исследуемый бактериофаг ни в растворе, ни на поверхности микросфер, что, по-видимому, может свидетельствовать о достаточно высокой специфичности фаговых рецепторов OmpF порина *Y. pseudotuberculosis*.

Следует отметить, что использование двух модельных систем позволило получить взаимодополняющую картину исследуемого взаимодействия “бактериофаг – микробная клетка”. Некоторые количественные расхождения полученных результатов могут объясняться несколькими причинами, прежде всего, различиями в условиях проведения эксперимента.

Исследование активности различных по структуре ЛПС иерсиний и неспецифических поринов разных типов как фаговых рецепторов позволило предположить, что не только структура, но и конформационное состояние поверхностных антигенов имеет существенное значение при взаимодействии бактерий с фагами. Так, в случае ЛПС способность его молекул агрегировать в водных растворах, а также увеличение длины О-специфических цепей снижают эффективность связывания с ПДБ.

Результаты взаимодействия препаратов поринов с ПДБ позволили предположить, что они обладают собственной активностью (связывание бактериофага), не зависящей от структуры примесного ЛПС. Такое заключение подтверждается более выраженной адгезивностью препарата OmpF по сравнению с OmpC, несмотря на то, что в препарате OmpF белка присутствует ЛПС с более длинными полисахаридными цепями, которые, как показали эксперименты по связыванию ПДБ в растворе, снижали рецепторные свойства ЛПС по отношению к фагу. Для поринов, нанесенных на микросферы, возможно, большое значение имело изменение конформации белковой молекулы в результате адсорбции на полистироле. Следствием этого могли стать изменения в доступности сайтов белковой молекулы, участвующих в рецепции фагов. Часть из них в результате связывания антигенов с полистиролом могли оказаться “закрытыми”. Наиболее заметно это проявилось в случае OmpC порина.

Также следует отметить, что при оценке роли ЛПС и поринов в адгезии ПДБ учитывали тот факт, что все поверхностные компоненты НМ интактной микробной клетки тесно интегрированы. Известно, что с одним тримером порина могут быть с разной степенью прочности связаны до 10 молекул ЛПС, причем одна из молекул — особо прочно [53]. Например, ЛПС, выделенный даже с помощью жесткой водно-фенольной экстракции, содержит прочно связанные примесные белки в количестве 1–3%. В изолированных препаратах поринов также присутствует 5–8% примесного ЛПС [54]. В нашем эксперименте свидетельством совокупного вклада этих двух доминантных компонентов НМ в рецепцию ПДБ является тот факт, что рекомбинантный OmpF порин *Y. pseudotuberculosis*, содержащий следовое количество эндотоксина (0.31 мкг ЛПС на 1 мг белка) связывал частицы фага в растворе в меньшей степени по сравнению с нативным OmpF, содержащим, как правило, до 8% ЛПС. Кроме того, этот результат может указывать и на значимость конформации белкового рецептора ПДБ в исследуемом взаимодействии, поскольку различная сте-

пень активности этих белков может быть связана с неполной ренатурацией рекомбинантного порина.

В заключение следует отметить, что в литературе имеются данные о бактериофагах, адгезия которых на бактериальной клетке может быть опосредована одним рецептором или протекать в два этапа. В двустадийной адгезии могут принимать участие как полисахаридные, так и белковые компоненты НМ бактерий, которые могут быть как первичными, так и вторичными рецепторами фага [6, 55]. Продемонстрированная в работе способность ЛПС и неспецифических поринов *Y. pseudotuberculosis* инактивировать ПДБ свидетельствовала о сложности процесса адгезии фага к микробным клеткам. Полученные результаты могут быть использованы при разработке новых средств специфической профилактики и диагностики бактериальных инфекций.

Статья подготовлена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых-кандидатов наук (№ МК-3383.2021.1.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cabanel N., Galimand M., Bouchier C., Chesnokova M., Klimov V., Carniel E. // Int. J. Med. Microbiol. 2017. V. 307. № 7. P. 371–381.
2. Rohde C., Wittmann J., Kutter E. // Surgical Infections. 2018. V. 19. № 8. P. 737–744.
3. Sharma S., Chatterjee S., Datta S., Prasad R., Dubey D., Prasad R.K., Vairale M.G. // Folia Microbiol. 2017. V. 62. P. 17–55.
4. Лепаров А.В., Куликов Е.Е. // Успехи биологической химии. 2017. Т. 57. С. 153–208.
5. Silva J.B., Storms Z., Sauvageau D. // FEMS Microbiol. Lett. 2016. V. 363. № 4. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>
6. Broeker N.K., Barbirz S. // Mol. Microbiol. 2017. V. 105. № 3. P. 353–357.
7. Gonzalez F., Helm R.F., Broadway K.M., Scharf B.E. // J Bacteriol. 2018. V. 200. № 19. e00363–18. <https://doi.org/10.1128/JB.00363–18>
8. Pajunen M.I., Molineux I.J., Skurnik M. // Adv. Exp. Med. Biol. 2003, V. 529. P. 233–240. https://doi.org/10.1007/0-306-48416-1_45
9. Chatterjee S., Rothenberg E. // Viruses. 2012. V. 4. № 11. P. 3162–3178.
10. Tomas J.M., Jofre J.T. // J. Bacteriol. 1985. V. 162. № 3. P. 1276–1279.
11. Nobrega F.L., Vlot M., de Jonge P.A., Dreesens L.L., Beaumont H.J.E., Lavigne R., Dutillh B.E., Brouns S.J.J. // Nature Reviews Microbiology. 2018. V. 16. P. 760–773.
12. Power M.L., Ferrari B.C., Littlefield-Wyer J., Gordon D.M., Slade M.B., Veal D.A. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. № 12. P. 7930–7932.
13. Langenscheid J., Killmann H., Braun V. // FEMS Microbiology Letters. 2004. V. 234. № 1. P. 133–137.

14. Gibbs K.A., Isaac D.D., Xu J., Hendrix R.W., Silhavy T.J., Theriot J.A. // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 53. № 6. P. 1771–1783.
15. Trojet S.N., Caumont–Sarcos A., Perrody E., Comeau A.M., Krisch H.M. // *Genome Biol. Evol.* 2011. V. 3. P. 674–686.
16. Bekhit A., Fukumachi T., Saito H., Kobayashi H. // *Biol. Pharm. Bull.* 2011. V. 34. P. 330–334.
17. Zhao X., Cui Y., Yan Y., Du Z., Tan Y., Yang H. et al. // *J. Virology.* 2013. V. 87. № 22. P. 12260–12269.
18. Ho T.D., Schlauch J.M. // *J. Bacteriol.* 2001. V. 183. № 4. P. 1495–1498.
19. Rashid M.H., Revazishvili T., Dean T., Butani A., Verratti K., Bishop–Lilly K.A., Sozhamannan S., Sulakvelidze A., Rajanna C. // *Bacteriophage.* 2012. V. 2. № 3. P. 168–177.
20. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y., Huang X.-Z., Gnade B.T., Mueller A.J., Fernandez–Prada C.M., Nikolich M.P. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 9. e25486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025486>
21. Skurnik M. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012. V. 954. P. 293–301.
22. Kiljunen S., Hakala K., Pinta E., Huttunen S., Pluta P., Gador A., Lönnberg H., Skurnik M. // *Microbiology.* 2005. V. 151. № 12. P. 4093–4102.
23. Бывалов А.А., Дудина Л.Г., Коньшиев И.В., Литвинец С.Г., Мартинсон Е.А. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015. Т. 160. № 11. С. 622–625.
24. Lu Q., Wang J., Faghijnejad A., Zeng H., Liu Y. // *Soft Matter.* 2011. V. 7. № 19. P. 9366–9379.
25. Burks G.A., Velegol S.B., Paramonova E., Lindenmuth B.E., Feick J.D., Logan B.E. // *Langmuir.* 2003. V. 19. № 6. P. 2366–2371.
26. Zou D., Wu W., Zhang J., Ma Q., Fan S., Cheng J., Li D., Niu J., Qian X., Li W., Cui D. // *RSC Adv.* 2019. V. 9. P. 39976–39985.
27. Xie S., Chen S., Zhu Q., Li X., Wang D., Shen S., Jin M., Zhou G., Zhu Y., Shui L. // *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020. V. 12. № 23. P. 26374–26383.
28. Filippov A.A., Sergueev K.V., He Y., Nikolich M.P. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012. V. 954. P. 123–134.
29. Zhao X., Skurnik M. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. V. 918. P. 361–375.
30. Чернядьев А.В., Дудина Л. Г., Литвинец С.Г., Черников В.П., Бывалов А.А. // *Проблемы особо опасных инфекций.* 2014. № 4. С. 80–82.
31. Filippov A.A., Sergueev K.V., Nikolich M.P. // *Bacteriophage.* 2012. V. 2. № 3. P. 186–189.
32. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* V. 1. 3rd Ed. / J. Sambrook, D.W. Russell. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 794 p.
33. Лабинская А.С. *Микробиология с техникой микробиологических исследований.* М.; 1978, 394 с.
34. Westphal O., Jann K. // *Methodes Carbohydr. Chem.* 1965. V. 5. P. 83–91.
35. Бывалов А.А., Дудина Л.Г., Литвинец С.Г., Новикова О.Д., Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Оводов Ю.С. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2014. Т. 50. № 2. С. 203–210.
36. Новикова О.Д., Федорева Л.И., Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Ермак И.М., Лихацкая Г.Н., Мороз С.В., Соловьева Т.Ф., Оводов Ю.С. // *Биоорганическая химия.* 1993. Т. 19. № 5. С. 536–547.
37. Garavito R.M., Rosenbusch J.P. // *Methods of Enzymology.* 1986. V. 125. P. 309–329.
38. Laemmly U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
39. Хоменко В.А., О.Ю. Портнягина, О.Д. Новикова, М.П. Исаева, Н.Ю. Ким, Г.Н. Лихацкая, О.П. Вострикова, Т.Ф. Соловьева // *Биоорганическая химия.* 2008. Т. 34. № 2. С. 162–168.
40. Schöler N., Olbrich C., Tabatt K., Müller R.H., Hahn H., Liesenfeld O. // *Int. J. Pharm.* 2001. V. 221. P. 57–67. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(01\)00660-3](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(01)00660-3)
41. Takeda K., Uetake H. // *Virology.* 1973. V. 52. № 1. P. 148–159.
42. Konyshev I., Byvalov A., Ananchenko B., Fakhrullin R., Danilushkina A., Dudina L. // *J. Biomech.* 2020. V. 99. 109504. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2019.109504>
43. Бывалов А.А., Коньшиев И.В., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю., Белозеров В.С., Хоменко В.А., Давыдова В.Н. // *Биофизика.* 2018. Т. 63. № 5. С. 913–922.
44. Santos N.C., Silva A.C., Castanho M.A., Martins–Silva J., Saldanha C. // *Chembiochem.* 2003. V. 4. № 1. P. 96–100.
45. Книрель Ю.А., Анисимов А.П. // *Acta Naturae.* 2012. Т. 4. № 3. С. 49–61.
46. Salem M., Skurnik M. // *Viruses.* 2018. V. 10. № 4. 174. <https://doi.org/10.3390/v10040174>
47. Kunstmann S., Scheidt T., Buchwald S., Helm A., Mulard L.A., Fruth A., Barbirz S. // *Viruses.* 2018. V. 10. № 8. 431. <https://doi.org/10.3390/v10080431>
48. Ho N., Kondakova A.N., Knirel Y.A., Creuzenet C. // *Mol. Microbiol.* 2008. V. 68. № 2. P. 424–447.
49. Kiljunen S., Datta N., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P., Knirel Y.A., Bengoechea J.A., Holst O., Skurnik M. // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. № 18. P. 4963–4972.
50. Born F., Braun P., Scholz H.C., Grass G. // *Pathogens.* 2020. V. 9. № 8. 611. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080611>
51. Begic S., Worobec E.A. // *Microbiology.* 2006. V. 152. № 2. P. 485–491.
52. Быстрицкая Е.П. // *Вестник ДВО РАН.* 2014. № 1. С. 164–168.
53. Holzenburg A., Engel A., Kessler R., Manz H.J., Lustig A., Aebi U. // *Biochemistry.* 1989. V. 28. № 10. P. 4187–4193.
54. Новикова О.Д., Ваколина Т.И., Хоменко В.А., Лихацкая Г.Н., Ким Н.Ю., Емельяненко В.И., Кузнецова С.М., Соловьева Т.Ф. // *Биохимия.* 2008. Т. 73. № 2. С. 173–184.
55. Bertozzi Silva J., Storms Z., Sauvageau D. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2016. 363. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>

Lipopolysaccharide and Non-Specific Porins of *Yersinia pseudotuberculosis* are Involved in the Reception of the Pseudotuberculous Diagnostic Bacteriophage

L. G. Dudina^{a, b}, O. D. Novikova^{c, *}, O. Yu. Portnyagina^c,
V. A. Chomenko^c, I. V. Konyshev^{a, b}, and A. A. Byvalov^{a, b, **}

^aVyatka State University, Kirov, 610000 Russia

^bInstitute of Physiology, Komi Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982 Russia

^cElyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

*e-mail: novolga_05@mail.ru

**e-mail: byvalov@nextmail.ru

The role of the outer membrane components of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* in adsorption of pseudotuberculosis diagnostic bacteriophage (PDB) was assessed using two model systems 'bacteriophage-antigen', in which the target antigens were either in solution or on the surface of polystyrene microspheres. It was established that the nonspecific OmpF and OmpC porins of *Y. pseudotuberculosis* are involved in the reception of PDB along with lipopolysaccharide. It was elucidated that molecular conformation of the porins play a significant role in interaction with the bacteriophage. It was found that the O-antigen of *Y. pseudotuberculosis* not only does not participate in the reception of PDB, but also prevents it by shielding the receptor site on the *Yersinia* lipopolysaccharide core which remains completely accessible for the bacteriophage on *Y. pestis* cells.

Keywords: bacteriophage, porins, lipopolysaccharide, receptor, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*

УДК 577.121

ОПТИМИЗАЦИЯ АНАЭРОБНОЙ ПРОДУКЦИИ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ *Escherichia coli* С НАРУШЕННОЙ СПОСОБНОСТЬЮ К БРОЖЕНИЮ ЗА СЧЕТ ФОРСИРОВАННОГО ГИДРОЛИЗА АТФ

© 2021 г. А. Ю. Скороходова¹, *, А. Ю. Гулевич¹, В. Г. Дебабов¹

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

*e-mail: sasha.skorokhodova@gmail.com

Поступила в редакцию 10.12.2020 г.

После доработки 25.01.2021 г.

Принята к публикации 22.02.2021 г.

Исследована анаэробная продукция пировиноградной кислоты из глюкозы рекомбинантными штаммами *Escherichia coli* с нарушенной способностью к брожению при дыхании с нитратом в качестве внешнего акцептора электронов. Базовый штамм *E. coli* MG1655 $\Delta ackA-pia$, $\Delta proxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, P_{1glk} , $P_{tac}galP$, $\Delta frdAB$, $\Delta pflB$, $\Delta sdhAB$, $\Delta aceEF$ при нитратном дыхании в минимальной солевой среде лишенной ионов аммония конвертировал глюкозу в пировиноградную кислоту с выходом 1.72 моль/моль, секретируя молочную кислоту в качестве единственной детектированной примеси. Делеция в штамме генов *lldD* и *dld* приводила к прекращению секреции данного побочного продукта. Соответствующий штамм, лишенный респираторных L- и D-лактатдегидрогеназ *LldD* и *Dld*, синтезировал пировиноградную кислоту из глюкозы с выходом 1.76 моль/моль, не полностью потребляя доступный углеводный субстрат. Форсированный гидролиз АТФ, за счет действия в клетке футильных циклов пировиноградная кислота – шавелевоуксусная кислота – яблочная кислота – пировиноградная кислота или пировиноградная кислота – фосфоенолпируват – пировиноградная кислота, обеспечивал выраженный рост потребления рекомбинантами глюкозы при сохранении уровня конверсии субстрата в целевой продукт. В результате, при анаэробном нитратном дыхании и форсированном гидролизе АТФ, достигнут выход пировиноградной кислоты из глюкозы составляющий 1.77–1.78 моль/моль, при практически исчерпывающем потреблении рекомбинантами субстрата и минимальном или же отсутствующем формировании побочных продуктов.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, брожение, глюкоза, дыхание, пировиноградная кислота, футильный цикл

DOI: 10.31857/S0555109921040152

Пировиноградная кислота является не только одним из ключевых центральных метаболитов живой клетки, но и важным промышленно значимым соединением, способным служить удобным предшественником в последующем синтезе широкого спектра веществ с высокой добавленной стоимостью. С использованием в качестве стартового материала пировиноградной кислоты в ходе органического синтеза могут быть получены пищевые добавки, лекарственные препараты, различные растворители, такие как ацетальдегид [1, 2] и бутанол [3], D/L-аланин, ароматические L-аминокислоты [4], 4-дигидроксид-L-фенилаланин [5] и N-ацетил-D-нейраминавая кислота [6]. Кроме того, пировиноградная кислота может быть непосредственно использована в питании, как диетическая добавка, обладающая множеством полезных для здоровья свойств [7].

В настоящее время пировиноградную кислоту получают нефтехимическим синтезом. Однако современные стратегии устойчивого развития предполагают постепенную, но неуклонную замену продуктов химической промышленности соответствующими продуктами микробной биотехнологии. Таким образом, получение микробных продуцентов пировиноградной кислоты, способных к эффективному биосинтезу целевого соединения из дешевого и доступного возобновляемого сырья (т.е. сахаров растительной биомассы), является актуальной задачей. Необходимо отметить, что в клетке пировиноградная кислота выступает в качестве основного метаболита-предшественника для множества биохимических путей, ведущих к формированию различных классов органических молекул. Поэтому, высокоэффективные продуценты пировиноградной кислоты могут служить,

кроме того, штаммами-платформами для дальнейшего создания специализированных продуцентов других полезных соединений. В последние годы был достигнут значительный прогресс в разработке процессов биологической конверсии углеводов в пировиноградную кислоту с использованием различных видов промышленно значимых микроорганизмов [8]. В качестве соответствующего продуцента, лучшие характеристики, при этом, продемонстрировал направленно сконструированный штамм *Escherichia coli*, который был способен синтезировать пировиноградную кислоту из глюкозы с выходом 1.53 моль/моль, составляющим 77% от теоретического максимума [9].

Ключевым биохимическим путем, снабжающим клетку пировиноградной кислотой при утилизации соответствующих субстратов (в первую очередь глюкозы), служит гликолиз, консервативный метаболический путь множества микроорганизмов присущий, в том числе, традиционной для промышленной биотехнологии факультативно анаэробной бактерии *E. coli*. Известно, что гликолиз транскрипционно не лимитирован и контролируется, в основном, внутриклеточными соотношениями НАДН/НАД⁺ и АТФ/АДФ [10, 11]. В результате гликолитической утилизации глюкозы формируются две молекулы пировиноградной кислоты, две молекулы НАДН и две молекулы АТФ. При аэрации гликолитический НАДН реокисляется в дыхательной электрон-транспортной цепи с участием кислорода в качестве терминального акцептора электронов, тогда как пировиноградная кислота и АТФ вовлекаются в анаболические процессы формирования биомассы. В условиях анаэробноза значительная доля гликолитически сформированной пировиноградной кислоты прямо или опосредованно участвует в реакциях брожения, с целью поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса, выступая внутренним терминальным акцептором электронов для окисления НАДН.

В клетках *E. coli* ключевыми ферментами, ответственными за анаэробную диссимиляцию пировиноградной кислоты являются лактатдегидрогеназа LdhA (КФ 1.1.1.28), ацетаткиназа AcsA (КФ 2.7.2.1), фосфотрансацетилаза Pta (КФ 2.3.1.8), бифункциональная алкоголь/альдегиддегидрогеназа AdhE (КФ 1.1.1.1/1.2.1.3), катализирующие формирование основных продуктов смешанно-кислотного брожения, то есть молочной, уксусной кислот и этанола, а также пируват-формиатлиаза PflB (КФ 2.3.1.54), конвертирующая пировиноградную кислоту в муравьиную кислоту и ацетил-КоА. Инактивация этих ферментов является обязательным условием для обеспечения возможности эффективной анаэробной продукции пировиноградной кислоты рекомбинантны-

ми штаммами *E. coli*. Однако штаммы *E. coli* дефицитны по путям смешанно-кислотного брожения неспособны расти анаэробно [12]. Более того, остаточная способность к реокислению НАДН у соответствующих штаммов весьма незначительна, а их потребность в АТФ резко снижена. В результате, подобные мутанты практически не могут утилизировать глюкозу в бескислородных условиях [13]. Вместе с тем, именно анаэробные процессы являются более предпочтительными для биосинтеза ценных продуктов, нежели аэробные, в силу меньших капитальных затрат, операционных издержек и проблем, связанных с массообменом и контаминацией [14]. Благодаря тому, что *E. coli* является факультативно анаэробной бактерией, анаэробная продукция пировиноградной кислоты из глюкозы рекомбинантами, лишенными путей брожения, может быть достигнута в результате двухстадийной ферментации, включающей стадию аэробного накопления биомассы с последующей анаэробной продуктивной стадией. Регенерация НАД⁺ в бескислородных условиях может быть обеспечена в данном случае за счет анаэробного дыхания с внешним акцептором электронов, таким как ДМСО [15], нитрат [16], или даже электрод, функционирующий в режиме анода [17].

Действительно, ранее было показано, что направленно сконструированный штамм *E. coli*, обладающий модифицированной системой транспорта и фосфорилирования глюкозы, лишенный основных путей смешанно-кислотного брожения и возможности взаимопревращения фумарат-сукцинат, а также не способный формировать ацетил-КоА из соответствующего трехуглеродного предшественника в присутствии в среде нитрата натрия анаэробно конвертирует глюкозу в пировиноградную кислоту с довольно высоким молярным выходом [18]. Единственным побочным продуктом, секретированным штаммом помимо пировиноградной кислоты, была молочная кислота, сформированная, по всей вероятности, в результате вовлечения целевого продукта в реакции альтернативного анаэробного дыхания с внутренним акцептором электронов [19, 20]. При этом, несмотря на эффективное реокисление гликолитического НАДН за счет анаэробного дыхания, как с внешним, так и с внутренним акцептором электронов, штамм не потреблял доступную глюкозу полностью. Ключевым фактором, лимитирующим потребление глюкозы рекомбинантом в бескислородных условиях, являлись, по-видимому, избыточные внутриклеточные уровни АТФ.

Цель работы – оптимизация анаэробной продукции пировиноградной кислоты из глюкозы рекомбинантными штаммами *Escherichia coli* с

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

№	Последовательность
P1	5'-catgattatttccgcagccagcgattatcgccggc-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac-3'
P2	5'-ctatgccgattccctttcccatgggagccagtg-cgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P3	5'-aatgtcttccatgacaacaactgataataaagcctt-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac-3'
P4	5'-ttactccacttctgccagttttccgtttactgg-tgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P5	5'-gattcaggaagatcaggctcg-3'
P6	5'-cagagtgaggagatcacatag-3'
P7	5'-gccataagcatgatggagagag-3'
P8	5'-ccggtaaagtgatgctgtgc-3'
P9	5'-tgcgac-agatct-ctcacctaccaacaatgccc-3'
P10	5'-atgtatatctcttc-acggccaatgctctgttc-3'
P11	5'-ccaagaccagcggtagcagccattgtggacat-atgtatatctcttc-acggccaatg-3'
P12	5'-ctagta-agatct-tgaagcctgctttttataactaagttgg-3'
P13	5'-tctcaaaccttcatttatcacaagaagattgtcg-cgctcaagtagtataaaaaagctgaac-3'
P14	5'-gtcgaagagagcagatttgcgc-3'
P15	5'-cctgtctacatcattcatgccg-3'

нарушенной способностью к брожению за счет форсированного гидролиза АТФ.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали рестриктазу *Bgl*II, T4 ДНК лигазу, ДНК полимеразу Taq (“Thermo Scientific”, Литва), а также высокоточную ДНК полимеразу Кара HiFi (“Roche”, Швейцария). ПЦР-продукты очищали электрофорезом в агарозном геле и выделяли с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (“Qiagen”, США). Олигонуклеотиды (“Евроген”, Россия) представлены в табл. 1. Компоненты питательных сред, соли и другие реактивы были произведены фирмами “Panreac” (Испания) и “Sigma” (США).

Бактериальные штаммы, плазмиды и среды. Используемые в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл. 2. Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195), ранее сконструированный штамм *E. coli* MG1655 Δ ackA-pta, Δ proxB, Δ ldhA, Δ adhE, Δ ptsG, P_Lglk, P_{tac}galP [21], обозначенный как PA4, обладающий модифицированной системой транспорта и фосфорилирования глюкозы, лишенный основных путей смешанно-кислотного брожения, а также его производный штамм PA4FPSA [18], с дополнительно блокированной возможностью взаимопревращения фумарат-сукцинат и не способный конвертировать пировиноградную кислоту в ацетил-КоА, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе рекомбинантов.

Бактерии культивировали в богатых средах LB, SOB, SOC и минимальной среде M9 [22], с добавлением, при необходимости, ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл). Для поддержания аэробного роста *ΔaceEF* штамма PA4FPSA и его производных среды дополнительно содержали 10 мМ ацетата натрия.

Конструирование штаммов. Все хромосомные модификации осуществляли по ранее описанному методу [23].

Линейные фрагменты ДНК для инактивации генов *lldD* и *dld*, содержащих маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*), получали при помощи ПЦР с использованием пар праймеров P1 и P2, P3 и P4, и плазмиды pMW118-(λ attL-Сm- λ attR) [24] в качестве матрицы. Полученные фрагменты ДНК были индивидуально интегрированы в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46. Факт соответствия предполагаемых и полученных экспериментально структур хромосом отобранных штаммов, с индивидуально инактивированными генами *lldD* и *dld*, подтверждали ПЦР-анализом с помощью пар локус-специфичных праймеров P5 и P6, P7 и P8.

Конструирование фрагмента ДНК для замены нативной регуляторной области гена *ppsA* искусственным генетическим элементом P_L-SD_{φ10}, содержащим промотор P_L фага лямбда и эффективный сайт связывания рибосом гена φ10 из фага T7, проводили в несколько стадий. На первой стадии, с помощью ПЦР был получен фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, промотор P_L,

Таблица 2. Штаммы и плазмиды

Объект	Генотип	Ссылка
Штамм		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
PA4	<i>E. coli</i> MSG1.0 (MG1655 Δ ackA-pta, Δ poxB, Δ ldhA, Δ adhE, Δ ptsG, P _L glk, P _{tac} galP)	[21]
PA4FPSA	<i>E. coli</i> MSG1.0 Δ frdAB, Δ pf1B, Δ sdhAB, Δ aceEF	[18]
PA4FPSAL	<i>E. coli</i> MSG1.0 Δ frdAB, Δ pf1B, Δ sdhAB, Δ aceEF, Δ lldD	Данная работа
PA4FPSAD	<i>E. coli</i> MSG1.0 Δ frdAB, Δ pf1B, Δ sdhAB, Δ aceEF, Δ dld	»
PA4FPSALD	<i>E. coli</i> MSG1.0 Δ frdAB, Δ pf1B, Δ sdhAB, Δ aceEF, Δ lldD, Δ dld	»
PA4FPSAPyc	<i>E. coli</i> MSG1.0 Δ frdAB, Δ pf1B, Δ sdhAB, Δ aceEF, pPYC	»
PA4FPSAPps	<i>E. coli</i> MSG1.0 Δ frdAB, Δ pf1B, Δ sdhAB, Δ aceEF, P _L -SD _{φ10} -ppsA	»
PA4FPSALDPyc	<i>E. coli</i> MSG1.0 Δ frdAB, Δ pf1B, Δ sdhAB, Δ aceEF, Δ lldD, Δ dld, pPYC	»
PA4FPSALDPps	<i>E. coli</i> MSG1.0 Δ frdAB, Δ pf1B, Δ sdhAB, Δ aceEF, Δ lldD, Δ dld, P _L -SD _{φ10} -ppsA	»
Плазмида		
pMW118-(λ attL-Cm- λ attR)	pSC101, bla, cat, λ attL-cat- λ attR	[24]
pKD46	pINT-ts, bla, P _{araB} - λ gam-bet-exo	[23]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, bla, P _R - λ xis-int, cIts857	[25]
pPYC	pMW119 с клонированным геном пируваткарбоксылазы (pucA) из <i>B. subtilis</i>	[33]

последовательность SD гена ϕ 10 из фага T7 и 36 нуклеотидов, комплементарных 5'-концу кодирующей области гена *ppsA*.

Фрагмент получали в два этапа. На первом этапе, с использованием в качестве матрицы геномной ДНК фага лямбда и праймеров P9 и P10 был получен фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, промотор P_L и часть последовательности SD гена ϕ 10 из фага T7. Полученный ПЦР-продукт служил матрицей в следующем раунде ПЦР с использованием праймеров P9 и P11. Праймер P11 содержал область комплементарную 3'-концу промотора P_L, последовательность SD гена ϕ 10 из фага T7 и 36 первых нуклеотидов из рамки считывания гена *ppsA*. Параллельно осуществляли вторую стадию конструирования фрагмента ДНК. Фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*) и 36 нуклеотидов, гомологичных участку ДНК, непосредственно предшествующему кодирующей области гена *ppsA*, был получен ПЦР с использованием праймеров P12 и P13 и плазмиды pMW118-(λ attL-Cm- λ attR) в качестве матрицы. Полученные фрагменты ДНК были обработаны эндонуклеазой рестрикции *Bgl*II и лигированы T4 ДНК-лигазой. Продукт лигирования амплифицировали с использованием праймеров P11 и P13. Полученный ПЦР-продукт был интегрирован в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плаз-

миду-помощник pKD46. Соответствие запланированной и экспериментально полученной нуклеотидной последовательности нового регуляторного элемента, введенного перед кодирующей областью гена *ppsA*, было подтверждено секвенированием с помощью праймеров P14 и P15.

Соответствующие индивидуальные генетические модификации были, в последствии, введены в хромосомы целевых рекомбинантных штаммов с помощью P1-зависимых трансдукций [22]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [25]. Трансформацию штаммов плазмидами осуществляли по стандартной методике.

Культивирование штаммов. Рекомбинантные штаммы выращивали в течение ночи в среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы при 37°C. По 5 мл ночных культур разбавляли в 10 раз, добавляя 45 мл среды M9, содержащей 10 г/л дрожжевого экстракта. Полученные культуры выращивали в колбах объемом 750 мл при 37°C на роторной качалке при 250 об./мин в течение 8 ч. Клеточные суспензии центрифугировали в течение 15 мин при 2000 г при 4°C. Осадки ресуспендировали в 15 мл модифицированной среды M9, лишенной ионов аммония, содержащей 10 г/л глюкозы и 50 мМ нитрата натрия до ОП₆₀₀ ~ 10. В дальнейшем культу-

ры инкубировали анаэробно в течение 24 ч в пробирках объемом 15 мл, закрытых заворачивающимися крышками, при 37°C на роторной качалке при 250 об./мин. В случае штаммов, несущих pMW-производные плазмиды, среды дополнительно содержали 100 мкг/мл ампициллина (ООО “Синтез”, Россия). Для обеспечения функциональной активности пируваткарбоксилазы в штаммах с геном *pycA* *Bacillus subtilis* в среды, используемые на последней стадии, вносили NaHCO₃ до конечной концентрации 10 г/л.

Собранные для анализа клеточные суспензии центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. В полученных супернатантах определяли концентрации секретированных метаболитов и остаточной глюкозы. Все эксперименты повторялись не менее трех раз.

Аналитические методы. Концентрации органических кислот в культуральных жидкостях, освобожденных от биомассы центрифугированием, определяли методом ВЭЖХ с использованием системы “Waters” HPLC system (США). Применяли ион-эксклюзионную колонку Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) (300 × 7.8 мм, 8 мкм, “Phenomenex”, США) с детекцией при длине волны 210 нм. В качестве подвижной фазы использовали водный раствор серной кислоты (2.5 мМ) со скоростью потока 0.5 мл/мин. Для измерения концентрации глюкозы, система была укомплектована рефрактивным детектором “Waters” 2414 и колонкой Spherisorb-NH2 (4.6 × 250 мм, 5 мкм, “Waters”, США). Подвижной фазой служила смесь ацетонитрил/вода (объемное соотношение 75/25) при скорости потока 1.0 мл/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве базового продуцента пировиноградной кислоты был использован ранее сконструированный штамм *E. coli* PA4FPSA. В данном штамме основные пути смешанно-кислотного брожения, ответственные за анаэробную диссимиляцию пирувата и ведущие к формированию уксусной и молочной кислот, а также этанола, были инактивированы за счет делеции генов *ackA*, *pta*, *pxxB*, *ldhA* и *adhE*, кодирующих ферменты, катализирующие соответствующие реакции. Возможность анаэробного дыхания с фумаратом в качестве внутреннего акцептора электронов была исключена в штамме, в первую очередь, за счет делеции генов *frdAB*, кодирующих компоненты фумаратредуктазы (КФ 1.3.5.4). Известно, что в штаммах *E. coli* с инактивированными генами *frdAB* сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.5.1) способна функционально замещать фумаратредуктазу [26]. Поэтому, гены *sdhAB*, кодирующие компоненты сукцинатдегидрогеназы были также делетированы в штамме. Вовлечение пировиноградной кислоты через

промежуточное образование ацетил-КоА в реакции цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), активирующиеся при дыхании, было предотвращено в штамме в результате делеций генов *pflB* и *aceEF*, кодирующих пируват-формат-лиазу и компоненты пируватдегидрогеназного ферментативного комплекса (КФ 1.2.4.1/2.3.1.12/1.8.1.4). Кроме того, система транспорта и фосфорилирования глюкозы была модифицирована в штамме таким образом, чтобы потреблять АТФ для фосфорилирования углеводного субстрата вместо фосфоенолпирувата (ФЕП) с целью потенциального снижения ингибирования начальной и терминальной стадий гликолиза АТФ, генерируемым на его промежуточных стадиях. Это было достигнуто за счет инактивации гена *ptsG*, кодирующего пермеазу глюкозы ФЕП-зависимой фосфотрансферной системы, при оверэкспрессии генов *galP* и *glk*, кодирующих Н⁺-симпортер галактозы и АТФ-зависимую глюкокиназу (КФ 2.7.1.2). В результате, после аэробного выращивания, штамм PA4FPSA был способен анаэробно конвертировать глюкозу в пировиноградную кислоту, при дыхании с нитратом в качестве внешнего акцептора электронов, с выходом ~1.7 моль/моль [18].

Основной детектированной примесью, формируемой штаммом, являлась молочная кислота. Результаты анализа энантиомерного состава секретированной штаммом молочной кислоты указывали на то, что за формирование этого соединения могли быть ответственные респираторные лактатдегидрогеназы LldD и Dld (КФ 1.1.5.12). В норме, соответствующие ферменты катализируют хинон-зависимую конверсию L-молочной кислоты и D-молочной кислоты в пировиноградную [19]. Однако, в условиях анаэробно-инвертированное хинол-зависимое действие, ведущее к образованию из пировиноградной кислоты соответствующего восстановленного продукта, могло дополнительно способствовать поддержанию внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса в штамме с нарушенной способностью к брожению.

Помимо лактатдегидрогеназ LldD и Dld в альтернативном анаэробном дыхании с пировиноградной кислотой в качестве внутреннего акцептора электронов может принимать участие D-аланиндегидрогеназа DadA (КФ 1.4.5.-) [20]. Для исключения потенциального вклада соответствующего фермента в процессы поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса, характеристику анаэробной утилизации глюкозы и биосинтеза пировиноградной кислоты штаммом PA4FPSA и его производными в ходе двухстадийной ферментации осуществляли в настоящей работе, используя на финальной стадии модифицированную минимальную среду M9, лишенную ионов аммония.

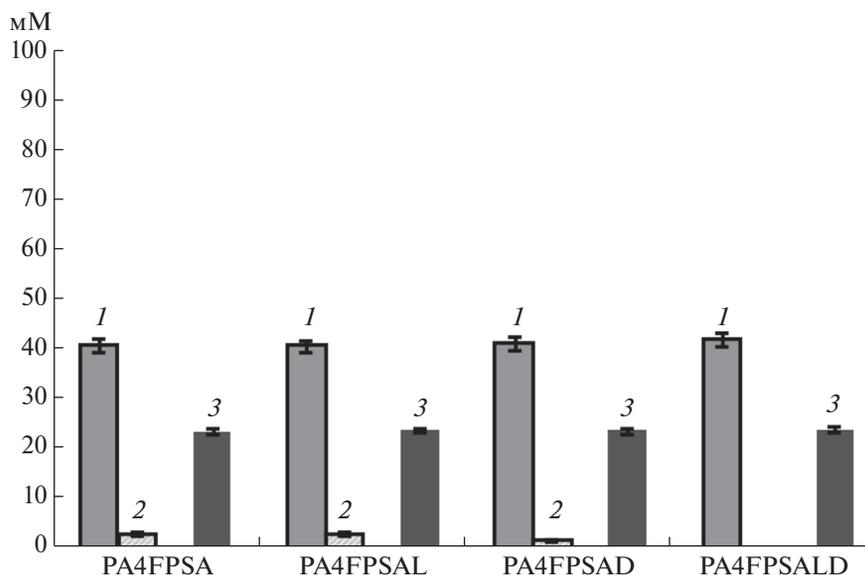


Рис. 1. Концентрации метаболитов (мМ) пировиноградной (1) и молочной (2) кислот, секретированных штаммом PA4FPSA и его производными PA4FPSAL, PA4FPSAD, PA4FPSALD в ходе анаэробной утилизации глюкозы (3) при дыхании с нитратом натрия в качестве внешнего акцептора электронов.

В присутствии в среде ионов нитрата и при отсутствии ионов аммония, штамм PA4FPSA демонстрировал характеристики, аналогичные полученным ранее, потребляя около 23.6 мМ глюкозы и синтезируя ~40.8 мМ (рис. 1) пировиноградной кислоты с выходом 1.72 моль/моль (табл. 3). Аланин ожидаемо не был обнаружен среди продуктов анаэробной утилизации глюкозы, секретированных штаммом, и единственным побочным продуктом, сформированным рекомбинантом, являлась молочная кислота (рис. 1). Наблюдаемый в присутствии нитрата натрия синтез штаммом молочной кислоты объяснялся, по-видимому, высоким потенциалом (~0.19 V) соответствующих

респираторных реакций, использующих внутренний акцептор электронов, лишь в два раза уступающим соответствующему показателю (~0.42 V) для дыхания с участием нитратредуктаз Nar-системы и превосходящим показатель для дыхания с фумаратом (~0.03 V) и даже ДМСО (~0.16 V) в качестве внешних акцепторов электронов [19].

Известно, что в условиях нитратного дыхания в клетках *E. coli* индуцируется экспрессия гена, по крайней мере одной из хинон-зависимых лактатдегидрогеназ, LldD [27]. Поэтому, для предотвращения побочной продукции молочной кислоты в штамме PA4FPSA первично был делегирован ген *lldD*. Соответствующий произ-

Таблица 3. Характеристики потребления углеродного субстрата и продукции метаболитов штаммами PA4FPSA, PA4FPSAL, PA4FPSAD, PA4FPSALD в ходе анаэробной утилизации глюкозы при дыхании с нитратом натрия в качестве внешнего акцептора электронов*

Штамм	Потребленная глюкоза, мМ	Выход метаболитов, моль/моль		Углеродный баланс, %
		пировиноградная кислота	молочная кислота	
PA4FPSA	23.6 ± 0.5	1.72 ± 0.02	0.13 ± 0.01	93
PA4FPSAL	23.8 ± 0.5	1.71 ± 0.02	0.12 ± 0.01	92
PA4FPSAD	23.7 ± 0.6	1.74 ± 0.02	0.07 ± 0.01	91
PA4FPSALD	23.8 ± 0.6	1.76 ± 0.03	н.д.	89

* Углеродный баланс рассчитан как выраженное в % отношение общего количества молей углерода в секретированных продуктах к количеству молей углерода потребленной глюкозы.

Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.
н.д. — не детектировано.

водный штамм PA4FPSAL синтезировал пировиноградную кислоту из глюкозы с эффективностью, практически идентичной эффективности родительского штамма (рис. 1, табл. 3), продолжая, тем не менее, секретировать значимые количества молочной кислоты (рис. 1). Более того, несмотря на инактивацию L-лактатдегидрогеназы LldD, выход молочной кислоты, сформированной штаммом при утилизации глюкозы, не снижался (табл. 3). Можно было предположить, что D-лактатдегидрогеназа Dld была основным ферментом, ответственным за формирование молочной кислоты штаммами PA4FPSA и PA4FPSAL. С целью проверки этой гипотезы, ген *dld* был делетирован в штамме PA4FPSA. При инактивации D-лактатдегидрогеназы анаэробная продукция пировиноградной кислоты из глюкозы соответствующим штаммом PA4FPSAD не изменялась по сравнению со штаммом PA4FPSA, тогда как секреция молочной кислоты заметно падала (рис. 1, табл. 3). Однако образование молочной кислоты *dld*⁻ мутантом не прекращалось полностью. Таким образом, несмотря на предпочтительное формирование в штаммах PA4FPSA и PA4FPSAL молочной кислоты под действием D-лактатдегидрогеназы, L-лактатдегидрогеназа была способна частично компенсировать потерю активности альтернативного фермента в штамме PA4FPSAD. Соответственно, гены обеих лактатдегидрогеназ были, в дальнейшем, совместно делетированы в штамме PA4FPSA.

Штамм PA4FPSALD с инактивированными респираторными лактатдегидрогеназами LldD и Dld не секретировал заметных количеств молочной кислоты в ходе анаэробной утилизации глюкозы. При этом продукция штаммом пировиноградной кислоты (~42.1 мМ) несколько превосходила уровень синтеза целевого вещества, демонстрируемый исходным штаммом PA4FPSA (рис. 1) и выход соответствующего карбоксилата из глюкозы достигал 1.76 моль/моль (табл. 3). Отсутствие в среде восстановленных продуктов катаболизма глюкозы, в свою очередь, указывало на то, что дыхание с экзогенным нитратом в качестве единственного терминального акцептора электронов было способно обеспечить полноценное поддержание внутриклеточного окислительно-восстановительного баланса в штамме PA4FPSALD.

Вместе с тем, штамм PA4FPSALD, как и его предшественники, не потреблял всю доступную глюкозу (55.5 мМ) полностью (рис. 1, табл. 3), хотя Nar и Nrf системы нитратного и нитритного дыхания позволяют реокислить 250 мМ НАДН, используя 50 мМ добавленного в среду NaNO₃ [19], что эквивалентно количеству восстановленных эквивалентов, формируемых при гликолитической утилизации 125 мМ глюкозы. Таким образом, при даже эффективном реокислении глико-

литически сформированного НАДН посредством анаэробного дыхания с внешним акцептором электронов, избыточные внутриклеточные уровни АТФ оставались, как и в случае штамма PA4FPSA, ключевым фактором, лимитирующим потребление глюкозы в бескислородных условиях, его перспективным сконструированными производным PA4FPSALD.

На сегодняшний день описаны несколько подходов направленных на интенсификацию гликолитического потока углерода в рекомбинантных штаммах *E. coli* за счет снижения внутриклеточного уровня АТФ. Основной подход основывается на манипуляции компонентами (F₁F₀) H⁺-АТФ синтазного комплекса для предотвращения окислительного фосфорилирования и/или повышения гидролиза АТФ. Оверэкспрессия генов, кодирующих компоненты цитоплазматической субъединицы F₁, содержащей каталитический сайт, должна способствовать гидролизу АТФ. С другой стороны, инактивация генов мембранно-связанной субъединицы F₀, которая формирует протонный канал, будет приводить к прекращению продукции АТФ посредством оксидативного фосфорилирования с одновременным повышением активности АТФазы. Каждая из этих стратегий была успешно применена для улучшения биосинтетических показателей рекомбинантных штаммов *E. coli*, сконструированных для продукции пировиноградной кислоты из глюкозы в аэробных условиях [9, 28]. Альтернативный и достаточно перспективный подход состоит в реализации в клетке принудительного гидролиза АТФ в результате действия футильных циклов [29].

Ранее было обнаружено, что экспрессия гетерологичной пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1) в штаммах *E. coli* дефицитных по основным путям смешанно-кислотного брожения провоцирует, в ходе анаэробной утилизации глюкозы, возникновение искусственного футильного цикла пировиноградная кислота – щавелевоуксусная кислота (ЩУК) – яблочная кислота – пировиноградная кислота [30]. В данном цикле ЩУК, сформированная из пировиноградной кислоты АТФ-зависимой пируваткарбоксилазой, конвертировалась в яблочную кислоту через потребляющую НАДН начальную реакцию восстановительной ветви ЦТК, катализируемую малатдегидрогеназой Mdh (КФ 1.1.1.37), и, затем, декарбоксилировалась в пировиноградную кислоту в результате действия конститутивно экспрессирующегося в *E. coli* НАД⁺-зависимого малатного фермента MaeA (КФ 1.1.1.39), обеспечивая, в итоге, гидролиз 1 молекулы АТФ при отсутствии суммарной генерации НАДН. Инактивация этого цикла способствовала анаэробной продукции соответствующими рекомбинантными штаммами четырехуглеродных дикар-

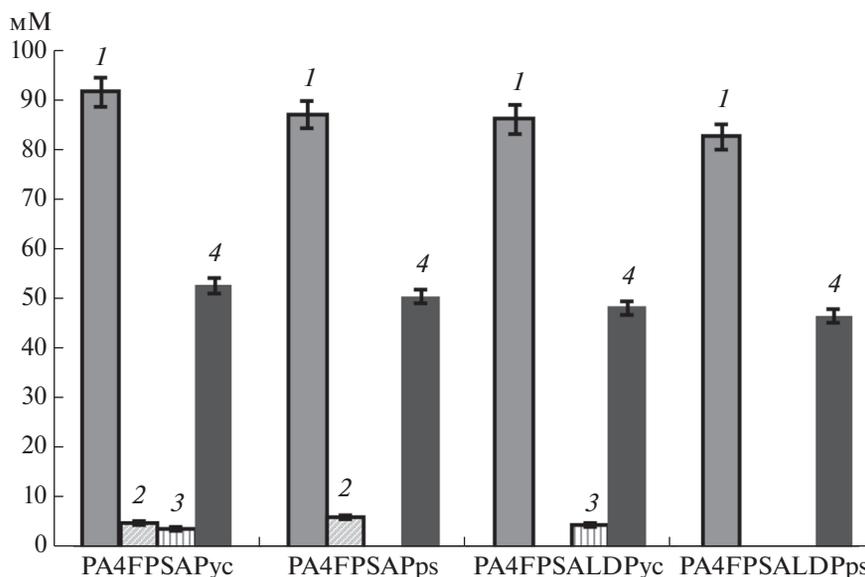


Рис. 2. Концентрации метаболитов (мМ) пировиноградной (1), молочной (2) и яблочной (3) кислот, секретированных штаммами PA4FPSAPyc, PA4FPSAPps, PA4FPSALDPyc и PA4FPSALDPps в ходе анаэробной утилизации глюкозы (4) при дыхании с нитратом натрия в качестве внешнего акцептора электронов и форсированном гидролизе АТФ за счет функционирования футильных циклов пировиноградная кислота – ЩУК – яблочная кислота – пировиноградная кислота (штаммы PA4FPSAPyc и PA4FPSALDPyc) и пировиноградная кислота – ФЕП – пировиноградная кислота (штаммы PA4FPSAPps и PA4FPSALDPps).

боновых кислот [31], тогда как его активация улучшала продукцию пировиноградной кислоты [18, 30].

Альтернативой футильному циклу пировиноградная кислота – ЩУК – яблочная кислота – пировиноградная кислота, функционирующему исключительно при анаэробии, когда активна восстановительная ветвь ЦТК, может служить цикл пировиноградная кислота – ФЕП – пировиноградная кислота. В присутствии в среде глюкозы, футильный цикл пировиноградная кислота – ФЕП – пировиноградная кислота может быть активен как в аэробных, так и в анаэробных условиях. В этом цикле пируваткиназа (КФ 2.7.1.40) катализирует АДФ-зависимое дефосфорилирование ФЕП в пировиноградную кислоту с образованием молекулы АТФ, а фосфоенолпируватсинтаза (КФ 2.7.9.2) фосфорилирует пировиноградную кислоту, используя АТФ как кофактор, расщепляя его до АМФ и неорганического фосфата. Регенерация АМФ в АТФ, под действием аденилаткиназы (КФ 2.7.4.3), требует, при этом, расхода двух АТФ. Способность соответствующего цикла улучшать продукцию целевого соединения из глюкозы в бескислородных условиях, за счет снижения внутриклеточного пула АТФ, была недавно продемонстрирована с использованием в качестве примера штамма *E. coli* – продуцента молочной кислоты [32].

Способность футильных циклов пировиноградная кислота – ЩУК – яблочная кислота – пи-

ривиноградная кислота и пировиноградная кислота – ФЕП – пировиноградная кислота улучшать анаэробное потребление глюкозы сконструированными рекомбинантами продуцентами пировиноградной кислоты была проверена при реализации их функциональности как в базовом штамме PA4FPSA, так и в его производном PA4FPSALD, лишенном респираторных лактатдегидрогеназ. С целью обеспечения в штаммах активности футильного цикла пировиноградная кислота – ЩУК – яблочная кислота – пировиноградная кислота, в клетки вводили плазмиду pPYC [33], экспрессирующую ген *pycA* *B. subtilis*, получая соответствующие производные PA4FPSAPyc и PA4FPSALDPyc. Функциональность футильного цикла пировиноградная кислота – ФЕП – пировиноградная кислота была обеспечена в штаммах PA4FPSAPps и PA4FPSALDPps за счет конститутивной экспрессии гена *ppsA*, кодирующего фосфоенолпируватсинтазу, под контролем промотора P_L фага лямбда.

Анаэробное потребление глюкозы сконструированными штаммами PA4FPSAPyc, PA4FPSALDPyc, PA4FPSAPps и PA4FPSALDPps резко возрастало по сравнению со штаммами предшественниками (рис. 1, 2), при сохранении высоких значений выхода синтезированной рекомбинантами пировиноградной кислоты (табл. 4). Это свидетельствовало о позитивном влиянии в штаммах форсированного гидролиза АТФ, в результате действия каждого из футильных циклов, на интенсивность

Таблица 4. Характеристики потребления углеродного субстрата и продукции метаболитов штаммами PA4FPSA-Pyc, PA4FPSAPps, PA4FPSALDPyc и PA4FPSALDPps в ходе анаэробной утилизации глюкозы при дыхании с нитратом натрия в качестве внешнего акцептора электронов и форсированном гидролизе АТФ*

Штамм	Потребленная глюкоза, мМ	Выход метаболитов, моль/моль			Углеродный баланс, %
		пировиноградная кислота	молочная кислота	яблочная кислота	
PA4FPSAPyc	53.1 ± 1.6	1.73 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01	97
PA4FPSAPps	51.0 ± 1.5	1.72 ± 0.02	0.13 ± 0.01	н.д.	92
PA4FPSALDPyc	48.8 ± 1.5	1.78 ± 0.03	н.д.	0.10 ± 0.01	96
PA4FPSALDPps	47.1 ± 1.4	1.77 ± 0.03	н.д.	н.д.	88

* Углеродный баланс рассчитан как выраженное в % отношение общего количества молей углерода в секретированных продуктах к количеству молей углерода потребленной глюкозы.

Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.

н.д. – не детектировано.

потока углерода через каскад гликолитических реакций, ведущих к целевому формированию пировиноградной кислоты в качестве основного продукта утилизации углеродного субстрата.

Тем не менее, эффект введения в штаммы соответствующих футильных циклов несколько различался. Так, штаммы PA4FPSAPyc, PA4FPSALDPyc с активным футильным циклом пировиноградная кислота – ЦУК – яблочная кислота – пировиноградная кислота секретировали, в качестве одного из продуктов утилизации глюкозы, яблочную кислоту (рис. 2). Это, с одной стороны, свидетельствовало о функциональности именно данного футильного цикла в клетках рекомбинантов, но, с другой стороны, указывало на недостаточную активность в клетках малатных ферментов. При этом значение углеродного баланса, характеризующее полноту конверсии субстрата в детектированные продукты, в случае штаммов PA4FPSAPyc и PA4FPSALDPyc возрастало в сравнении с родительскими штаммами, тогда как для штаммов PA4FPSAPps и PA4FPSALDPps оставалось практически неизменным (табл. 3, 4).

Поскольку функционирование футильного цикла пировиноградная кислота – ФЕП – пировиноградная кислота не приводило к формированию штаммами новых продуктов утилизации глюкозы, это указывало на то, что те или иные интермедиаты гликолиза вовлекались в соответствующих рекомбинантах в побочные реакции расхода субстрата, сопровождающиеся непродуктивной потерей углерода. С учетом отсутствия в штаммах пируватдегидрогеназы и, следовательно, невозможности протекания в условиях дыхания реакций оксидативной ветви ЦТК, за сниженное значение углеродного баланса могла быть ответственна частично активированная оксидативная ветвь пентозофосфатного пути (ПФП), обуславли-

вающая потерю углерода за счет высвобождения CO₂ на стадии реакции катализируемой 6-фосфоглюконатдегидрогеназой (КФ 1.1.1.44). Активность в клетках футильного цикла пировиноградная кислота – ЦУК – яблочная кислота – пировиноградная кислота снижала вклад оксидативной ветви ПФП в непродуктивную потерю рекомбинантами углерода, тогда как форсированное взаимопревращение пировиноградная кислота – ФЕП практически не влияло на интенсивность соответствующего процесса. Вместе с тем, штамм PA4FPSALDPps, гидролизующий избыточный АТФ за счет действия футильного цикла пировиноградная кислота – ФЕП – пировиноградная кислота, в отличие от штамма PA4FPSALDPyc, снижающего внутриклеточный пул соответствующего кофактора в результате функционирования футильного цикла пировиноградная кислота – ЦУК – яблочная кислота – пировиноградная кислота, синтезировал пировиноградную кислоту с повышенным выходом (1.77 моль/моль), не секретируя заметных количеств каких-либо побочных продуктов и потребляя доступную глюкозу практически полностью. С другой стороны, высокое значение углеродного баланса (96%, табл. 4), демонстрируемое штаммом PA4FPSALDPyc при анаэробной утилизации глюкозы в условиях нитратного дыхания, позволяло предположить, что достигнутый выход синтезированной штаммом пировиноградной кислоты (1.78 моль/моль, табл. 4) может быть и далее увеличен при повышении в клетках активности малатных ферментов. Однако, футильный цикл пировиноградная кислота – ЦУК – яблочная кислота – пировиноградная кислота, обеспечивающий в клетках штамма PA4FPSALDPyc форсированный гидролиз АТФ, не активен при отсутствии в среде доступного источника CO₂. При этом снабжение среды бикар-

бонатом будет увеличивать общую стоимость продукции целевого соединения.

Таким образом, промышленная применимость каждого из подходов, основанных на форсированном гидролизе АТФ за счет действия в клетках рекомбинантов искусственно созданных футильных циклов, для эффективной анаэробной продукции пировиноградной кислоты из глюкозы рекомбинантными штаммами *E. coli* должна оцениваться с учетом как потенциальной выгоды, так и возможного роста операционных издержек.

Результаты исследования наглядно демонстрируют потенциал форсированного гидролиза АТФ, за счет применения расходуемых данных кофактор футильных циклов, для улучшения биосинтетических характеристик рекомбинантных штаммов *E. coli*, направленно сконструированных для анаэробной продукции пировиноградной кислоты из глюкозы при анаэробном дыхании с внешним акцептором электронов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-04-01222).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ingram L.O., Conway T., Clark D.P., Sewell G.W., Preston, J.F. // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53. № 10. P. 2420–2425.
- Eram M.S., Ma K. // Biomolecules. 2013. V. 3. № 3. P. 578–596.
- Reiße S., Haack M., Garbe D., Sommer B., Steffler F., Carsten J., Bohnen F., Sieber V., Brück T. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2016. V. 4. № 74. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00074>
- Li Y., Chen J., Lun S.Y. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 57. № 4. P. 451–459.
- Park H.S., Lee J.Y., Kim H.S. // Biotechnol Bioeng. 1998. V. 58. № 2–3. P. 339–343.
- Zhang Y., Tao F., Du M., Ma C., Qiu J., Gu L., He X., Xu P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 86. № 2. P. 481–489.
- Saper R.B., Eisenberg D.M., Phillips R.S. // Am. Fam. Physician. 2004. V. 70. № 9. P. 1731–1738.
- Maleki N., Eiteman M.A. // Fermentation. 2017. V. 3. № 8. <https://doi.org/10.3390/fermentation3010008>
- Causey T.B., Shanmugam K.T., Yomano L.P., Ingram L.O. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. № 8. P. 2235–2240.
- Koebmann B.J., Westerhoff H.V., Snoep J.L., Nilsson D., Jensen P.R. // J. Bacteriol. 2002. V. 184. № 14. P. 3909–3916.
- Vemuri G.N., Altman E., Sangurdekar D.P., Khodursky A.B., Eiteman M.A. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. № 5. P. 3653–3661.
- Fischer C.R., Tseng H.C., Tai M., Prather K.L., Stephanopoulos G. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 88. № 1. P. 265–275. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2749-2>
- Скорородова А.Ю., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 3. С. 278–284.
- Chen G.Q. // Microb. Cell. Fact. 2012. V. 11. № 111. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-111>
- Carvalho M., Matos M., Roca C., Reis M.A. // N. Biotechnol. 2014. V. 31. № 1. P. 133–139.
- Jung H.M., Kim Y.H., Oh M.K. // Biotechnol. J. 2017. V. 12. № 11. <https://doi.org/10.1002/biot.201700121>
- Förster A.H., Beblawy S., Golitsch F., Gescher J. // Biotechnol. Biofuels. 2017. V. 10. № 65. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0745-9>
- Skorokhodova A.Y., Gulevich A.Y., Debabov V.G. // J. Biotechnol. 2019. V. 293. P. 47–55.
- Unden G., Bongaerts J. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1320. № 3. P. 217–234.
- Скорородова А.Ю., Сухоженко А.В., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 2. С. 16–24.
- Моржакова А.А., Скорородова А.Ю., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 2. С. 136–143.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed., N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
- Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
- Каташкина Ж.И., Скорородова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2005. Т. 39. № 5. С. 823–831.
- Гулевич А.Ю., Скорородова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М., Зименков Д.В., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2009. Т. 43. № 3. С. 547–557.
- Maklashina E., Berthold D.A., Cecchini G. // J Bacteriol. 1998. V. 180. № 22. P. 5989–5996.
- Nishimura Y., Tan I.K.P., Ohgami Y., Kohgami K., Kamihara T. // FEMS Microbiol. Lett. 1983. V. 17. № 1–3. P. 283–286.
- Zhu Y., Eiteman M.A., Altman R., Altman E. // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. № 21. P. 6649–6655.
- Hädicke O., Klamt S. // Biochem. Soc. Trans. 2015. V. 43. № 6. P. 1140–1145.
- Скорородова А.Ю., Стасенко А.А., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 2. С. 149–157.
- Скорородова А.Ю., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. // Биотехнология. 2018. Т. 34. № 2. С. 18–25.
- Hädicke O., Bettenbrock K., Klamt S. // Biotechnol. Bioeng. 2015. V. 112. № 10. P. 2195–2199.
- Скорородова А.Ю., Гулевич А.Ю., Моржакова А.А., Шакулов П.С., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 4. С. 415–423.

Optimization of Anaerobic Production of Pyruvic Acid from Glucose by Recombinant *Escherichia coli* Strains with Impaired Fermentation Ability Through Enforced ATP Hydrolysis

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

^aFederal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

*e-mail: sasha.skorokhodova@gmail.com

Anaerobic production of pyruvic acid from glucose by recombinant *Escherichia coli* strains with impaired fermentation ability during respiration with nitrate as an external terminal electron acceptor was studied. The core strain *E. coli* MG1655 $\Delta ackA-pta$, $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, P_{lgk} , $P_{tacgalP}$, $\Delta frdAB$, $\Delta pflB$, $\Delta sdhAB$, $\Delta aceEF$ during nitrate respiration in a minimal salt medium devoid of ammonium ions converted glucose to pyruvic acid with a yield of 1.72 mol/mol, secreting lactic acid as the only impurity detected. Deletion of the *lldD* and *dld* genes in the strain led to the cessation of the secretion of this by-product. The corresponding strain, devoid of the respiratory L- and D-lactate dehydrogenases LldD and Dld, synthesized pyruvic acid from glucose with a yield of 1.76 mol/mol, consuming the available carbohydrate substrate incompletely. Enforced hydrolysis of ATP, due to the action in the cell of futile cycles of pyruvic acid – oxaloacetate – malic acid – pyruvic acid or pyruvic acid – phosphoenolpyruvate – pyruvic acid, ensured a drastic increase in glucose consumption by recombinants while maintaining the levels of substrate to the target product conversion. As a result, during anaerobic nitrate respiration and enforced hydrolysis of ATP, the yield of pyruvic acid from glucose of 1.77–1.78 mol/mol was achieved, with an almost exhaustive consumption of substrate by recombinants and minimal or no by-products formation.

Keywords: *Escherichia coli*, fermentation, futile cycle, glucose, pyruvic acid, respiration

УДК 579.852.11+577.151

ЗАКИСЛЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ ПРОДУКТАМИ МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ ПРЕПЯТСТВУЕТ СИНТЕЗУ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ α -АМИЛАЗЫ БАКТЕРИЯМИ *BACILLUS SUBTILIS* 168

© 2021 г. А. В. Качан¹, *, А. Н. Евтушенко¹

¹Белорусский государственный университет, Минск, 220030 Беларусь

*e-mail: av.kachan@mail.ru

Поступила в редакцию 27.11.2020 г.

После доработки 07.01.2021 г.

Принята к публикации 22.02.2021 г.

Синтез α -амилазы *AmyM3* из *Bacillus flexus* 406 в клетках рекомбинантного штамма *B. subtilis* 168-28 существенно подавлялся при глубинном культивировании бактерий в питательной среде с добавлением 1% глюкозы. Подавление синтеза α -амилазы глюкозой в клетках *Bacillus subtilis* происходило на уровне транскрипции при участии белка катаболитного контроля *CsrA*. Удаление предполагаемого участка *cre* в гене *amyM3* приводило к исчезновению эффекта катаболитной репрессии, однако количество синтезированной внеклеточной α -амилазы в присутствии глюкозы оставалось сниженным. Было показано, что сдвиг pH среды культивирования до значений 5.8–6.0, обусловленный метаболитами, выделяемыми бактериями *B. subtilis* при утилизации глюкозы, препятствовал синтезу активной внеклеточной α -амилазы, вероятно, оказывая влияние на пост-секреторный фолдинг фермента. Это наблюдение демонстрирует новый аспект обусловленного регулятором *CsrA* влияния предпочтительных источников углерода на продукцию внеклеточной α -амилазы бактериями *B. subtilis*.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, альфа-амилаза, катаболическая репрессия, регуляция экспрессии генов, синтез экзоферментов

DOI: 10.31857/S0555109921040061

Микроорганизмы характеризуются избирательной утилизацией содержащихся в среде питательных субстратов, отдавая предпочтение веществам, подвергающимся катаболизму с меньшими энергетическими затратами, например, глюкозе. В присутствии легко метаболизируемого источника углерода происходит подавление экспрессии генов транспорта и утилизации других питательных субстратов. Такой способ регуляции метаболизма получил название катаболитной репрессии [1]. Катаболитный контроль подразумевает также активацию ряда генов, способствующих катаболизму предпочитаемого субстрата. Ключевую роль в катаболитном контроле экспрессии генов хорошо изученной почвенной бактерии *B. subtilis* играет глобальный транскрипционный регулятор *CsrA*. Данный белок семейства LacI/GalR активируется при повышении внутриклеточной концентрации фруктозо-1,6-бисфосфата, одного из первичных интермедиатов гликолитического расщепления глюкозы [2]. В присутствии глюкозы происходит активация регулируемой фруктозо-1,6-бисфосфатом протеинкиназы, фосфорилирующей белок

HPr, который, после данной модификации, образует комплекс с *CsrA*. В комплексе с *HPr* *CsrA* связывается со специфическими участками, называемыми *cre* (*catabolite-responsive element*), обнаруженными в более чем 60 регулируемых им оперонах. Под катаболитным контролем в клетках *B. subtilis* находятся гены ряда метаболических путей, дыхания, споруляции [3].

CsrA преимущественно действует в качестве репрессора транскрипции. В клетках *B. subtilis* 168 ген *amyE*, кодирующий α -амилазу (КФ 3.2.1.1), является мишенью репрессирующего действия белка *CsrA*. Регулятор связывается с последовательностью азотистых оснований 5'-TGT AAG CGC TTA CA-3', расположенной на 4 нуклеотида ниже области – 10 промотора, осуществляя репрессию транскрипции *amyE* в присутствии глюкозы [4]. Для некоторых оперонов *B. subtilis*, например, кодирующих ферменты превращения ацетил-КоА в ацетат, *CsrA* выступает в качестве активатора. Направленный мутагенез участков *cre* в генах биосинтеза биотехнологически значимых метаболитов позволяет повысить продуктив-

ность бактерий при их выращивании в богатых углеводами питательных средах.

Ранее из хромосомной ДНК *Bacillus flexus* 406 был изолирован ген *amyM3*, кодирующий термо-стабильную α -амилазу АмуМ3 [5]. После клонирования данного гена в клетках *B. subtilis* 168 бактерии эффективно синтезировали гетерологичный фермент.

Цель работы – охарактеризовать влияние катаболитного регулятора *SсpA* на синтез α -амилазы АмуМ3 и получить мутантный вариант кодирующего ее гена, не чувствительный к катаболитной репрессии.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. Штамм бактерий *Escherichia coli* XL1-Blue (*endA1 gyrA96(Nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ (lacZ)M15] hsdR17(*r_k⁻m_k⁻)*) был использован в работе для проведения молекулярного клонирования плазмидных векторов. Штамм бактерий *E. coli* TG-1 (K-12 *glnV44 thi-1 Δ (lac-proAB) Δ (mcrB-hsdSM)5, (*r_k⁻m_k⁻)*) F' [*traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15*]) использовали для получения препаратов плазмидных ДНК перед трансформацией клеток *B. subtilis*. Штаммы *E. coli* XL1-Blue и TG-1, а также штамм *B. subtilis* 168 (*trpC2*) взяты из коллекции микроорганизмов кафедры молекулярной биологии Белорусского государственного университета (Минск). Штамм *B. subtilis* CR2 (*trpC2 cspA::ermAM(Em^R)*) был получен замещением центральной части хромосомного гена *cspA* бактерий *B. subtilis* 168 (*trpC2*) на маркерный ген устойчивости к эритромицину, для чего в клетки *B. subtilis* 168 вводили интегративную плазмиду рMTL21c-*cspA-Em*. Штамм *B. subtilis* CR3 (*trpC2 cspA::spc(Sp^R)*) был получен замещением центральной части хромосомного гена *cspA* бактерий *B. subtilis* 168 (*trpC2*) на маркерный ген устойчивости к спектиномицину.**

Штаммы *B. subtilis* 168-28 (*trpC2 amyE::[amyM3 aphA3(Km^R)]*) и 168-22 (*trpC2 amyE::[amyM3-cre1 aphA3(Km^R)]*) получены путем введения в клетки бактерий *B. subtilis* 168 интегративных векторов рMTL21c-*amyE-amyM3-Km* и рMTL21c-*amyE-amyM3-cre1-Km* соответственно.

Штаммы *B. subtilis* CR2-28 (*trpC2 cspA::ermAM(Em^R) amyE::[amyM3 aphA3(Km^R)]*) и CR2-22 (*trpC2 cspA::ermAM(Em^R) amyE::[amyM3-cre1 aphA3(Km^R)]*) получены введением в клетки бактерий *B. subtilis* CR2 плазмид рMTL21c-*amyE-amyM3-Km* и рMTL21c-*amyE-amyM3-cre1-Km* соответственно.

Штаммы *B. subtilis* 168-MZ (*trpC2 amyE::[P_{amyM3}-lacZ ermAM(Em^R)]*) и CR3-MZ (*trpC2 cspA::spc(Sp^R) amyE::[P_{amyM3}-lacZ ermAM(Em^R)]*) получены введе-

нием в клетки бактерий *B. subtilis* 168 и CR3 соответственно плазмидной ДНК рMTL21c-*amyE-lacZ-amyM3*, которая позволяла встроить в состав кодирующей последовательности гена *amyE* *B. subtilis* репортерную конструкцию, обеспечивающую экспрессию гена β -галактозидазы (КФ 3.2.1.23) *lacZ E. coli* под контролем промоторного участка гена *amyM3*. Штамм *B. subtilis* 168-CZ (*trpC2 amyE::[P_{amyM3-cre1}-lacZ ermAM(Em^R)]*) содержал аналогичную инсерцию, в которой в промоторном участке гена *amyM3* отсутствовал предполагаемый сайт *cre*.

В работе также использовался штамм *B. subtilis* 568 (*amyE::ermAM(Em^R)*), который был создан на основе *B. subtilis* 168 и содержал ген α -амилазы *amyE*, инактивированный путем инсерции маркера устойчивости к эритромицину.

Культивирование. Бактерии выращивали при температуре 37°C в полноценной жидкой или на агаризованной пептонно-дрожжевой среде следующего состава (г/л): пептон ферментативный – 10,0, дрожжевой экстракт – 5,0, NaCl – 5,0, pH – 7,0. Для оценки активности ферментов, синтезируемых различными штаммами *B. subtilis*, культивирование бактерий проводили в жидкой питательной среде для споруляции (ПСС) [6]. При выращивании в жидкой среде для аэрации и перемешивания культур (240 об./мин) использовали орбитальный шейкер IST-4075 (“Jeio Tech”, Республика Корея). При необходимости в питательные среды вносили антибиотики в следующих концентрациях: ампициллин – 100 мкг/мл, канамицин – 50 мкг/мл, спектиномицин – 100 мкг/мл, эритромицин – 300 мкг/мл для *E. coli* и 3 мкг/мл для *B. subtilis*, хлорамфеникол – 5 мкг/мл для *B. subtilis*.

Измерение pH в питательных средах, растворах и отбираемых пробах бактериальных культур осуществляли с помощью pH-метра HI 83141 (“HANNA Instruments”, Германия).

Конструирование интегративных плазмид. Для введения в состав хромосомной ДНК *B. subtilis* 168 чужеродных генетических конструкции были использованы интегративные плазмиды, полученные на основе вектора рMTC21c, не способного реплицироваться в клетках *B. subtilis* [7]. При создании плазмиды рMTL21c-*cspA-Em* проводили амплификацию фрагмента хромосомной ДНК *B. subtilis* 168, содержащего ген *cspA*, в реакции ПЦР с олигонуклеотидами *cspF* (5'-TTT TGC TAG CAA TAT TAC GAT STA CGA TGT A-3') и *csp-R* (5'-TTC TCG AGT TAT GAC TTG GTT GAC TTT STA AGC T-3'). Для проведения всех описанных в работе реакций ПЦР использовали амплификатор SureCyler 8800 (“Agilent Technologies”, США), высокоточную ДНК-полимеразу Diamant HF и реагенты производства ОДО “Праймтех” (Беларусь). Реакционная смесь для

ПЦР объемом 50 мкл содержала около 50 нг тотальной ДНК *B. subtilis* 168, 0.2 ммоль/л каждого дНТФ, 0.5 мкмоль/л каждого праймера, 0.02 Е/мкл ДНК-полимеразы и соответствующий буфер. Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Целевые продукты очищали из геля с помощью набора Agarose Gel Extraction Kit ("Jena Bioscience", Германия), после чего полученный фрагмент ДНК объединяли в ходе реакции лигирования с плазмидой рМТC21с, предварительно линейризованной с помощью эндонуклеазы рестрикции *Sma*I. После клонирования рекомбинантных молекул в клетках *E. coli* XL1-Blue верификацию получения нужных плазмид осуществляли с помощью рестрикционного анализа. Выделение плазмидной ДНК, электрофорез ДНК в агарозном геле, рестрикционный анализ и лигирование, кальциевую трансформацию клеток *E. coli* проводили в соответствии с общепринятыми методиками [8]. В работе использовались препараты эндонуклеаз рестрикции и ДНК-лигазы фирм "Thermo Scientific" (Литва) и "New England Biolabs" (Великобритания).

После встраивания в состав вектора рМТL21с участка ДНК с геном *ccpA* полученную плазмиду обрабатывали эндонуклеазами *Cla*I и *Bsp*119I для удаления части кодирующей последовательности гена *ccpA*. Линейную плазмиду с делецией обрабатывали ДНК-полимеразой фага Т4 ("Thermo Scientific", Литва) для создания ровных концов, после чего лигировали с фрагментом ДНК, содержащим маркер устойчивости к эритромицину, который был получен путем обработки плазмиды рMUTIN-4 [9] ферментами *Xba*I, *Sau*3AI и ДНК-полимеразой фага Т4. Рекомбинантную плазмиду рМТL21с-*ccpA*-Em клонировали в клетках *E. coli* XL1-Blue.

Трансформация бактерий *B. subtilis* плазмидной ДНК производилась по общепринятой методике [10]. После трансформации проводили отбор колоний, клетки которых проявляли устойчивость к эритромицину (что указывало на присутствие в геноме бактерий вставки рМТL21с-*ccpA*-Em, интегрировавшейся в состав локуса *ccpA* путем гомологичной рекомбинации), при этом были чувствительными к хлорамфениколу (маркер устойчивости к которому присутствует в плазмиде рМТL21с). Такой фенотип указывал на то, что в клетках происходила двойная рекомбинация, в результате которой участок хромосомного гена *ccpA* замещался на поврежденную копию *ccpA*, при этом последовательность плазмиды рМТL21с в хромосому не внедрялась. Наличие в отобранном штамме *B. subtilis* CR2 данной генетической перестройки подтверждали с помощью ПЦР на матрице геномной ДНК штамма с праймерами *ccp*-F и *ccp*-R по образованию единственного продукта реакции длиной 2061 п.н., в то время как размер амплифицируемого участка ДНК *B. subtilis* 168 в аналогичной реакции составлял 1017 п.н.

Аналогичная стратегия была использована для конструирования других использованных в работе интегративных плазмид и получения с их помощью рекомбинантных штаммов *B. subtilis*. Плазмиды рМТL21с-*amyE*-*amyM3*-Km и рМТL21с-*amyE*-*amyM3*-*cre*1-Km обеспечивали инсерцию в состав локуса *amyE* маркера устойчивости к канамицину из векторной молекулы рKS1 [11] и гена α -амилазы *amyM3* *B. flexus* 406 [5]. Плазмида рМТL21с-*amyE*-*amyM3*-*cre*1-Km позволяла интегрировать в локус *amyE* *B. subtilis* 168 мутантный вариант гена с делецией предполагаемого участка *cre*. Полученные с использованием данных плазмид штаммы *B. subtilis* 168-28, 168-22, CR2-28 и CR2-22 содержали ген *amyM3* в составе хромосомного локуса *amyE*. Такая инсерция приводила к инактивации гена *amyE*, кодирующего собственную α -амилазу *B. subtilis* 168.

Благодаря полученной в работе плазмиде рМТL21с-*amyE*-*lacZ*-*amyM3* производилась интеграция в состав кодирующей последовательности гена *amyE* *B. subtilis* репортерной конструкции, обеспечивающей экспрессию гена β -галактозидазы *lacZ* *E. coli* (изолирован из плазмиды рMUTIN-4) под контролем промоторного участка гена *amyM3*. Репортерный вектор получали путем встраивания в состав плазмиды рМТL21с-*amyE* фрагментов из плазмиды рMUTIN-4, содержащих маркер устойчивости к эритромицину и ген *lacZ*. Затем полученную плазмиду линейризовали обработкой ферментом *Sma*I. Промоторный участок *amyM3* получали путем амплификации в реакции ПЦР с использованием плазмиды рALTER-1-*amyM3* в качестве матричной ДНК и олигонуклеотидов *srp*-F (5'-CGA TCG CCT ATT TGG CTT TTC CCC ATT CGC TAC TTC GAA AAA GCA GG TAG C-3') и *srp*-R (5'-GAT CCG CGG CGG CCG CCC ATG ATT CGG TGC AAC CGT TGG CAC-3'). Объединение промоторного участка гена *amyM3* с линейным интегративным вектором проводили с помощью методики кольцевой полимеразной реакции (CPEC) [12]. Реакционная смесь объемом 60 мкл включала 10 нг/мкл фрагмента гена *amyM3*, 10 нг/мкл линейризованного вектора, 0.2 ммоль/л каждого дНТФ и 0.02 Е/мкл ДНК-полимеразы. Реакцию осуществляли при следующем температурном режиме: 98°C 30 с; 20 циклов: 98°C 10 с, 70°C 30 с, 72°C 5 мин; 72°C 10 мин. Аналогичным образом в работе была сконструирована плазмида рМТL21с-*amyE*-*lacZ*-*amyM3*-*cre*, содержащая ген *lacZ* под контролем промотора *amyM3* с мутацией предполагаемого участка *cre*. Репортерные конструкции вводились в клетки штаммов *B. subtilis* 168 и CR2, с последующим отбором содержащих инсерции в локус *amyE* бактерий. Полученные штаммы *B. subtilis* 168-MZ, *B. subtilis* 168-CZ и CR3-MZ характеризовались отсутствием амило-

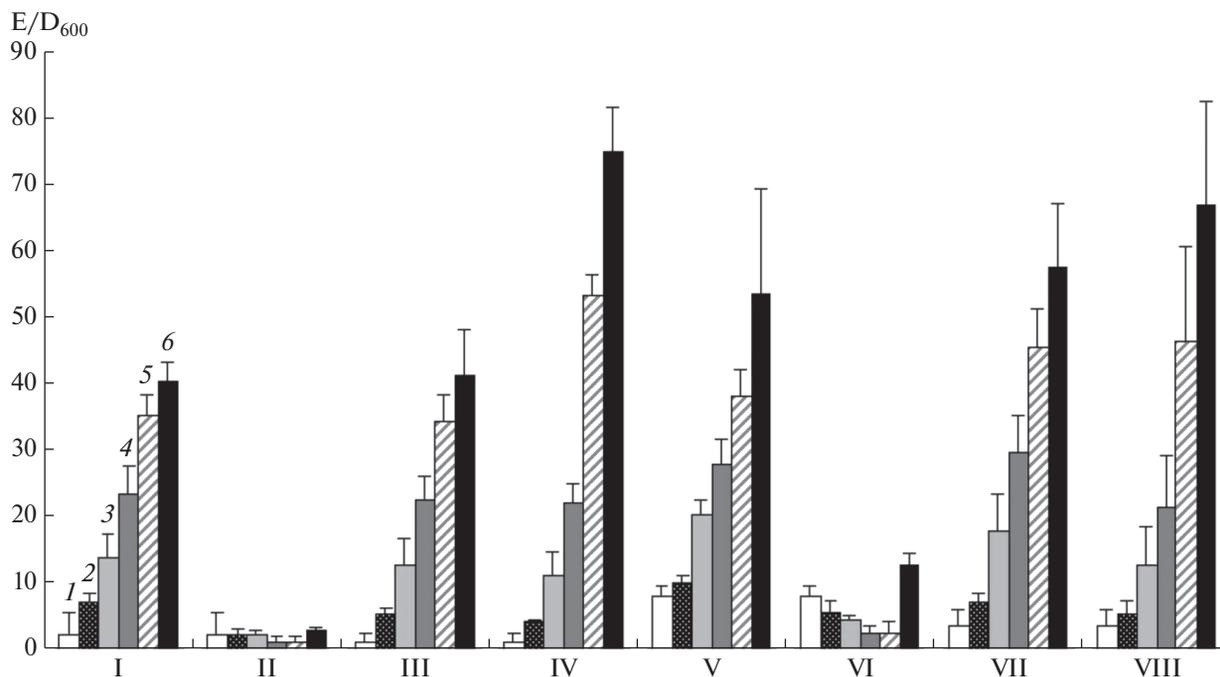


Рис. 1. Продуктивность (среднее значение $E/D_{600} \pm \sigma$) различных штаммов *B. subtilis* по α -амилазе: I, II – 168-28; III, IV – CR2-28; V, VI – 168-22; VII, VIII – CR2-22. В культуры I, III, V, VII глюкозу не вносили, в культуры II, IV, VI и VIII вносили глюкозу до концентрации 1.0% в середине экспоненциальной фазы. Активность фермента оценивали непосредственно после внесения в культуры глюкозы (1) или через 1 (2) 2 (3), 3 (4), 5 (5) и 7 (6) ч после этого.

литической активности, устойчивостью к эритромицину и чувствительностью к хлорамфениколу.

Направленный мутагенез предполагаемого участка *cre* гена *amyM3* проводили с помощью набора Altered Sites® II *in vitro* Mutagenesis System (“Promega Corp.”, США) в соответствии с рекомендуемым производителем протоколом. Наличие изменений в последовательности ДНК подтверждали с помощью секвенирования.

Определение концентрации D-глюкозы в бактериальных культурах проводили глюкозооксидазным-пероксидазным методом с использованием набора D-glucose assay kit (GPOD-Format) (“Megazyme”, Ирландия).

Оценку накопления α -амилазы в культуре бактерий осуществляли, выращивая штаммы до середины экспоненциальной фазы в среде ПСС, после чего культуры разделяли на две части, в одну из которых вносили раствор D-глюкозы до конечной концентрации 1% [6]. В течение дальнейшего культивирования в периодически отбираемых пробах культуры оценивали количество клеток по величине оптической плотности при длине волны 600 нм, а также измеряли активность внеклеточных α -амилаз с реагентом I_2/KI , как описано [6]. Продуктивность клеток выражали в виде отношения рассчитанных значений активности к значению D_{600} культуры (E/D_{600}).

Оценку активности гена β -галактозидазы *lacZ* в пробах выращенных аналогичным образом бак-

териальных культур проводили в соответствии с широко используемой методикой [13].

Статистический анализ данных. Все данные представляют собой средние значения, полученные по результатам по меньшей мере трех независимых экспериментов. Статистическая обработка результатов измерений проводилась в программе Microsoft Office Excel 2003. Погрешность измерений оценивали по величине среднеквадратичного отклонения (σ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При выращивании в жидкой питательной среде ПСС бактерии штамма *B. subtilis* 168-28 вступали в стационарную фазу роста на 2–3 ч после начала отбора проб в середине экспоненциальной фазы. Внесение глюкозы до концентрации 1.0% в этой фазе роста культуры вызывало задержку в достижении стационарной фазы. При оценке количества α -амилазы в культуре бактерий *B. subtilis* 168-28, выращиваемых в данных условиях, было обнаружено, что активность фермента через 3 ч после внесения в культуру глюкозы составляла около 5% от активности фермента в культуре без глюкозы, как показано на рис. 1. Было выдвинуто предположение, что в клетках *B. subtilis* 168-28 ген *amyM3* подвергается катаболитной репрессии по механизму, характерному для гена *amyE*, т.е. обусловленному транскрипционным регулято-

351 TCAGCTAACACCTGAAAATATTCGCTACTTCGAAAAAGCAGGTAGCGAACCTTGGGAAGAGTTATAATCCT
 421 TTA AAAAAGCTCAAACAAGAAATTTCTTGTTTGAGCGTTTTTATGCTTTTAGCTTTATATAGTCAATAAAG
 491 CTGATGAATTTTTATTTTTTAAAAAACTAGATAACTTTCTTTCTTTTTTTTGGAAAAAAGAAGGATTT
 561 TTTATTGTTTCATCTCTAAACCCTCTTTGGGTAACGTTTACAAAAAAGTGAAGGGGATGGAAATGTGAGAA
 631 CAAAAAGTTCAAGAACATGGTTTAGTTTACTTCTTGCTTTATTGATTTTTGTGCCAACGGTTGCAACCGAA
 701 TCATAAAGCGGAAGCAGCAGCGCAAAACGGAACGATGATGCAATACTTTGAATGGTACGTGCCCAATGAT
 771 GGCCAACACTGGAACCGATTGCCCAATGATGCGGCATACTTAAAAAGCATAGGTGTTTCGGCTGTTTGGAA
 841 CACCTCCTGCTTATAAAGGTACAAGCCAAAATGATGTTGGATATGGCGCTTATGATCTCTATGATTTAGG
 911 AGAATTC AATCAAAAAAGGAACGATTCGAACAAAGTACGGAACAAAAGCAGAATTA AAATCAGCGGTTAGT
 981 ACTCTCAAATCAAACGGCATTCAAGTATATGGAGATGTCGTTATGAATCATAAAGGTGGCGCTGACTATA
 1051 CTGAAAACGTAACA GCAGTTGAAGTAAACCCTTCTAACCGAAATCAAGAACTT CAGATGAATATACCAT
 1121 CCAAGCGTGGACTGGCTTTAACTTTCCAGGTCGCGGGACTACGCACAGTCCATTTAAATGGCAGTGGTAT
 1191 CATTTTGATGGAACGGACTGGGATCAATCACGAAACGCCAGCCGCATTTTTAAATCCGTGGAACAGGAA
 1261 AAGCGTGGGACTGGGAAGTATCAAGTGA AAAACGGCAACTATGATTATTTAATGTATGCTGACCTTGATTT
 1331 TGATCACCCCGATGTTGGGAACGAAATGAAGA ACTGGGGCGTATGGTACGCAAACGAAGTCGGCTTAGAC
 1401 GGCTTTTCGCTTAGACGCAGTGAAACATATTAAGCATTCTACTTAGGGGATTGGGTCAACCATGTTTCGTA
 1471 CGAAAACCGGAAAAGAAAATGTTTACAGTGGCAGAGTACTGGCAAACGATGTGAATGCCATTAATAACTA
 1541 CCTAGCAAAGGTA AACTATAACCATTCTGTCTTTGATGCACCTCTTCACTACAATTTCCATTATGCTTCT
 1611 CAGTCTGGTGGAAATACGATATGAGAAATTTATTA AACGGAAACGGTTGTTGCTGCACACCCAACAAAGG
 1681 CCGTAACGTTAGTTGAAAATCACGATTCACAGCCAGGT CAGTCCCTAGAATCCGTTGTACAGCCTTGGTT
 1751 TAAACCGCTAGCCTATGCGTTTATCCTAACACGAGCAGAAGGTTACCCAAGCATATTTTACGGTGACATG
 1821 TACGGTACAAAAGGAAACAGTTCATATGAGATCCCAGCTTTAAAAACAAAGATAGAGCCTCTATTA AAAAG
 1891 CTCGTAAAGATTACGCATACGGTACGCAGCACAATTATATGGACC ACTGGGACGTAATTGGCTGGACCGG
 1961 AGAAGGAGACAGCACAAAAGAAAATCTGGTCTCGCAACGCTTGTTACAGATGGAGCTGGCGGATCAAAA
 2031 TGGATGTATGTTGGAAAACAAAACGCTGGTGAGTTTGGTACGACATTACAGGTAATCGAACAGATAAGA
 3101 TTACGATTAATACAGATGGATGGGGGAATTTCCAAGTAAACGGTGGATCCGATCTGTTTACGGTCAGCA
 2171 ATAAAAAACAACAAAAATAAGCTCTGCGGTGAAGCATTATCCCGCAGAGCTTTTTAATAGTTAACTCTCAA

Рис. 2. Результаты поиска областей *cre* в гене *amyM3* с помощью программы FIMO. Подчеркнуты предполагаемые промотор и RBS-сайт, в рамке – кодирующая последовательность гена. Черным фоном выделена наиболее вероятная последовательность *cre*, серым – менее вероятные.

ром *СсрА*. Это предположение подтверждалось тем, что в культуре бактерий *B. subtilis* CR2-28, у которых ген *ссрА* был инактивирован, активность α -амилазы продолжала увеличиваться несмотря на присутствие глюкозы в среде культивирования. Через 3 ч культивирования как в среде ПСС с глюкозой, так и без глюкозы в культуре *B. subtilis* CR2-28 регистрировали сопоставимые уровни амилолитической активности (около 23 Е/D₆₀₀). Через 5 и 7 ч после внесения в культуру глюкозы бактерии продолжали активно синтезировать фермент (активность 53.3 ± 3.2 и 74.9 ± 6.7 Е/D₆₀₀ соответственно), в то время как в культуре, в которую глюкозу не добавляли, через 5 и 7 ч культивирования прирост активности снижался (активность 34.6 ± 3.7 и 41.4 ± 6.7 Е/D₆₀₀ соответственно).

Для поиска участков связывания белка *СсрА* в нуклеотидной последовательности гена *amyM3* с помощью базы данных DBTBS был получен спи-

сок 44 участков *cre*, функциональное значение которых в регуляции различных генов и оперонов *B. subtilis* 168 было подтверждено экспериментально [14]. В программе FIMO [15] было осуществлено сканирование нуклеотидной последовательности гена *amyM3* (код доступа в Genbank: JX429073.1) полученной консенсусной последовательностью *cre*. В результате анализа в последовательности гена *amyM3* было обнаружено 14 участков, проявляющих сходство с последовательностью *cre* ($p < 0.001$). Результаты поиска представлены на рис. 2. Наибольшее подобие с консенсусом последовательности *cre* *B. subtilis* обладал участок 5'-TGG TAA CGT TTA CA-3', который локализовался в положении 588–601 проанализированной последовательности гена *amyM3*, между областью – 10 предполагаемого промотора гена и последовательностью Шайна-Дальгарно, как показано на рис. 2. Такое расположение соответствует локализации участков *cre* во многих генах,

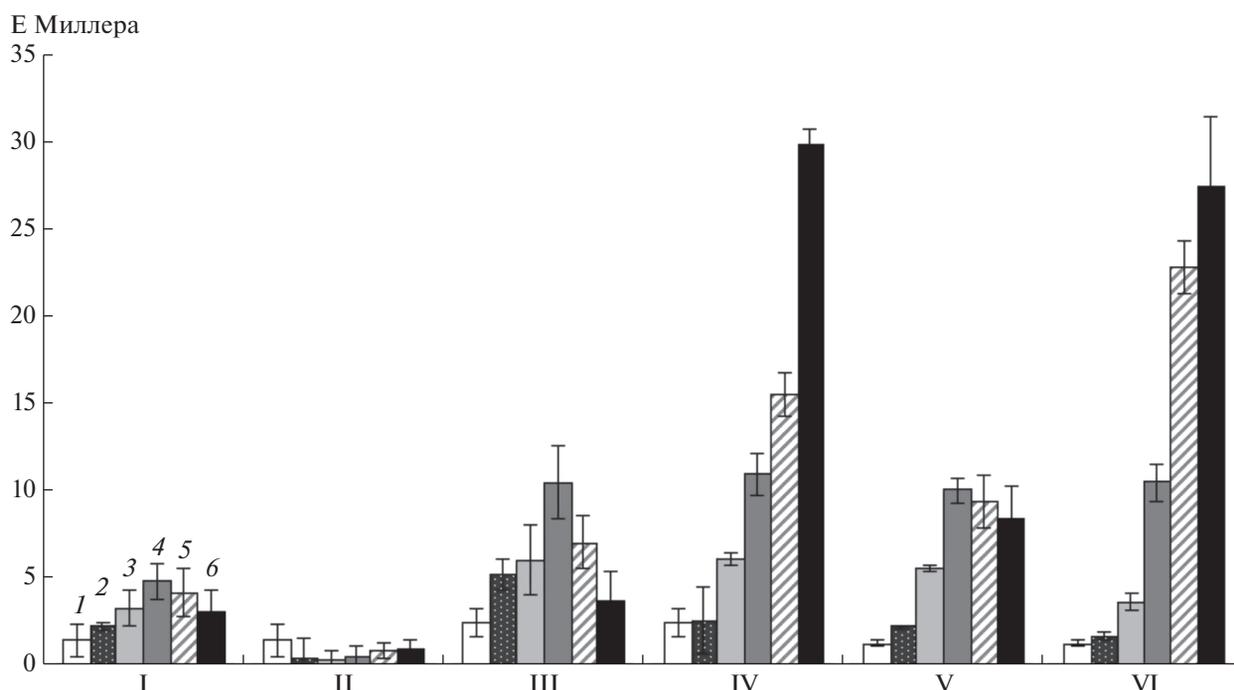


Рис. 3. Активность гена β -галактозидазы (среднее значение Е Миллера $\pm \sigma$), находящегося под контролем различных вариантов промотора гена *amyM3*, в клетках различных штаммов *B. subtilis*: I, II – 168-MZ; III, IV – 168-CZ; V, VI – CR3-MZ. В культуры I, III, V глюкозу не вносили, в культуры II, IV и VI вносили глюкозу до концентрации 1.0% в середине экспоненциальной фазы. Измерения проводили непосредственно после внесения в культуры глюкозы (1) или через 1 (2), 2 (3), 3 (4), 4 (5) и 5 (6) ч после этого.

для которых подтверждена регуляция белком СсрА [3]. Значительное сходство с консенсусом наблюдалось как на прямой, так и на обратной цепи ДНК в положении 588–601, что указывает на выраженную палиндромную структуру этого участка. Менее четким сходством с консенсусной последовательностью *cre* обладали 5 участков, расположенных внутри кодирующей последовательности гена (координаты 682–695, 703–716, 780–793, 1052–1065 и 1286–1299 на рис. 2). Другие выявленные участки не имели ряда важных структурных особенностей, характерных для областей *cre B. subtilis*, например, консервативной пары CG, либо располагались на значительном расстоянии от точки старта транскрипции, поэтому их роль в зависимой от белка СсрА репрессии гена *amyM3* маловероятна.

Чтобы определить, задействован ли обнаруженный участок 5'-TGG TAA CGT TTA CA-3' в регуляции активности гена α -амилазы, осуществляемой СсрА, был проведен его направленный мутагенез, в результате которого вышеуказанная 14-нуклеотидная последовательность была заменена на сайт узнавания эндонуклеазы *SpeI* 5'-ACT AGT-3'. Мутантный вариант гена *amyM3* с удаленным таким образом предполагаемым участком *cre* внедрили в состав хромосомного локуса *amyE* бактерий *B. subtilis*, имеющих как функциональный, так и инактивированный ген *ccpA*. В резуль-

тате были получены штаммы *B. subtilis* 168-22 и CR2-22 соответственно.

Результаты оценки активности α -амилазы в культурах бактерий *B. subtilis* 168-22 и CR2-22 приведены на рис. 1. В культуре *B. subtilis* CR2-22 динамика накопления внеклеточной α -амилазы существенно не отличалась от характерной для штамма *B. subtilis* CR2-28. Продуктивность клеток бактерий *B. subtilis* 168-22 по α -амилазе в присутствии глюкозы была низкой (4.64 ± 0.42 E/D₆₀₀), хотя в первые 2 ч после внесения глюкозы она была значимо больше, чем в культуре штамма *B. subtilis* 168-28, имеющего нативную последовательность гена *amyM3* (2.28 ± 0.51 E/D₆₀₀). Был сделан вывод, что подавление синтеза фермента глюкозой обусловлено фактором СсрА, однако регулятор либо действует через связывание с другим участком гена *amyM3*, либо может оказывать опосредованное влияние через иные факторы.

Чтобы детальнее изучить влияние регулятора СсрА на функционирование гена α -амилазы *AmyM3*, в хромосомы бактерий *B. subtilis* 168 и CR3 вводилась репортерная конструкция, содержащая кодирующий β -галактозидазу ген *lacZ*, выше которого был встроен фрагмент ДНК, содержащий промоторный участок гена *amyM3* либо этот промотор с мутацией предполагаемого участка *cre*. Оценка активности β -галактозидазы в клетках по-

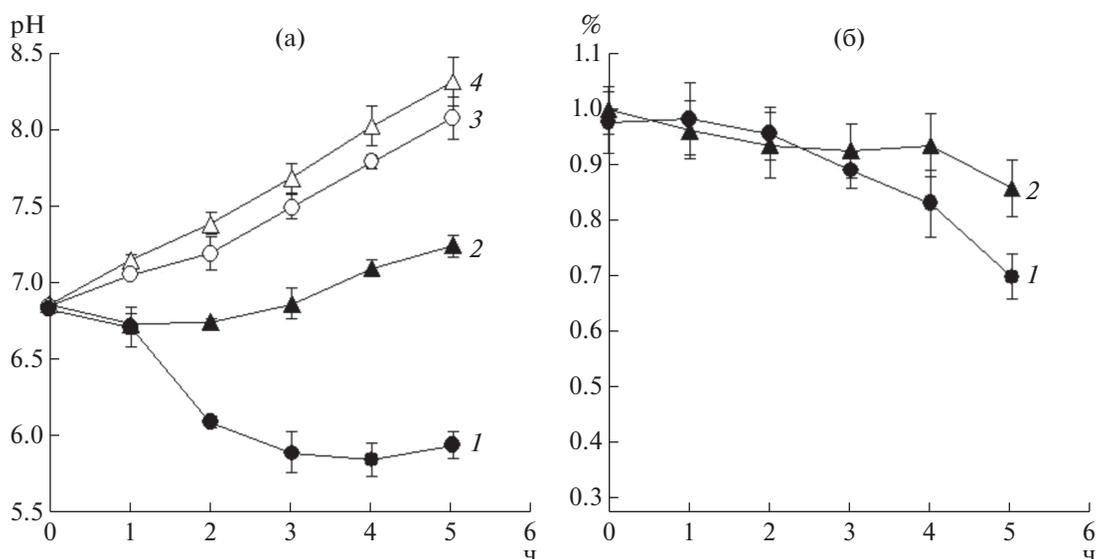


Рис. 4. Значение pH (среднее значение $\pm \sigma$) среды ПСС (а) и остаточная концентрация глюкозы (среднее значение $\pm \sigma$, б) при культивировании бактерий *B. subtilis* 168-28 (1, 3) и CR2-28 (2, 4) в присутствии 1% глюкозы (1, 2) или без ее добавления (3, 4). Измерения проводили каждый час, начиная с момента внесения в культуры глюкозы.

лученных штаммов *B. subtilis* 168-MZ, 168-CZ и CR3-CZ показала, что промотор гена *amyM3* наиболее эффективно инициировал транскрипцию в начале стационарной фазы роста культуры, после чего активность гена постепенно снижалась. Как видно на рис. 3, при внесении в культуру глюкозы наблюдалось практически полное подавление активности нативного промотора, однако промотор с мутацией в предполагаемом участке *cre* обеспечивал повышенный уровень транскрипции гена-репортера при добавлении в среду культивирования глюкозы. Соизмеримо высокая активность гена *lacZ*, находящегося под контролем нативного промотора *amyM3*, обнаруживалась и в клетках штамма, имеющего инактивированный ген *csrA*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что белок CsrA контролирует инициацию транскрипции в промоторе гена *amyM3*, при наличии глюкозы подавляя экспрессию гена путем контакта с участком *cre*, имеющим нуклеотидную последовательность 5'-TGG TAA CGT TTA CA-3'.

Интересен тот факт, что при внесении в культуру глюкозы, несмотря на сохранение высокой активности промотора *amyM3* с делецией участка *cre*, у штамма *B. subtilis* 168-22, содержащего ген с данным промотором, синтез внеклеточной α -амилазы существенно подавляется. Известно, что метаболизм глюкозы клетками *B. subtilis* 168 происходит путем гликолиза с последующим окислительным декарбоксилированием пирувата. Конечный продукт этого процесса, ацетил-КоА, превращается в силу “эффекта избыточного метаболизма (overflow metabolism)” преимущественно в ацетат. Регулятор CsrA выступает активатором соответствующих генов, одновременно блокируя гены

метаболизма ацетил-КоА в цикле трикарбоновых кислот. Уксусная кислота, а также пируват, ацетонин и 2,3-бутандиол выделяются клетками во внешнюю среду в качестве основных побочных продуктов утилизации глюкозы [16, 17]. В работе была проведена оценка изменения pH питательной среды в ходе культивирования бактерий *B. subtilis* 168-28 и CR2-28 в среде ПСС с 1.0% глюкозы. Результаты, представленные на рис. 4, подтверждают известные из литературы факты, что утилизация бактериями глюкозы приводила к интенсивному выделению в среду культивирования кислот, приводя к сдвигу значения pH культуры до 5.8–6.0 через 2 ч после добавления углевода [18]. Закисления среды при культивировании штамма, дефектного по гену *csrA*, практически не наблюдалось, что может объясняться нарушением регуляции экспрессии ряда генов углеводного и азотного обмена, находящихся под контролем CsrA [19]. Как показано на рис. 4, за 5 ч культивирования количество глюкозы в культурах штаммов *B. subtilis* 168-28 и CR2-28 снижается до 0.7 и 0.86% соответственно.

Полученные результаты позволяют предположить, что низкие значения внеклеточной амилазной активности при культивировании бактерий *B. subtilis* 168-22 в среде с глюкозой обусловлены фактором CsrA, однако не прямой репрессией гена α -амилазы, лишенного участка *cre* (транскрипция гена в клетках данного штамма в среде с глюкозой сохранялась на высоком уровне), а опосредовано, через снижение pH среды культивирования продуктами утилизации углевода. Чтобы подтвердить наличие такого влияния, бактерии *B. subtilis* 168-22 и *B. subtilis* CR2-22

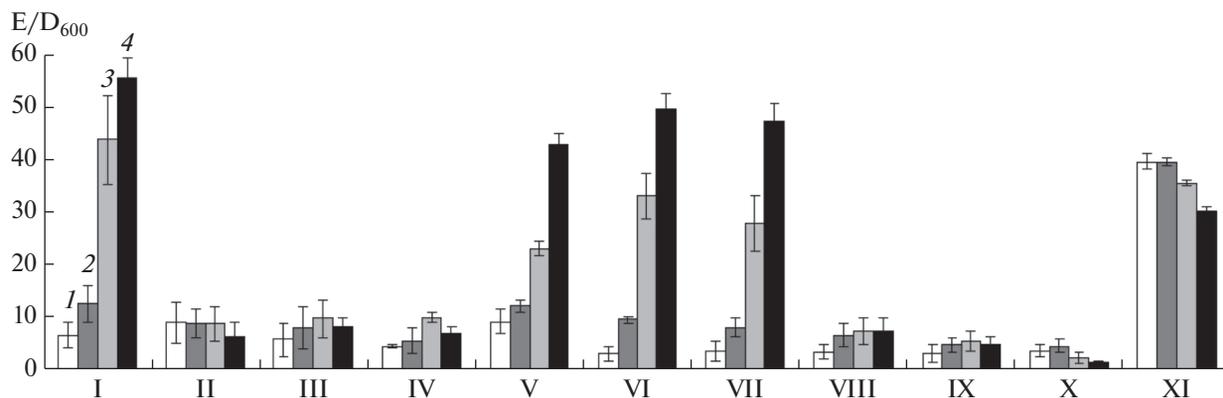


Рис. 5. Продуктивность (среднее значение $E/D_{600} \pm \sigma$) штаммов *B. subtilis* 168-22 (I–V), CR2-22 (VI–X) по α -амилазе в условиях сдвига pH. В культуры II, V, VII и X вносили глюкозу до концентрации 1.0% в середине экспоненциальной фазы. В культуру V также вносили 2 М NH_4OH для поддержания значения pH 7.5. Для поддержания значения pH 5.9 в культуры III и VIII вносили 0.5 М уксусную кислоту, в культуры IV, IX, X – 1 М HCl. XI – культура *B. subtilis* 568 с добавлением 40 Е/мл АмуМЗ, в которую вносили 1 М HCl для поддержания значения pH 5.9. Активность амилаз измерена непосредственно после внесения в культуры глюкозы (1) или через 1 (2), 3 (3) и 5 (4) ч после этого.

культивировали в питательной среде ПСС, периодически внося в нее раствор, содержащий 0.5 М ацетата или 1 М HCl в таких количествах, чтобы обеспечить снижение pH среды культивирования до значений 5.8–6.0, соответствующих наблюдаемому в содержащей глюкозу среде. Для оценки стабильности α -амилазы АмуМЗ в такой среде в культуру бактерий *B. subtilis* 568, не способных синтезировать α -амилазу, фермент вносили до концентрации 40 Е/мл. Представленные на рис. 5 результаты показывают, что подавление синтеза α -амилазы бактериями *B. subtilis* 168-22 происходило как при утилизации глюкозы, в ходе чего происходит снижение pH внеклеточной среды до 5.8–6.0 (рис. 4), так и при внесении в культуру уксусной или соляной кислоты. В культурах штамма *B. subtilis* CR2-22, клетки которого лишены регулятора CspA, необходимого для выделения кислот, образующихся при метаболизме глюкозы, синтез внеклеточной амилазы также мог быть блокирован доведением pH до 5.8–6.0. С другой стороны, смещение pH до значения 7.5, производимое путем внесения 2 М раствора гидроксида аммония, при выращивании *B. subtilis* 168-22 в среде ПСС с глюкозой позволяло восстановить накопление амилотической активности в среде культивирования, что служило доказательством влияния pH среды культивирования на синтез внеклеточной α -амилазы.

Следует отметить, что инактивация внесенного в культуру *B. subtilis* 568 фермента в анализируемых условиях была незначительной, рассчитанное время полуинактивации α -амилазы в такой культуре составляло около 10 ч. Оптимум активности данного фермента ранее был определен в диапазоне значений pH от 6.0 до 7.0.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что катаболизм глюкозы до

кислотных продуктов, контролируемый при участии транскрипционного фактора CspA, и закисление ими культуральной жидкости препятствует синтезу внеклеточной α -амилазы АмуМЗ бактериями *B. subtilis*. Это объясняет, почему бактерии, имеющие ген *amyM3* с удаленным участком *cre*, выделяли лишь незначительные количества α -амилазы в культуре с добавлением глюкозы.

Анализ приведенных наблюдений позволяет предположить, что чувствительность α -амилазы АмуМЗ, синтезируемой клетками *B. subtilis* 168, к кислому pH среды проявлялся на стадии транслокации через мембрану либо пост-транслокационного фолдинга. Известно, что многие гетерологичные α -амилазы, синтезируемые в клетках *B. subtilis* 168, как и ряд других внеклеточных ферментов, секретируясь в развернутом виде, подвергаются внеклеточному фолдингу с участием липопротеина PrsA [20]. Затруднения на этапе принятия секреторируемыми белками нативной третичной структуры, обычно связанные с их сверхпродукцией или отсутствием необходимых для фолдинга факторов, приводят к накоплению несвернутых полипептидов в просвете между мембраной и клеточной стенкой. В клетках *B. subtilis* это инициирует секреторный стресс, сопровождающийся повышенной экспрессией генов мембранных протеаз HtrA и HtrB, которые обеспечивают деградацию дефектных белков [21]. В исследовании Манабэ с соавт. было показано, что одним из факторов, влияющих на внеклеточный фолдинг щелочной α -амилазы АмуК38, является значение внеклеточного pH – смещение pH среды культивирования бактерий с 6.8 до 8.4 приводило к существенному повышению уровня внеклеточной активности α -амилазы и снижению экспрессии маркеров секреторного стресса [22]. Вероятно, фолдинг α -амилазы АмуМЗ, выделяющейся из клеток *B. sub-*

tilis, также нарушается при снижении pH до значений 6.0.

Обнаруженное влияние низких значений pH среды культивирования на способность бактерий *B. subtilis* выделять функциональную α -амилазу является еще одним аспектом действия регулятора CcpA, активирующегося при утилизации клетками легко метаболизируемых углеводов, на продукцию внеклеточной α -амилазы бактериями *B. subtilis*. Данное влияние следует учитывать в процессах ферментации, при использовании богатых углеводами питательных сред для выращивания штаммов-продуцентов внеклеточных белков.

Дальнейшие исследования позволят детальнее понять, что происходит с α -амилазой AmyM3 после секреции и какие генетические изменения клеток *B. subtilis* могут уменьшить негативный эффект внеклеточного pH на синтез этого фермента.

Работа выполнялась в рамках задания государственной программы научных исследований “Биотехнологии” за 2018–2020 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Deutscher J.* // Curr. Opin. Microbiol. 2008. V. 11. № 2. P. 87–93.
2. *Fujita Y.* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009. V. 73. № 2. P. 245–259.
3. *Lorca G.L., Chung Y.J., Barabote R.D., Weyler W., Schilling C.H., Saier Jr. M.H.* // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 22. P. 7826–7839.
4. *Weickert M.J., Chambliss G.H.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 16. P. 6238–6242.
5. *Kachan A.V., Evtushenkov A.N.* // Cent. Eur. J. Biol. 2013. V. 8. № 4. P. 346–356.
6. *Nicholson W.L., Chambliss G.H.* // J. Bacteriol. 1985. V. 161. № 3. P. 875–881.
7. *Chambers S.P., Prior S.E., Barstow D.A., Minton N.P.* // Gene. 1988. V. 68. № 1. P. 139–149.
8. *Маниатус Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Ред. А.А. Баев, К.Г. Скрыбин. М.: Мир, 1984. 480 с.
9. *Vagner V., Dervyn E., Ehrlich S.D.* // Microbiology. 1998. V. 144. № 11. P. 3097–3104.
10. *Spizizen J., Anagnostopoulos C.* // J. Bacteriol. 1961. V. 81. № 5. P. 741–746.
11. *Shatalin K., Neyfakh A.* // FEMS Microbiol Lett. 2005. V. 245. № 2. P. 315–319.
12. *Кулик Е.В., Селезнева Ю.В., Качан А.В., Русь О.Б., Евтушенков А.Н.* // Изв. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. 2020. Т. 65. № 3. С. 319–327.
13. *Ferrari E., Howard S.M., Hoch J.A.* // J. Bacteriol. 1986. V. 166. № 1. P. 173–179.
14. *Sierro N., Makita Y., de Hoon M., Nakai K.* // Nucl. Acids Res. 2008. V. 36. P. D93–D96.
15. *Grant C.E., Bailey T.L., Noble W.S.* // Bioinformatics. 2011. V. 27. № 7. P. 1017–1018.
16. *Speck E.L., Freese E.* // J. Gen. Microbiol. 1973. V. 78. № 2. P. 261–275.
17. *Blencke H.-M., Homuth G., Ludwig H., Mäder U., Hecker M., Stülke J.* // Metab. Eng. 2003. V.5. № 2. P. 133–149.
18. *Turinsky A.J., Moir-Blais T.R., Grundy F.J., Henkin T.M.* // J. Bacteriol. 2000. V. 182. № 19. P. 5611–5614.
19. *Sonenshein A.L.* // Nat. Rev. Microbiol. 2007. V. 5. № 12. P. 917–927.
20. *Vitikainen M., Hyyryläinen H.-L., Kivimäki A., Kontinen V.P., Sarvas M.* // J. Appl. Microbiol. 2005. V. 99. № 2. P. 363–375.
21. *Hyyryläinen H.-L., Bolhuis A., Darmon E., Muukkonen L., Koski P., Vitikainen M., Sarvas M., Prágai Z., Bron S., van Dijl J.M., Kontinen V.P.* // Mol. Microbiol. 2001. V. 41. № 5. P. 1159–1172.
22. *Manabe K., Kageyama Y., Tohata M., Ara K., Ozaki K., Ogasawara N.* // Microb. Cell Fact. 2012. V. 11. <https://doi.org/74-10.1186/1475-2859-11-74>

Acidification of Culture Medium by Products of Glucose Metabolism Inhibit Synthesis of Heterologous Extracellular α -Amylase by *Bacillus subtilis* 168

A. V. Kachan^{a,*} and A. N. Evtushenkov^a

^aBelarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

*e-mail: av.kachan@mail.ru

The synthesis of α -amylase AmyM3 from *B. flexus* 406 in recombinant strain *B. subtilis* 168–28 was significantly repressed during submerged cultivation in nutrient medium supplemented with 1% glucose. Repression of α -amylase synthesis by glucose in *B. subtilis* cells observed at the level of transcription and mediated by catabolite control protein CcpA. After deletion of putative *cre* site in the *amyM3* gene the effect of catabolite repression was eliminated, but the amount of extracellular α -amylase still significantly decreased in the presence of glucose. It was shown that a shift of the cultivation medium pH to 5.8–6.0, caused by glucose overflow metabolites excreted by *B. subtilis*, despite the high level of *amyM3* gene activity, interferes with the synthesis of active extracellular α -amylase, probably affecting post-secretory folding of the enzyme. This observation is a newly demonstrated facet of CcpA-mediated influence of preferentially utilized sugars on extracellular α -amylase production in *Bacillus subtilis*.

Keywords: *Bacillus subtilis*, alpha-amylase, catabolite repression, gene expression regulation, exoenzyme synthesis

УДК 579.67:579.864:577.11

ХАРАКТЕРИСТИКА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛАКТОБАЦИЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЕФИРНЫХ ГРИБКОВ

© 2021 г. А. В. Бегунова¹, О. С. Савинова², К. В. Моисеенко²,
О. А. Глазунова², И. В. Рожкова¹, Т. В. Фёдорова², *

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

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

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Поступила в редакцию 02.02.2021 г.

После доработки 15.02.2021 г.

Принята к публикации 22.02.2021 г.

Кефирный грибок представляет собой естественный симбиотический консорциум бактерий и дрожжей и является уникальным источником новых пробиотических микроорганизмов. В данной работе три новых изолята лактобацилл – *Lactobacillus helveticus* и два штамма *Lactocaseibacillus paracasei* – были выделены из кефирного грибка, происходящего из Северо-Кавказского региона России, и проведена их биохимическая и молекулярно-генетическая идентификация. Для всех штаммов были описаны профили ферментативных активностей, а также проведен скрининг устойчивости к антимикробным препаратам и наличия генетических детерминант антибиотикорезистентности. При ферментации коровьего молока все три штамма показали более низкую кислотообразующую активность по сравнению с кефирной закваской, но сопоставимую с ней протеолитическую, антиоксидантную и гипотензивную активности.

Ключевые слова: кефирный грибок, лактобациллы, ферментативный профиль, протеолитическая активность, антиоксидантная активность, АПФ-ингибирующая активность

DOI: 10.31857/S0555109921040036

За последнюю пару десятилетий произошел существенный сдвиг в понимании взаимосвязи питания и здоровья. Взгляд, который можно охарактеризовать фразой “еда как источник веществ и энергии”, постепенно дополнился новой формулировкой – “еда как лекарство” [1]. Помимо обеспечения организма питательными веществами, необходимыми для нормального протекания метаболических процессов, еда теперь рассматривается как инструмент для улучшения самочувствия и профилактики заболеваний [2]. Сегодня, более чем когда-либо прежде, потребители заинтересованы в контроле над своим здоровьем. Отражением данной тенденции является появление таких новых терминов, как “функциональное питание”, “нутрицевтики”, “пробиотики” и “пребиотики” [3].

Новый взгляд на питание изменил отношение потребителей к ряду давно известных продуктов, а в особенности к ферментированной пище. Если ранее ферментация рассматривалась как способ приготовления пищи, при котором рост и метаболическая активность микроорганизмов используются для сохранения продуктов, то

сейчас ферментированная еда рассматривается как важный источник биологически активных соединений [4]. В случае кисломолочных продуктов, последние тенденции указывают на неуклонно возрастающий интерес к продуктам, подвергающимся естественному сквашиванию при помощи спонтанно сформировавшихся микробных консорциумов [5].

Кефир – традиционный кисломолочный продукт, произведенный путем смешанного (молочнокислого и спиртового) брожения с использованием закваски, приготовленной на кефирных грибках, или “кефирных зернах” (“kefir grains”) [6, 7] без добавления чистых культур молочнокислых микроорганизмов и дрожжей. Кефирный грибок – единственная спонтанно сформировавшаяся естественная симбиотическая закваска, применяемая в промышленном масштабе. Кефирные грибки содержат различные бактерии и дрожжи, заключенные в матрицу белка и полисахаридов [8]. Исследования ряда авторов показали, что в качестве доминирующих микроорганизмов в составе кефирных грибков определяются лактобациллы 70–95%, лактококки – 5–8%, дрожжи – 0.5–3% и

уксуснокислые бактерии — около 0.05% [7]. Лактобациллы представлены такими видами как *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* и др.; лактококки — преимущественно *Lactococcus lactis*. Среди дрожжей идентифицированы такие виды как *Kazachstania exigua*, *Dekkera bruxellensis* и *Kluyveromyces marxianus*. Многовидовая микрофлора кефирного грибка существенно влияет на качество (вкус и консистенцию) и функциональные свойства кефира. Вместе с тем, видовой состав кефирных грибков в большой степени зависит от места их происхождения и различается в разных географических регионах [8]. Данные различия могут быть связаны как с разными источниками выделения кефирных грибков, так и с разными технологиями, используемыми во время их культивирования и обработки [9].

Изучение микробного состава и функциональных свойств кефира является одной из актуальных тем для исследований в последние десятилетия [10]. Регулярное потребление кефира улучшает пищеварение, оказывает антибактериальный, гипохолестеринемический, антигипертензивный, противовоспалительный эффекты на организм, а также способствует снижению глюкозы в плазме крови [7]. Подобные оздоравливающие эффекты кефира, как правило, связывают с наличием лактобацилл в составе кефирных грибков.

Цель работы — выделение отдельных штаммов лактобацилл из кефирного грибка и исследование их функционального потенциала, что позволит в дальнейшем разрабатывать с их использованием ассоциации заквасочных культур для производства кисломолочных продуктов с определенным направлением оздоравливающим действием.

МЕТОДИКА

Культуры. В работе использовались кефирные грибки из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ВНИМИ), полученные на Северных склонах кавказского хребта (Россия). Для культивирования использовали пастеризованное обезжиренное молоко.

Реактивы. В работе использовались реактивы производства фирмы “Sigma-Aldrich” (США), остальные реактивы отечественного производства имели квалификацию “ос. ч.” или “х. ч.”. Все буферы, использованные в работе, были профильтрованы через нитроцеллюлозные мембраны фирмы “Millipore” (Германия) с диаметром пор 0.45 мкм.

Выделение чистых культур лактобацилл. Перед проведением исследований кефирные грибки культивировали в пастеризованном обезжиренном коровьем молоке для получения кефирной закваски в

соответствии с “Технологической инструкцией по приготовлению и применению заквасок для кисломолочных продуктов на предприятиях молочной промышленности” [11]. После чего кефирные грибки отделяли от кефирной закваски с использованием профлампированного сита, отбирали 10 г кефирного грибка и ресуспендировали в 90 мл стерильного раствора хлористого натрия, далее гомогенизировали с использованием лабораторного блендера (“Bosh”, Германия). Из полученной суспензии готовили ряд десятикратных разведений в стерильном растворе хлористого натрия и проводили посев в MRS-бульон с добавлением 10% этанола. Посевы культивировали при температуре $30 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 3–5 сут для обогащения среды лактобациллами. Для выделения отдельных штаммов проводили посев обогащенной культуры лактобацилл на агаризованную среду MRS (pH = 5.4) и инкубировали в анаэробных условиях с использованием газогенерирующей системы GasPak EZ Anaerobe Container System (“BD Biosciences”, США) при температуре $30 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 3–5 сут. Среди морфологически идентичных колоний (по окраске, форме, текстуре) для выделения в чистую культуру выбирали одну и пересевали на питательную среду MRS-бульон (pH 5.4), после чего инкубировали при температуре $30 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч для накопления клеток.

Идентификация изолятов лактобацилл. Биохимическую идентификацию выделенных лактобацилл проводили с использованием тест-систем API 50CH (“BioMerieux”, Франция). Для этого суспензию чистой культуры микроорганизма, приготовленную по стандарту мутности 2 Mac Farland на основе жидкой среды API 50 CHL, инокулировали в лунки стрипа API 50CH сразу после приготовления. Стрипы в специальных закрытых контейнерах инкубировали в термостате при 37°C . Окончательный учёт результатов проводили через 48 ч. Видовую принадлежность микроорганизма определяли с помощью веб-сервера “APIWEB” (<https://apiweb.biomerieux.com>).

Для подтверждения фенотипической и биохимической идентификации полученных изолятов было проведено их генотипирование. Для генотипирования изолятов лактобацилл 16-часовая культура каждого штамма высевалась на жидкую MRS среду и инкубировалась анаэробно в течение 48 ч при 37°C . Геномную ДНК выделяли с использованием коммерческого набора DNeasy Mini Kit (“Qiagen”, США). Выделенную ДНК хранили при -20°C и в дальнейшем использовали во всех ПЦР в данном исследовании.

ПЦР амплификацию гена 16S рРНК проводили согласно [12] с использованием набора Taq ДНК-полимераза (“Евроген”, Россия) и праймеров bak11w (5'-AGT TTG ATC MTG GCT CAG-3')

и bak4 (5'-AGG AGG TGA TCC ARC CGC A-3'). Для проверки успешности ПЦР-амплификации проводили электрофорез в 2%-ном агарозном геле. Успешно амплифицированные ПЦР продукты выделяли из агарозного геля с использованием коммерческого набора QIAquick Gel Extraction Kit ("Qiagen", США). Секвенирование по Сэнгеру очищенных ПЦР продуктов осуществлялось с применением тех же праймеров, что и для проведения ПЦР.

Для описания морфологии колоний и клеток микроорганизмов использовали иммерсионную микроскопию (микроскоп BX50, "Olympus", Япония).

Ферментативный профиль лактобацилл. Оценку ферментативной активности выделенных из кефирного грибка штаммов лактобацилл проводили с использованием наборов API ZYM ("Bio-Merieux", Франция). Система API ZYM позволяет проводить полуколичественное измерение ферментативных активностей. Эта система представляет собой стрип с 20 лунками, 19 из которых содержат дегидратированный хромогенный субстрат для выявления активности различных ферментов и лунку без субстрата в качестве отрицательного контроля. В лунки добавляли буфер и суспензию клеток исследуемых бактерий, после чего тест-полоска инкубировалась 48 ч при 37°C. Далее проводили визуальную оценку изменения цвета субстрата в лунке по шкале 0–5 по сравнению с контролем.

Определение антибиотикорезистентности. Антибиотическая резистентность штаммов лактобацилл анализировалась диско-диффузным методом с помощью набора дисков, пропитанных различными видами антибиотиков. Диски накладывались на плотную питательную среду, засеянную культурой исследуемого штамма, после чего осуществляли культивирование в течение суток при температуре 37°C и последующее измерение диаметра зоны задержки роста вокруг дисков.

Для проверки наличия генов антибиотикорезистентности проводили ПЦР-амплификацию с выделенной геномной ДНК, используя набор Taq ДНК-полимераза ("Евроген", Россия), согласно инструкции производителя. Последовательности праймеров и основные параметры амплификации приведены в табл. 1. Для проверки успешности ПЦР-амплификации, проводили электрофорез в 2%-ном агарозном геле.

Функциональные свойства штаммов лактобацилл и кефирной закваски. Для изучения функциональных свойств кефирной закваски и штаммов лактобацилл в стерильное обезжиренное молоко вносили 1% инокулята соответствующих микроорганизмов и проводили культивирование в термостате при температуре (24 ± 2)°C (кефирная закваска), 30°C (*L. paracasei*) и 37°C (*L. helveticus*) в

течение 72 ч. В ходе ферментации через 6, 16, 24, 48 и 72 ч стерильно отбирали аликвоты молока, после чего проводили измерение количества жизнеспособных клеток (КОЕ) и pH с использованием pH-метра Seven Easy ("Mettler Toledo", США). В белково-пептидных фракциях ферментированного молока определяли протеолитическую, антиоксидантную и АПФ-ингибирующую (гипотензивную) активности.

Определение количества жизнеспособных клеток. В кефирной закваске определяли общее количество жизнеспособных молочнокислых микроорганизмов методом наиболее вероятного числа молочнокислых бактерий (НВЧ) при помощи посева в пробирки со стерильным обезжиренным молоком и инкубирования при 30°C в течение 72 ч. Количество клеток определяли по ГОСТ 33951–2016 [13].

Количество клеток лактобацилл определяли методом посева на питательную среду MRS-агар (ООО "НПЦ Биокомпас-С", Россия). Культивирование проводили в анаэробных условиях при 30 ± 1°C для *L. paracasei* и 37 ± 1°C для *L. helveticus* с использованием анаэростана ("Oxiod", США) и газ-пакетов GasPak ("BD Biosciences", США), подсчитывались все выросшие на среде в течение 72 ч колонии.

Получение белково-пептидных фракций. Аликвоту (15 мл) образца ферментированного молока центрифугировали при температуре 4°C в течение 30 мин при 10000 g на центрифуге 5702R ("Eppendorf", Германия) и фильтровали надосадочную жидкость вместе с жировым слоем через складчатый бумажный фильтр (MN 640W, "Macherey-Nagel", Германия). pH фильтрата доводили до 4.6 добавлением 0.1 M раствора гидроксида натрия, после чего фильтрат центрифугировали при 4°C в течение 30 мин при 10 000 g на центрифуге 5702R ("Eppendorf", Германия) и фильтровали через шприцевые фильтры с гидрофильной мембраной с диаметром пор 0.45 мкм ("Sartorius", Германия). Полученные белково-пептидные фракции замораживали и хранили при температуре –73°C до проведения анализа.

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

Протеолитическая активность. Протеолитическую активность определяли путем измерения количества высвобождаемых аминокрупп в исследуемых образцах спектрофотометрическим методом с использованием 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислоты (TNBS) [14]. Оптическую плотность растворов определяли на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy2 ("BioTek",

Таблица 1. Праймеры для проверки наличия генов антибиотикорезистентности и параметры ПЦР-амплификации

Ген	Праймеры	Последовательность	ПЦР	Ссылка
Аминогликозиды:				
<i>aac(6)-aph(2'')</i>	aac_F	5'-CCAAGAGCAATAAGGGCATA-3'	$T_m = 60^\circ\text{C}$ ≈ 220 bp	[36]
	aac_R	5'-CACTATCATAACCACTACCG-3'		
<i>aad(E)</i>	aad(E)_F	5'-GCAGAACAGGATGAACGTATTTCG-3'	$T_m = 55^\circ\text{C}$ ≈ 369 bp	[37]
	aad(E)_R	5'-ATCAGTCGGAACATGTCCC-3'		
Тетрациклины:				
<i>RPP*</i>	DI	5'-GAYACNCCNGGNCAVRTNGAYTT-3'	$T_m = 50^\circ\text{C}$ ≈ 1083 bp	[38]
	DII	5'-GCCCARWANGGRTTNGGNGGNACYTC-3'		
	Tet-1	5'-GCTCACGTTGACGCAGGAA-3'	$T_m = 50^\circ\text{C}$ ≈ 1300 bp	[39]
	Tet-2	5'-AGGATTTGGCGGGACTTCTA-3'		
<i>tet(K)</i>	tet(K)_F	5'-TTATGGTGGTTGTAGCTAGAAA-3'	$T_m = 45^\circ\text{C}$ ≈ 348 bp	[40]
	tet(K)_R	5'-AAAGGGTTAGAACTCTTGA-3'		
<i>tet(L)</i>	tet(L)_F	5'-GTMGTTGCGCGCTATATTCC-3'	$T_m = 45^\circ\text{C}$ ≈ 696 bp	
	tet(L)_R	5'-GTGAAMGRWAGCCACCTAA-3'		
Амфениколы:				
<i>cat</i>	cat_F	5'-ATGACTTTTAATATTAATRAWTT-3'	$T_m = 49^\circ\text{C}$ ≈ 648 bp	[41]
	cat_R	5'-TCATYTACMYTATSAATTATAT-3'		
MLS:				
<i>erm(A)</i>	erm(A)_F	5'-TCTAAAAGCATGTAAAAGAA-3'	$T_m = 48^\circ\text{C}$ ≈ 645 bp	[42]
	erm(A)_R	5'-CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT-3'		
<i>erm(B)</i>	erm(B)_F	5'-GAAAAGGTACTCAACCAAATA-3'	$T_m = 50^\circ\text{C}$ ≈ 639 bp	
	erm(B)_R	5'-AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC-3'		
<i>erm(C)</i>	erm(C)_F	5'-TCAAAACATAATATAGATAAA-3'	$T_m = 43^\circ\text{C}$ ≈ 642 bp	
	erm(C)_R	5'-GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT-3'		
<i>erm(F)</i>	erm(F)_F	5'-CGGGTCAGCACTTTACTATTG-3'	$T_m = 50^\circ\text{C}$ ≈ 466 bp	[43]
	erm(F)_R	5'-GGACCTACCTCATAGACAAG-3'		
<i>erm(T)</i>	erm(T)_F	5'-CCGCCATTGAAATAGATCCT-3'	$T_m = 55^\circ\text{C}$ ≈ 478 bp	[44]
	erm(T)_R	5'-GCTTGATAAAATTGGTTTTTGGGA-3'		
<i>mef(A)</i>	mef(A)_F	5'-ACCGATTCTATCAGCAAAG-3'	$T_m = 43^\circ\text{C}$ ≈ 940 bp	[45]
	mef(A)_R	5'-GGACCTGCCATTGGTGTG-3'		

* *RPP* – гены, кодирующие белки-защитники рибосомы (включая *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(S)*, *tet(T)*, *tet(W)*, *tet(32)* и *tet(36)*).

США) при длине волны 340 нм. В качестве стандарта для определения протеолитической активности использовали L-лейцин (“Sigma-Aldrich”, США). Результаты измерений выражали в мМ эквивалентов лейцина.

Антиоксидантная активность. Антиоксидантную активность *in vitro* в образцах определяли флуоресцентным методом **ORAC** (oxygen radical absorbance capacity) с помощью микропланшет-

ного фотометра-флуориметра BioTek Synergy 2 (“BioTek”, США) с генерацией пероксильного радикала в реакционной среде [15].

АПФ-ингибирующая (гипотензивная) активность. Гипотензивную активность *in vitro* в образцах определяли по их способности ингибировать ангиотензин-1-превращающий фермент (АПФ) – ключевое звено ренин-ангиотензиновой системы, участвующей в регуляции артериального дав-

ления – как описано в работе [15]. Измерения проводили с помощью микропланшетного фотометра-флуориметра BioTek Synergy 2 (“BioTek”).

Все эксперименты были выполнены в 3 биологических повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение, биохимическая и молекулярно-генетическая идентификация штаммов. По результатам последних исследований перспективными источниками новых эффективных пробиотических штаммов могут быть кисломолочные продукты, получаемые путем естественного сквашивания [16]. В этом отношении внимания заслуживают естественно сформированные популяции микроорганизмов, входящие в состав кефирных грибков [8, 17].

Для выделения чистых культур микроорганизмов, кефирные зерна отделяли от закваски, гомогенизировали и вносили в жидкую накопительную среду с добавлением спирта, способствующую преимущественному росту бактерий семейства *Lactobacillaceae* (поскольку лактобациллы более спиртоустойчивы, по сравнению с лактококками). При дальнейшем высеве накопительной культуры на агаризованную среду наблюдали поверхностные колонии округлой формы и вытянутые глубинные. При микроскопировании изолятов в первые дни после выделения наблюдали многочисленные длинные цепочки палочек, напоминающие сплетение стромы кефирного грибка. Через несколько пересевов цепочки палочек распадались и наблюдались лишь отдельные короткие и длинные палочки. В результате из кефирной закваски в чистую культуру были выделены три штамма лактобацилл.

Результаты биохимической идентификации с использованием системы API 50CH не дали однозначной идентификации в случае изолята № 1 и выделенный микроорганизм был предварительно отнесен к *Lactobacillus acidophilus* (табл. 2). Изоляты № 2 и № 3 были отнесены к *Lactobacillus curvatus* (99.9% идентичности) и *Lactobacillus plantarum* (98.7% идентичности) соответственно (табл. 2). Как было отмечено ранее в работе Королевой [18], при выделении отдельных молочнокислых бактерий из кефирного грибка, возникали трудности, связанные с тем, что чистые культуры микроорганизмов, либо не росли в молоке, либо утрачивали свою биохимическую активность. В связи с этим их биохимическая идентификация могла быть затруднена, и для однозначного определения родовой и видовой принадлежности требовалось использование молекулярно-генетических методов.

На рис. 1 приведено филогенетическое дерево, построенное на основе как полученных в данной работе последовательностей 16S рРНК выделенных

лактобацилл, так и последовательностей 16S рРНК из штаммов микроорганизмов, ранее использованных в работе [19] в качестве типовых для своего вида. Расположение выделенных штаммов на дереве позволило однозначно определить их родовую и видовую принадлежность: изолят № 1 был идентифицирован как *Lactobacillus helveticus*, а изоляты № 2 и № 3 – как *Lactobacillus paracasei* (в соответствии с новой классификацией *Lacticaseibacillus paracasei*). Полученные последовательности 16S рРНК были депонированы в базу данных GenBank, а штаммам присвоены коллекционные номера: *L. helveticus* KF3 – MW558120 (изолят № 1); *L. paracasei* KF1 – MW558119 (изолят № 2); *L. paracasei* АВК – MN994625 (изолят № 3).

Интересно отметить, что штамм *L. helveticus* KF3 из кефирного грибка значительно отличался по биохимическому профилю от штамма *L. helveticus* NK1, выделенного из ЖКТ человека [20]. В отличие от последнего, он был не способен сбраживать D-фруктозу, D-целлобиозу, D-мальтозу, D-сахарозу и N-ацетилглюкозамин, однако обладал способностью утилизировать гентиобиозу, гликоген и эскулин с добавлением цитрата железа (табл. 2). Что касается двух штаммов *L. paracasei*, то оба изолята были способны ферментировать рибозу, но не глицерин и ксилозу, что отличает данный вид от других родственных видов лактобацилл. Кроме того, два разных изолята *L. paracasei* отличались друг от друга по способности утилизировать арбутин и эскулин с добавлением цитрата железа, а также способностью ферментировать D-мелибиозу, D-тагатазу и гентиобиозу.

Ферментативная активность штаммов лактобацилл. Актуальной задачей является исследование ферментативного профиля пробиотических штаммов бактерий, в том числе, активности протеолитических и гидролитических ферментов, а также ферментов антиоксидантной защиты. Качественные и количественные характеристики ферментативной активности молочнокислых бактерий имеют большое значение при выборе микроорганизмов в качестве заквасок и пробиотических препаратов. В результате действия ферментов, вырабатываемых населяющими кишечник микроорганизмами, образуются различные соединения, которые оказывают влияние на эпителиальный обмен, обеспечивают конъюгацию желчных кислот, принимают участие в метаболизме билирубина и восстановлении холестерина до копростерина, повышают осмотическое давление в просвете кишки при одновременном понижении рН и тем самым стимулируют перистальтику кишечника и др. [21]. Большое значение имеют также гликозил-гидролазы, которые участвуют в метаболизме многих биологически активных соединений растительного происхождения [22]. Некоторые виды микроорганизмов, используемые в качестве пробиотиков и йогуртных заква-

Таблица 2. Биохимические свойства изолятов лактобацилл: *Lactobacillus helveticus* KF3 – (изолят № 1); *Lacticaseibacillus paracasei* KF1 – (изолят № 2); *Lacticaseibacillus paracasei* АВК – (изолят № 3)

Соединение	Биохимическая реакция, № изолята			Соединение	Биохимическая реакция, № изолята		
	№ 1	№ 2	№ 3		№ 1	№ 2	№ 3
Глицерин	–	–	–	Салицин	–	+	+
Эритрол	–	–	–	D-целлобиоза	–	+	+
D-арабиноза	–	–	–	D-мальтоза	–	+	+
L-арабиноза	–	–	–	D-лактоза	+	+	+
D-рибоза	–	+	+	D-мелибиоза	–	–	+
D-ксилоза	–	–	–	D-сахароза	–	–	–
L-ксилоза	–	–	–	D-трегалоза	–	+	+
D-адонитол	–	–	–	Инулин	–	–	–
Метил-βD-ксилапиранозид	–	–	–	D-меллицитоза	–	+	+
D-галактоза	–	+	+	D-раффиноза	–	–	–
D-глюкоза	+	+	+	Крахмал	–	–	–
D-фруктоза	–	+	+	Гликоген	+	–	–
D-манноза	+	+	+	Ксилит	–	–	–
L-сорбоза	–	–	–	Гентиобиоза	+	–	+
L-рамноза	–	–	–	D-тураноза	–	+	+
Дульцитол	–	–	–	D-ликсоза	–	–	–
Инозит	–	–	–	D-тагатоза	–	+	–
D-маннит	–	+	+	D-фукоза	–	–	–
D-сорбит	–	–	–	L-фукоза	–	–	–
Метил-αD-маннопиранозид	–	–	–	D-арабит	–	–	–
Метил-αD-глюкопиранозид	–	–	–	L-арабит	–	–	–
N-ацетилглюкозамин	–	+	+	Глюконат калия	–	–	–
Амигдалин	–	–	–	2-кетоглюконат калия	–	–	–
Арбутин	–	–	+	5-кетоглюконат калия	–	–	–
Эскулин, цитрат железа	+	–	+				

сок, являются продуцентами гликозил-гидролаз, отсутствующих или недостаточно активных у человека [23]. При употреблении людьми кисломолочных продуктов, содержащих данные микроорганизмы, в их кишечнике появляется активность α-галактозидазы и увеличивается активность β-галактозидазы (лактазы), недостаточность которой приводит к непереносимости лактозы.

Оценка ферментативной активности штаммов лактобацилл проводилась полуколичественным способом с использованием наборов API ZYM (рис. 2). Было показано, что штаммы *L. paracasei* в целом обладали выраженной и разнообразной

гликозилгидролазной активностью, в то время как у штамма *L. helveticus* KF3 были выявлены активности всего трёх гликозил-гидролаз. У всех штаммов лактобацилл была обнаружена умеренная α-галактозидазная (0.5–1 у. ед.) и высокая β-галактозидазная активность (4–5 у. ед.). У штаммов *L. paracasei* наблюдали достаточно высокую активность α-глюкозидазы (3–4 у. ед.), но при этом невысокую активность β-глюкозидазы (≤0.5 у. ед.) и α-фукозидазы (~0.5 у. ед.), а штамм *L. helveticus* KF3 не проявлял этих ферментативных активностей. Активности β-глюкуронидазы, α-маннозидазы и α-фукозидазы отсутствовали у

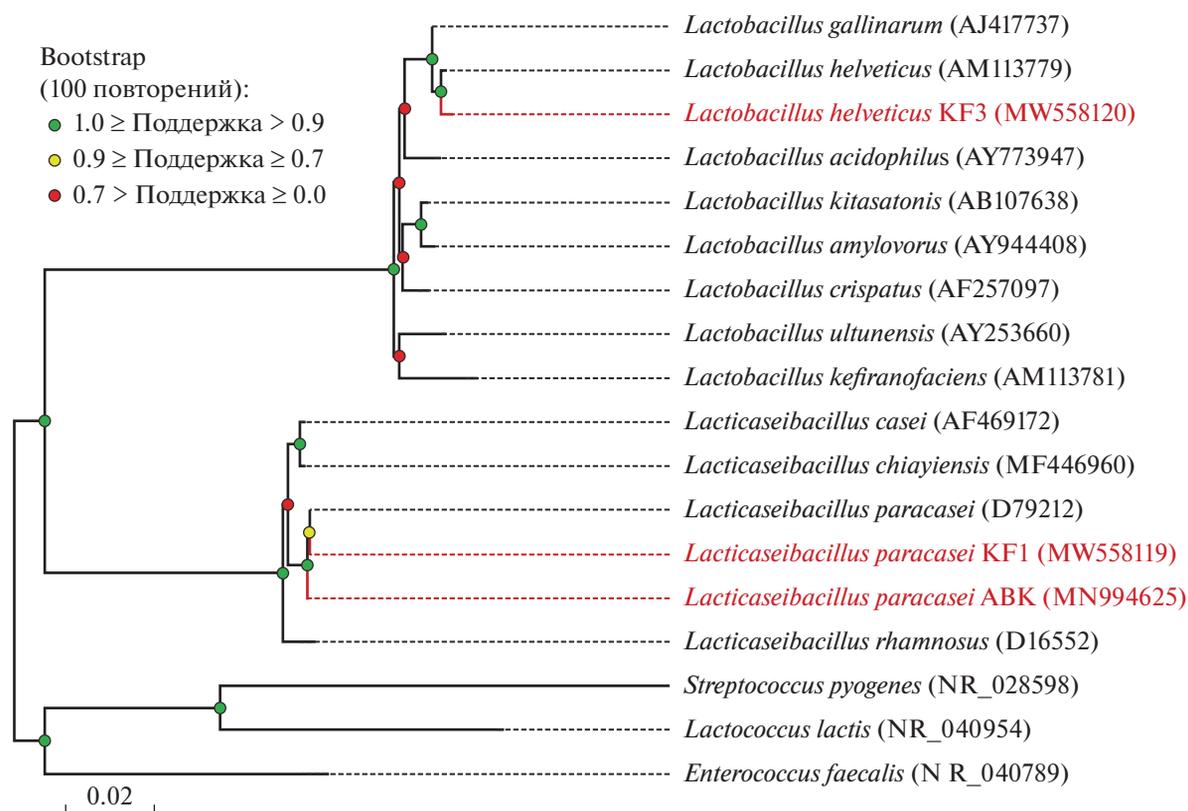


Рис. 1. Филогенетическое дерево, включающее типовые штаммы для различных видов лактобацилл и штаммы, выделенные в данной работе (отмечены красным). Эволюционное расстояние, соответствующее 1 замене нуклеотида на каждые 100, показано масштаб. Статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью “bootstrap”-анализа, показана цветными кружками.

всех тестируемых штаммов. Штаммы *L. paracasei* показали также высокую аминокатазную активность (лейцин- и валин аминокатазы, 3–5 у. ед.) (рис. 2), при этом активностей протеиназ (трипсин и α -химотрипсин) обнаружено не было. Штамм *L. helveticus* демонстрировал слабые аминокатазную и протеазную активности, но показал достаточно высокие активности кислой фосфатазы и фосфогидролазы в диапазоне 1.5–3.5 у. ед. У обоих штаммов *L. paracasei* была выявлена умеренная активность эстеразы (С4) и эстераз-липазы (С8) (средняя активность в диапазоне 1–2.5 у. ед.), у *L. helveticus* активность данных ферментов не обнаружена. У всех трех штаммов отсутствовала липазная активность (С14).

Антибиотикорезистентность штаммов лактобацилл. В работе была определена чувствительность выделенных из кефирного грибка штаммов лактобацилл к 15 антибактериальным препаратам, наиболее часто используемым в клинической практике для лечения различных кишечных и легочных инфекций, а также заболеваний мочевыводящих путей. Выбранные антибиотики относились к восьми различным структурным семействам и функционально подразделялись на ингибиторы биосинтеза клеточной стенки, белка и ДНК (рис. 3).

Как видно из рис. 3 резистентность к наибольшему числу антибиотиков наблюдали для штамма *L. helveticus* KF3. Этот штамм был устойчив практически ко всем антибиотикам, нарушающим процесс синтеза клеточной стенки, за исключением оксациллина. Из антибиотиков, ингибирующих синтез белка, *L. helveticus* KF3 был устойчив ко всем антибиотикам, связывающимся в пептидилтрансферазном центре 50S рибосомальной субъединицы, и лишь к одному, тетрациклину, связывающемуся в А-сайте 30S субъединицы рибосомы. Также данный штамм был устойчив ко всем антибиотикам, блокирующим синтез ДНК. Крайне интересным оказался факт значительно различающейся устойчивости к антибиотикам штаммов *L. paracasei* KF1 и *L. paracasei* АВК. Эти два микроорганизма показывали совпадающие статусы антибиотикорезистентности только для неомицина, к которому оба были устойчивы, и для ампициллина, который достоверно подавлял оба штамма. Для таких антибиотиков как амоксициллин, доксициклин, тетрациклин и хлорамфеникол результаты были диаметрально противоположны: если штамм *L. paracasei* KF1 проявлял к ним резистентность, то штамм *L. paracasei* АВК ими достоверно подавлялся.

Фермент	Активность, у. ед.					
	<i>L. helveticus</i> KF3	<i>L. paracasei</i> KF1	<i>L. paracasei</i> ABK			
1 Контроль	0	0	0			
2 Щелочная фосфатаза	≤0.5	0.5	≤0.5			
3 Эстераза (C4)	0.5	1.5	2.0			
4 Эстераз-липаза (C8)	≤0.5	1.0	1.0			
5 Липаза (C14)	0	0	0			
6 Лейцин ариламидаза	1.5	3.0	4.0			
7 Валин ариламидаза	≤0.5	4.0	4.5			
8 Цистин ариламидаза	0	≤0.5	≤0.5			
9 Трипсин	0	0	0			
10 α-Химотрипсин	0	0	0			
11 Кислая фосфатаза	3.0	1.5	1.0			
12 Нафтол-AS-BI-фосфогидролаза	3.0	≤0.5	≤0.5			
13 α-галактозидаза	1.0	≤0.5	0.5			
14 β-галактозидаза	≥0.5	4.0	5.0			
15 β-глюкоронидаза	0	0	0			
16 α-глюкозидаза	0	3.0	4.0			
17 β-глюкозидаза	0	≤0.5	≤0.5			
18 N-ацетил-β-глюкозаминидаза	0	0	0			
19 α-манозидаза	0	0	0			
20 α-фукозидаза	0	0.5	≤0.5			

Рис. 2. Ферментативный профиль (API ZYM) штаммов лактобацилл.

Чтобы определить, имеет ли наблюдаемая антибиотикорезистентность штаммов лактобацилл переносимый характер, все изученные штаммы прошли ПЦР-проверку на наличие генов антибиотикорезистентности (AR-генов). Проверяемые гены (табл. 1) включали те, возможность горизонтального переноса которых была ранее показана у лактобацилл [24–28].

ПЦР-анализ показал отсутствие всех проверяемых генов у трех выделенных штаммов лактобацилл. Таким образом, с высокой вероятностью можно заключить, что наблюдаемая в тестах *in vitro*, антибиотикорезистентность штаммов носит не передаваемый характер. Возможно, различный уровень резистентности исследованных штаммов лактобацилл носит “врожденный” характер и объ-

ясняется индивидуальными мутациями и уровнями экспрессии определенных генов.

Сравнительная характеристика параметров ферментации коровьего молока кефирной закваской и выделенными чистыми культурами лактобацилл. Основные параметры ферментации и динамика изменения протеолитической, антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностей ферментированного коровьего молока для кефирной закваски и выделенных из кефирного грибка штаммов лактобацилл представлены на рис. 4. Из сопоставления графиков по изменению количества жизнеспособных клеток лактобацилл и pH можно заключить, что штамм *L. helveticus* KF3 – наименее кислотоустойчив по сравнению с обоими штаммами *L. paracasei*, его рост замедлялся уже

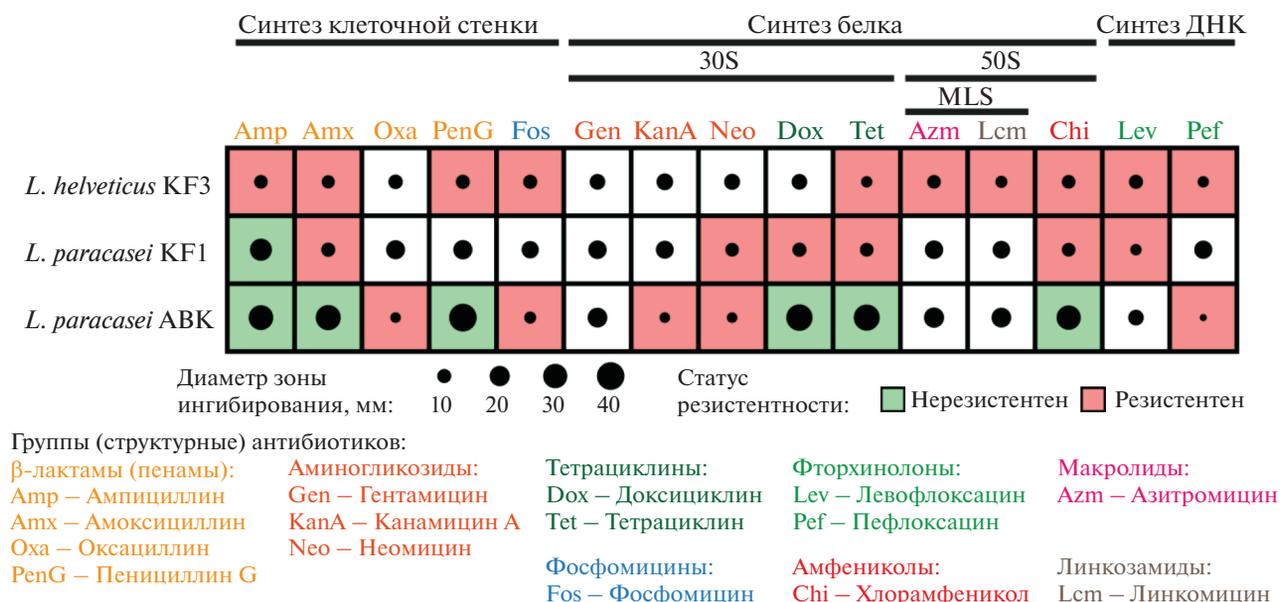


Рис. 3. Профиль антибиотикорезистентности выделенных в данной работе штаммов лактобацилл.

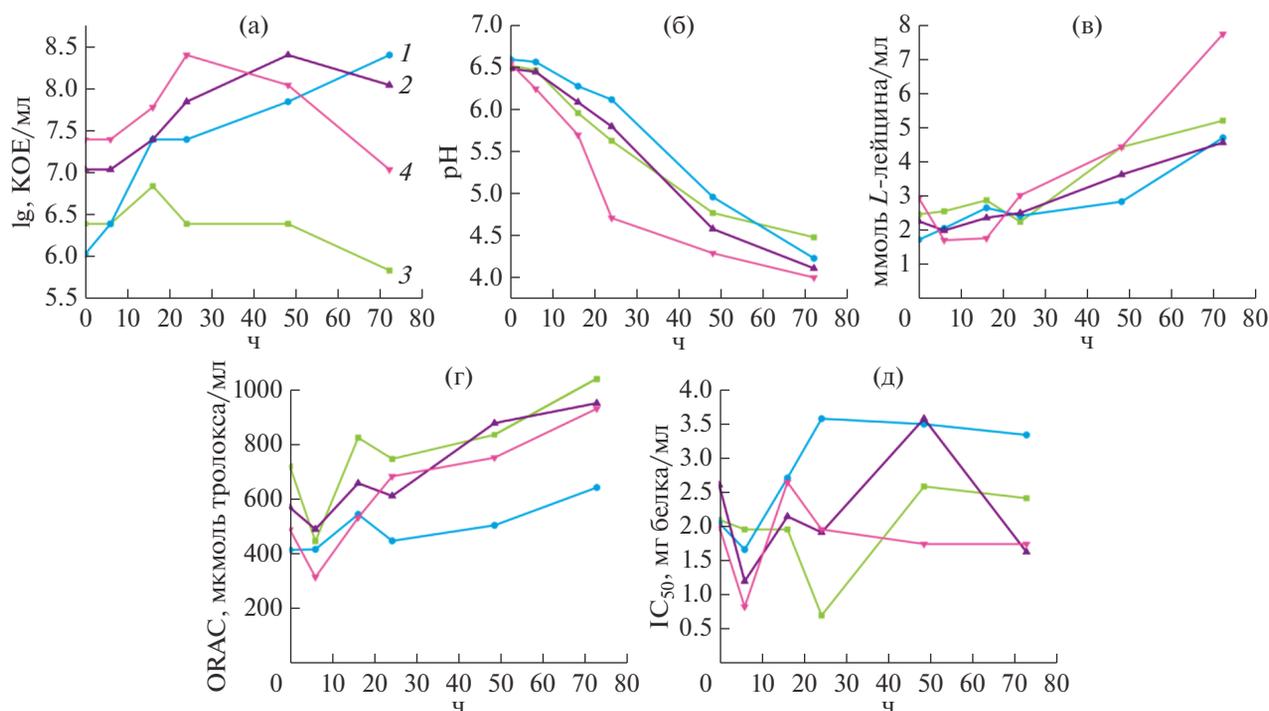


Рис. 4. Изменение количества жизнеспособных клеток лактобацилл (а), активной кислотности (б), протеолитической (в), антиоксидантной (г) и гипотензивной (д) активностей при ферментации обезжиренного коровьего молока при помощи трех штаммов лактобацилл и кефирной закваски. 1 – *L. paracasei* KF1, 2 – *L. paracasei* АВК, 3 – *L. helveticus* KF3, 4 – кефирная закваска (цвет кривых для штаммов одинаков на всех рисунках).

после 25 ч культивирования при достижении значения pH 5.5. Наиболее кислотообразующим и при этом самым кислотоустойчивым был штамм *L. paracasei* АВК, в присутствии которого закисление среды происходило быстрее остальных, но

при этом не оказывало видимого ингибирующего эффекта на его рост. Самую низкую скорость кислотообразования показал штамм *L. paracasei* KF1, для которого значения pH ферментированного молока в ходе всего культивирования, за исклю-

чением 72 ч, были выше по сравнению с двумя другими штаммами. Это объясняет его стабильный рост и замедление выхода на стационарную фазу за наблюдаемый период времени.

Несмотря на различную скорость роста штаммов, динамика их протеолитической активности была сопоставима в интервале от 0 до 48 ч. К 72 ч ферментации протеолитическая активность значительно увеличивалась у кефирной закваски, что могло быть связано с возрастающей активностью других микроорганизмов в составе закваски, таких как уксуснокислые бактерии и дрожжи, причем к этому моменту времени количество молочнокислых бактерий значительно снижалось. Как для кефирной закваски, так и для отдельных штаммов наблюдалось увеличение протеолитической активности на относительно поздних стадиях ферментации при выходе на стационарную фазу или в фазе клеточной гибели.

В целом изменение антиоксидантной активности положительно коррелировало со степенью гидролиза, в то время как АПФ-ингибирующая активность оставалась практически неизменной на поздних этапах ферментации. Наблюдаемые различия в паттернах развития антиоксидантной и АПФ-ингибирующей активностей для исследуемых штаммов можно объяснить общими требованиями к пептидам, проявляющим данные активности. В случае антиоксидантной активности пептиды должны быть короткими (до 20 аминокислот) и содержать высокую долю гидрофобных аминокислот [29–31]. Поскольку многие пептиды могут удовлетворять этим минимальным требованиям, любая молочнокислая бактерия потенциально может продуцировать среди прочих некоторое количество таких пептидов. Следовательно, чем больше общее количество пептидов (то есть степень протеолиза) в ферментированном молоке, тем большее количество антиоксидантных пептидов оно будет содержать и тем более высокой антиоксидантной активностью оно будет обладать. Следует отметить, что такое же соотношение протеолитической и антиоксидантной активности ранее сообщалось в работах [32–34]. В отличие от антиоксидантных, АПФ-ингибирующие пептиды очень специфичны к аминокислотной последовательности, поскольку они должны осуществлять конкурентное ингибирование каталитического сайта ангиотензин-превращающего фермента [31]. Следовательно, их продукция сильно зависит от способности протеолитической системы конкретного микроорганизма высвобождать из аминокислотной последовательности белка пептиды, состоящие из определенных аминокислот. Таким образом, только небольшая фракция пептидов, если таковая имеется, будет обладать АПФ-ингибирующей активностью независимо от степени протеолиза.

Необходимо отметить, что, несмотря на значительно большую степень протеолиза белков молока, ферментированного кефирной закваской, его антиоксидантные свойства были сопоставимы, а гипотензивные свойства (АПФ-ингибирующая активность) в первые 24 ч культивирования были слабее выражены, чем у молока, заквашенного чистыми культурами лактобацилл. Однако в ходе дальнейшей ферментации кефирной закваской АПФ-ингибирующая активность сквашенного молока увеличивалась и становилась выше, чем при ферментации отдельными штаммами лактобацилл. Это может объясняться присутствием отличных от лактобацилл микроорганизмов в составе кефирной закваски на данных этапах ферментации. Действительно, ранее была показана способность кефира снижать артериальное давление и частоту сердечных сокращений за счет ингибирования АПФ в крови крыс с экспериментальной гипертензией [35].

Таким образом, из кефирного грибка были выделены три штамма лактобацилл, относящиеся к видам *L. helveticus* и *L. paracasei*, обладающие широким спектром ферментативных активностей, включая α - и β -галактозидазную, α -глюкозидазную, фосфатазную, аминопептидазную и липазную. В тестах *in vitro* показаны антиоксидантные и гипотензивные свойства молока, ферментированного этими штаммами лактобацилл, которые сопоставимы со свойствами молока, ферментированного кефирной закваской. Как показали результаты анализа ПЦР, в геномах выделенных штаммов лактобацилл отсутствовали гены антибиотикорезистентности *aad*, *aacB'-aph2'*, *RPP* (включая *tet(M)*, *tet(O)* и др.), *tetK/L*, *ermA/B/C/F/T*, *cat*, *mefA* как в хромосомах, так и в плазмидах. Поэтому новые штаммы лактобацилл могут быть использованы в качестве пробиотических культур при формировании ассоциаций заквасочных культур для разработки кисломолочных продуктов с лечебно-профилактическим действием, и для прямого использования в качестве пробиотиков, поскольку не могут служить источником генов устойчивости к антибиотикам в микробиоме человека. Тем не менее, необходимо подтверждение пробиотических свойств выделенных из кефирных грибков штаммов лактобацилл в *in vivo* экспериментах.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ и НИФ в рамках научного проекта № 19-54-60002 и в рамках НИР по Госзаданию (шифр темы 0578-2019-0023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Turkmen N., Akal C., Özer B.* // J. Funct. Foods. 2019. V. 53. P. 62–75.
2. *German J.B., Zivkovic A.M., Dallas D.C., Smilowitz J.T.* // Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2011. V. 2. № 1. P. 97–123.

3. Kwak N.-S., Jukes D.J. // *Food Control*. 2001. V. 12. № 2. P. 99–107.
4. Şanlıer N., Gökçen B.B., Sezgin A.C. // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019. V. 59. № 3. P. 506–527.
5. Gänzle M.G. // *Curr. Opin. Food Sci.* 2015. V. 2. P. 106–117.
6. Rozhkova I.V., Moiseenko K. V., Glazunova O.A., Begunova A.V., Fedorova T.V. // *Food Science and Technology* / Ed. O.A. Ijabadeniyi Berlin: De Gruyter, 2020. P. 215–234.
7. Rosa D.D., Dias M.M.S., Grześkowiak Ł.M., Reis S.A., Conceição L.L., Peluzio M. do C.G. // *Nutr. Res. Rev.* 2017. V. 30. № 1. P. 82–96.
8. Plessas S., Nouska C., Mantzourani I., Kourkoutas Y., Alexopoulos A., Bezirtzoglou E. // *Fermentation*. 2016. V. 3. № 1. P. 1.
9. Nielsen B., Gürakan G.C., Ünlü G. // *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2014. V. 6. № 3–4. P. 123–135.
10. Leite A.M.O., Miguel M.A.L., Peixoto R.S., Ruas-Madiedo P., Paschoalin V.M.F., Mayo B., Delgado S. // *J. Dairy Sci.* 2015. V. 98. № 6. P. 3622–3632.
11. Технологическая инструкция по приготовлению и применению заквасок и бактериальных концентратов для кисломолочных продуктов. Москва, 2004. С. 56.
12. Dasen G., Smutny J., Teuber M., Meile L. // *Syst. Appl. Microbiol.* 1998. V. 21. № 2. P. 251–259.
13. ГОСТ 33951–2016 Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов. Москва: Стандартинформ, 2016. P. 15.
14. Adler-Nissen J. // *J. Agric. Food Chem.* 1979. V. 27. № 6. P. 1256–1262.
15. Торкова А.А., Рязанцева К.А., Азаркова Е.Ю., Кручинин А.Г., Центалович М.Ю., Фёдорова Т.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 6. С. 580–591.
16. Zielińska D., Kolozyn-Krajewska D., Laranjo M. // *Biomed Res. Int.* 2018. V. 2018. P. 5063185.
17. Mantzourani I., Chondrou P., Bontsidis C., Karolidou K., Terrou A., Alexopoulos A., Bezirtzoglou E., Galanis A., Plessas S. // *Ann. Microbiol. Annals of Microbiology*, 2019. V. 69. № 7. P. 751–763.
18. Koroleva N.S. // *Therapeutic properties of fermented milks* / Ed. R.K. Robinson. London: Elsevier Applied Science, 1991. P. 159–179.
19. Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M.A.P., Harris H.M.B., Mattarelli P., O'Toole P.W., Pot B., Vandamme P., Walter J., Watanabe K., Wuyts S., Felis G.E., Gänzle M.G., Lebeer S. // *Int. J. Syst. EV. Microbiol.* 2020. V. 70. № 4. P. 2782–2858.
20. Фёдорова Т.В., Васина Д.В., Бегунова А.В., Рожкова И.В., Раскошная Т.А., Габриэлян Н.И. // Прикл. Биохимия и Микробиология. 2018. Т. 54. № 3. С. 264–276.
21. Molinero N., Ruiz L., Sánchez B., Margolles A., Delgado S. // *Front. Physiol.* 2019. V. 10. P. 10:185.
22. Braune A., Blaut M. // *Gut Microbes*. 2016. V. 7. № 3. P. 216–234.
23. Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Foligné B., Gänzle M., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E.J., Hutkins R. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2017. V. 44. P. 94–102.
24. Sharma P., Tomar S.K., Goswami P., Sangwan V., Singh R. // *Food Res. Int.* 2014. V. 57. P. 176–195.
25. Roberts M.C. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. V. 245. № 2. P. 195–203.
26. Roberts M.C. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2008. V. 282. № 2. P. 147–159.
27. Mathur S., Singh R. // *Int. J. Food Microbiol.* 2005. V. 105. № 3. P. 281–295.
28. Ammor M.S., Belén Flórez A., Mayo B. // *Food Microbiol.* 2007. V. 24. № 6. P. 559–570.
29. Sarmadi B.H., Ismail A. // *Peptides*. 2010. V. 31. № 10. P. 1949–1956.
30. Pihlanto A. // *Int. Dairy J.* 2006. V. 16. № 11. P. 1306–1314.
31. Udenigwe C.C., Aluko R.E. // *J. Food Sci.* 2012. V. 77. № 1. P. R11–R24.
32. Ramesh V., Kumar R., Singh R.R.B., Kaushik J.K., Mann B. // *Dairy Sci. Technol.* 2012. V. 92. № 2. P. 179–188.
33. Virtanen T., Pihlanto A., Akkanen S., Korhonen H. // *J. Appl. Microbiol.* 2007. V. 102. № 1. P. 106–115.
34. Begunova A. V., Savinova O.S., Glazunova O.A., Moiseenko K. V., Rozhkova I. V., Fedorova T. V. // *Foods*. 2021. V. 10. № 1. P. 17.
35. Kanbak G., Uzuner K., Kuşat Ol K., Oğlakçı A., Kartkaya K., Şentürk H. // *Clin. Exp. Hypertens.* 2014. V. 36. № 1. P. 1–8.
36. Rojo-Bezares B., Sáenz Y., Poeta P., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C. // *Int. J. Food Microbiol.* 2006. V. 111. № 3. P. 234–240.
37. Klare I., Konstabel C., Werner G., Huys G., Vankerckhoven V., Kahlmeter G., Hildebrandt B., Müller-Bertling S., Witte W., Goossens H. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2007. V. 59. № 5. P. 900–912.
38. Clermont D., Chesneau O., De Cespédès G., Horaud T. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997. V. 41. № 1. P. 112–116.
39. Barbosa T.M., Scott K.P., Flint H.J. // *Environ. Microbiol.* 1999. V. 1 № 1. P. 53–64.
40. Gevers D., Danielsen M., Huys G., Swings J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. № 2. P. 1270–1275.
41. Hummel A., Holzapfel W.H., Franz C.M.A.P. // *Syst. Appl. Microbiol.* 2007. V. 30. № 1. P. 1–7.
42. Rizzotti L., Simeoni D., Cocconcelli P., Gazzola S., Delaglio F., Torriani S. // *J. Food Prot.* 2005. V. 68. № 5. P. 955–965.
43. Roberts M.C., Chung W.O., Roe D., Xia M., Marquez C., Borthagaray G., Whittington W.L., Holmes K.K. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. V. 43. № 6. P. 1367–1372.
44. Woodbury R.L., Klammer K.A., Xiong Y., Bailiff T., Glennen A., Bartkus J.M., Lynfield R., Van Beneden C., Beall B.W. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. V. 52. № 3. P. 1140–1143.
45. Luna V.A., Cousin S.J., Whittington W.L.H., Roberts M.C. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. V. 44. № 9. P. 2503–2506.

Characterization and Functional Properties of Lactobacilli Isolated from Kefir Grains

A. V. Begunova^a, O. S. Savinova^b, K. V. Moiseenko^b, O. A. Glazunova^b,
I. V. Rozhkova^a, and T. V. Fedorova^{b,*}

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

^bA.N. Bach Institute of Biochemistry, Biotechnology Research Center of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Being a natural symbiotic consortium of bacteria and yeasts, kefir grains provide a unique source of new probiotic microorganisms. In this work, three new isolates of lactobacilli – *Lactobacillus helveticus* and two strains of *Lacticaseibacillus paracasei* – were isolated from kefir grains originating from the North Caucasian region of Russia, and their identification via biochemical and genetic methods was carried out. For all strains, enzyme activity profiles were described, and antimicrobial resistance and genetic determinants of antibiotic resistance were screened. During fermentation of cow's milk, all three strains showed lower acid-forming activity, but comparable proteolytic, antioxidant and hypotensive activities in comparison with kefir starter culture.

Keywords: kefir grains, lactobacilli, enzymatic profile, proteolytic activity, antioxidant activity, ACE-inhibitory activity

УДК 579.222.3:604.2

ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ МИКРОМИЦЕТА *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D НА ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЯХ НА ОБРАЗОВАНИЕ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ ПРОТЕАЗЫ-АКТИВАТОРА ПРОТЕИНА С ПЛАЗМЫ КРОВИ

© 2021 г. С. К. Комаревцев^{1,2}, С. Н. Тиморшина¹, М. Р. Леонтьева¹,
С. В. Шабунин², Е. С. Лобакова¹, А. А. Осмоловский^{1,2, *}

¹Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова,
Москва, 119234 Россия

²Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии,
Воронеж, 394087 Россия

*e-mail: aosmol@mail.ru

Поступила в редакцию 21.10.2020 г.

После доработки 01.12.2020 г.

Принята к публикации 22.12.2020 г.

Проведен поиск среди наиболее известных полимеров (альгинат, каррагинан и акриламид) для использования в качестве носителей клеток мицелия *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D – продуцента фибринолитической протеазы-активатора протеина С плазмы крови человека при его глубинном культивировании. Показаны морфо-цитологические особенности развития мицелия *A. ochraceus* ВКМ-F4104D в гранулах каррагинана и альгината кальция. Оптимизированы условия культивирования микромицета, иммобилизованного в гранулах 3.5%-ного альгината кальция. Показано, что иммобилизованные клетки мицелия продуцента имели повышенную стабильность и были способны синтезировать протеазу-активатор протеина С плазмы крови на максимальном уровне в течение 10 сут и более. Кроме того, иммобилизованные клетки мицелия при культивировании могли быть использованы многократно (до 5 циклов).

Ключевые слова: полимерные носители, иммобилизация, *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D, активатор протеина С, фибринолитики

DOI: 10.31857/S0555109921030077

Протеин С плазмы крови представляет собой один из важных антикоагулянтных факторов, который подавляет образование тромбина, стимулирует фибринолиз и также обладает свойствами цитопротекторной сигнальной молекулы [1–3]. Он образуется в печени в виде неактивного одноцепочечного предшественника и переходит в двуцепочечную активную форму в процессе ограниченного протеолиза. В физиологических условиях это достаточно сложный процесс, проходящий на поверхности эндотелиальных клеток, в который вовлечены тромбин и два мембранных рецептора – тромбомодулин и эндотелиальный рецептор протеина С (ЕРСР) [4, 5]. В современной медицине и диагностике активно используются активаторы протеина С, способные напрямую превращать протеин С из предшественника в активную форму [6, 7]. В состав наиболее распространенных препаратов такого типа действия входят активаторы протеина С из яда змей, в частности южноамериканского медноголового щитомордика *Agkistrodon contortrix contortrix* [8, 9].

Ранее было показано, что секретируемая внеклеточная протеаза, образуемая штаммом микромицета *Aspergillus ochraceus* ВКМ-F4104D, способна активировать протеин С из неактивного предшественника [10–12]. Изучение свойств этой протеазы показало ее сходство с активатором протеина С из яда *Agkistrodon c. contortrix*, в частности, по способности к гидролизу специфических хромогенных субстратов, оптимуму рН и температурной стабильности, а также чувствительности к ряду ингибиторов [13, 14]. Способность микромицетов к культивированию на простых питательных средах позволяет рассматривать протеазу, образуемую микромицетом *A. ochraceus*, в качестве доступного аналога активатора протеина С из яда *Agk. contortrix*, перспективного для использования в диагностических, медицинских и ветеринарных целях [15, 16].

Иммобилизация клеток микроорганизмов в гранулах различных полимерных носителей широко используется в современной биотехнологии [17]. Она позволяет существенно повысить эффектив-

ность процесса ферментации за счет увеличения стабильности продуцента и возможности его использования в нескольких циклах культивирования, а также облегчения разделения культуральной жидкости и биомассы [18, 19]. Среди наиболее популярных полимерных носителей, используемых для иммобилизации, можно выделить альгинат кальция, каррагинан и полиакриламид, которые обладают хорошими механическими и адсорбционными свойствами, не требуют сложных технологических процессов при использовании и имеют невысокую стоимость [20, 21].

Цель работы – исследование влияния иммобилизации микромицета *A. ochraceus* ВКМ-F4104D на полимерных носителях на образование фибринолитической протеазы-активатора протеина С плазмы крови человека.

МЕТОДИКА

Объект исследования. Использовали изученный ранее [15] штамм микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, продуцирующий протеазу-активатор протеина С. Для получения посевного материала микромицет выращивали в пробирках на скошенном сусло-агаре (3°Б) в течение 7 сут при 28°С.

Иммобилизация *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. Для иммобилизации клеток использовали акриламид, альгинат кальция и каррагинан. С поверхности культуры микромицета делали смыв стерильной водой, содержащей 0.0001% Твин-80, после чего споры смешивали с растворами иммобилизующих агентов. Полимеризацию акриламида (4%) проводили добавлением персульфата аммония и тетраметилэтилендиамина, после чего полученный гель разрезали скальпелем на кубики размером ребра около 3–5 мм и промывали стерильной водой.

Смеси суспензии спор с растворами альгината (2.5–5.5%) и каррагинана (3%) по каплям добавляли к охлажденным растворам 0.3 М CaCl₂ и 2%-ного KCl соответственно, инкубировали в течение 8 ч при 4°С для формирования гранул, после чего промывали стерильной водой. Полученные гранулы иммобилизованных спор *A. ochraceus* ВКМ F-4104D вносили в питательную среду для дальнейшего культивирования.

Глубинное культивирование *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. Культивирование микромицета проводили в две последовательные стадии по ранее описанной схеме [15]. На предварительной стадии смыв спор микромицета с агаризованной среды вносили в посевную среду следующего состава (%): сусло – 6.7, глюкоза – 1, пептон – 0.1, рН 5.5–6.0, и выращивали в течение 2 сут. Часть биомассы переносили в ферментационную среду (%): глюкоза – 3.5, гидролизат рыбной муки – 1, NaCl – 0.2, крахмал – 0.125, пептон – 0.1, KН₂РO₄ – 0.05, MgSO₄ – 0.05, рН 5.5–6.0, для проведения основ-

ной стадии культивирования, во время которой происходит наработка протеазы-активатора протеина С. Выращивание проводили в качалочных колбах объемом 750 мл, содержащих 100 мл питательной среды, при температуре 28°С в шейкере-инкубаторе Biosan ES 20/60 (“Biosan”, Латвия) при 200 об./мин.

Подбор оптимальных условий для иммобилизации. Для выбора наиболее подходящего носителя проводили культивирование иммобилизованного *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в 4.0%-ном полиакриламиде (акриламид – 3.9%, метиленабисакриламид – 0.1%), 3.5%-ном альгинате и 3.0%-ном каррагинане [17–21], культивировали в ферментационной среде с предварительным выращиванием в течение 2 сут в посевной среде с иммобилизованным носителем (вариант 1) и без него (вариант 2). Оценивали активность и динамику образования протеазы-активатора протеина С в культуральной жидкости в процессе культивирования. Для подбора оптимальной концентрации носителя, показавшего лучшие результаты, его концентрацию меняли в пределах от 2.5 до 5.5% с шагом в 1%. Культивирование проводили в качалочных колбах емкостью 750 мл, со 100 мл питательной среды и суммарным объемом гранул иммобилизующего носителя 25 мл при температуре 28°С, на орбитальной качалке при 200 об./мин.

Полунепрерывное культивирование иммобилизованного *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. Выращивание проводили, используя подобранные в ходе работы оптимальные параметры. После достижения максимальной активности протеазы-активатора протеина С в культуральной жидкости проводили замену питательной среды на свежую и продолжали культивирование.

Определение протеолитической активности. Ферментативную активность протеазы-активатора протеина С определяли по реакции специфического расщепления бесцветного хромогенного пептидного субстрата *n*-нитроанилида тозил-глицил-пролил-аргинина (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA), сопровождающегося накоплением окрашенного в желтый цвет свободного *n*-нитроанилина, как было описано ранее [10]. Измерение оптической плотности проводили при 405 нм на спектрофотометре “Eppendorf BioSpectrometer” (Германия). За единицу активности (*E*) принимали количество мкмоль *n*-нитроанилина, образовавшегося в результате гидролиза субстрата за 1 мин в 1 мл культуральной жидкости.

Световая и сканирующая электронная микроскопия. Для изучения влияния иммобилизации *A. ochraceus* ВКМ F-4104D на полимерных носителях на морфологию мицелия на 4 сут культивирования, в период максимальной продукции протеазы-активатора протеина С, отбирали гранулы полимеров, содержащий гифы микромицета.

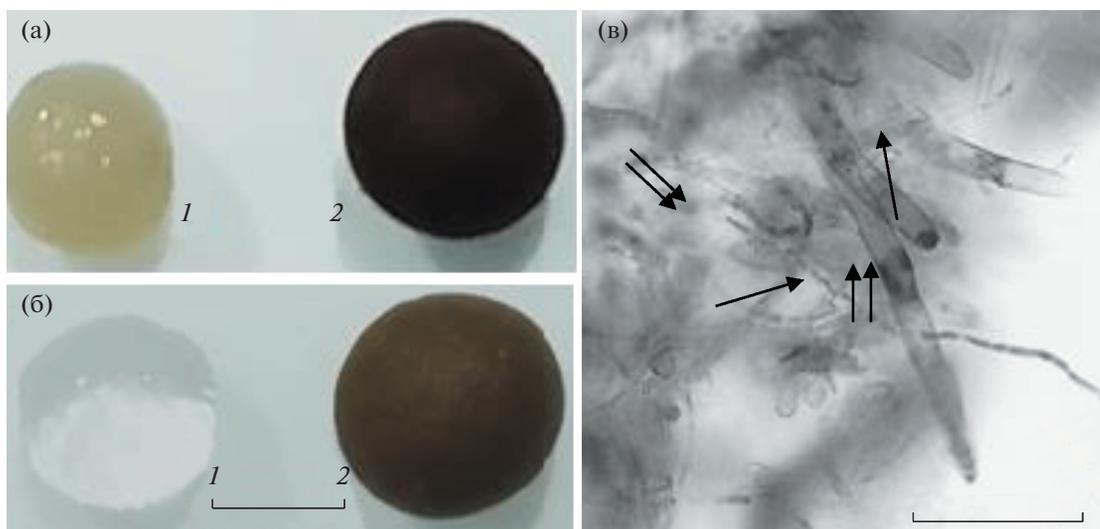


Рис. 1. Гранулы полимерных носителей каррагинана (а) и альгината (б) без мицелия (1) и с иммобилизованным мицелием *A. ochraceus* (2) и гифы тонкого (двойные стрелки) и толстого (одиночные стрелки) мицелия на поверхности гранул альгината (в); масштабный отрезок на фрагментах 1а и 1б – 5 мм, на фрагменте 1в – 20 мкм.

Световую микроскопию проводили непосредственно изучая поверхность гранул с помощью микроскопа Микромед-1 (“ЛОМО”, Россия), оснащенного камерой UCМOS05100KPA (“Tourcam”, Китай). Для цифровой визуализации и обработки изображения использовали программу TopView.

Для сканирующей электронной микроскопии гранулы фиксировали 2.5%-ным раствором глутарового альдегида в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.3) в течение 12 ч и обезвоживали в растворах этанола возрастающей концентрации (30–96%). После окончательной дегидратации в абсолютном этаноле гранулы выдерживали 12 ч в ацетоне и высушивали на установке НСР-2 (“Hitachi”, Япония). Далее образцы гранул напыляли смесью металлов Au-Pd Eiko IB-3 Ion Coater (“Hitachi”, Япония) и исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (“Jeol”, Япония), при ускоряющем напряжении 15 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате иммобилизации микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в 4.0%-ном полиакриламиде, 3.5%-ном альгинате кальция и 3.0%-ном каррагинане были получены однородные гранулы с размером около 3–5 мм (рис. 1а, 1б). Гранулы были охарактеризованы как механически устойчивые, не склонные к агрегации или распаду в процессе культивирования и подготовительных к нему манипуляций. При этом во всех использованных полимерных материалах при наблюдении под микроскопом отмечали проникновение мицелия в полимерный носитель, сопровождающееся ростом мицелия как внутри, так и на поверхности гранул носителя (рис. 1) без обра-

зования флоккул в среде, характерного для роста не иммобилизованной культуры.

Морфо-цитологические особенности иммобилизованного *A. ochraceus* ВКМ F-4104D изучали при помощи СЭМ (рис. 2а–2е). Микроскопию проводили для вариантов микромицета, иммобилизованного в альгинате кальция и каррагинане без предварительного культивирования в посевной среде (вариант 2). Как видно на рис. 2а и 2г, наиболее плотный слой иммобилизованного мицелия продуцента располагался на поверхности гранул и имел ширину около 200 мкм. При иммобилизации в обоих типах полимерных носителей развивались гифы микромицета различной толщины, которая внутри гранул составляла около 4 мкм (рис. 1в, рис. 2в и 2е), а на поверхности наблюдали образование как тонких гиф диаметром 2.0–3.0 мкм, так и толстых гиф диаметром 7.0–7.5 мкм (рис. 2б и 2д). Такая особенность мицелия оказалась характерной для *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, иммобилизованного в гранулах как альгината кальция, так и каррагинана. Однако только при иммобилизации в альгинате кальция микромицет образовывал в условиях глубинного культивирования малиново-бордовый пигмент, характерный для продуцента при росте без иммобилизации, что подтверждало наличие физиологических различий при иммобилизации *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в разных типах полимерных носителей.

В табл. 1 приведены результаты экспериментов по выбору оптимального полимерного носителя для иммобилизации и условий культивирования микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D. Наибольшую активность протеазы-активатора протеина С по сравнению с контролем со свободными клетками наблюдали при иммобилизации

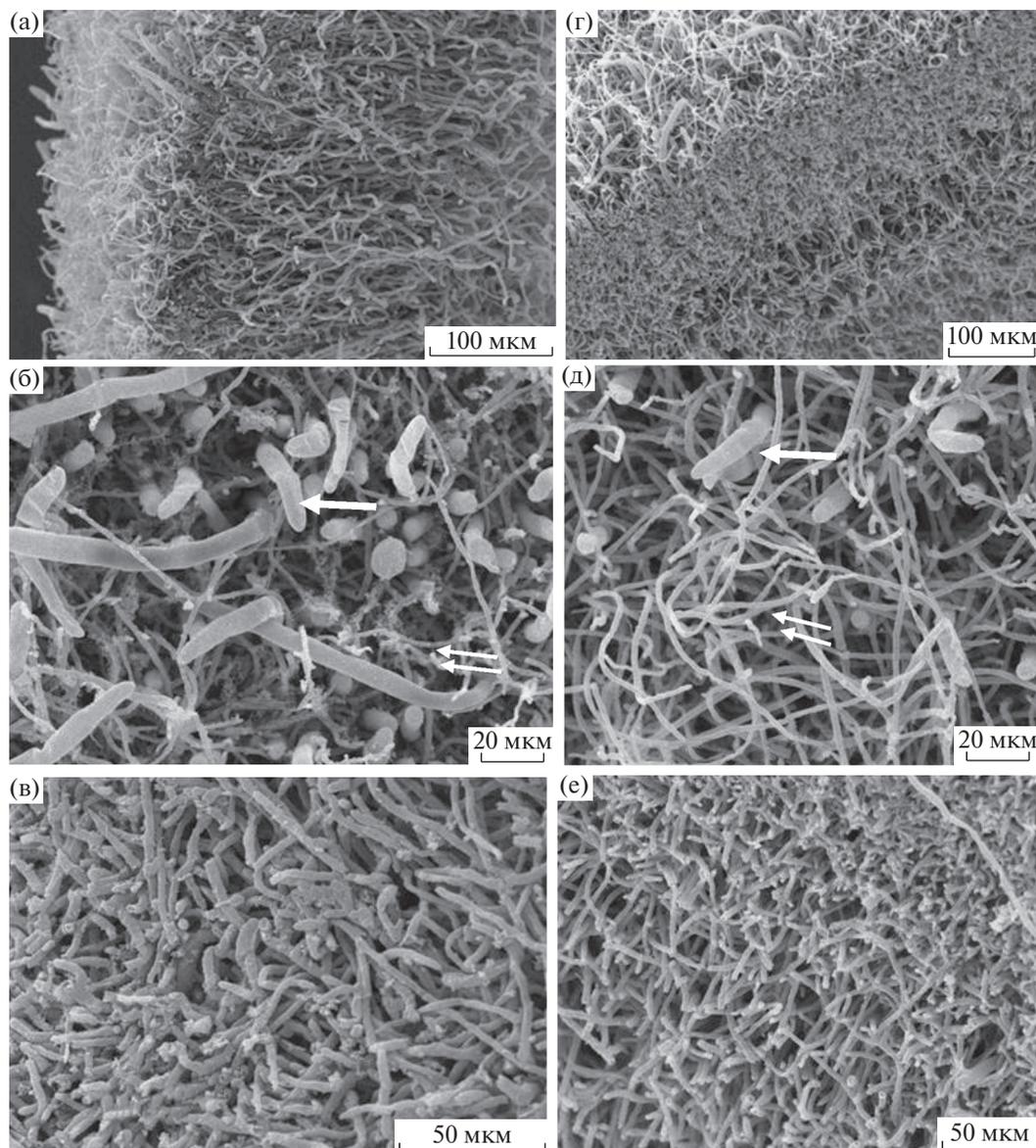


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия гранул альгината (а–в) и каррагинана (г–е) с иммобилизованным мицелием *A. ochraceus* ВКМ F-4104D: наружный мицелий (а, г), поверхность гранул (б, д) и мицелий, включенный в гранулы (в, е) (одиночными стрелками обозначены толстые гифы, двойными – тонкие).

спор продуцента в гранулах альгината кальция. При этом максимальный выход целевого продукта был получен при культивировании иммобилизованного продуцента в ферментационной среде без предварительного выращивания продуцента в посевной среде (вариант № 2). Активность протеазы при иммобилизации микромицета в гранулах каррагинана была также достаточно высокой, однако ниже, чем при иммобилизации в гранулах альгината кальция. При иммобилизации микромицета в гранулах полиакриламида активность протеазы-активатора протеина С была существенно ниже как по сравнению с контролем, так и другими носителями. Таким образом, для дальнейших экспериментов в качестве носителя был выбран аль-

Таблица 1. Образование фермента при иммобилизации микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D на различных носителях

Носитель для иммобилизации	Максимальная протеолитическая активность при различных вариантах культивирования, Е/мл $\times 10^{-3}$	
	вариант 1	вариант 2
Альгинат	71	139
Каррагинан	24	124
Полиакриламид	12	2
Без иммобилизации	118	нет данных

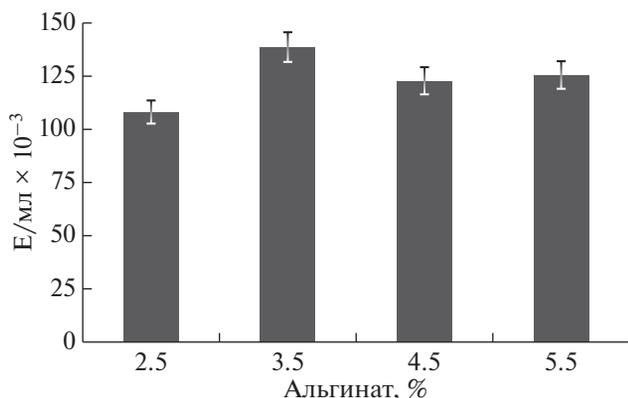


Рис. 3. Зависимость максимальной активности протеазы-активатора протеина С от концентрации альгината кальция при иммобилизации.

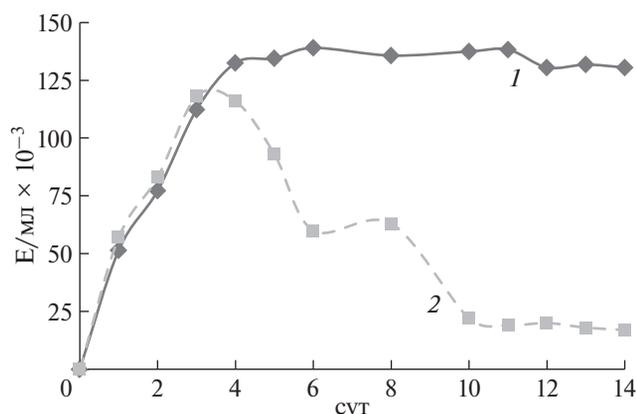


Рис. 4. Динамика образования протеазы-активатора протеина С при глубинном культивировании микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, иммобилизованного в альгинате кальция (1) и без иммобилизации (2).

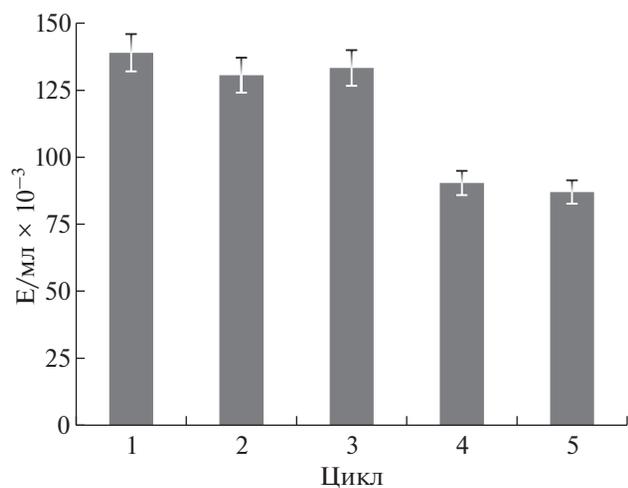


Рис. 5. Образование протеазы-активатора протеина С в нескольких циклах полунепрерывного культивирования микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D, иммобилизованного в альгинате кальция.

гинат кальция с оптимальным режимом культивирования в ферментационной среде (вариант № 2).

Для выбора оптимальной концентрации альгината кальция для иммобилизации и выхода фермента измеряли активность протеазы-активатора протеина С во время культивирования микромицета с концентрациями гранул альгината кальция от 2.5 до 5.5%. Как видно на рис. 3, разброс значений активности протеазы-активатора протеина С в исследуемом диапазоне концентраций альгината оказался небольшим — 110–130 Е/мл × 10⁻³. Наивысшее значение наблюдали при концентрации альгината кальция 3.5% (145 Е/мл × 10⁻³). Для проведения дальнейших экспериментов по изучению динамики образования протеиназы при полунепрерывном культивировании использовали эту концентрацию носителя. Полученные результаты хорошо согласовывались с данными литературы, согласно которым оптимальная концентрация альгината кальция для иммобилизации клеток микроорганизмов находится в диапазоне от 2.0 до 5.0% [17–21].

На рис. 4 приведена динамика образования протеазы-активатора протеина С при глубинном культивировании иммобилизованного в альгинате кальция и свободно растущего микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D в течение 14 сут. Показано, что активность фермента достигла своего максимального значения на 3–4 сут культивирования при выращивании продуцента без носителя, после чего снижалась в 2 раза на 6–7 сут и в 4 раза — на 10 сут. В тоже время при культивировании иммобилизованного микромицета максимальный уровень активности фермента также наблюдали на 4 сут культивирования, а затем этот уровень активности практически не изменялся в течение последующих 10 сут, что свидетельствовало о более стабильном синтезе целевого продукта иммобилизованным продуцентом по сравнению со свободно растущим.

Для исследования возможности многократного использования иммобилизованного в альгинате кальция микромицета в биотехнологических процессах было проведено пять циклов полунепрерывного культивирования *A. ochraceus* ВКМ F-4104D с заменой питательной среды на свежую перед каждым циклом. Активности целевого фермента в культуральной жидкости, полученные в процессе такого культивирования, показаны на рис. 5. Наибольшую активность наблюдали в первых трех циклах выращивания, после чего наблюдали снижение выхода активности примерно на треть по сравнению с первоначальными значениями. Полученные результаты показали возможность многократного повторения культивирования иммобилизованного в альгинате кальция микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D для получения протеазы-активатора протеина С.

Таким образом, установлено, что иммобилизация микромицета *A. ochraceus* ВКМ F-4104D на

полимерных носителях увеличивала время образования фибринолитической протеазы-активатора протеина С плазмы крови, повышала стабильность продуцента и позволяла многократно использовать в процессе полунепрерывного культивирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках грантового соглашения № 20-16-00085.

СЭМ-микроскопию проводили в ЦКП УНО “Электронная микроскопия в науках о жизни” Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

ВКЛАД АВТОРОВ

В получении и обработке результатов участвовали Комаревцев С.К., Тиморшина С.Н., Леонтьева М.Р., в написании статьи – Комаревцев С.К., Тиморшина С.Н., в анализе и обсуждении результатов – Лобакова Е.С., Шабунин С.В., в концептуализации работы, корректировке статьи и общем руководстве работой – Осмоловский А.А.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Griffin J.H., Zlokovic B.V., Mosnier L.O. // *Blood*. 2018. V. 132. № 2. P. 159–169.
2. Bouwens E.A., Stavenuiter F., Mosnier L.O. // *J. Thromb. Haemost.* 2013. V. 11. № 1. P. 242–253.
3. Струкова С.М. // *Биохимия*. 2004. Т. 69. № 10. С. 1314–1331.
4. Chen K., Stafford A.R., Wu C., Yeh C., Kim P.Y., Fredenburgh J.C., Weitz J.I. // *Biochemistry*. 2017. V. 56. № 24. P. 3119–3128.
5. Griffin J.H., Fernandez J.A., Gale A.J., Mosnier L.O. // *J. Thromb. Haemost.* 2007. V. 5. № 1. P. 73–80.
6. Mohammed S., Favaloro E.J. // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1646. № 10. P. 137–143.
7. Barranco-Medina S., Murphy M., Pelc L., Chen Z., Di Cera E., Pozzi N. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 44596. P. 1–8.
8. Asmat A., Ramzan F. // *Protein Pept. Lett.* 2018. V. 25. № 7. P. 643–651.
9. Gempeler-Messina P.M., Müller C. // *Toxin Rev.* 2006. V. 25. № 4. P. 335–349.
10. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Кураков А.В., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2012. Т. 48. № 5. С. 537–542.
11. Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // *Биоорганическая химия*. 2014. Т. 40. № 6. С. 688–694.
12. Патент РФ. 2011. № 2460772.
13. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2015. Т. 51. № 1. С. 86–92.
14. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2017. Т. 53. № 4. С. 373–379.
15. Осмоловский А.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Кураков А.В., Егоров Н.С. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2013. Т. 49. № 6. С. 580–586.
16. Осмоловский А.А., Орехова А.В., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. // *Биомедицинская химия*. 2018. Т. 64. № 1. С. 115–118.
17. Guisan J.M. *Immobilization of Enzymes and Cells*: Third Ed. N.Y.: Humana Press, 2013. 377 p.
18. Zhang Y., Li X., Zhang C., Yu X., Huang F., Huang S., Li L., Liu S. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 33. № 176. P. 1–7.
19. Chatterjee S. // *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2015. V. 6. № 1. P. 2–6.
20. Yewale T., Panchwagh S., Rajagopalan S., Dhamole P.B., Jain R. // *3 Biotech.* 2016. V. 6. № 75. P. 1–10.
21. Mostafa Y.S., Alamri S.A. // *Saudi J. Biol. Sci.* 2012. V. 19. № 2. P. 241–246.

Immobilization on Polymeric Carriers Effect on the Pro-Duction of Fibrinolytic Protease-Activator of Blood Plasma Protein C by *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D

S. K. Komarevtsev^{a, b}, S. N. Timorshina^a, M. R. Leontieva^a, S. V. Shabunin^b, E. S. Lobakova^a, and A. A. Osmolovskiy^{a, b, *}

^aBiological Faculty, Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Moscow, 119234 Russia

^bAll-Russian Scientific Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy, Voronezh, 394087 Russia

*e-mail: aosmol@mail.ru

A search among the most known polymers (alginate, carrageenan and acrylamide) for use as carriers of mycelium cells of *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D, a producer of fibrinolytic protease-activator of protein C in human blood plasma during its deep cultivation was carried out. Morpho-cytological features of the development of *A. ochraceus* VKM-F4104D mycelium in granules of carrageenan and calcium alginate are shown. The conditions for cultivation of micromycete immobilized in granules of 3.5% calcium alginate were optimized. It was shown that the immobilized cells of the producer's mycelium had increased stability and were able to synthesize the protease-activator of protein C of blood plasma at the maximum level for 10 days or more. In addition, immobilized mycelium cells during cultivation can be used repeatedly (up to 5 cycles).

Keywords: polymer carriers, immobilization, *Aspergillus ochraceus* VKM-F4104D, protein C activator, fibrinolytics

УДК 66.061.34+579.66

ХИМИЧЕСКОЕ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ КОЛЛЕКТИВНЫХ СУЛЬФИДНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ РАСТВОРОМ СУЛЬФАТА ТРЕХВАЛЕНТНОГО ЖЕЛЕЗА

© 2021 г. М. И. Муравьев¹*, А. Е. Паниюшкина¹, В. С. Меламуд¹, А. Г. Булаев¹, Н. В. Фомченко¹

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

*e-mail: maxmuravyov@gmail.com

Поступила в редакцию 27.11.2020 г.

После доработки 15.01.2021 г.

Принята к публикации 22.02.2021 г.

Исследовано выщелачивание цветных металлов из медно-цинкового и медно-никелевого сульфидных концентратов раствором сульфата трехвалентного железа, полученным микробным окислением сульфата двухвалентного железа, при разных условиях (температура, плотность пульпы, концентрация окислителя). Установлено, что максимальная концентрация цветных металлов в жидкой фазе была достигнута при 80°C. Показано, что плотность пульпы не оказывала существенного влияния на выщелачивание меди, однако ее повышение от 1 до 3% снижало извлечение цинка и никеля в жидкую фазу. Исследование влияния концентрации окислителя (ионов Fe³⁺) показало, что при концентрации Fe³⁺ 10 г/л извлечение цинка и никеля было максимальным. При всех исследованных режимах цинк переходил в жидкую фазу более эффективно, чем никель, однако медь преимущественно концентрировалась в осадке обоих концентратов. Показано, что в осадках выщелачивания содержание цинка снижалось с 7.36 до 0.05%, никеля – с 9.45 до 6.86% при повышении содержания меди в обоих случаях. Предложенный способ селективного выщелачивания минералов из коллективных концентратов может рассматриваться как одна из стадий повышения качества сульфидных концентратов.

Ключевые слова: сульфидный концентрат, халькопирит, сфалерит, пентландит, виоларит, биогидрометаллургия, выщелачивание

DOI: 10.31857/S0555109921040115

Переработка многих сульфидных полиметаллических руд связана с технологическими трудностями их разделения на кондиционные индивидуальные концентраты в процессе обогащения, что обусловлено как флотационными свойствами самих минералов руды, так и морфологическими особенностями их строения (срастанием друг с другом, вкрапленностью и др.). Наиболее распространенные флотационные методы обогащения руд позволяют эффективно и с высокой скоростью получать коллективные сульфидные концентраты, такие как медно-цинковые и медно-никелевые [1, 2]. Непригодные для пирометаллургической переработки, они могут представлять интерес для биогидрометаллургии, основанной на выщелачивании металлов с использованием микроорганизмов [3–5]. Наибольшее применение в промышленности нашло использование сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, способных окислять двухвалентное железо и восстановленные соединения серы, для извлечения меди из руд вторичных сульфидов, а также золота из пиритно-арсенопиритных руд [6]. Это обу-

словлено относительно быстрым и полным растворением минералов группы халькозина в кислых растворах трехвалентного железа в первом случае и высокой стоимостью золота – во втором.

Наиболее распространенный сульфидный минерал меди – халькопирит (CuFeS₂) – характеризуется устойчивостью в растворах сернокислого трехвалентного железа в том числе в процессах биовыщелачивания, вызванной как образованием продуктов реакции (элементарная сера, ярозит) на поверхности частиц, препятствующих доступу окислителя в зону реакции, так и электрохимическими характеристиками самого минерала [7, 8]. Попытки коммерческого использования биогидрометаллургии для переработки сырья, содержащего халькопирит, в биореакторах не увенчались успехом в связи с высокими эксплуатационными расходами, необходимыми для обеспечения активности термофильного микробного сообщества [9].

Известно, что окисление смеси сульфидных минералов обуславливается в том числе их гальваническим взаимодействием. При этом в большей степени растворяется минерал, обладающий

Таблица 1. Содержание основных элементов в концентратах

Концентрат	Содержание, %							
	Cu	Zn	Ni	Fe	Co	S	Ca	Si
Медно-цинковый	10.1	7.36	–	36.1	–	34.5	0.1	1.77
Медно-никелевый	10.9	–	9.45	21.3	0.25	26.8	0.91	7.28

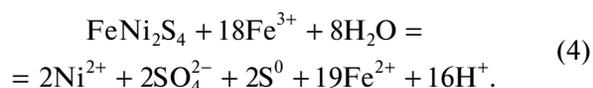
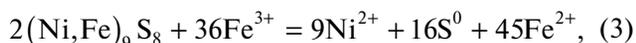
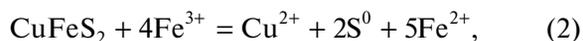
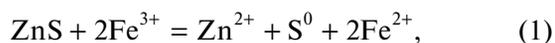
Таблица 2. Содержание основных сульфидных минералов в концентратах

Концентрат	Содержание, %					
	CuFeS ₂	ZnS	Fe _{1-x} S	FeS ₂	(Ni,Fe) ₉ S ₈	FeNi ₂ S ₄
Медно-цинковый	29	11	34	13	0	0
Медно-никелевый	31	<0.5	4	4	15	11

меньшим значением электродного потенциала (рис. 1) [10].

На основании этого для получения кондиционного для пирометаллургии монометаллического концентрата представляет интерес селективное выщелачивание минералов из коллективных сульфидных концентратов. Одними из перспективных для такой переработки могут быть халькопирит-сфалеритовые и халькопирит-пентландит-виоларитовые концентраты для удаления из них цинка и никеля соответственно и получения качественного медного концентрата.

Выщелачивание металлов при окислении сфалерита (ZnS), халькопирита (CuFeS₂), пентландита (Ni,Fe)₉S₈ и виоларита (FeNi₂S₄) можно выразить в виде следующих упрощенных уравнений:



Разрушение кристаллической решетки сульфидных минералов протекает за счет их химического взаимодействия с ионами трехвалентного железа в сернокислой среде. Известно, что скорость химических реакций повышается с увеличением температуры. Кроме того, на нее могут влиять основные технологические параметры процесса – плотность пульпы, концентрация окислителя (Fe³⁺) и др. [11], поэтому представляет интерес сравнение скорости и эффективности селективного выщелачивания цинка и никеля из медно-цинкового и медно-никелевого некондиционных сульфидных концентратов растворами сульфата трехвалентного железа в различных условиях. В предыдущих работах было показано, что про-

цесс выщелачивания может эффективно осуществляться с помощью растворов сульфата трехвалентного железа, полученного микробным окислением [12, 13].

Цель работы – определение эффективности выщелачивания цветных металлов из медно-цинкового и медно-никелевого некондиционных сульфидных концентратов с помощью раствора сульфата трехвалентного железа, полученного с помощью биоокисления, в зависимости от параметров процесса.

МЕТОДИКА

Концентраты. Объектами исследований являлись медно-цинковый сульфидный концентрат руды Тарньерского месторождения (Свердловская область, Россия), а также медно-никелевый сульфидный концентрат руды месторождения Шануч (Камчатский край, Россия). Медно-цинковый концентрат содержал следующие сульфидные минералы: халькопирит, сфалерит, пирротин (Fe_{1-x}S), пирит (FeS₂) и молибденит (MoS₂). Нерудные минералы были представлены ярозитом, а также глинистыми разновидностями – иллитом, хлоритом и каолинитом. Медно-никелевый концентрат содержал халькопирит, пентландит, виоларит, пирротин, пирит, а также нерудные минералы – ярозит, плагиоклаз, хлорит, кварц. Содержание основных элементов и сульфидных минералов в концентратах представлено в табл. 1 и 2 соответственно.

Выщелачивающий раствор. Для приготовления выщелачивающих растворов для высокотемпературного выщелачивания была использована смешанная культура ацидофильных хемолитотрофных железнокислителей, включающая бактерии *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Leptospirillum* sp. Культура была выделена при 30°C из лежалых пиритных отходов обогащения сульфидных руд Гай-

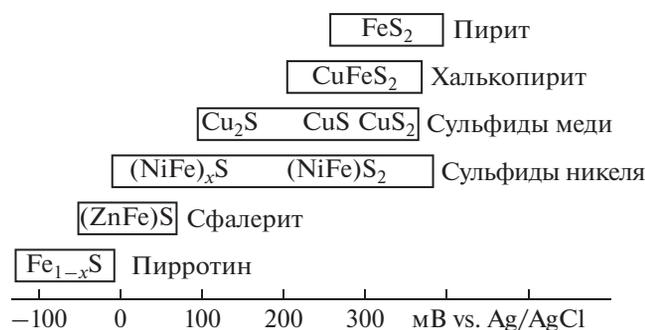


Рис. 1. Электродные потенциалы сульфидных минералов [10].

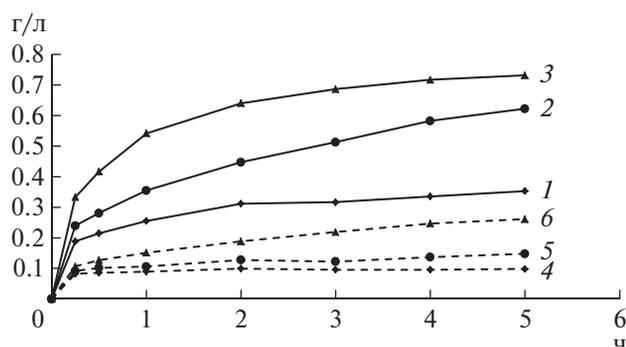


Рис. 2. Концентрация цинка (1–3) и меди (4–6) в жидкой фазе при выщелачивании медно-цинкового концентрата при 50 (1, 4), 65 (2, 5) и 80°C (3, 6), содержании твердой фазы в суспензии 1%, начальной концентрации Fe^{3+} 10 г/л и рН 1.15.

ского горно-обогатительного комбината (Оренбургская область, Россия). Выщелачивающий раствор был приготовлен путем биоокисления коммерческого реагента соли $FeSO_4 \times 7H_2O$ при 30°C в среде Сильвермана и Лундгрена 9К [14]. Величину рН на уровне 1.4 в процессе биоокисления поддерживали добавлением 98.5%-ной серной кислоты. Полученный раствор содержал 20 г/л Fe^{3+} . Этот раствор, либо растворы, полученные его разбавлением дистиллированной водой до необходимой концентрации Fe^{3+} , после добавления 98.5%-ной серной кислоты до рН 1.15 были использованы для окислительного высокотемпературного выщелачивания исследуемых концентратов.

Выщелачивание. Опыты проводили в реакторе объемом 500 мл, содержащем 200 мл суспензии, при перемешивании верхнеприводной четырехлопастной мешалкой (с наклоненными под углом 45° лопастями) с частотой 500 об./мин. Реактор был погружен в водяную баню для термостатирования на заданном уровне. Продолжительность выщелачивания составляла 5 ч.

Аналитические методы. Значения рН измеряли с помощью рН-метра рН-150МИ (“Измерительная

техника”, Россия). Концентрации Fe^{3+} и Fe^{2+} в жидкой фазе определяли титриметрическим методом с трилоном Б [15]. Концентрацию ионов меди, цинка и никеля определяли на атомно-абсорбционном спектрометре с пламенной атомизацией 3100 (“Perkin Elmer”, США).

Выход твердой фазы (%) определяли по формуле:

$$\gamma = \frac{m_{oc}}{m_{исх}} \times 100, \quad (5)$$

где m_{oc} – масса осадка (г) после биовыщелачивания, $m_{исх}$ – масса исходного концентрата (г) в выщелачиваемой суспензии.

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

$$\varphi = 100 - \frac{\beta_{oc}\gamma}{\beta_{исх}}, \quad (6)$$

где β_{oc} и $\beta_{исх}$ – содержание металла в осадке биовыщелачивания и исходном концентрате соответственно (%).

Скорость выщелачивания цветных металлов (г/(г·ч)) определяли по формуле:

$$\omega = \frac{\varphi}{100\tau}, \quad (7)$$

где τ – продолжительность выщелачивания (ч).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние температуры. Исследования по влиянию температуры на выщелачивание металлов из концентратов проводили при плотности пульпы 1%, рН 1.15 и начальной концентрации ионов Fe^{3+} 10.0 г/л. Результаты выщелачивания медно-цинкового и медно-никелевого концентратов при 50, 65 и 80°C представлены на рис. 2 и 3 соответственно.

Из данных рис. 2 следует, что скорость повышения концентрации цветных металлов в жидкой фазе значительно зависела от температуры, причем максимальная концентрация цинка была достигнута при 80°C и составила 731 мг/л, а меди – 261 мг/л. При этих же условиях (рис. 3) максимальная концентрация никеля составила 400 мг/л, а меди – 107 мг/л.

Анализ снижения концентрации ионов Fe^{3+} в результате взаимодействия с минералами показал, что при выщелачивании медно-цинкового концентрата при 50°C концентрация ионов Fe^{3+} в жидкой фазе снижалась с 10.0 до 7.25 г/л, при 65°C – до 6.23 г/л, а при 80°C – до 4.76 г/л. При выщелачивании медно-никелевого концентрата остаточная концентрация Fe^{3+} составила 8.46, 8.36 и 7.56 г/л соответственно. Эти данные свидетельствовали о том, что более активное выщела-

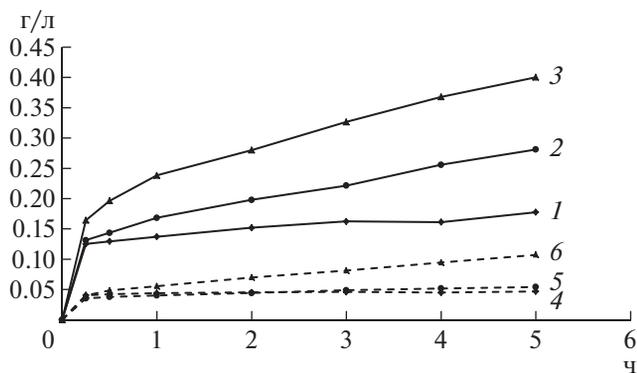


Рис. 3. Концентрация никеля (1–3) и меди (4–6) в жидкой фазе при выщелачивании медно-никелевого концентрата при 50 (1, 4), 65 (2, 5) и 80°C (3, 6), содержании твердой фазы в суспензии 1%, начальной концентрации Fe^{3+} 10 г/л и pH 1.15.

чивание цветного металла (цинка) связано с более активным восстановлением ионов Fe^{3+} , то есть снижением его концентрации в процессе выщелачивания.

Следует отметить, что медь находилась в составе минерала халькопирита в обоих концентратах и содержание ее было сходным. Однако из медно-цинкового концентрата она выщелачивалась лучше, чем из медно-никелевого, что может быть объяснено как различием свойств халькопирита в разных концентратах, так и гальваническим взаимодействием между минералами, образующих в том числе пару халькопирит-пирит для медно-цинкового концентрата и халькопирит-пирротин/пентландит для медно-никелевого концентрата. Так как с повышением температуры эф-

фективность выщелачивания увеличивалась, все последующие опыты были проведены при 80°C.

Влияние содержания твердой фазы в суспензии. Исследования по влиянию плотности пульпы на выщелачивание металлов из концентратов проводили при 80°C, pH 1.15, концентрации ионов Fe^{3+} 10.0 г/л и плотности пульпы 1 и 3%. Результаты выщелачивания представлены на рис. 4 и 5.

Из рис. 4 следует, что при плотности 1% концентрация ионов трехвалентного железа снижалась ~ на 50%, а извлечение цинка при этом достигало 99.5%. При плотности 3% основное количество железа потреблялось за 2 ч, поэтому за оставшиеся 3 ч извлечение цинка не возрастало и оставалось на уровне 74.2%. Следует отметить, что на извлечение меди плотность пульпы не оказывала существенного влияния и оно составило 22.4–25.8%.

Из рис. 5 следует, что при плотности 1% концентрация ионов трехвалентного железа снижалась почти на 25%, а извлечение никеля при этом составило 42.4%. Повышение плотности твердой фазы до 3% увеличивало потребление ионов Fe^{3+} более чем в 2 раза, но извлечение никеля снижалось на 12.6% и составило 29.8%. На извлечение меди плотность суспензии не оказывала влияния, и оно оставалось низким (7.5–9.8%). Выход осадка выщелачивания не зависел от плотности пульпы и составил для медно-цинкового концентрата 73.5% при плотности пульпы 1% и 75.0% — при 3%, а для медно-никелевого 79.5 и 82.5% соответственно.

Влияние концентрации окислителя в выщелачивающем растворе. Для проведения исследований были выбраны следующие концентрации ионов трехвалентного железа в выщелачивающем рас-

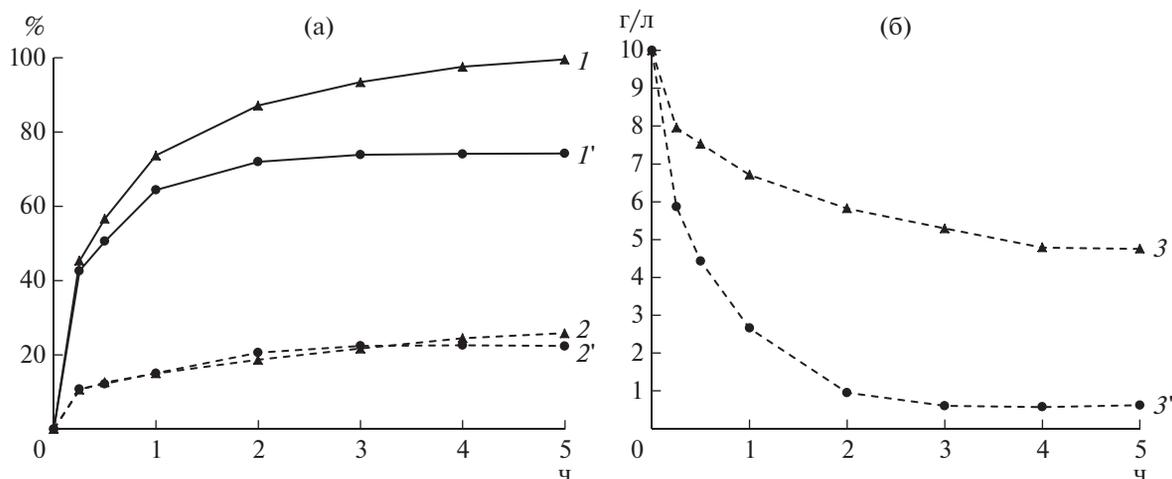


Рис. 4. Извлечение цинка (1, 1'), меди (2, 2') (а) и концентрация Fe^{3+} (3, 3') в жидкой фазе (б) при выщелачивании медно-цинкового концентрата и содержании твердой фазы в суспензии 1% (1, 2, 3) и 3% (1', 2', 3') при 80°C и начальной концентрации Fe^{3+} 10 г/л, pH 1.15.

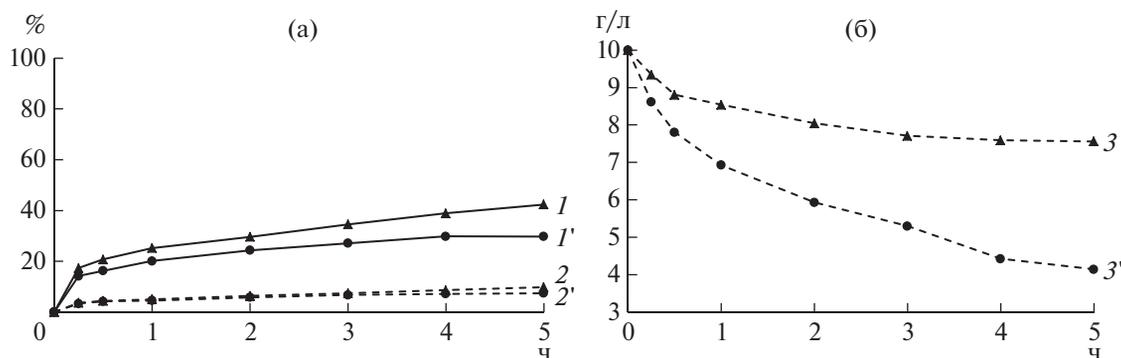


Рис. 5. Извлечение никеля (1, 1') и меди (2, 2') (а) и концентрация Fe³⁺ (3, 3') в жидкой фазе (б) при выщелачивании медно-цинкового концентрата при содержании твердой фазы в суспензии 1% (1, 2, 3) и 3% (1', 2', 3') 80°C, начальной концентрации Fe³⁺ 10 г/л, pH 1.15.

творе: 5, 10 и 20 г/л при плотности пульпы 1% и выщелачивании при 80°C и pH 1.15. На рис. 6 приведена динамика изменения концентрации цинка и меди при выщелачивании медно-цинкового концентрата, а на рис. 7 — никеля и меди при выщелачивании медно-никелевого концентрата при различных концентрациях ионов Fe³⁺.

Из рис. 6 и 7 следует, что концентрация трехвалентного железа не оказывала влияния на выщелачивание меди как из медно-цинкового, так и из медно-никелевого концентратов. Выщелачивание цинка было сходным при концентрации трехвалентного железа 10 и 20 г/л и снижалось при снижении концентрации железа до 5 г/л. Выщелачивание никеля из медно-никелевого концентрата было максимальным при использовании выщелачивающего раствора, содержащего 10 г/л трехвалентного железа.

Извлечение металлов и выход осадка при выщелачивании концентратов при различной кон-

центрации окислителя представлены в табл. 3. Из данных следует, что повышение концентрации окислителя Fe³⁺ от 10 до 20 г/л приводило к значительному повышению выхода осадка выщелачивания — на четверть для обоих концентратов, что свидетельствовало о выпадении осадка трехвалентного железа (очевидно, в виде труднорастворимого ярозита) и приводило к потере его качества.

Таким образом, оптимальной концентрацией окислителя была концентрация Fe³⁺ в выщелачивающем растворе, равная 10 г/л.

Анализ результатов показал, что выщелачивание цинка из медно-цинкового концентрата было значительно эффективнее выщелачивания никеля из медно-никелевого за то же время. Однако стоит отметить, что эффект селективного выщелачивания никеля из никелевых минералов по сравнению с медью из медных минералов подтвердился и для медно-никелевого концентрата.

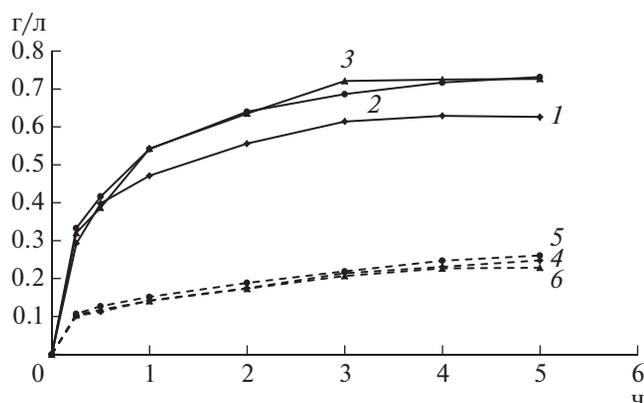


Рис. 6. Концентрация цинка (1–3) и меди (4–6) в жидкой фазе при выщелачивании медно-цинкового концентрата при начальной концентрации Fe³⁺ 5 (1, 4), 10 (2, 5) и 20 г/л (3, 6) 80°C, содержании твердой фазы в суспензии 1%, pH 1.15.

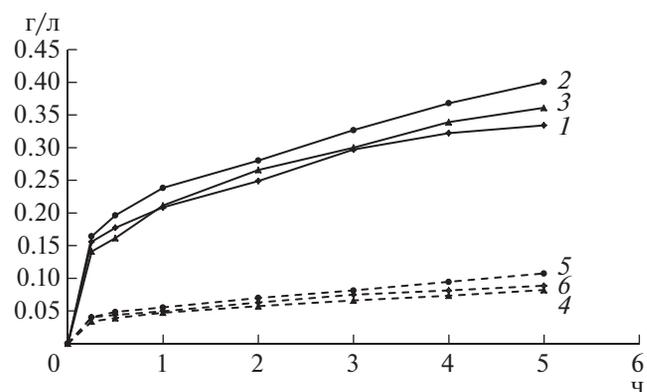


Рис. 7. Концентрация никеля (1–3) и меди (4–6) в жидкой фазе при выщелачивании медно-никелевого концентрата при начальной концентрации Fe³⁺ 5 (1, 4), 10 (2, 5) и 20 г/л (3, 6), 80°C, содержании твердой фазы в суспензии 1%, pH 1.15.

Таблица 3. Основные результаты исследований высокотемпературного выщелачивания медно-никелевого и медно-цинкового концентратов при 80°C, pH 1.15

Концентрация Fe ³⁺ , г/л	Медно-цинковый концентрат			Медно-никелевый концентрат		
	выход осадка, %	извлечение, %		выход осадка, %	извлечение, %	
		Zn	Cu		Ni	Cu
5	64.5	85.2	24.5	76.0	35.4	8.1
10	73.5	99.5	25.8	79.5	42.4	9.8
20	102	98.9	22.6	105.0	38.2	7.5

Максимальное извлечение как цинка из медно-цинкового концентрата (99.5%), так и никеля из медно-никелевого концентрата (42.4%) наблюдались при следующих условиях: 10 г/л Fe³⁺ в выщелачивающем растворе, 80°C и плотность пульпы 1%. При этом извлечение меди оставалось относительно низким и составляло 25.8 и 9.8% соответственно. Большее извлечение меди при выщелачивании медно-цинкового концентрата могло быть связано как с различными физико-химическими характеристиками халькопирита из разных месторождений, так и наличием кратно большего количества пирита. Например, ранее были показаны различия в эффективности окисления пирита разных месторождений культурами ацидофильных микроорганизмов, различавшегося, по мнению авторов, физическими, химическими и электрофизическими характеристиками [16, 17]. Во многих исследованиях было показано увеличение интенсивности окисления халькопирита при добавлении пирита, что в результате привело к разработке промышленного процесса Galvanox® [18]. Ранее также было показано увеличение скорости (био)выщелачивания сфалерита при увеличении доли халькопирита в сульфидном концентрате [19–21].

В табл. 4 представлена средняя скорость выщелачивания меди, цинка и никеля из сульфидного сырья, содержащего сфалерит, халькопирит и/или виоларит/пентландит, полученная в исследованиях различных авторов. Из табл. 4 видно, что средняя скорость выщелачивания цинка находилась преимущественно в диапазоне 0.19–0.36 г/(г·ч) в зависимости от условий опыта. Низкая средняя скорость выщелачивания цинка, полученная в работе [24], связана с большой длительностью процесса (10 ч) с целью выщелачивания халькопирита и достижения почти полного выщелачивания сфалерита задолго до его окончания. Выщелачивание никеля из пентландит/виоларитового сырья протекало со значительно меньшей скоростью – 0.052–0.085 г/(г·ч), что, вероятно, объяснялось образованием слоя элементарной серы на поверхности минералов, препятствующего доступу окислителя [26]. Низкая скорость выщелачивания никеля в исследовании [27] связана с проведением опыта в колбах на

роторной качалке, массообменные характеристики которых существенно хуже по сравнению с таковыми в реакторах с механическим перемешиванием. Средняя скорость выщелачивания меди из халькопирита составляла 0.023–0.067 г/(г·ч), при этом во всех исследованиях наблюдалось сильное замедление выщелачивания меди со временем за счет пассивации поверхности минерала. Анализ скорости выщелачивания цветных металлов из сульфидного сырья показал перспективность селективного удаления сфалерита из халькопирит-сфалеритовых концентратов при выщелачивании в растворе сульфата трехвалентного железа. Использование предложенного способа удаления никеля из медно-никелевого сульфидного сырья сдерживается низкой скоростью выщелачивания никеля и может быть перспективным для медного сульфидного сырья с низким содержанием никеля.

По уравнениям химических реакций (1–4) был рассчитан стехиометрический расход трехвалентного железа на окисление всех сульфидных минералов цветных металлов (учитывая степень их окисления), находящихся в концентратах. Расчеты показали, что для медно-цинкового концентрата этот расход составил 6.5 г/л, а для медно-никелевого – 2.75 г/л, тогда как фактический расход составил 5.25 и 2.44 г/л соответственно. Небольшая разница между теоретическим и фактическим значениями в обоих случаях свидетельствовала о частичном кислотном растворении сульфидных минералов (видимо, преимущественно пирротина [28, 29]) и об отсутствии интенсивного образования ярозита, приводящего к связыванию ионов трехвалентного железа.

Расчеты показали, что осадок выщелачивания медно-цинкового концентрата содержал 0.05% цинка и 10.2% меди. Осадок, полученный после выщелачивания медно-никелевого концентрата содержал 12.4% меди и 6.86% никеля. Таким образом, количество меди в нем повышалось на 1.47%, а никеля снижалось на 2.59% по сравнению с исходным концентратом.

Таким образом, показано, что основные закономерности, полученные при выщелачивании медно-цинкового концентрата, сохранялись и при выщелачивании медно-никелевого концентрата. Ни-

Таблица 4. Средняя скорость выщелачивания цветных металлов из сульфидного сырья в растворах сульфата трехвалентного железа в реакторе в периодическом режиме

Выщелачиваемый материал (содержание, %)	Средняя скорость выщелачивания, г/(г·ч)			Условия опыта	Источник
	Zn	Ni	Cu		
Сфалерит-халькопиритовый концентрат (Zn 7.36, Cu 10.1, Fe 36.1)	0.20	—	0.051	80°C, 10 г/л Fe ³⁺ , 1% твердой фазы, pH 1.3, 500 об/мин, 5 ч	Настоящее исследование
Халькопирит-сфалеритовый концентрат (Zn 17.0, Cu 14.8, Fe 26.9)	0.19	—	0.040	80°C, 12 г/л Fe ³⁺ , 1% твердой фазы, pH 1.25, 800 об/мин, 5 ч	[22]
Халькопирит-содержащий сфалеритовый концентрат (Zn 42.8, Cu 2.1, Fe 9.9)	0.36	—	0.067	80°C, 28 г/л Fe ³⁺ , 5% твердой фазы, 0.5M H ₂ SO ₄ , 350 об/мин, 2.7 ч	[23]
Сфалерит-содержащий халькопиритовый концентрат (Zn 2.8, Cu 22.2, Fe 30.9)	0.10	—	0.030	80°C, 12 г/л Fe ³⁺ , 1% твердой фазы, pH 1.25, 800 об/мин, 10 ч	[24]
Сфалерит-халькопиритовый концентрат (Zn 8.47, Cu 4.92, Fe 34.6)	0.25	—	—	80°C, 10 г/л Fe ³⁺ , 2% твердой фазы, pH 1.25, 600 об/мин, 3.3 ч	[25]
Пентландит-виоларит-халькопиритовый концентрат (Ni 9.45, Cu 10.9, Fe 21.3)	—	0.085	0.023	80°C, 10 г/л Fe ³⁺ , 1% твердой фазы, pH 1.3, 500 об/мин, 5 ч	Настоящее исследование
Пирротиновые хвосты флотации (Ni 1.0, Cu 0.2, Fe 42.5)	—	0.052	—	80°C, 10 г/л Fe ³⁺ , 0.5% твердой фазы, pH 0.65, 600 об/мин, 10 ч	[26]
Пентландитовый концентрат (Ni 30.6, Cu 0.5, Fe 32.3)	—	0.025	—	80°C, 14 г/л Fe ³⁺ , 10% твердой фазы, 2M H ⁺ , в колбах при 400 об/мин, 4 ч	[27]

Примечание: “—” — неприменимо.

кель, как и цинк, преимущественно переходил в раствор, а медь концентрировалась в твердой фазе. Однако из-за большей стойкости пентландита в сернокислых растворах трехвалентного железа по сравнению со сфалеритом эффективность выщелачивания никеля была ниже, чем цинка.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 18-29-24103.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алгебраистова Н.К., Маркова А.С., Прокопьев И.В., Развязная А.В. // Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журн.). 2016. № 1. С. 187–195.
2. Абрамов А.А. Флотационные методы обогащения: учебник для вузов. М.: Издательство “Горная книга”, 2016. 595 с.
3. Brierley C., Brierley J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 97. № 17. P. 7543–7552.
4. Olson G., Brierley J., Brierley C. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 63. № 3. P. 249–257.
5. Fomchenko N., Muravyov M. // Hydrometallurgy. 2017. V. 174. P. 116–122.

6. Mahmoud A., Cezac P., Hoadley A.F.A., Contamine F., D'Hugues P. // *Int. Biodeter. Biodegr.* 2017. V. 119. P. 118–146.
7. O'Connor G., Eksteen J. // *Minerals Engineering.* 2020. 154. № 106401.
8. Zhao H., Zhang Y., Zhang X., Qian L., Sun M., Yang Y., Wang J., Kim H., Qiu G. // *Minerals Engineering.* 2019. V. 136. P. 140–154.
9. Batty J., Rorke G. // *Hydrometallurgy.* 2006. V. 83. № 1–4. P. 83–89.
10. Riekkola-Vanhanen M., Heimala, S. // *International Biohydrometallurgy Symposium. Proceed. V. 1. Jackson Hole: TMS, 1993. P. 561–570.*
11. Levenspiel O. *Chemical Reaction Engineering.* 2nd Ed. N.Y.: Wiley, 1972. 578 p.
12. Муравьев М.И., Фомченко Н.В. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2019. Т. 55. № 4. С. 396–402.
13. Фомченко Н.В., Муравьев М.И. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2017. Т. 53. № 1. С. 82–87.
14. Silverman M.P., Lundgren D.G. // *J. Bacteriol.* 1959. V. 77. № 5. P. 642–647.
15. Davis D.G., Jacobsen W.R. // *Anal. Chem.* 1960. V. 32. № 2. P. 215–217.
16. Тупикина О., Kondrat'eva T., Samorukova V., Rassulov V., Karavaiko G. // *Hydrometallurgy.* 2006. V. 83. № 1–4. P. 255–262.
17. Тупикина О.В., Саморукова В.Д., Кондратьева Т.Ф. // *Микробиология.* 2009. Т. 78. № 2. С. 202–212.
18. Dixon D., Mayne D., Baxter K. // *Can. Met. Q.* 2008. V. 47. № 3. P. 327–336.
19. Fomchenko N., Uvarova T., Muravyov M. // *Minerals Engineering.* 2019. V. 138. P. 1–6.
20. Fomchenko N., Muravyov M. // *Hydrometallurgy.* 2019. V. 185. P. 82–87.
21. Фомченко Н.В., Муравьев М.И. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2020. Т. 56. № 4. С. 366–372.
22. Carranza F., Palencia I., Romero R. // *Hydrometallurgy.* 1997. V. 44. № 1–2. P. 29–42.
23. Santos S.M.C., Machado R.M., Correia M.J.N., Reis M.T.A., Ismael M.R.C., Carvalho J.M.R. // *Miner. Eng.* 2010. V. 23. № 8. P. 606–615.
24. Carranza F., Iglesias N., Mazuelos A., Palencia I., Romero R. // *Hydrometallurgy.* 2004. V. 71. № 3–4. P. 413–420.
25. Lorenzo–Tallafigo J., Iglesias–Gonzalez N., Romero R., Mazuelos A., Carranza F. // *Minerals Engineering.* 2018. V. 125. P. 50–59.
26. Garg S., Judd K., Mahadevan R., Edwards E., Papangelakis V. // *Can. Met. Q.* 2017. V. 56. № 4. P. 372–381.
27. Corrans I.J., Scholtz M.T. // *J. South African Inst. Min. Met.* 1976. № 10. P. 403–411.
28. Wang H. // *Miner. Proc. Extr. Met. Rev.* 2007. V. 29. № 1. P. 1–41.
29. Zhang Y., Zhao H., Qian L., Sun M., Lv X., Zhang L., Petersen J., Qiu G. // *Minerals Engineering.* 2020. V. 158. № 106586. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2020.106586>

Ferric Leaching of Bulk Sulfidic Concentrates with Biologically Generated Solution

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

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

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

The leaching of nonferrous metals from copper-zinc and copper-nickel sulfidic concentrates with a ferric sulfate solution obtained via microbial oxidation of ferrous sulfate was studied under different conditions (temperature, pulp density, and oxidant concentration). The highest concentration of nonferrous metals in the liquid phase was reached at 80°C. The pulp density was shown to have no significant effect on copper leaching, although its increase from 1 to 3% decreased the extraction of zinc and nickel into the liquid phase. The study of the effect of the oxidant (Fe³⁺) concentration indicated that the recovery of zinc and nickel reached its maximum at 10 g/L of Fe³⁺. In all modes studied, zinc was released into the liquid phase more efficiently than nickel; however, copper was predominantly concentrated in the residues of both concentrates. The contents of zinc and nickel were shown to decrease from the initial values of 7.36 and 9.45% to 0.05 and 6.86% in the leach residues, respectively, while the copper content increased in both cases. The proposed method for the selective mineral leaching from bulk concentrates may be considered a process step to improve the grade of sulfidic concentrates.

Keywords: sulfidic concentrate, chalcopyrite, sphalerite, pentlandite, violarite, biohydrometallurgy, leaching

УДК 579.6

ВЛИЯНИЕ ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА РОСТ КОЛОНИЙ И РАЗМНОЖЕНИЕ КЛЕТОК ЭНДОФИТНОГО ШТАММА БАКТЕРИЙ *Bacillus subtilis* 26Д

© 2021 г. Е. Р. Сарварова¹, Р. М. Хайруллин¹, *, И. В. Максимов¹

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: krm62@mail.ru

Поступила в редакцию 26.08.2020 г.

После доработки 24.12.2020 г.

Принята к публикации 22.02.2021 г.

В стрессовых условиях, в том числе в ответ на инфицирование фитопатогенами, растения вырабатывают различные соединения, являющиеся активаторами роста, например, оксикоричные кислоты (ОК), в том числе феруловую кислоту (ФК). Роль ОК во взаимоотношениях растений с эндофитными бактериями детально не исследована. В работе изучали влияние ФК в пределах концентраций 1.0–1000 мкг/л на размножение и рост эндофитного штамма *Bacillus subtilis* 26Д на агаризованных и жидких средах. Установлено, что на 1.5%-ной агаризованной среде ФК подавляла, а при меньшей концентрации агара (0.7%) увеличивала размеры бактериальных колоний. В жидкой среде ФК стимулировала размножение клеток бактерий. Показано, что бактерии штамма *B. subtilis* 26Д способны к деградации ФК.

Ключевые слова: эндофитный штамм *Bacillus subtilis* 26Д, феруловая кислота, рост и размножение бактерий, подвижность

DOI: 10.31857/S0555109921040140

В настоящее время не вызывает сомнений, что присутствие во внутренних тканях растений микроорганизмов может благоприятно влиять на рост и устойчивость организма-хозяина. Такие бактерии, проникающие во внутренние растительные ткани без повреждений, вызванных воздействием каких-либо других факторов, и способные жить внутри растений, не нанося им вреда, относят к эндофитам [1]. Ценным свойством эндофитных бактерий, позволяющим использовать их в защите растений, является их способность к синтезу антибиотических соединений, ингибирующих рост и размножение фитопатогенов, а также индукции защитных реакций самого растения [2].

Хорошо известно, что одной из универсальных защитных реакций растений при патогенезе является формирование в растительных тканях сложного полимера лигнина из мономерных фенольных соединений, создающего своеобразный защитный барьер на пути распространения инфекции. Ключевым фенольным компонентом, укрепляющим клеточные стенки растений, является оксикоричная феруловая кислота (ФК) [3]. При этом сами фенольные соединения, вовлекающиеся в лигнификацию, способны непосредственно подавлять

рост фитопатогенных грибов и выступать в роли природных пестицидов [4]. В этой связи возникает вопрос, как влияют подобные фенольные соединения на самих эндофитов, так как по аналогии с действием на фитопатогены, эти вещества могут подавлять рост и размножение мутуалистических эндофитных бактерий.

Анализ работ, посвященных изучению действия оксикоричных кислот (ОК) на бактерии, свидетельствует о том, что эти соединения по отношению к некоторым видам микроорганизмов проявляют антимикробное действие. Авторы работы [5] наблюдали подавление роста бактерий *Escherichia coli* DMF 7503, *Bacillus cereus* DMF 2001, *Listeria monocytogenes* DMF 5776 под действием ФК. Такой эффект Боргес с соавт. [6] объяснили влиянием ОК на физико-химические свойства внешних структур бактериальных клеток, поверхностный заряд, целостность бактериальной цитоплазматической мембраны. Вместе с тем у представителей *Bacillus subtilis* обнаружена способность использовать ФК в качестве единственного источника углерода [7].

Бактерии рода *Bacillus* довольно часто встречаются среди эндофитов [8]. В связи с этим возникает вопрос, как ФК могут влиять на рост и раз-

множение эндофитных представителей рода *Bacillus*. Работы, отвечающие на данный вопрос, в известной нам литературе не найдены.

Цель работы – исследование влияния ФК в концентрациях, близких к содержанию в ризосфере растений, на рост на агаризованных средах и в жидкой культуре эндофитного штамма бактерий *B. subtilis* 26Д – основы хорошо известного коммерческого фунгицида Фитоспорин-М.

МЕТОДИКА

В экспериментах использовали ФК (*trans-ferulic acid*, 99%) компании “Sigma-Aldrich” (США). Для изучения влияния кислоты на рост колоний штамма *B. subtilis* 26Д (коллекция ВНИИСХМ, №128) использовали агаризованную среду LB (Luria Bertani), следующего состава (%): триптон – 1.0, дрожжевой экстракт – 0.5, хлорид натрия – 1.0, картофельно-глюкозный отвар (КГА, отвар картофеля – 200 г/л) – 200 мл, глюкоза – 20, вода дистиллированная 1 л, агар-агар – 1.5, а также полусинтетическую среду (ПСС), состав которой приведен в работе [9].

Для инокуляции твердых сред использовали жидкие 24-часовые культуры. ФК в асептических условиях растворяли в стерильных пробирках в 96%-ном этаноле и выдерживали 60 мин в темноте для исключения возможной полимеризации из-за образования на свету свободных радикалов. Раствор вносили в незаствывшую агаризованную среду с температурой 45°C и перемешивали для равномерного распределения кислоты. При этом объем вносимого этанола был одинаков во всех вариантах эксперимента.

Влияние ФК на рост колоний на плотных средах и его характер изучали в нескольких экспериментах. В одной серии на каждую чашку Петри, содержащую определенную концентрацию кислоты в питательной среде (1.5% агара), наносили по 5 мкл суспензии 24-часовой бактериальной культуры в 6 повторностях. Чашки помещали в термостат и инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C. Для оценки диаметра колоний измеряли два перпендикулярных диаметра, из 12 замеров рассчитывали средний диаметр в мм.

В другой серии экспериментов одновременно определяли возможность распространения колонии бактерий по типу скольжения по поверхности полутвердой среды (0.7% агара) с содержанием 5 мМ KCl [10], на этой же среде выясняли наличие хемотаксиса, используя метод, описанный в работе [11]. Для этого в чашку Петри вначале заливали питательную среду с содержанием ФК в концентрации 10, 100, или 1000 мкг/л, формируя скошенную поверхность наклоном чашки. После затвердевания первой среды, чашку ставили горизонтально и наливали питательную среду без

ФК, формируя горизонтальную поверхность, под которой оставалась скошенная среда, концентрация ФК в которой менялась от 0 до 10 или 100, или 1000 мкг/л. В центр чашки Петри на поверхность наносили суспензию клеток бактерий, культивировали при 37°C 24 ч, характер роста колонии оценивали визуально. При наличии хемотаксиса форма колонии должна быть вытянутой в сторону увеличения концентрации испытуемого вещества.

Так как ФК могла неравномерно диффундировать в скошенной среде, для оценки характера распределения ее концентрации в чашке Петри формировали среду, как описано в работе [11], но используя при этом чистый 1.5%-ный агар. Чашку выдерживали 24 ч в термостате при 37°C, затем вырезали три цилиндрических блока равной массы: по краям чашки с минимальной и максимальной концентрацией ФК, а также в центре. ФК в вырезанных образцах экстрагировали 96%-ным этанолом. Оптическую плотность (ОП) растворов при 311 нм определяли на спектрофотометре UNICO 2000 (“United Products & Instruments”, США). Установлено, что через 24 ч градиент концентрации ФК в среде сохранялся: при концентрациях ФК в среде 0 и 1000 мкг/л ОП была 0.005 и 0.090, в среде в центре чашки Петри 0.05.

Для оценки влияния ФК на рост бактерий в жидкой культуре LB в каждую колбу с равным объемом среды и определенной концентрации кислоты добавляли по 100 мкл суспензии 24-часовой бактериальной культуры. Колбы (три повторности для каждого варианта) помещали в термостатируемый шейкер и инкубировали 24 ч при 37°C. Концентрацию клеток определяли по ОП суспензии на спектрофотометре Bio-Rad SmartSpec Plus (“Bio-Rad Laboratories”, США) при длине волны 600 нм и оценивали, сравнивая со стандартом мутности.

Способность бактерий *B. subtilis* 26Д продуцировать ферменты деструкции ФК оценивали спектрофотометрически по методу, предложеному в работе [12].

Культуру клеток *B. subtilis* 26Д выращивали 12 ч на жидкой среде LB с ФК в концентрации 100 мкг/л при 37°C. Клетки отделяли центрифугированием при 5000 g, промывали трижды раствором 70 мМ фосфатно-солевого буфера (ФБС, 0.15 М NaCl в натрий-фосфатном буфере, рН 6.0) и ресуспендировали в объеме, в 5 раз меньшем, по сравнению с исходным объемом культуры. Затем клетки ресуспендировали в ФБС до половины исходного объема культуры. Суспензию клеток делили на 2 части. Одну часть (контроль) – прогревали при 100°C на кипящей водяной бане 5 мин, вторую использовали для оценки активности ферментов, разрушающих ФК. К 9.8 мл каждой из суспензий добавляли 0.2 мл раствора ФК (10 мг в 1 мл 96%-ного этанола). Реакционную смесь

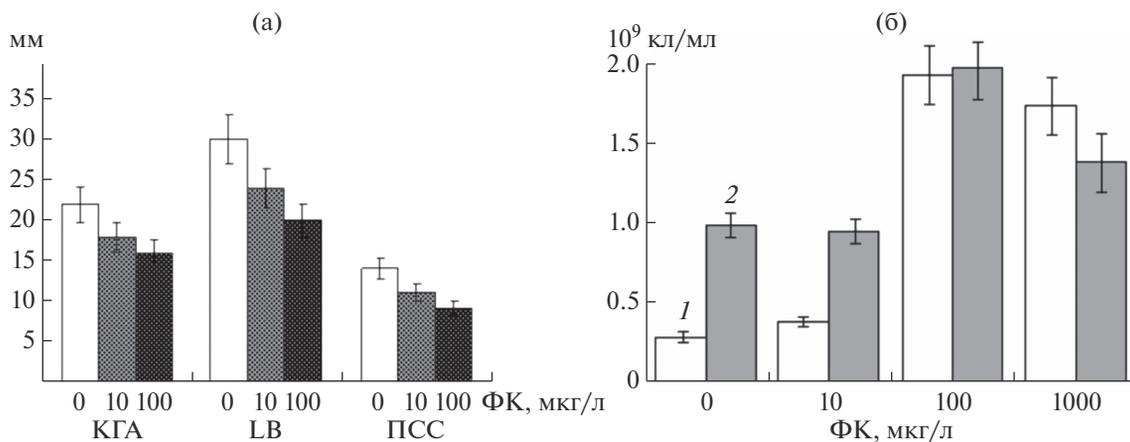


Рис. 1. Влияние феруловой кислоты на рост колоний *B. subtilis* 26Д (мм) на агаризованных средах КГА, LB и ПСС (а) и на размножение клеток (10^9 кл./мл) в жидкой среде LB (б): 1 – 24; 2 – 48 ч.

выдерживали при температуре 30°C на качалке 120 мин, отбирали 1 мл пробы и отделяли клетки центрифугированием. К 200 мкл супернатанта добавляли 2.8 мл ФБС и определяли спектр поглощения в диапазоне от 250 до 400 нм на спектрофотометре UNICO 2000.

Статистическая обработка результатов экспериментов проведена с использованием программы Excel Microsoft. На гистограммах вертикальными линиями указаны пределы значений стандартных отклонений от среднего значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что ФК, как и другие ОК, находится в растительных тканях в связанной форме в структуре лигнина [3]. Однако, по данным Ву с соавт. [13], она может выделяться в окружающую среду в виде *цис*-формы, в среднем, в концентрации 2.3 мкг/л, в *транс*-форме – 10.2 мкг/л. На основании этих данных в работе использовали концентрации ФК 10 и 100 мкг/л, а в некоторых экспериментах и 1000 мкг/л.

На агаризованной богатой среде LB (1.5% агара) бактерии росли лучше, и ожидаемо хуже на обедненной белками минеральной среде ПСС (рис. 1а). В присутствии ФК рост колоний бактерий подавлялся на всех изученных средах, достоверно при концентрации ФК 100 мкг/л.

При культивировании микроорганизмов в жидкой питательной среде выявлен обратный эффект действия ФК на размножение бактерий (рис. 1б). Например, при концентрации ФК 100 мкг/л наблюдалось шестикратное увеличение плотности клеток по сравнению с контрольной средой.

Ингибирование роста колоний на плотной среде могло быть связано с описанным ранее Боргес с соавт. [6] непосредственным влиянием ФК не

только на поверхностный заряд клетки и целостность цитоплазматической мембраны, но и на подвижность бактерий. Известно, что бактерии используют различные двигательные механизмы для колонизации окружающей среды, такие как жгутико-зависимое плавание и роение, а также жгутико-независимое скольжение. В работе Р. Херши [14] указывает, что скользящая подвижность является пассивным способом перемещения бактериальных клеток для распространения по поверхностям. Наименее исследованы механизмы скольжения бактерий – движения клеточной массы силой пролиферации клеток на среде с поверхностью, уменьшающей трение между клетками и субстратом [15].

Для исследования возможности распространения бактерий по поверхности твердой среды по типу скольжения и, одновременно, возможно, благодаря хемотаксису, использовали полутвердую среду LB (0.7% агара) с градиентом ФК, сформированном как описано в разделе “Методика”. Выявлено, что на такой среде с ФК размеры колоний бактерий многократно увеличивались (рис. 2). При этом не было выявлено преимущественного роста колоний в сторону увеличения концентрации ФК – колонии формировались правильной круглой формы. На среде LB без ФК клетки формировали типичные для штамма *B. subtilis* 26Д сухие, морщинистые колонии с четко очерченными фестончатыми краями. На среде с ФК колонии “расплывались”, края были нечеткими, лучистыми, превышающими диаметр колоний на контрольной среде без ФК от полутора до двух раз.

Поскольку в жидкой среде ФК стимулировала размножение клеток бактерий, можно предположить, что это соединение способно выступать не только как регулятор скольжения, но и как питательный субстрат или регулятор размножения, несмотря на незначительную концентрацию в среде.

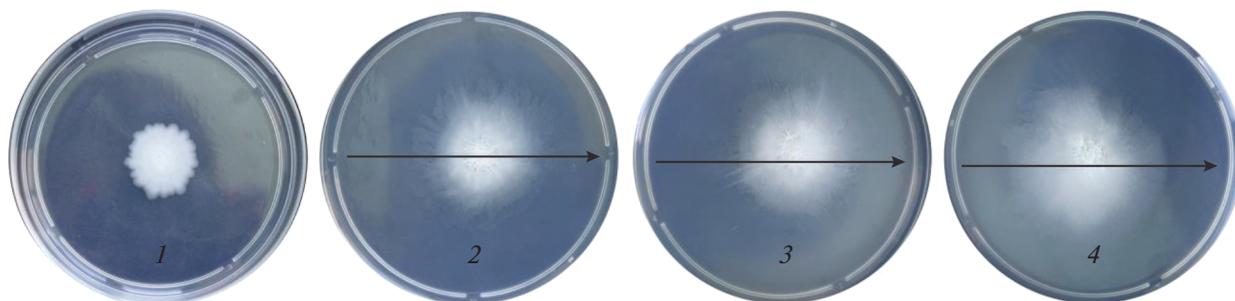


Рис. 2. Форма колоний *B. subtilis* 26Д на полутвердой среде с градиентом концентрации ФК. Стрелкой показано направление увеличения концентрации ФК в среде: контроль (1), 0–10 (2), 0–100 (3) и 0–1000 мкг/л (4).

Известно, что некоторые штаммы *B. subtilis* способны к деструкции ОК благодаря наличию гена, кодирующего синтез декарбоксилазы фенольных кислот (PAD, phenolic acid decarboxylase) [16], транскрипционно регулируемой кумаровой, феруловой или кофейной кислотами [17].

На основе этих данных проведен анализ наличия у бактерий штамма *B. subtilis* 26Д ферментативной активности, способной привести к деструкции ФК. Для этого оценивали изменение спектра поглощения ФК в среде с живыми и инактивированными клетками бактерий (рис. 3). Спектры поглощения исходных растворов ФК без клеток бактерий (рис. 3, 1), а также в суспензии живых клеток бактерий (рис. 3, 2) совпадали. Уменьшение показателя поглощения в суспензиях клеток можно объяснить частичной адсорбцией этого соединения на стенках клеток. Двухчасовая инкубация ФК с живыми клетками в течение 2 ч меняла спектр поглощения ФК, что согласовывалось с результатами работы [12], объясняющими этот эффект деструкцией вещества. Спектр поглощения ФК при инкубировании в среде с инактивированным ферментом не изменялся. Таким образом, установлено, что бактерии штамма были способны метаболизировать ФК.

Результаты эксперимента по исследованию возможности деструкции ФК клетками бактерий *B. subtilis* 26Д могут свидетельствовать о том, что, несмотря на заявленную чистоту вещества, при проведении экспериментов часть ФК изомеризовалась в *цис*-форму, так как спектр поглощения смешался в коротковолновую область (рис. 3) [18]. Результаты анализа различных форм ФК в растениях показали, что в растительных тканях присутствуют обе формы кислоты при преобладании *транс*-изомера, при этом *цис*-изомер ФК способен ингибировать рост растений [19]. Таким образом, деструкция ФК эндофитным штаммом бактерий *B. subtilis* 26Д, особенно *цис*-изомера, может приводить к уменьшению концентрации этой формы, ингибирующей рост растений, что согласуется с данными о стимуляции роста раз-

личных сельскохозяйственных культур этой бактерией [1].

Подавление ФК роста колоний бактерий на твердых средах (1.5% агара, рис. 1а) было показано также другими авторами на других видах бактерий [5, 6]. В отличие концентраций ФК, использованных в цитируемых литературных источниках, в настоящей работе исследованы концентрации, близкие к выявленным при секреции ФК корнями растений в окружающую среду [14]. В результате поиска и анализа литературы не было найдено работ, в которых исследовали действие на бактерии ФК или других ОК в концентрациях, совпадающих с наблюдаемыми в ризосфере растений, что позволяет считать полученные результаты приоритетными. Способность бактерий к деструкции ФК описана [16, 17], однако ее влияние на свой-

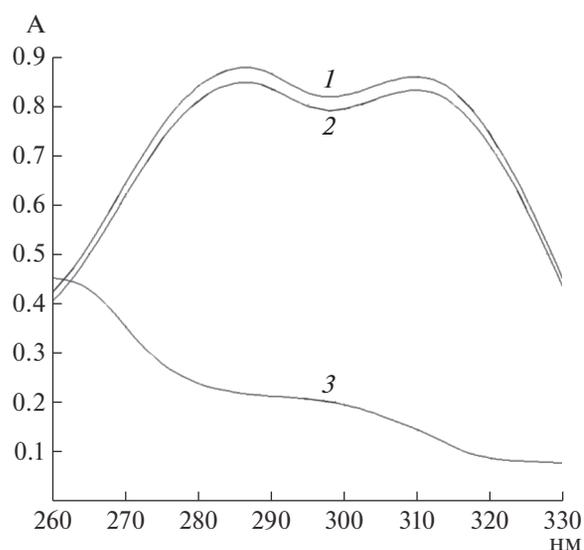


Рис. 3. Изменение спектра поглощения ФК в среде с клетками *B. subtilis* 26Д: 1 – спектр поглощения ФК с живыми клетками в начале реакции; 2 – спектр поглощения ФК после инкубации клеток 120 мин в среде с инактивированными клетками; 3 – то же в среде с живыми клетками.

ства бактерий не только эндофитных, но и других штаммов в связи с их взаимоотношениями с растениями не рассматривалось.

В настоящее время функциональная роль ФК, как одного из ключевого соединения в структуре клеточной стенки растений [3], детально исследована. Хорошо известно, что ОК являются структурными компонентами лигнина – сложного полимера, входящего в состав клеточных стенок растений. Лигнин весьма плохо поддается деструкции ферментами микроорганизмов, поэтому его считают своеобразным защитным барьером в растительной клетке на пути проникновения инфекционных структур фитопатогенов. Активный синтез лигнина наблюдался при поранении растительных тканей, а также атаке грибных и бактериальных фитопатогенов [20]. Кроме механической барьерной функции лигнин может играть роль защитного химического барьера, так как при его разрушении такими ферментами, как, например, грибные лакказы [21], могут высвобождаться олигомеры и мономеры ОК, обладающие в высоких концентрациях бактериостатической активностью в отношении, например, условно-патогенных бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes* [5].

Несомненно, мономерные формы ОК должны присутствовать не только при деградациии, но и при синтезе лигнина в ходе естественного физиологического процесса роста и старения клеток растений, а также при действиях экзогенных факторов – поранениях, атаке фитопатогенных микроорганизмов. В связи с этим интересно поведение мутуалистических бактерий-эндофитов, населяющих внутренние ткани растений при изменении концентрации ФК в растительных тканях. Понимание возможных реакций эндофитов на активизацию синтеза ФК и увеличение ее концентрации в растительных тканях, как при синтезе лигнина, так и при его деструкции, а также при выделении ФК в ризосферу корнями растений [13] могут способствовать полученным нами результатам.

Так, увеличение скорости роста колоний бактерий на полутвердой питательной среде с ФК (рис. 2) позволяет выдвинуть предположение о существовании своеобразного механизма движения клеток эндофитов вслед за хорошо растущими и развивающимися органами растений с высокой влажностью. Постепенная лигнификация стенок молодых растительных клеток, неразрывно связанная с синтезом лигнина и участием ФК создает определенный ее пул, что также может активизировать движение бактерий по развивающимся сосудам не только благодаря току воды при транспирации, но и наличию соединений, таких, как, например ФК, усиливающих двигательную активность эндофитов. Усиление лигнификации тканей характерное для роста и старе-

ния растений, сопровождающееся, как правило, уменьшением содержания влаги, способно автоматически тормозить распространение эндофитов. Возможно, таким образом формируется система контроля распространения эндофитов в растительных тканях. Вместе с этим, секреция ФК корнями растений [13] при наличии в достаточном количестве влаги в окружении может способствовать увеличению биомассы представителей рода *Bacillus*, и являться одним из первых механизмов, способствующих проникновению эндофитов в ткани растений.

Установленная способность клеток штамма *B. subtilis* 26Д утилизировать ФК (рис. 3) позволяет предположить, что эндофит может выполнять несколько функций, в том числе и неблагоприятного агента. С одной стороны, деструкция ФК и уменьшение ее содержания может быть своеобразным сигналом для растения-хозяина, свидетельствующим о возможности дальнейшего роста, то есть сигналом “омоложения”. Это предположение согласуется с работой Дос Сантос с соавт. [22], в которой выявлено, что обработка ФК корней сои ингибирует их рост, индуцируя синтез лигнина. Именно это свойство – стимуляция роста растений – характерно для данного штамма бактерии [1]. С другой стороны, высокая концентрация клеток эндофита в растительных тканях может приводить к уменьшению уровня ФК, что снижает эффективность защитного действия не столько самой бактерии, сколько растения-хозяина, так как появляется вероятность недостаточной лигнификации и формирования непрочного барьера на пути патогенов. Однако наличие известной антагонистической активности данного эндофита ко многим фитопатогенам позволяет проявиться эффекту замещения защитного механизма растения с помощью лигнификации на защиту с помощью антибиотических компонентов самого эндофита, присутствующего в растительных тканях. Таким образом, растение вместе с эндофитом представляет собой тонко и самостоятельно настроенную систему, контролирующую физиологическое развитие хозяина в благоприятной для него среде, также создающую многоуровневую защиту при атаке фитопатогенов.

Впервые показано, что при наличии в среде ФК в концентрациях, характерных для ее секреции корнями растений, рост и скорость распространения колоний бактерий *B. subtilis* по поверхности может возрастать. Установлена также способность бактерий *B. subtilis* штамма 26Д к деструкции ФК. Исследование влияния других ОК (кумаровой, синаповой, кофейной), а также оксibenзойных кислот (галловой, сиреневой и других) на подвижность и размножение как эндофитных, так и фитопатогенных бактерий позволят, по мнению авторов, открыть новые механизмы взаимоотношений растений и микроорганизмов.

Работа выполнена по теме госзадания, № АААА-А16-116020350027-7 с использованием оборудования ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии, Региональный центр коллективного пользования “Агидель”).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кураמיшина З.М., Смирнова Ю.В., Хайруллин Р.М. // Физиология растений. 2016. Т. 63. № 5. С. 679–687.
2. Khare E., Mishra J., Kumar N.A. // Front. Microbiol. 2018. V. 15. Art. 02732. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02732>
3. De Oliveira D.M., Finger-Teixeira A., Mota T.R., Salvador V.H., Moreira-Vilar F.C., Molinari H.B.C. et al. // Plant Biotechnology J. 2015. V. 13. Art. 12292. P. 1224–1232. <https://doi.org/10.1111/pbi.12292>
4. Patzke H., Schieber A. // Food Res. Int. 2018. V. 113. P. 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.062>
5. Merkl R., Hrádková I., Filip V., Šmidrkal J. // Czech. J. Food Sci. 2010. V. 28. P. 275–279. <https://doi.org/10.17221/132/2010-CJFS>
6. Borges A., Ferreira C., Saavedra M. J., Simoes M. // Microbial Drug Resistance. 2013. V. 19. № 4. P. 256–265. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0244>
7. Gurujeyalakshmi G., Mahadevan A. // Current Microbiology. 1987. V. 16. № 2. P. 69–73.
8. Lopes R., Tsui S., Gonçalves P.J.R.O., de Queiroz M.V. // World J. Microbiol. Biotechnol. 2018. V. 34. № 7. Art 94. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2479-7>
9. Недорезков В.Д. Биологическая защита пшеницы от болезней в условиях Южного Урала. М.: Изд-во МСХА, 2002. 173 с.
10. Fall R., Kearns D.B., Nguyen T. // BMC Microbiology. 2006. V. 6. № 1. Art. 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-31>
11. Hamouche L., Laalami S., Lakkis G., Kobaissi A., Chokr A., Putzer H., Hamze K. // Int. J. Scientific & Technology Research. 2015. V. 4. № 10. P. 14–20.
12. Degrassi G., de Laureto P.P., Bruschi C.V. // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 1. P. 326–332. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.1.326-332.1995>
13. Wu H., Haig T., Pratley J., Lemerle D., An M. // J. Chemical Ecology. 2000. V. 26. P. 2141–2154. <https://doi.org/10.1023/A:1005520500110>
14. Harshey R.M. // Ann. Rev. Microbiol. 2003. V. 57. № 1. P. 249–273. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.091014>
15. Henrichsen J. // Bacteriol. Rev. 1972. V. 36. № 4. P. 478–503.
16. Cavin J.F., Dartois V., Diviès C. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 4. P. 1466–1471.
17. Tran N.P., Gury J., Dartois V., Nguyen T.K., Seraut H., Barthelmebs L., Gervais P., Cavin J.F. // J. Bacteriology. 2008. V. 190. № 9. P. 3213–3224. <https://doi.org/10.1128/JB.01936-07>
18. Istasse T., Jacquet N., Berchem T., Haubruge E., Nguyen B.K., Richel A. // Analytical Chemistry Insights. 2016. V. 11. P. 49–57. <https://doi.org/10.4137/ACI.S39739>
19. Salum M.L., Erra-Balsells R. // Environ. Control Biol. 2013. V. 51. № 1. P. 1–10.
20. Zhao Q. // Trends in Plant Science. 2016. V. 21. № 8. P. 713–721. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.006>
21. Johannes C., Majcherczyk A. // J. Biotechnol. 2000. V. 78. № 2. P. 193–199. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(00\)00208-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(00)00208-x)
22. Dos Santos W.D., Ferrarese, M.L.L., Nakamura C.V., Mourão K.S.M., Mangolin C.A., Ferrarese-Filho O. // J. Chemical Ecol. 2008. V. 34. P. 1230–1241. Art. 1230. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9522-3>

Ferulic Acid Activate the Reproduction and Mobility of the Endophytic Strain *Bacillus subtilis* 26D Cells

E. R. Sarvarova^a, R. M. Khairullin^{a,*}, and I. V. Maksimov^a

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

*e-mail: krm62@mail.ru

Endophytic microorganisms can be effective, safe and natural biocontrol agents that function for a long time in agrocenoses, they protect plants from diseases and other stress factors of the environment. Under stressful conditions, in response to infection with phytopathogens, plants produce various compounds that are growth activators, for example, hydroxycinnamic acids, including ferulic acid. The role of hydroxycinnamic acids in the relationship of plants with endophytic bacteria in detail has not been studied. In this work, the effect of ferulic acid in concentrations of 10, 100, and 1000 µg/l on the colonies reproduction and growth of the endophytic strain *Bacillus subtilis* 26D on agar media was studied. It was found that this compound in a solid medium contain 1.5% agarose suppresses, and at a lower agarose concentration (0.7%) increases the size of bacterial colonies. In a liquid medium, hydroxycinnamic acid stimulates the reproduction of bacterial cells. It was revealed that bacteria strain of *Bacillus subtilis* 26D are capable of destructing ferulic acid, and the authors explain this ability by the effect of stimulating cell reproduction in a liquid medium. The proposed mechanisms of plant – endophytic microbe interaction with ferulic acid involvement is discussed.

Keywords: *Bacillus subtilis* 26D, ferulic acid, growth and reproduction of bacteria, mobility

УДК 581.5:633.358:577.13

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ С НЕРИЗОБИАЛЬНЫМИ ЭНДОФИТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ РАСТЕНИЙ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.), ПЕРЕМЕЩАЮЩИМИСЯ ИЗ ИХ КОРНЕЙ В ПРИКОРНЕВУЮ ЗОНУ

© 2021 г. Л. Е. Макарова¹ *, Ю. А. Маркова¹, А. С. Морищ¹,
М. С. Кареева¹, А. В. Сидоров¹, Н. А. Соколова¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 30.12.2020 г.

После доработки 19.02.2021 г.

Принята к публикации 22.02.2021 г.

Показано, что из 11 штаммов эндофитных бактерий, обнаруженных в семенах растений гороха (*Pisum sativum* L.), 6 оказывались в водной среде роста корней их проростков в условиях гидрокультуры. Обнаружено различное влияние бактерий инокулятов (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Azotobacter chroococcum* и *Rhodococcus erythropolis*) на состав и концентрацию эндофитных бактерий в прикорневой зоне проростков гороха. У всех 6 культур эндофитных бактерий, обнаруженных в зоне роста корней, выявлена различная способность к деградации N-фенил-2-нафтиламина (N-ФНА) с образованием фталатов. На неодинаковый характер катаболизма этими бактериями N-ФНА, негативного аллелопатического компонента корневых экссудатов бобовых культур, указывал процент неразрушенного в среде роста субстрата и соотношение видов фталатов, образовавшихся при его деградации. Эти показатели могли определять степень участия выявленных эндофитных бактерий в контроле взаимоотношений растений гороха с разнообразными по стратегии взаимодействия бактериями.

Ключевые слова: *Pisum sativum* L., ризосфера, межмикробные взаимодействия, эндофитные бактерии, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Rhodococcus*, N-фенил-2-нафтиламин, фталаты

DOI: 10.31857/S0555109921040103

В публикации [1] сообщалось об исследованиях 50-летней давности, когда были получены первые доказательства сосуществования в клубеньках бобовых культур ризобий с эндофитными бактериями, а позднее показана неспособность последних самостоятельно вызывать образование клубеньков. Результатами многих исследований представлены доказательства важной роли непатогенных эндофитных бактерий в питании, защите от патогенов и регуляции роста растений [1–6]. В литературе приводятся свидетельства способности растений регулировать не только локализацию эндофитных бактерий в пределах организма, но и их численность, а также свидетельства возможности эндофитных ненодулирующих видов бактерий осуществлять биоконтроль растений. В публикации [7] высказано мнение, что поселяющиеся в клубеньках неризобиальные эндофитные бактерии способствуют функционированию азотфиксирующей системы, обеспечивая улучшение минерального питания и синтез биологически активных соединений. В настоящее время обсуждаемую группу

бактерий объединяют термином PGPE (Plant Growth Promoting Endophytes), подобно бактериям, отнесенным к группе PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), которые, как известно, также играют существенную положительную роль для растений [2].

В список таксонов эндофитных бактерий, встречающихся у бобовых культур, входит более 25 неризобиальных и 10 ризобиальных родов, включая *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Sphingomonas*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*, *Devosia*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Azospirillum* и др. [4, 8].

В обзорах [2, 8] обсуждаются пути и механизмы проникновения эндофитных бактерий в ткани бобовых культур. Эндофитные бактерии попадают в растения в основном через корневую систему из почвы и, отчасти, через устьица. Существует вероятность проникновения этих бактерий также и с участием гидролитических ферментов. Экспе-

риментально показано [5], что одним из путей попадания эндофитных бактерий в корни являются разрывы в области выхода боковых корней, и дальнейшее их проникновение в ткани коры и сосудистой системы, как полагают, осуществляется апопластическим путем. Допускают проникновение эндофитных неризобияльных бактерий в корни совместно с ризобиями через корневые волоски [4, 7].

Приведенные в ряде публикаций факты указывают на присутствие эндофитных бактерий у бобовых культур не только в клубеньках, но и в разных органах и в сосудистых системах [1, 2, 7–9].

У исследователей, работающих с бобовыми культурами, интерес вызывают в основном бактерии, поселяющиеся в корнях и корневых клубеньках. Носителями и местом временного сохранения эндофитных бактерий могут быть семена растений [8, 10]. Однако в семенах бобовых культур эти бактерии менее исследованы. Известно об изолировании из семян гороха *Paenibacillus mendelii* sp. nov. [11]. При прорастании семени вероятны перемещения эндофитных бактерий в ткани надземных и подземных органов проростков. Миграция из семени в корни – это еще один возможный путь для появления эндофитных бактерий не только в составе бактериальной ассоциации клубеньков, образующихся под влиянием ризобий, но также и в составе ризосферного микробиома. На перемещение эндофитных бактерий из корней в прикорневую зону проростков гороха также указывали результаты исследований, представленных в настоящей работе.

Растение может контролировать концентрацию бактерий в прикорневой зоне посредством биологически активных компонентов корневых экссудатов негативного действия. В числе негативных аллопатических соединений в корневых экссудатах растений гороха наряду с давно известным фиталексином пизатином были выявлены N-фенил-2-нафтиламин (N-ФНА) и фталаты [12]. В недавно опубликованной работе [13] показано, что некоторые виды ризосферных бактерий способны осуществлять деградировать N-ФНА до фталатов, а также преобразовывать одни виды фталатов в другие. Можно предположить, что количество и качественный состав фталатов в прикорневой зоне растения формируются в результате экскреции этих соединений из корней и трансформации бактериями, присутствующими в ризосфере. Важно, что фталаты могут подавлять бактерии избирательно, в зависимости от вида бактерий, типа алкильных заместителей в молекулах фталатов и концентрации их в среде [14]. На степень разнообразия бактерий ризосферного микробиома могут влиять возникающие в прикорневой зоне количественные и качественные изменения в составе фталатов. Количество этих соединений может

возрастать благодаря присутствующим в ризосфере видам бактерий, способных образовывать фталаты при деградации полициклических соединений [13]. Падение их количества вероятно при деградации фталатов по β -кетоадипатному пути до кислот цикла Кребса [15]. Один из двух путей биодеградации полициклических ароматических соединений, который приводил к образованию *o*-фталевой кислоты, чаще всего выявляли у представителей таких родов бактерий, как *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Burkholderia* [15–18]. К некоторым из перечисленных родов бактерий относятся виды эндофитных бактерий, поселяющихся в тканях бобовых культур [4, 8].

Цель работы – выяснение роли эндофитных бактерий, обнаруживаемых в прикорневой зоне корней проростков гороха в результате перемещения из корневых тканей во внешнюю среду, в биоконтроле ризосферного микробиома.

МЕТОДИКА

Объекты исследований. Объектами исследования служили семена и проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Торсдаг. Семена урожая 2017 г. получены при выращивании растений гороха в открытом грунте на территории СИФИБР СО РАН. В качестве инокулятов использовали бактерии *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (штамм 245 а – RCAM 1022, получен из Всероссийского института сельскохозяйственной микробиологии, г. Пушкин, Россия), и *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* штамм. 1845, *Azotobacter chroococcum* штамм Az d10 ВКМ В-2272 Д, *Rhodococcus erythropolis* штамм 108 ВКМ – Ac 2784 D из коллекции Центра коллективного пользования (ЦКП “Биоресурсный центр” Сибирского института физиологии и биохимии растений (СИФИБР СО РАН)).

Эксперименты с проростками проводили по схеме, описанной нами ранее [12]. Согласно схеме прорастание семян и рост проростков, служивших исходным материалом в работе, проводили на влажной фильтровальной бумаге в термостате без освещения при температуре 21°C в течение 48 ч. Далее проростки инкубировали в условиях гидрокультуры в камере BINDER KBW-240 (“Binder”, Германия) при 21°C, освещении $81 \text{ мкМ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь) в течение 24 ч. При изучении межбактериальных взаимодействий эндофитных бактерий с вносимыми в среду бактериями в составе инокулятов верхнюю часть проростков (семя + эпикотиль) располагали на поверхности пластиковой решетки. В отверстия решетки, служившей также крышкой сосуда с водной средой объемом 240 мл, пропускали корни проростков, которые на расстоянии 1.5 см от поверхности решетки погру-

жали в водную среду. При таком размещении верхняя часть проростков не контактировала с водой. Для предотвращения проникновения в сосуды бактерий из внешней среды сверху на крышку сосудов с растениями помещали плотно прилегающие по ее краям стеклянные чашки. Для получения достоверных доказательств выхода эндофитных бактерий из корней в прикорневую зону при проведении экспериментов использовали специальную конструкцию. Она представляла собой стеклянный цилиндр, сверху закрываемый ватным тампоном, и помещенную вертикально в его нижней части пластиковую непрозрачную пробирку объемом 15 мл с крышкой. В отверстие в крышке пробирки продевали корни проростков. Корни внутри пробирки на расстоянии 1.5 см от крышки погружали в водную среду без бактерий.

Средние размеры корней исходных проростков имели длину 30–35 мм, по окончании эксперимента – 46–58 мм. Для оценки взаимодействия растения с возникающими в водной среде ассоциациями бактерий прослеживали влияние последних на рост корней.

В водную среду для проростков вносили необходимые для роста микроэлементы из расчета 1 мл/л воды каждого раствора солей: $ZnSO_4$ (0.05 г/л), $NaMoO_4$ (1.76 г/л), $CuSO_4$ (0.05 г/л), $MnCl_2$ (0.35 г/л), H_3BO_3 (0.5 г/л). Одновременно с помещением корней проростков в водную среду в нее вносили бактерии *R. leguminosarum* bv. *viceae*, *P. syringae* pv. *pisi*, *A. chroococcum*, *R. erythropolis*. В среду с контрольными растениями инокулят не вносили. В начале и конце эксперимента (экспозиции) в водной среде, где росли корни проростков, подсчитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ).

Поверхностное обеззараживание семян, используемых для исследования в них эндофитных бактерий и для получения проростков, проводили в 3 этапа. Вначале промывали их мыльным раствором, затем помещали на 10 мин в 95%-ный этанол, а после отмывания – на 30 мин в 3%-ный раствор пероксида водорода. После отмывки от раствора пероксида семена на 30 мин заливали нагретой до 60°C водой. Для получения проростков после остывания воды семена набухали в течение 6–7 ч. Набухание семян, рост проростков, процедуры, проводимые с проростками, происходили в строго соблюдаемых асептических условиях.

Наличие и состав эндофитных бактерий в семенах исследовали через 24 ч их набухания в стерильной воде. Семена, растирали до кашицы в керамической ступке, заливали небольшим объемом стерильной воды, перемешивали полученную массу и после 24-часового настаивания отбирали 1 мл жидкости для микробиологического анализа.

Культуры бактерий. Культуры бактерий выращивали на твердых агаризованных средах. Для бактерий *R. leguminosarum* bv. *viceae* и *P. syringae* pv. *pisi* среды готовили на гороховом отваре по прописи Берестецкого [19], для бактерий *A. chroococcum* использовали среду Эшби, для *R. erythropolis* – питательный агар на основе гидролизата говяжьего мяса (ГМФ-Агар, “Научно-исследовательский центр фармакотерапии ООО”, Россия).

Определение количества бактерий в водной среде роста корней. Титр бактерий, вносимых в водную среду, определяли по оптической плотности при 595 нм на фотометре для микропланшетов “iMark” (“Bio-Rad Microplate Manager”, США), и по количеству КОЕ. КОЕ в водной среде определяли в момент помещения на неё корней и через 24 ч. КОЕ подсчитывали, после разведения и высева разбавленных в 10^2 – 10^6 раз суспензий на твердые агаризованные среды. Суспензии с бактериями из водной среды с проростками контроля наносили на твердую среду, приготовленную на гороховом отваре в соответствии с прописью из работы [19]. Рост бактерий инокулятов оценивали по соотношению КОЕ в средах с растениями в начале и через 24 ч экспозиции, выраженному в процентах. Содержание (общее) эндофитных бактерий за 24 ч экспозиции в тех же средах оценивали по соотношению КОЕ для них и бактерий инокулятов, и выражали в %. Основой для дифференцированного подсчета КОЕ для этих двух групп бактерий были морфологические показатели для их колоний.

Исследование состава эндофитных бактерий. Состав эндофитных бактерий исследовали на основании морфологических признаков колоний на твердых средах в чашках Петри, которые засеивали водными суспензиями из сосудов с растениями, а также из водных вытяжек семян. Для микроскопических исследований окрашенных по Граму клеток использовали инвертированный микроскоп “Axio Observer” (“Carl Zeiss Microscopy”, Германия).

Изучение деструкции N-ФНА эндофитными бактериями. Суспензию клеток (смыв с твердого субстрата) переносили для адаптации в течение суток в конические колбы с жидкой минимальной средой, приготовленной, как описано в работе [20]. Суспензии с адаптированными бактериями переносили в ту же культуральную среду (объемом 250 мл) внесенную в коническую стеклянную колбу объемом 500 мл для инкубации в течение 1 сут с 10 мкМ N-ФНА (“Sigma”, США). При исследованиях деградации N-ФНА объем вносимых суспензий рассчитывали для получения конечного титра бактерий – 1.5×10^3 кл./мл. Титр суспензии рассчитывали, измеряя оптическую плотность на планшетном спектрофотометре “Immunochem-2100” при 675 нм (“High Technology Inc.”, США).

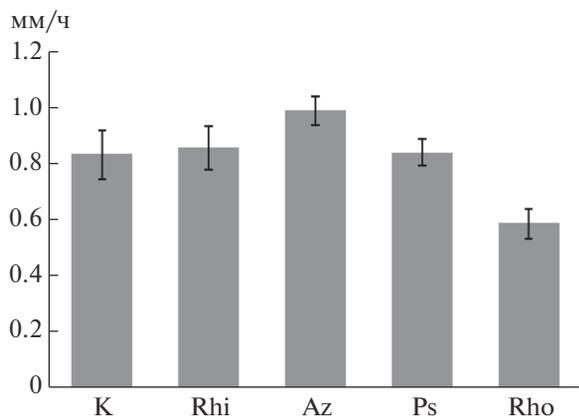


Рис. 1. Скорость роста корней проростков гороха (мм/ч) в течение 24 ч при инокуляции разными видами бактерий: К – контроль; бактерии инокулята водной среды: Rhi – *R. leguminosarum* bv. *viceae*, Az – *A. chroococcum*, Ps – *P. syringae* pv. *pisii*, Rho – *R. erythropolis*.

Колбы с бактериями помещали на роторную качалку (60 об./мин) и выращивали при температуре 20–22°C. Выросшую культуру центрифугировали при 8000 g в течение 20 мин при 4°C. Из супернатанта после подкисления 2 н HCl до pH 3.0–4.0 этилацетатом экстрагировали ароматические соединения. Полученные экстракты упаривали досуха в вакууме в темноте, сухой остаток растворяли в небольших объемах очищенного от перекисей этилацетата и помещали в стеклянные бутылочки для газо-хромато-масс-спектрометрического (ГХ-МС) анализа

Анализ состава ароматических продуктов деградации N-ФНА. Анализ состава этилацетатных экстрактов из культуральных сред проводили методом ГХ-МС на газожидкостном хроматографе с масс-

спектрометрическим детектором с использованием хромато-масс-спектрометра “7000QQQTripleQuad/7890A MSD/DS” (“Agilent Technology”, США), как описано в работе [13]. Для идентификации анализируемых соединений использовали библиотеки масс-спектров NIST08 и WILEY7, а также проводили сравнение с аутентичными образцами N-ФНА (“Sigma”, США), бис (2-этил-гексил) фталата (синоним – диоктилфталат), диэтилфталата (“Sigma–Aldrich”, Германия) и дибутылфталата (“Реахим”, Россия).

Статистическая обработка. Для статистической обработки полученных результатов использовали пакет R 3.6.2. На рис. 1 и в табл. 2 и 3 приведены средние значения полученных показателей и стандартные отклонения для них, рассчитанные из трех независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Для выяснения роли эндофитных бактерий, появляющихся в прикорневой зоне корней проростков гороха в результате перемещения из корневых тканей во внешнюю среду, в биоконтроле ризосферного микробиома исследования проводили по двум направлениям. Первое из них связано с выявлением изменений в составе и концентрации бактерий в водной среде для роста корней проростков гороха (*Pisum sativum* L.) через 1 сут после внесения в нее разных видов ризосферных бактерий. Второе направление исследований связано с выяснением возможного вклада изучаемых эндофитных бактерий в метаболизм N-ФНА.

Приведенные в табл. 1 результаты свидетельствуют об обнаружении эндофитных бактерий гороха в семенах и появлении части этих бактерий в

Таблица 1. Культуры эндофитных бактерий, обнаруженные в семенах и водных средах корней проростков гороха

№ культуры	Семя	Водная среда для роста корней				
		без инокуляции (контроль)	инокулированные бактерии			
			<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viceae</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>pisii</i>	<i>Az. chroococcum</i>	<i>Rh. erythropolis</i>
1	+	+	+	–	–	+
2	+	+	+	+	+	–
3	+	+	+	+	+	–
4	+	+	+	–	+	+
5	+	+	+	–	–	–
6	+	+	+	–	+	–
7	+	–	–	–	–	–
8	+	–	–	–	–	–
9	+	–	–	–	–	–
10	+	–	–	–	–	–
11	+	–	–	–	–	–

Примечание: “+”, “–” – присутствие или отсутствие колоний бактерий, соответственно.

Таблица 2. Изменение количества бактерий инокулятов и их соотношения с количеством эндофитов в среде роста корней проростков гороха после 24 ч экспозиции

Бактерии инокулята	Изменение КОЕ бактерий инокулятов, % к исходному	Отношение: КОЕ эндофитные бактерии/КОЕ бактерий инокулята, %
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	312 ± 36	129 ± 25
<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	195 ± 27	35 ± 1
<i>A. chroococcum</i>	489 ± 57	49 ± 8
<i>R. erythropolis</i>	242 ± 1	11 ± 1

ризосфере корней проростков. Результаты в табл. 1 показали, что максимально 6 из 11 выделенных из семян культур бактерий обнаруживались в водной среде, где происходил рост корней проростков гороха. Верхняя часть проростков (семя + эпикотиль и часть прилегающего к ним корня длиной 1.5 см) не касались поверхности водной среды (см. Методику), куда была погружена большая часть корня. Наиболее вероятно, что обнаруженные в водной среде бактерии перемещались в среду из семени через ткани корня.

Все эти бактерии были грамположительными. Из них 4 культуры (№ 2, 7, 8, 11, табл. 1) палочковидной формы, спорообразующие, относились к роду *Bacillus*. В культурах 1, 3, 4, 5, 10 (табл. 1) представлены бактерии, имеющие форму кокков, а культуры 6, 10 не образующие споры палочки.

В настоящее время не ясно, почему только 6 из 11 обнаруженных нами в семенах эндофитных бактерий оказались способными транспортироваться из корней в водную среду. Возможно, ответом станут данные по определению у них активности гидролитических ферментов, которые, скорее всего, и обуславливают их продвижение через ткани корней.

Обнаружение бактерий в прикорневой зоне проростков гороха послужило основанием для изучения их взаимодействия с ризосферными бактериями. Такие взаимодействия неизбежно должны происходить с нодулирующими корнями гороха бактериями *R. leguminosarum*. Вероятны они и с бактериями, являющимися патогенами для названного растения, к которым, в частности, относятся *P. syringae* pv. *pisi*, использованные в экспериментах. Без сомнения, те же эндофитные бактерии в ризосфере будут иметь влияние на свободноживущие почвенные бактерии. Такое влияние было подтверждено результатами работы, в которой в качестве инокулятов для корней проростков использовали представителей свободноживущих бактерий *A. chroococcum* и *R. erythropolis*. *A. chroococcum* — азотфиксирующие бактерии, могли оказывать положительное влияние на рост растений гороха [21]. *R. erythropolis*, был выделен из ризосферы растений *Elytrigia repens*, росших на загрязненных нефтепродуктами почвах. Штамм способен активно деградировать полициклические ароматические со-

единения и положительно влиял на рост растений в условиях загрязнения почв нефтепродуктами [22, 23].

Соотношения концентраций эндофитных бактерий и бактерий, использованных в качестве инокулятов, определенные в водной среде по величине КОЕ через 1 сут экспозиции может служить показателем межмикробных взаимодействий в прикорневой зоне проростков гороха. Вторым показателем взаимодействий является количество вариантов эндофитных бактерий, появившихся на твердой среде совместно с бактериями инокулятов.

Титр бактерий инокулятов, вносимых в среду для корней проростков гороха, рассчитывали по показателям оптической плотности и затем корректировали по КОЕ после высева суспензии на твердые среды в чашках Петри. В начале экспериментов показатели КОЕ варьировали в пределах $0.1-0.3 \times 10^7$ кл./мл — для ризобий, и $1.4-1.9 \times 10^7$ кл./мл — для псевдомонад, азотобактеров и родококков. Бактерии в среде роста корней неинокулированных проростков (контроль) в начале экспозиции отсутствовали, а через 24 ч их роста суммарный показатель КОЕ для всех обнаруженных нами в этой среде эндофитных бактерий составлял $2.29 \pm 0.03 \times 10^7$ кл./мл.

Компоненты корневых экссудатов, по-видимому, способствовали росту бактерий, внесенных в водную среду в качестве инокулята, но в разной степени для различных исследуемых видов. Из результатов табл. 2 следует, что максимальный прирост КОЕ наблюдали у *A. chroococcum*. За ним в порядке убывания могут быть размещены ризобии, родококки и псевдомонады.

О различном характере взаимодействий бактерий, внесенных в водную среду роста корней в виде инокулята, с бактериями, поступившими в эту среду из корней можно судить по результатам, приведенным в табл. 2. Так, в водной среде с ризобиями доля эндофитных бактерий выше, чем ризобий (табл. 2). При этом состав колоний эндофитных бактерий по морфолого-культуральным показателям был аналогичен их составу в среде контроля (табл. 1). Возможно, имеет место совместимость исторически сформировавшихся бактериальных ассоциаций, которые благоприятны

для сосуществования каждого из представителей не только в тканях растения, но и в ризосфере растения-хозяина.

В среде с азотобактером обнаружено всего четыре варианта эндофитных бактерий (табл. 1). Это может быть связано со слабым ростом некоторых эндофитов на среде Эшби. В процессе работы выяснилось, что очень слабый рост на среде Эшби имели 2 из 6 культур (культуры бактерий № 1 и 5, табл. 1) эндофитных бактерий, выделенных из водных сред. По результатам, представленным в табл. 2, количество эндофитных бактерий в среде роста корней составляло около 50% от количества клеток *A. chroococcum*. Это достаточно хороший показатель совместного роста бактерий азотобактера и эндофитных бактерий. К такому заключению можно прийти, учитывая, что доминирующие в ростовой среде бактерии *A. chroococcum* отличались от трех других видов инокулированных бактерий наиболее высоким приростом (табл. 2).

Твердые среды на основе горохового отвара и ГМФ-агара, использованные, соответственно, для анализа состава бактерий в водных средах с псевдомонадами и родококками (см. Методику), вполне подходили и для роста на них колоний всех выделенных изолятов эндофитных бактерий. Поэтому наблюдаемое в табл. 1 отсутствие четырех форм эндофитных бактерий в водных средах с *P. syringae* pv. *pisi* и *R. erythropolis*, наиболее вероятно объясняется антибактериальным действием этих двух видов бактерий. Кроме того, можно утверждать, что псевдомонады и родококки сосуществовали с двумя, но не одинаковыми представителями эндофитных бактерий семян гороха. Можно предположить избирательное подавление псевдомонадами и родококками эндофитных бактерий. Подтверждают отмеченное выше действие псевдомонад и родококков в отношении эндофитных бактерий растений гороха представленные в табл. 2 показатели относительного содержания последних в средах роста корней. Они более низкие, чем в средах с ризобиями и азотобактером. При этом самое низкое содержание эндофитных бактерий в среде с родококками.

Для оценки взаимодействия растения с формирующимися в водной среде ассоциациями бактерий прослеживали их влияние на линейный рост корней проростков гороха. Оказалось, что инокуляция бактериями *R. leguminosarum* bv. *viceae* и *P. syringae* pv. *pisi* не приводила к изменениям скорости их роста (рис. 1). Бактерии *A. chroococcum* усиливали, а бактерии *R. erythropolis*, напротив, заметно снижали рост корней. Примечательно, что два последних вида характеризовались высокой гормонсинтезирующей активностью [23, 24]. Именно этим свойством *A. chroococcum* объяснялось ускорение роста инокулированных этими бак-

териями корней проростков гороха в работе [21]. Однако причина ингибирующего влияния бактерий *R. leguminosarum erythropolis*, также активно синтезирующих ростстимулирующие фитогормоны, на рост корней тех же растений пока не ясна. Возможно, в клетках этого вида бактерий образуются соединения неизвестной природы негативно действующие на эндофитные бактерии растений гороха и на рост его корней.

В работах [12, 25] было показано, что в корнях бобовых культур и их корневых экссудатов обнаружены вещества N-ФНА и фталаты. Названные соединения оказывали ростподавляющее действие на бактерии *R. leguminosarum* bv. *viceae*, *P. syringae* pv. *pisi*, *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus* [12, 13]. Было установлено, что перечисленные виды бактерий способны образовывать фталаты при деградации N-ФНА [13]. То есть ряд видов бактерий, отнесенные к разным родам, способны деградировать полициклические ароматические соединения (ПАУ) по пути с образованием *o*-фталевой кислоты и затем фталатов. Обнаружена аналогичная способность к деструкции N-ФНА и у штамма *A. chroococcum* (данные не опубликованы), использованного в работе. У *R. erythropolis* способность к деградации N-ФНА не была исследована, однако ранее у этого вида установили высокую активность при деградации ПАУ нефти с образованием протокатеховой кислоты [22].

Обнаружение в среде роста корней проростков гороха эндофитных бактерий позволило предположить, что в их взаимоотношениях с ризосферными бактериями также могут быть задействованы N-ФНА и фталаты. В составе этих соединений, являющихся компонентами корневых экссудатов растений гороха [12, 25], возможны количественные и качественные (в составе фталатов) изменения при участии ризосферных бактерий, способных деградировать N-ФНА и преобразовывать одни виды фталатов в другие [14]. Правомерным является выяснение роли эндофитных бактерий в возникновении изменений в количестве N-ФНА и в составе фталатов.

Результаты, представленные в табл. 3, показали, что все 6 бактериальных культур, которые были выявлены в зоне роста корней проростков гороха, способны деградировать N-ФНА с образованием фталатов. Наиболее высокая деградирующая активность у культур № 3 и № 6, самая низкая – у культуры № 5. У исследуемых культур при деградации N-ФНА в культуральных средах, где они инкубировались в присутствии вышеназванного субстрата, оказалось различным соотношение видов фталатов (табл. 3). Диоктилфталат, характеризующийся сильным антибактериальным действием [13, 14], среди продуктов деградации N-ФНА преобладал в среде, куда вносили бактерии культуры № 3 и составлял большой процент

Таблица 3. Состав фталатов, образовавшихся при деградации N-фенил-2-нафтиламина культурами эндофитных бактерий, показатели времени удерживания ($t_{уд}$) и степени вероятности (Ver, %)

Соединение	$t_{уд}$, мин	Ver, %	Относительная площадь пика, %					
			№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
Диэтилфталат	14.2	80.0	0.9 ± 0.1	—	—	—	—	—
Бутил-тетрадецил фталат	19.7	16.6	1.9 ± 0.4	—	—	1.5 ± 0.3	0.8 ± 0.2	3.3 ± 0.9
Дибутилфталат	21.6	34.8	75.7 ± 6.4	66.5 ± 4.2	54.0 ± 5.3	40.2 ± 3.1	20.2 ± 1.8	100
Диоктилфта-лат	31.5	70.7	67.1 ± 7.1	12.9 ± 2.2	100	31.3 ± 3.6	3.3 ± 0.9	79.7 ± 8.0
N-фенил-2-нафтиламин	26.2	46.6	100	100	18.7 ± 1.7	100	100	30.2 ± 3.5

Примечание: № 1–6 – номера культур эндофитных бактерий.

в среде с бактериями культур № 1 и № 6. Дибутилфталат доминировал среди продуктов деградации N-ФНА в средах с бактериями большинства культур (исключая культуру № 6). Наиболее активно образовывали дибутилфталат бактерии культуры № 6. Данное соединение не всегда вызывает негативное действие на бактерии. Исследованиями авторов работы [14] обнаружено ингибирование этим соединением образования бактериальных биопленок. Подавление роста бактерий в планктонной культуре он вызывал только при высоких концентрациях, а при более низких стимулировал этот процесс. Таким образом, показано, что обнаруженные в ризосфере проростков гороха эндофитные бактерии способны образовывать фталаты при деградации N-ФНА.

Итак, приведенные в настоящей работе результаты показывают, что в ризосфере растений гороха наблюдался различный характер взаимодействия между эндофитными бактериями и свободноживущими ризосферными бактериями, характеризующимися разными типами отношений с растениями гороха. Благоприятным оказалось сосуществование этих бактерий с ризобиями, нодулирующими корни гороха. *P. syringae* pv. *pisi*, патоген для растений гороха, поражающий органы надземной части данного растения, по сравнению с тремя другими исследуемыми нами видами бактерий, показал наименее интенсивный рост в среде роста корней (табл. 3) и обнаружил способность подавлять эндофитные бактерии растения-хозяина (табл. 1, 3). Бактерии *A. chroococcum* и *R. erythropolis*, использованные в эксперименте, существенно различались по активности роста в среде обитания корней и по характеру влияния на эндофиты гороха. Влияние корневых экссудатов гороха, очевидно, способствовало хорошей адаптации бактерии *A. chroococcum*, которые при этом не вызвали значительных изменений в составе и концентрации эндофитных бактерий. Этот вид бактерий положительно влиял на рост корней проростков гороха. В противоположность азотобактерам, родококки показали в водной среде невысокий прирост и наибольшую для четырех об-

суждаемых видов бактерий антибактериальную активность, а также ингибирующее действие на рост корней гороха.

Обнаруженное у эндофитных бактерий, перемещающихся из тканей корней растения гороха во внешнюю среду, свойство деградировать N-ФНА, одного из негативных аллелопатических компонентов корневых экссудатов, позволяет предположить важную роль образующихся при этом фталатов в их взаимоотношениях как с бактериями, проникающими в ткани данного растения, так и со свободноживущими ризосферными бактериями.

Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования (ЦКП) “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск, Россия).

Работа выполнена в рамках проекта под № гос.регистрации АААА-А17-117011810099-8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muresu R., Polone E., Sulas L., Baldan B., Tondello A., Delogu G. et al. // FEMS Microbiol Ecol. 2008. V. 63. P. 383–400.
2. Гарипова С.Р. // Успехи современной биологии. 2012. Т. 132. № 5. С. 493–505.
3. Чеботарь В.К., Мальфанова Н.В., Щербакоев А.В., Ахтемова Г.А., Борисов А.Ю., Люгтенберг Б., Тухонович И.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 3. С. 283–289.
4. Martinez-Hidalgo P., Hirsh A.M. // Phytobioms. 2017. V. 1. № 2. P. 70–82.
5. Гарипова С.Р., Гарифуллина Д.В., Баймиев А.Х., Хайруллин Р.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 3. С. 299–307
6. Иванчина Н.В., Гарипова С.Р., Хайруллин Р.М. // Агробиохимия. 2018. № 4. С. 39–44.
7. Benito P., Alonso-Vega P., Aguado C., Luján R., Anzai Y., Hirsch A.M., Trujillo M.E. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 11051 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11428-1>
8. Dudeja S.S., Giri R., Saini R., Suneja-Madan P., Kothe E. // J. Basic Microbiol. 2012. V. 52. № 3. P. 248–260.

9. Кузнецова И.Г., Сазанова А.Л., Сафронова В.И., Пинаев А.Г., Верховина А.В., Тихомирова Н.Ю., Оследкин Ю.С., Белимов А.А. // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50. № 3. С. 345–352.
10. Щербakov А.В., Заплаткин А.Н., Чеботарь В.К. // Достижения науки и техники АПК. 2013. № 7. С. 35–38.
11. Smerda J., Sedlacek I., Pacova Z., Durnova E., Smiskova A., Havel L. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2005. V. 55. № 6. P. 2351–2354.
12. Макарова Л.Е., Петрова И.Г., Соколова Н.А., Мориц А.С. // Агрохимия. 2020. № 3. С. 62–69.
13. Макарова Л.Е., Мориц А.С., Соколова Н.А., Петрова И.Г., Семенов А.А., Дударева Л.В., Третьякова М.С., Сидоров А.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 2. С. 165–173.
14. Шафикова Т.Н., Омеличкина Ю.В., Еникеев А.Г., Бояркина С.В., Гильдис Д.Э., Семенов А.А. // Докл. Академии наук. 2018. Т. 480. № 3. С. 381–383.
15. Liang D.-W., Zhang T., Fang H.H.P., He J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 80. № 2. P. 183–198.
16. Seo J.S., Keum Y.-S., Li Q.X. // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2009. V. 6. P. 278–309.
17. Eaton R.W., Ribbons D.W. // J. Bacteriol. 1982. V. 151. № 1. P. 48–57.
18. Chang H.K., Zylstra G.J. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 24. P. 6529–6537.
19. Берестецкий В.А. Методические рекомендации по получению новых штаммов *Rhizobium leguminosarum* и оценки их эффективности. Л.: ВНИИСХМ, 1976. 31 с.
20. Hartwig U.A., Josef C.M., Phillips D.A. // Plant Physiol. 1991. V. 95. № 3. P. 797–803.
21. Акимова Г.П., Верхотуров В.В., Соколова М.Г., Белолухов С.Л. // Известия ТСХА. 2019. № 1. С. 138–145.
22. Беловежец Л.А., Макарова Л.Е., Третьякова М.С., Маркова Ю.А., Дударева Л.В., Семенова Н.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2017. Т. 53. № 1. С. 76–81.
23. Третьякова М.С., Беловежец Л.А., Маркова Ю.А., Макарова Л.Е. // Агрохимия. 2017. № 12. С. 46–51.
24. Патент РФ. 2004. № 2231546.
25. Макарова Л.Е., Смирнов В.И., Клыба Л.В., Петрова И.Г., Дударева Л.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 4. С. 394–402.

Study of the Interaction of Rhizosphere Bacteria with Non-Rhizobial Endophytic Bacteria of Pea Plants (*Pisum sativum* L.), Moving from Their Roots to the Root Zone

L. E. Makarova^{a,*}, Yu. A. Markova^a, A. S. Morits^a, M. S. Karepova^a,
A. V. Sidorov^a, and N. A. Sokolova^a

^aSiberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

*e-mail: makarova@sifibr.irk.ru

It was shown that out of 11 strains of endophytic bacteria found in the seeds of pea plants (*Pisum sativum* L.), only 6 found themselves in the aquatic growth medium of the roots of their seedlings grown under hydroculture conditions. Different effects of inoculum bacteria (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, *Azotobacter chroococcum*, and *Rhodococcus erythropolis*) on the composition and concentration of endophytic bacteria in the root zone of pea seedlings were found. All 6 cultures of endophytic bacteria found in the root growth zone showed a different ability to degrade N-phenyl-2-naphthylamine (N-PNA) to the formation of phthalates. The unequal nature of catabolism by these bacteria of this negative allelopathic component of root exudates of leguminous crops was shown by the percentage of the indicated substrate that was not destroyed in their growth medium and the ratio of phthalates formed during its degradation. These indicators can determine the degree of participation of the identified endophytic bacteria in controlling the relationship of pea plants with bacteria of various strategies of interaction.

Keywords: *Pisum sativum* L., rhizosphere, intermicrobial interactions, endophytic bacteria, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Rhodococcus*, N-phenyl-2-naphthylamine, phthalates

УДК 575.2:632.4+633.111

ВЛИЯНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ АРОМАТИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ CAD^{im} НА МИКРОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ТКАНЕЙ У ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ *Triticum aestivum* L.

© 2021 г. А. А. Коновалов¹ *, Е. В. Карпова², И. К. Шундрин²,
Е. П. Размахнин³, И. В. Ельцов⁴, Н. П. Гончаров^{1,5}

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

²Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

³Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирская область, Новосибирский район, пос. Краснообск, 630501 Россия

⁴Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

⁵Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, 630039 Россия

*e-mail: konov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 14.12.2020 г.

После доработки 15.02.2021 г.

Принята к публикации 22.02.2021 г.

В работе изучали наследование аллельных вариантов ароматической алкогольдегидрогеназы CAD^{im} (CAD intermediate) и их влияние на выраженность признаков растений яровой мягкой пшеницы: флуоресценцию срезов проростков, микроморфологию и химический состав тканей. Растения с контрастными генотипами CAD^{im} (гомозиготы +/+ и –/–) использовали для изучения автофлуоресценции тканей, микроморфологии и химического состава. Толщина стенок соломины у генотипа CAD^{im–} выше, чем у генотипа CAD^{im+}, что может влиять на устойчивость растений пшеницы к полеганию. Наблюдали различия по содержанию хлорофилла и, особенно, по соотношению хлорофиллов A и B, что вероятно влияет на фотосинтез. Обнаружено повышенное содержание карбоильных групп у генотипа CAD^{im+}, а так же различия по коричневым мономерам лигнина. Из полученных результатов следует, что аллельные варианты CAD^{im+} и CAD^{im–} оказывают существенное влияние на ряд признаков растения, и, следовательно, полиморфизм по локусу CAD^{im} является функциональным, что позволяет использовать его в селекции и биотехнологии.

Ключевые слова: мягкая пшеница, дегидрогеназа коричневого спирта, автофлуоресценция, микроморфология, химический состав, лигнин

DOI: 10.31857/S0555109921040085

Полиморфизм по ферментным локусам у растений влияет на многие признаки, связанные с ростом и развитием и может приводить к существенным изменениям микроморфологии тканей и их химического состава [1]. Изучение таких различий способствует лучшему пониманию механизмов формирования признаков растения и свойств растительного сырья, и может иметь прикладное значение для селекции и в биотехнологии [2].

Фенилпропаноидный путь метаболизма, присутствующий у всех сосудистых растений, приводит к синтезу лигнина и формированию склеренхимы, ткани, выполняющей механические и защитные функции [3]. Кроме лигнина, продуктами

фенилпропаноидного пути являются лигнаны и ароматические гликозиды [4], также обладающие защитными функциями.

Терминальная реакция фенилпропаноидного пути – восстановление коричневых альдегидов до спиртов, таких как *n*-кумаровый, конифероловый и синаповый, – контролируется семейством ферментов CAD (Cinnamyl alcohol dehydrogenase – дегидрогеназа коричневого спирта; КФ 1.1.1.195) [3, 5]. Полиморфизм по генам, кодирующим CAD обнаружен у многих видов растений, и во многих случаях это приводит к существенным изменениям свойств и признаков растений [2]. Наличие или отсутствие одного из изоферментов CAD в тканях растения вызывает изменения в спектре

метаболитов, образующихся в данном участке обмена веществ, что в свою очередь может привести к изменениям других признаков, таких как устойчивость к полеганию [6–10].

У мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) описаны два набора гомеологических генов: НАДФ-зависимая САД, гены которой локализованы в длинных плечах хромосом 5-й гомеологической группы, и неспецифическая НАД(Ф)-зависимая САД, гены которой локализованы в хромосомах 6-й гомеологической группы [11–13]. Ранее было установлено, что полиморфизм САД у пшеницы влияет на механическую прочность соломины [14], и на устойчивость к листовым инфекциям – мучнистой росе и листовой (бурой) ржавчине [15].

У сорта яровой мягкой пшеницы Новосибирская 29 в промежутке между спектрами НАДФ-САД и НАД(Ф)-САД присутствует дополнительный изофермент САД (intermediate, САД^{im}). Было установлено, что наличие или отсутствие этого изофермента влияет на устойчивости к грибным инфекциям [15].

Цель работы – изучение влияния изофермента САД^{im} на микроморфометрические характеристики и химический состав тканей пшеницы.

МЕТОДИКА

Для исследования были использованы образцы мягкой яровой пшеницы *Triticum aestivum* L., контрастные по спектрам САД: сорт Новосибирская 29 селекции СибНИИРС, у которой присутствует изофермент САД^{im+} (intermediate) с подвижностью, промежуточной между НАДФ-САД и НАД(Ф)-САД, и сортообразец Яровая-9 (селекционер Е.П. Размахнин), у которых этот изофермент отсутствовал.

Гибриды первого поколения имели фенотип САД^{im+}, т.е. признак САД^{im+} являлся доминантным. Во втором поколении наблюдалось расщепление в соотношении 3 : 1 САД^{im+} к САД^{im-} (образцы, не содержащие изофермент). Скрещивание и последующее выделение потомства F₃ (третьего поколения) позволило выровнять генетический фон, поскольку исходные образцы могли различаться по другим генам. Среди растений F₃ были отобраны гомозиготные потомства с контрастными фенотипами САД^{im+} и САД^{im-}, ставшие объектами данного исследования.

Изоферментные спектры САД определяли методом гель-электрофореза, с последующей окраской на САД-активность тетразолиевым методом, с использованием НАДФ в качестве кофактора и коричневого спирта в качестве субстрата [11].

Автофлуоресценцию изучали на поперечных срезах недельных проростков. Срезы толщиной 30 мкм получали на замораживающем микротоме

Криостат НМ 550 (“Termo Scientific”, Финляндия), препараты просматривали на флуоресцентном микроскопе AxioImager Z1 с приставкой ApoTome и программой AxioVision (“Carl Zeiss”, Германия), при возбуждении флуоресценции излучением с длинами волн 365, 470 и 546 нм. Микроморфологические показатели стеблей зрелых растений определяли с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) ТМ-1000 (“Hitachi”, Япония). Параметры работы СЭМ – ускоряющее напряжение 15 кэВ, режим низкого вакуума. Образцы поперечных срезов стеблей без предварительной обработки фиксировались на предметном столике с помощью токопроводящего скотча.

Термогравиметрический анализ (ТГА) проводили на приборе NETZSCH STA 409 (Германия). Содержание золы определяли как остаток после нагревания при 600°C.

Высушенные на воздухе стебли пшеницы измельчали и экстрагировали смесью толуол/этанол (2 : 1 по объему) в аппарате Сокслета в течение 8 ч. Содержание целлюлозы и лигнина Комарова определяли по стандартной методике [16]. Раствор после отделения лигнина Комарова использовался для спектрофотометрического определения содержания кислоторастворимого лигнина [17]. Соотношение гидроксибензильных, гваяцильных и сиригильных звеньев в структуре лигнина определяли методом нитробензольного окисления (НБО), как в предыдущей работе [14].

Для определения содержания флавоноидов навеску спирто-толуольного экстракта стеблей растений растворяли в этаноле в ультразвуковой ванне (УЗВ), раствор центрифугировали, аликвоту раствора смешивали с раствором хлорида алюминия в этаноле, фотометрировали на спектрофотометре Cary-5000 (“Varian”, США), в 1 см кювете. Содержание флавоноидов определяли по калибровочному графику в эквиваленте кверцетина на г сырья (мгQE/г).

Содержание остаточных хлорофиллов в зрелых растениях (в мг/г сухого сырья) определяли двумя способами. В первом случае навеску спирто-толуольного экстракта растворяли в ацетоне в УЗВ, раствор центрифугировали и фотометрировали в 1 см кювете. Во втором варианте навеску исходного сухого сырья экстрагировали ацетоном в УЗВ в течение часа, раствор фильтровали и фотометрировали в 1 см кювете. Содержание хлорофиллов рассчитывали по поглощению при 662 и 644 нм [18]. Для растворов пигментов в неразбавленном ацетоне использовали следующие уравнения:

$$C_A = 9.784E_{662} - 0.990E_{644};$$

$$C_B = 21.426E_{644} - 4.650E_{662},$$

где C_A и C_B – содержание соответственно хлорофилла A и B (в мг/л); E_{662} и E_{644} – величина опти-

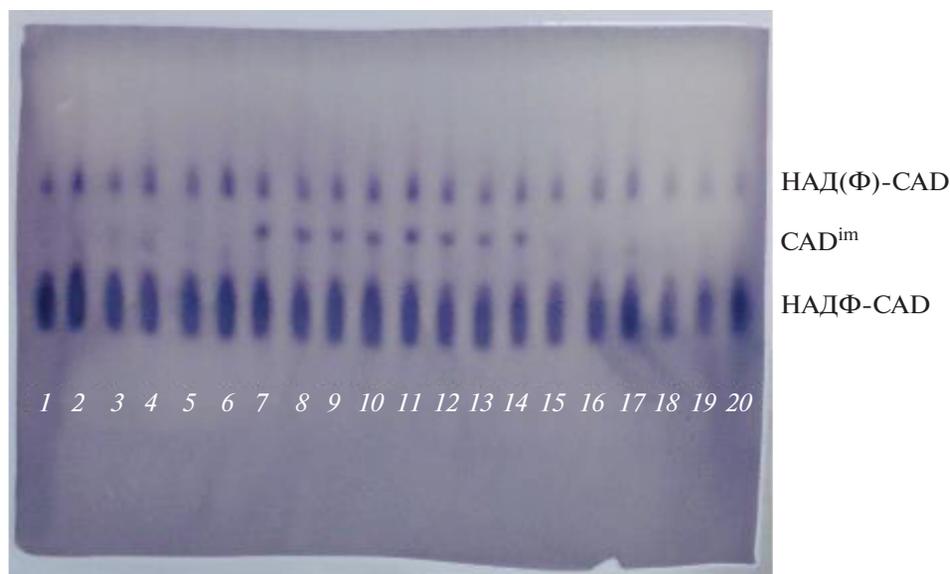


Рис. 1. Зимограмма CAD проростков пшеницы: 1–6 и 15–20: CAD^{im-}; 7–14: CAD^{im+}.

ческой плотности суммарной вытяжки пигментов при двух длинах волн, соответствующих максимумам пигментов в данном растворителе.

Выделение образцов диоксанлигнинов и их анализ ЯМР-спектроскопией проводили как описано ранее [9]. Отнесение сигналов протонного магнитного резонанса (ПМР) и магнитного резонанса по ¹³C проводили согласно [19]. Отнесение кросс-сигналов ¹H/¹³C в HSQC-спектрах (heteronuclear single quantum coherence) диоксанлигнинов проводилось по [20, 21]. Относительное содержание основных типов связей в макромолекуле лигнина, концевых групп, молярное соотношение мономерных звеньев (H : G : S), содержание кумаратов и ферулатов определяли согласно [21]. ИК-спектры экстрактов и образцов диоксанлигнина регистрировали на ИК-Фурье спектрометре Tensor 27 (“Bruker”, Германия) в диапазоне 4000–400 см⁻¹, с разрешением 4 см⁻¹ по 32 сканирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изофермент CAD^{im} на зимограмме располагался между спектрами НАДФ-CAD (в “быстрой” зоне) и НАД(Ф)-CAD (в “медленной” зоне) (рис. 1). Аллельные варианты выглядят как присутствие или отсутствие окрашенной зоны, соответственно, аллельные варианты были обозначены как CAD^{im+} (наличие изофермента) и CAD^{im-} (отсутствие изофермента), генотипы соответственно +/+ или -/-.

Во втором поколении расщепление в потомствах соответствовало моногенному соотношению 3 : 1, как у прямых, так и обратных гибридов, то есть реципрокные различия отсутствовали

(табл. 1). Из этого следовало, что фермент CAD^{im} контролируется одним ядерным геном с аллелями CAD^{im+} и CAD^{im-}. Аллель CAD^{im+} является функциональным, аллель CAD^{im-} относится к так называемым нулевым аллелям, лишённым специфической активности. Растения, гомозиготные по функциональному и нулевому аллелю фермента, могли различаться по набору метаболитов и другим показателям. В следующем поколении F₃ (третье поколение гибридов) были выделены гомозиготные потомства (потомства, где все растения имели генотип +/+ или -/-, и соответствующий фенотип: наличие или отсутствие изофермента CAD^{im}), которые были использованы для изучения свойств тканей.

На срезах недельных проростков изучаемых генотипов обнаружены различия по автофлуоресценции тканей (рис. 2). Генотип CAD^{im-} сильнее флуоресцирует в красной и зелёной областях, генотип CAD^{im+} в синей, коротковолновой области.

Генотипы CAD^{im+} и CAD^{im-} различались по морфологии клеток в тканях стебля (табл. 2, рис. 3). Толщина стенок у клеток генотипа CAD^{im-} выше, чем у генотипа CAD^{im+}, при этом толщина скле-

Таблица 1. Расщепление в реципрокных потомствах F₂ (второе поколение гибридов) яровой мягкой пшеницы

Потомство	CAD ^{im+}	CAD ^{im-}	χ ²
(Я-9 × Н29)	132	49	0.41
(Н29 × Я-9)	168	69	2.13
Всего	300	118	2.32

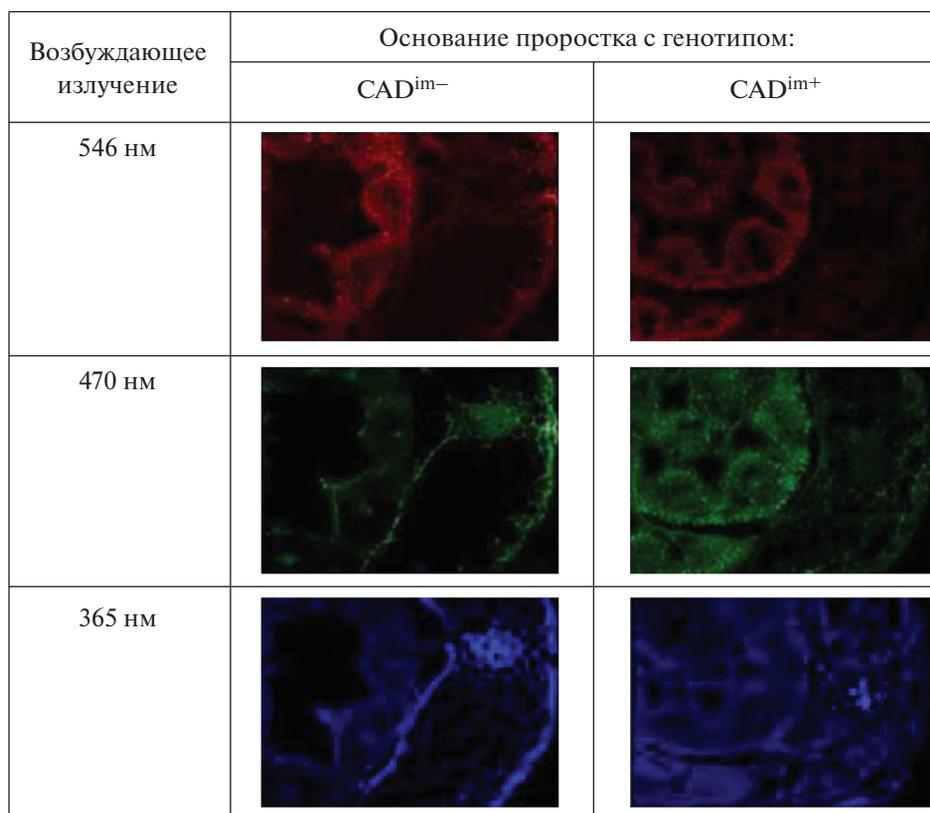


Рис. 2. Автофлуоресценция тканей на срезах проростков.

ренхимного слоя и толщина стенки соломины не различались.

Анализ химического состава тканей стеблей растений показал, что содержание полимерных компонентов в образцах довольно близко (табл. 3). Различия наблюдались в зольности, соотношении гваяцильных и сиригинильных мономеров в структуре лигнинов, а также в соотношении пигментов. Соотношение хлорофиллов *A* и *B* менялось в зависимости от способа экстракции, однако в обоих случаях обнаружено аномально высокое содержание хлорофилла *B* у генотипа CAD^{im-}, содержание флавоноидов также выше у растений этого генотипа.

На рис. 4 приведены ИК-спектры спирто-толуольных экстрактов стеблей растений сравнива-

емых генотипов (спектры нормированы по полосе 1597 см⁻¹ – поглощение ароматических колец). Большая интенсивность полосы 1737 см⁻¹ в спектре генотипа CAD^{im-} подтверждает данные о повышенном содержании остаточных хлорофиллов в этих растениях. Небольшое различие в интенсивности полосы 1656 см⁻¹ указывало на меньшее содержание флавоноидов в стеблях генотипа CAD^{im+}. В то же время интенсивность полосы 1100–1000 см⁻¹ выше в спектре экстракта стеблей генотипа CAD^{im+}, что могло быть связано с большим содержанием в них углеводов. Интенсивность полосы 1713 см⁻¹ (поглощение карбонильных и карбоксильных групп) выше в спектре экстракта CAD^{im-}, что связано с большим содержанием в нем альдегидов и кислот.

Таблица 2. Морфология тканей на срезах стеблей пшеницы

Показатель	Генотип	
	CAD ^{im+}	CAD ^{im-}
Толщина стенки клетки эпидермиса, мкм	1.5 ± 0.1	2.8 ± 0.2
Толщина стенки склеренхимных клеток, мкм	2.5 ± 0.3	3.6 ± 0.1
Толщина склеренхимного слоя, мкм	60 ± 10	60 ± 10
Толщина стенки стебля, мкм	400 ± 20	415 ± 20

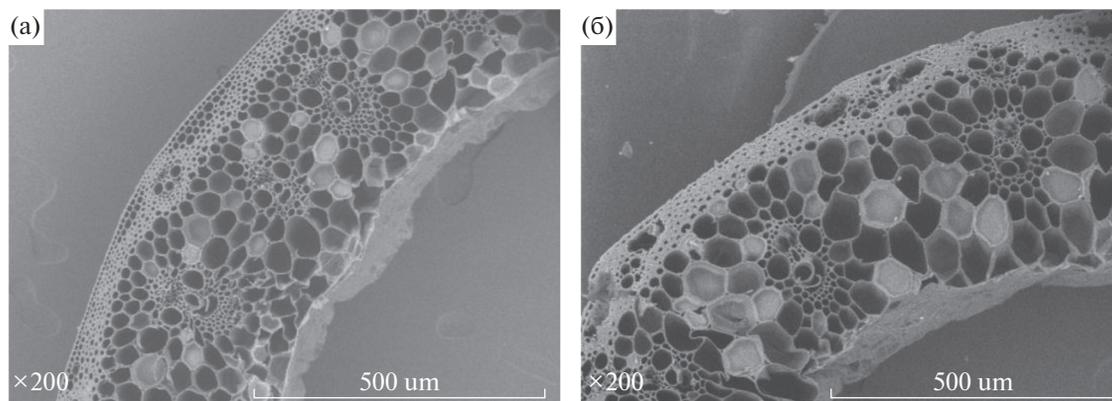


Рис. 3. СЭМ изображения срезов соломины пшениц генотипов CAD^{im+} (а) и CAD^{im-} (б) (увеличение $\times 200$).

Метод термогравиметрии использовался для оценки содержания лигнина и целлюлозы без их выделения из тканей растений с помощью химических методов. Анализ основан на том, что лигнин и целлюлоза разлагаются в разных температурных диапазонах. Целлюлоза разлагается при более низкой температуре по сравнению с лигнином. На рис. 5 приведены термограммы разложения образцов с CAD^{im+} и CAD^{im-}. Потери массы для них на первой и второй ступенях разложения одинаковы, что указывает на отсутствие различий в содержании целлюлозы и лигнина. Этот результат согласуется с данными табл. 3.

Различия в структуре лигнинов сравниваемых генотипов изучались методами ИК- и ЯМР-спектроскопии на препаратах диоксанлигнинов, выделенных из стеблей растений. По данным ИК-спектроскопии (рис. 6), в препарате диоксанлигнина из пшеницы генотипа CAD^{im+} выше содержание карбонильных групп (полоса 1707 см⁻¹), в препарате диоксанлигнина из пшеницы генотипа CAD^{im-} выше содержание алифатических гидроксильных групп (полоса 1031 см⁻¹).

Спектры ПМР препаратов диоксанлигнинов показывают несколько большее содержание аль-

Таблица 3. Химический анализ состава стеблей генотипов CAD^{im+} и CAD^{im-}

Генотип	CAD ^{im+}	CAD ^{im-}
Зольность 600°C, %	5.20	6.12
Экстрактивные вещества, %	4.59	4.13
Лигнин, %	21.60	21.53
Кислоторастворимый лигнин, %	1.50	1.51
H : G : S	0 : 1 : 0.97	0 : 1 : 1.10
Целлюлоза, %	47.48	49.17
Хлорофиллы (1 способ):		
ChlA, мг/г	0.101 \pm 0.005	0.106 \pm 0.006
ChlB, мг/г	0.029 \pm 0.001	0.123 \pm 0.005
ChlA/ChlB	3.48	0.86
Хлорофиллы (2 способ):		
ChlA, мг/г	0.013	0.013
ChlB, мг/г	0.007	0.011
ChlA/ChlB	1.86	1.18
Содержание флавоноидов	0.65 \pm 0.01	0.72 \pm 0.02

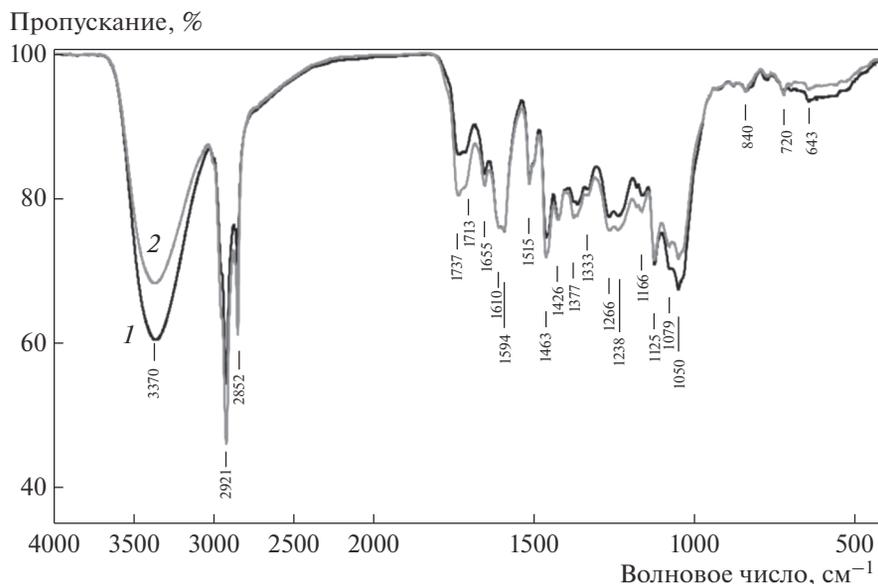


Рис. 4. ИК-спектры спирто-толуольных экстрактов стеблей растений генотипов CAD^{im+} (1) и CAD^{im-} (2).

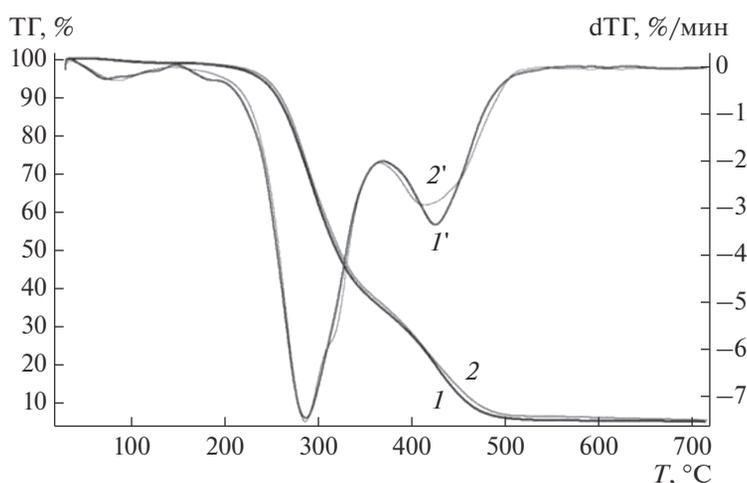


Рис. 5. ТГ и dTG диаграммы для соломы генотипов CAD^{im+} (1, 1') и CAD^{im-} (2, 2').

дегидных групп в препарате диоксанлигнина из стеблей пшеницы генотипа CAD^{im+} (табл. 4).

Содержание структурных фрагментов (рис. 7, 8) в препаратах диоксанлигнинов, оценивалось по спектрам ¹³C-ЯМР (табл. 5) и 2Д-ЯМР (табл. 6).

До недавнего времени солома злаков (стебли и листья), а также отходы обмолота (мякина) считались малоценным продуктом растениеводства и использовались нерационально. В настоящее время активно разрабатываются химические и микробиологические методы рационального использования возобновляемого растительного сырья [22, 23]. Основное влияние на свойства растительных тканей оказывают генотипы растений по генам, кон-

тролирующим соответствующие участки метаболизма.

Влияние генотипов CAD на микроморфологию тканей стебля было обнаружено ранее в работе на диплоидной пшенице [14]. В данном исследовании отсутствие изофермента CAD^{im} сказывалось на толщине клеточных стенок растения, при этом общая толщина стенок соломины оставалась неизменной. Можно предположить, что такой полиморфизм может влиять на механическую прочность соломины, как это было на диплоидной пшенице, что, в свою очередь, влияет на такой важный производственный показатель как полегаемость посевов. Влияние гена пшеницы TaCAD1 на полегание пшеницы (lodging) об-

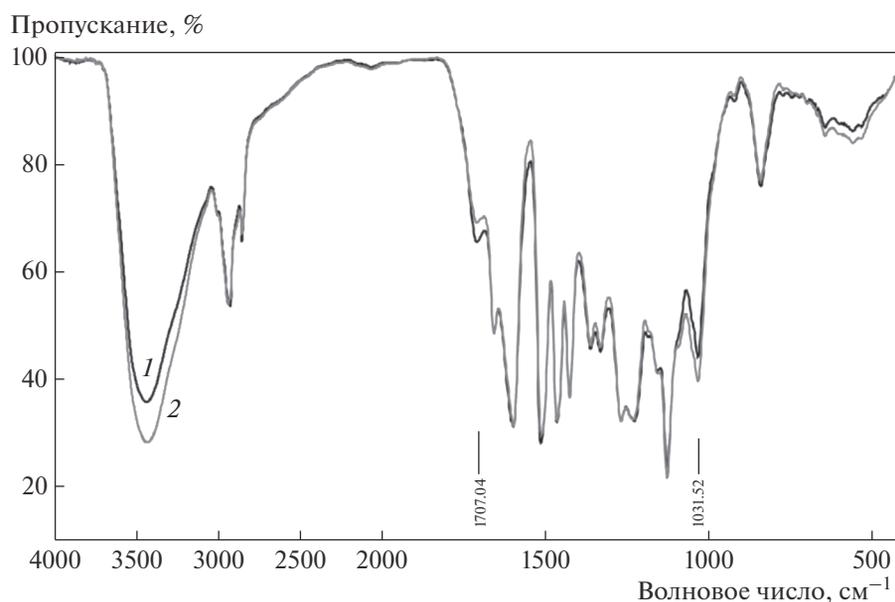


Рис. 6. ИК-спектры препаратов диоксанлигнинов стеблей растений генотипов CAD^{im+} (1) и CAD^{im-} (2).

наружено в работе [24], однако соответствует ли ген TaCAD1 гену CAD^{im} , пока не установлено. В настоящее время селекция на устойчивость к полеганию основана в основном на генах короткостебельности [25], использование полиморфизма CAD может быть дополнительным фактором устойчивости.

Флуоресцентные методы исследования хотя и не позволяют идентифицировать конкретный метаболит, но дают общую картину содержания и локализации флуоресцирующих веществ в тканях и широко используются при изучении микромор-

фологии растений [26]. Обнаруженная несколько более сильная флуоресценция в красной области у генотипа CAD^{im-} могла быть вызвана избытком хлорофилла *B* (табл. 3). Хлорофилл *B* флуоресцирует в более дальней (более “красной”) области, чем хлорофилл *A*. Более сильная флуоресценция генотипа CAD^{im-} в зеленой области, по-видимому, вызвана повышенным содержанием флавоноидов (табл. 3), дающих максимум флуоресценции в диапазоне 530–560 нм. Более сильная флуоресценция генотипа CAD^{im+} в “синей” коротковолновой области (рис. 1) могла быть связана с несколько по-

Таблица 4. Относительное содержание структурных фрагментов препаратов диоксанлигнинов по данным ПМР ($q_x = I_x/I_{общ}$)

Диапазон хим. сдвигов 1H (м.д.)	Фрагменты и группы	Отнесение	CAD^{im+}	CAD^{im-}
14.0–12.0	$H_{(C=O)OH}$	ОН карбоксильных групп	0.008	0.007
9.7–9.0	$H_{(C=O)H}$	Н альдегидных групп	0.014	0.010
12.4–9.3	$H_{ОНфен(1)}$	ОН при С-4 в гваяцильных фрагментах (G)	0.009	0.007
9.3–8.4	$H_{ОНфен(1)}$	ОН при С-4 в сирингильных звеньях (S), гваяцильных звеньях с 5-5 (C) и β -5 (B) связями	0.016	0.013
8.4–6.3	$H_{ар}$	Атомы водорода ароматических колец	0.201	0.189
6.3–2.9	$H_{O-ал}$	$CH=CH-$, $CHO-$, CH_2O- , CH_3O- группы в α , β , γ -положениях к ароматическому кольцу, CHO углеводов	0.721	0.737
2.3–0.3	$H_{\alpha,\beta,\gamma}$	$CH-$, CH_2- , CH_3- группы в α , β , γ -положениях к ароматическому кольцу, CHO углеводов	0.040	0.039

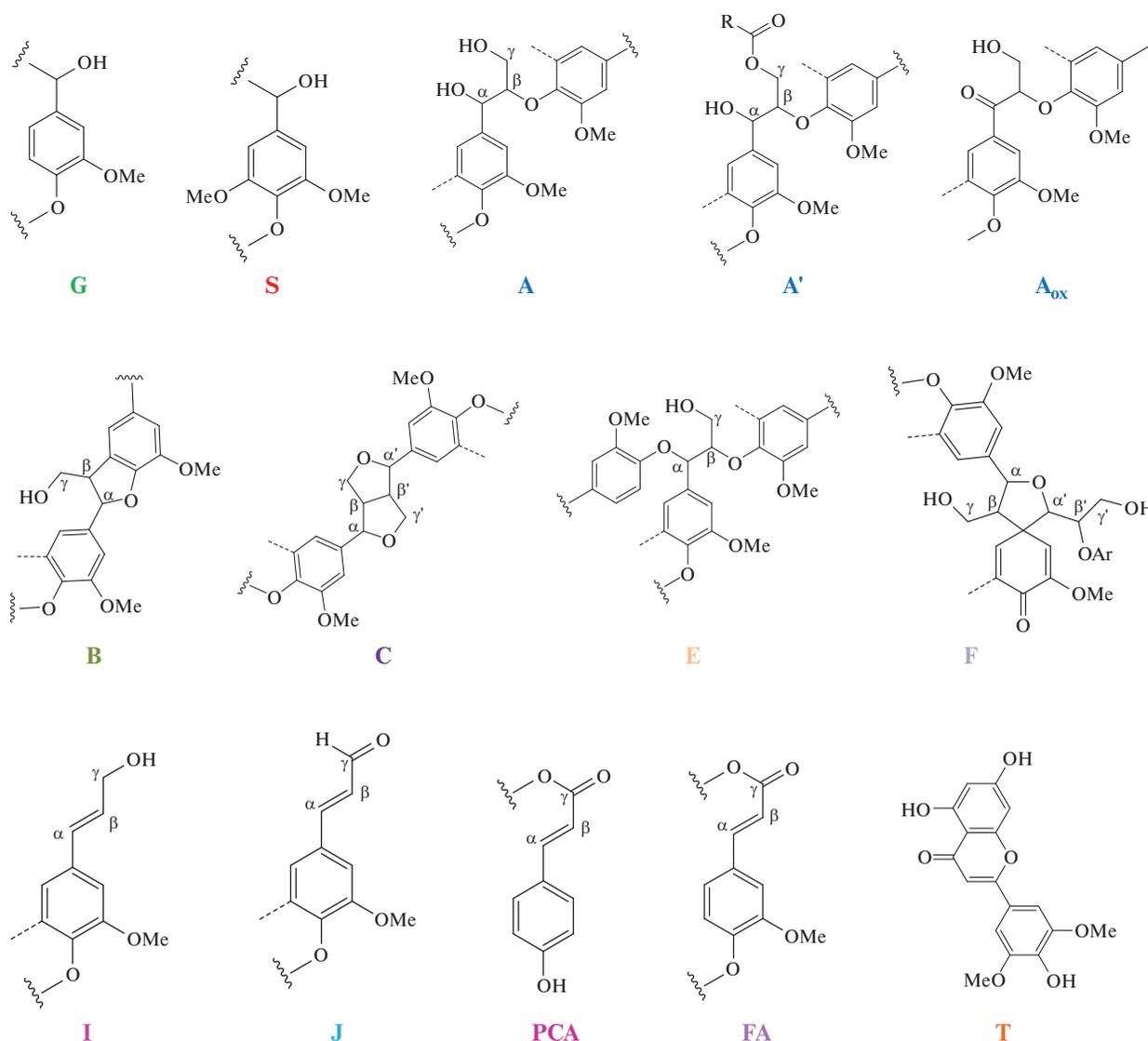


Рис. 7. Структурные фрагменты макромолекулы лигнина: G – гваяцил, S – сирингил, A/A' – β-O-4' арилэфир, B – фенилкумаран, C – резинол, E – α-O-4' арилэфир, F – спиродиенон, I – концевые группы коричневого спирта, J – концевые группы коричневого альдегида, PCA – *n*-кумараты, FA – ферулаты, T – трицин.

вышним содержанием экстрактивных веществ, среди которых присутствовали ароматические кислоты, которые флуоресцируют в этой области. Покровные ткани флуоресцируют преимущественно синим, тогда как зеленым и красным – ткани паренхимы. Вероятно, фенольные соединения, которые флуоресцируют в более коротковолновой области, локализируются во внешних слоях, в паренхиме локализованы хлорофиллы, и, возможно, флавоноидные пигменты, флуоресценция которых сдвинута в длинноволновую область [26, 27].

Химический анализ стеблей растений (табл. 3) и ТГА (рис. 4) не выявил различий по содержанию полимерных компонентов клеточной стенки в сравниваемых генотипах. Различия наблюда-

лись в содержании экстрактивных веществ, особенно хлорофиллов.

У растений с полным набором хлорофиллов соотношение ChlA/ChlB варьирует у разных видов растений от 1.7 до 5–6, т.е. концентрация хлорофилла B не превышает 60% от хлорофилла A, обычно 15–25% от общего содержания хлорофиллов [28]. У трансгенного арабидопсиса со сверхэкспрессией хлорофиллид-а-оксигеназы, при которой синтезируется повышенное количество хлорофилла B, соотношение составляло 0.92–1.13 в зависимости от световых условий [29], но у обычных нетрансгенных растений такое соотношение не описано. Следует подчеркнуть, что в данной работе изучено содержание остаточных хлорофиллов в сухом

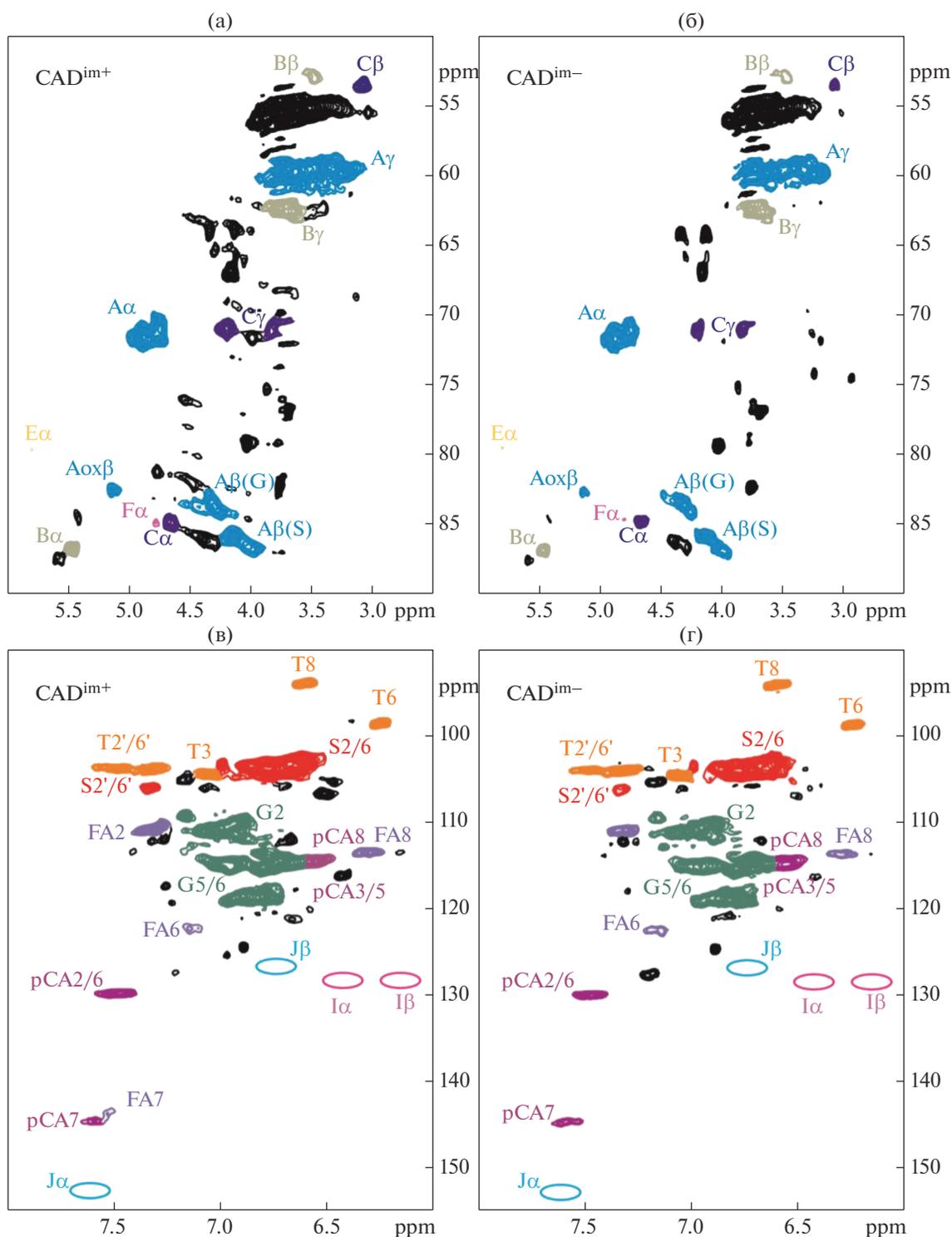


Рис. 8. Области HSQC-спектров препаратов диоксанлигнинов стеблей растений генотипов CAD^{im+} (а, б) и CAD^{im-} (б, г): области 50–90 ppm (а, б), области 90–155 ppm (в, г).

материале, которое различается в зависимости от метода выделения. Полученные генотипы в дальнейшем могут быть использованы для изучения прижизненных показателей содержания фотосинтетических пигментов, и их влияния на продуктивность.

Несмотря на то, что содержание лигнина в стеблях обоих генотипов практически одинаково, соотношение мономерных единиц, определенное методом нитробензольного окисления, показало различия в содержании сирингильных звеньев. Полное отсутствие *n*-гидроксифенилпропановых

Таблица 5. Содержание структурных элементов на одно ароматическое кольцо n_x в препаратах диоксанлигнинов по данным ^{13}C -ЯМР

Диапазон	Отнесение	CAD ^{im+}	CAD ^{im-}
220–190	C=O кетонов	0.515	0.268
210–185	(C=O)H альдегидов	0.556	0.279
185–163.5	C=O(O) карбоксильные и сложноэфирные	0.391	0.285
156–120	CH=CH в связях Ar-CH=CH-R	3.331	3.212
156–150	C-3, C-5 в сиригильных звеньях (S), C-4 в гваяцильных (G) (в том числе при кето-группе в α -положении к АК)	0.455	0.744
150–141	C-3/C-4 в гваяцильных звеньях (G), C-3/C-5 в незамещенных сиригильных звеньях (S)	1.145	0.852
141–123	C-1 в гваяцильных (G) и сиригильных (S) звеньях	1.552	1.433
138.8–133.3	C-4 в сиригильных звеньях (S)	0.482	0.580
124.5–117	C-6 в гваяцильных звеньях (G)	0.522	0.556
117–112.8	C-5 в гваяцильных звеньях (G)	0.700	0.750
112.8–95	C-1/C-3 в окисленных β -O-4 структурах (A')	1.731	1.596
112.8–108	C-2 в гваяцильных звеньях (G)	0.530	0.472
108–104	C-2/C-6 в сиригильных звеньях (S) (в том числе при кето-группе в α -положении к АК)	0.651	0.789
104–102.5	C-2/C-6 в сиригильных звеньях (S)	0.372	0.259
104–95	C-5 β -O-4 структур (A и A')	0.551	0.334
90–78	C $_{\alpha,\beta}$ в (A) и фенилкумарановых (B) структурах	0.504	0.920
80–67	C $_{\alpha,\beta}$ -ОН	0.626	1.116
74–64	C $_{\gamma}$ в CH $_2$ -O-R, CH $_2$ -ОН	0.562	0.935
64–58	Ar-OCH $_3$ β -O-4 структурах A'	0.552	0.869
58–54	метоксильные группы	2.038	2.342
54–52	C $_{\beta}$ в структуре резинола (C)	0.115	0.116
54–50	C $_{\beta}$ в фенилкумарановых структурах (B)	0.135	0.126
35–5	CH, CH $_2$, CH $_3$ алифатические	0.131	0.405
102.6–95	Углеводы	0.184	0.077

звеньев в лигнинах указывало на то, что в обоих генотипах не накапливался *n*-кумаральдегид, т.е. активность НСТ (Hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase) и/или СЗН (4-coumarate 3-hydroxylase) выше активности ССР (Cinnamoyl-CoA reductase) [30]. Пониженное соотношение сиригил/гваяцил в лигнине стеблей генотипа CAD^{im+} может быть связано с повышенной активностью САД над САld5Н (Coniferaldehyde 5-hydroxylase или F5H) в этих растениях [31].

По данным спектроскопии ЯМР содержание кето-, альдегидных и карбоксильных групп на одно ароматическое кольцо выше в лигнине пшени-

цы генотипа CAD^{im+} (почти в два раза для карбонильных групп, табл. 4). Эти данные подтверждают ИК-спектры препаратов диоксанлигнинов. Относительное содержание атомов водорода ароматических колец по данным ПМР выше в диоксанлигнине генотипа CAD^{im+}, что согласовывалось с данными НБО по содержанию гваяцильных/сиригильных фрагментов в структурах.

Двойные связи в лигнине однодольных растений в основном содержат концевые группы конифероловых и синаповых спиртов и альдегидов. Часто в структуру лигнина внедряются концевые группы коричневого спирта (I), коричневого альдеги-

Таблица 6. Структурные характеристики препаратов диоксанлигнинов по данным 2D-ЯМР

Структурный фрагмент	CAD ^{im+}	CAD ^{im-}
β -O-4' арилэфир (A/ A')	74.2	77.3
В том числе окисленный в α -положении β -O-4' арилэфир	1.3	1.0
Фенилкумараны (B)	14.3	11.6
Резинолы (C)	10.9	10.7
α -O-4' арилэфир (E)	0.2	0.1
Спиродиеноны (F)	0.4	0.3
Концевые группы		
Концевые группы коричневого спирта (I)	—	—
Концевые группы коричневого альдегида (J)	—	—
<i>n</i> -кумараты (pCA)	3.7	3.3
Ферулаты (FA)	5.8	5.2
Трицин (T)	0.08	0.08

да (J), а также *n*-кумараты (pCA) и ферулаты (FA), образующие сложноэфирные связи с гидроксильной группой при C₇ [32]. Содержание концевых групп оценивали по 2D-ЯМР-спектрам выделенных препаратов диоксанлигнинов. На рис. 8 в соответствии с цветом структурных фрагментов из рис. 7 показаны кросс-сигналы ¹H–¹³C в HSQC-спектрах. Эти спектры показывают, какие фрагменты и в каком количестве присутствуют в выделенных препаратах лигнина каждого генотипа. В препаратах диоксанлигнинов обоих изучаемых генотипов отсутствуют концевые группы коричневого альдегида и спирта (пустые области спектров J α , J β , I α , I β) (рис. 8).

Как показывают 2D-ЯМР спектры основным типом связывания структурных единиц лигнина в растениях обоих генотипов является β -O-4' ариловый эфир (структурные фрагменты A). Содержание окисленных структур β -O-4' арилэфира выше в лигнине растений генотипа CAD^{im+}. Количество резинольных структур (C) и α -O-4' связей арилэфира (E) примерно одинаково в лигнинах обоих генотипов. Содержание фенилкумарановых структур (B) и спиродиенонов (F) выше в лигнине растений генотипа CAD^{im+}, так же как и содержание *n*-кумаратов (pCA) и ферулатов (FA). Трицин (T) присутствует в лигнинах растений обоих генотипов в одинаковом количестве.

Полученные данные по строению лигнина показали, что наличие дополнительного варианта CAD способствует накоплению карбонильных групп в структуре лигнина.

Ранее было установлено влияние полиморфизма CAD на многие признаки, не связанные напрямую с фенилпропаноидным путем метабо-

лизма, в частности, на хлорофилл-связывающий белок хлоропластов (chlorophyll a/b binding protein) [33–35]. К тому же фенилпропаноидный путь метаболизма является продолжением шикиматного пути, который локализован в хлоропластах [3]. В дальнейших исследованиях предстоит выяснить, есть ли функциональная связь между синтезом хлорофилла и фенилпропаноидным метаболизмом или это случайное совпадение.

Из полученных результатов следует, что аллельные варианты CAD^{im+} и CAD^{im-} оказывают существенное влияние на ряд признаков растения, и, следовательно, полиморфизм по локусу CAD^{im} является функциональным. Изученные в данном исследовании генотипы дают возможность оценить вклад данного полиморфизма в селекционно значимые признаки у сортов образцов яровой мягкой пшеницы. Кроме того, результаты могут быть использованы при разработке технологических методов рационального использования соломы.

Автофлуоресценцию изучали на поперечных срезах недельных проростков в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Спектральные и аналитические измерения проведены в Химическом исследовательском центре коллективного пользования СО РАН.

Работа поддержана бюджетными проектами № 0259-2021-0012 (ИЦИГ СО РАН) и 0302-2020-0005 (НИОХ СО РАН), а также региональным проектом РФФИ 19-44-540003 p_a.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yoon J., Choi H., An G.* // J. Integr. Plant Biol. 2015. V. 57. P. 902–912.
2. *Коновалов А.А., Шундрин И.К., Карпова Е.В.* // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135. № 5. С. 496–513.
3. *Гудвин Т., Мерсер Э.* Введение в биохимию растений. 2 Изд. М.: Мир, 1986. Т. 1. 393 с. Т. 2. 312 с.
4. *Himi E., Maekawa M., Noda K.* // International J. Plant Genomics. 2011. V. 374: 369460. <https://doi.org/10.1155/2011/369460>
5. *Dixon R. A., Chen F., Guo D., Parvathi K.* // Phytochemistry. 2001. V. 57. P. 1069–1084. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00092-9)
6. *Hepworth D.G., Vincent J.F.V.* // Annals of Botany. 1998. V. 81. № 6. P. 751–759.
7. *Li X., Yang Y., Yao J., Chen G., Li X., Zhang Q., Wu C.* // Plant Mol. Biol. 2009. V. 69. № 6. P. 685–697.
8. *Ookawa T., Inoue K., Matsuoka M., Ebitani T., Takarada T., Yamamoto T., Ueda T., Yokoyama T., Sugiyama S., Nakaba S., Funada R., Kato H., Kanekatsu M., Toyota K., Motobayashi T., Vazirzanjani M., Tojo S., Hirasawa T.* // Sci. Rep. 2014. V. 4: 6567 <https://doi.org/10.1038/srep06567>
9. *Коновалов А.А., Шундрин И.К., Карпова Е.В., Ельцов И.В., Орлова Е.А., Гончаров Н.П.* // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 6. С. 686–693. <https://doi.org/10.18699/VJ17.286>
10. *Карпова Е.В., Шундрин И.К., Орлова Е.А., Коновалов А.А.* // Химия растительного сырья. 2019. №4. С. 87–95. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2019045238>
11. *Jaaska V.* // Theoretical and Applied Genetics. 1978. V. 53. № 5. P. 209–217.
12. *Hart G.E., Gale M.D., McIntosh R.A.* Linkage Maps of *Triticum aestivum* (Hexaploid wheat, $2n = 42$, Genomes A, B & D) and *T. tauschii* ($2n = 14$, Genome D) // Genetic maps. 6 ed. Cold Spring Harbor Lab. Pres, 1993. P. 6.204–6.219.
13. *Коновалов А.А., Шундрин И.К., Карпова Е.В., Гончаров Н.П., Кондратенко Е.Я.* // Генетика. 2016. Т. 52. № 10. С. 1222–1228. <https://doi.org/10.7868/S0016675816080051>
14. *Коновалов А.А., Шундрин И.К., Карпова Е.В., Нефедов А.А., Гончаров Н.П.* // Генетика. 2014. Т. 50. № 11. С. 1310–1318.
15. *Коновалов А.А., Орлова Е.А., Карпова Е.В., Шундрин И.К.* Генофонд и селекция растений. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2020. С. 147–150. <https://doi.org/10.18699/GPB2020-38>
16. *Оболенская А.В., Щёголев В.П., Аким Г.Л., Аким Э.Л.* Практические работы по химии древесины и целлюлозы. М.: Лесн. промышленность, 1965. 412 с.
17. *Swan B.* // Svensk Papperstidn. 1965. V. 68. № 22. P. 791–795.
18. *Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандовина Л.М.* Большой практикум по физиологии растений. М.: “Высшая школа”. 1975. 392 с
19. *Калабин Г.А., Каницкая Л.В., Кушнарев Д.Ф.* Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия, 2000. 408 с.
20. *Белый В.А., Алексеев И.Н., Садыков Р.А.* // Изв. Коми науч. центра УрО РАН. 2012. Т. 3. № 11. С. 20–26.
21. *del Río J.C., Lino A.G., Colodette J.L., Lima C.F., Gutiérrez A., Martínez Á.T., Lu F., Ralph J., Rencoret J.* // Biomass and Bioenergy. 2015. V. 81. P. 322–338.
22. *Мусеев И.И.* // Вестник Российской Академии наук. 201. Т. 81. № 5. С. 405–413.
23. *Онищенко Д.В., Рева В.П., Воронов Б.А.* // Доклады Российской Академии Сельскохозяйственных наук. 2013. № 4. С. 58–60.
24. *Ma Q.-H.* // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. № 10. P. 2735–2744. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq107>
25. *Сухих И.С., Вавилова В.Ю., Блинов А.Г., Гончаров Н.П.* // Генетика. 2021. Т. 57. № 2. С. 127–139. <https://doi.org/10.31857/S0016675821020107>
26. *Talamond P., Verdeil J.L., Conéjéro G.* // Molecules. 2015. V. 20. № 3. P. 5024–5037. <https://doi.org/10.3390/molecules20035024>
27. *Donaldson L.* // Molecules. 2020. V. 25. № 10. 2393. <https://doi.org/10.3390/molecules25102393>
28. *Тютерева Е.В., Дмитриева В.А., Войцеховская О.В.* // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 5. С. 843–855. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.5.843rus>
29. *Sakuraba Y., Balazadeh S., Tanaka R., Mueller-Roeber B., Tanaka A.* // Plant Cell Physiol. 2012. V. 53. № 3. P. 505–517. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs006>
30. *Ralph J., Akiyama T., Kim H., Lu F., Schatz P.F., Marita J.M., Ralph S.A., Reddy M.S.S., Chen F., Dixon R.A.* // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 8843–8853.
31. *Takeda Y., Koshiha T., Tobimatsu Y., Suzuki S., Murakami S., Yamamura M., Rahman M.M., Takano T., Hattori T., Sakamoto M., Umezawa T.* // Planta. 2017. V. 246. № 2. P. 337–349. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2692-x>
32. *Ralph J., Lapierre C., Boerjan W.* // Curr. Opin. Biotechnol. 2019. V. 56. P. 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.019>
33. *Dauwe R., Morreel K., Goeminne G., Gielen B., Rohde A., Van Beeumen J., Ralph J., Boudet A.M., Kopka J., Rochange S.F., Halpin C., Messens E., Boerjan W.* // Plant J. 2007. V. 52. № 2. P. 263–285.
34. *Yan L., Liu S., Zhao S., Kang Y., Wang D., Gu T., Xin Z., Xia G., Huang Y.* // Physiol. Plant. 2012. V. 146. № 4. P. 375–387.
35. *Yan L., Xia G.-M., Huang Y.-H., Zhao Sh.-Y.* // Plant Physiol. J. 2013. V. 49. № 12. P. 1433–1441.

Inheritance and Properties of Allelic Variants of CAD^{im} (Aromatic Alcohol Dehydrogenase) in Spring Bread Wheat *Triticum aestivum* L.

A. A. Konovalov^{a,*}, E. V. Karpova^b, I. K. Shundrina^b, E. P. Razmakhnin^c,
I. V. Eltsov^d, and N. P. Goncharov^{a,e}

^a*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

^b*Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of the Siberian Branch of Russian Academy of Science,
Novosibirsk, 630090 Russia*

^c*Siberian Research Institute of Crop Production and Selection – branch of ICG SB RAS,
Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501 Russia*

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

^e*Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, 630039 Russia*

*e-mail: konov@bionet.nsc.ru

In this study, we determined the inheritance of allelic variants of CAD^{im} (CAD intermediate) and their influence on expressiveness of spring bread wheat plants traits: fluorescence of seedlings slices, micromorphology and the chemical composition of tissues. Plants with contrast CAD^{im} genotypes (homozygotes +/+ and -/-) were used to study tissue autofluorescence, micromorphology and chemical composition. The thickness of the straw walls in CAD^{im-} genotype cells is higher than in CAD^{im+} genotype, which can affect the resistance of wheat plants to lodging. There are differences in the content of chlorophyll and, especially, in the ratio of chlorophylls A and B, which probably affects photosynthesis. An increased content of carbonyl groups was found in the CAD^{im+} genotype, as well as differences in the cinnamoyl monomers of lignin. From the obtained data, it follows that the allelic variants CAD^{im+} and CAD^{im-} have a significant effect on a number of plant traits, and, therefore, the polymorphism on the CAD^{im} locus is functional. This allows the use of this polymorphism in plant breeding and biotechnology.

Keywords: bread wheat, cinnamoyl alcohol dehydrogenase, autofluorescence, micromorphology, chemical composition, lignin