

СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 6, 2022

Твердофазная биodeградация полилактида (обзор) <i>В. В. Миронов, Е. С. Трофимчук, Н. А. Загустина, О. А. Иванова, А. В. Вантеева, Е. А. Бочкова, В. В. Острикова, Ш. Чжан</i>	537
Флавинозависимые монооксигеназы путей бактериальной деградации пара-замещенных фенолов <i>Н. В. Жарикова, В. В. Коробов, Е. Ю. Журенко</i>	551
Бактериальный виолацеин: свойства, биосинтез и перспективы применения <i>Н. С. Ляховченко, В. М. Травкин, В. Ю. Сенченков, И. П. Соляникова</i>	568
Полимерные мицеллы для адресной доставки лекарств (Обзор) <i>О. И. Гулий, С. А. Староверов, А. С. Фомин, Е. Г. Жничкова, С. В. Козлов, Л. Г. Ловцова, Л. А. Дыкман</i>	578
Новые FRET-пары флуоресцентных белков для определения активности каспаз <i>in vitro</i> <i>Н. К. Марынич, И. Э. Грановский, А. П. Савицкий</i>	592
Термостабильность нуклеозидфосфорилаз из прокариот. I. Роль первичной структуры <i>n</i> -концевого фрагмента белка в термостабильности уридинфосфорилаз <i>В. П. Вейко, А. Н. Антипов, Н. Н. Мордкович, Н. А. Окорокова, Т. Н. Сафонова, К. М. Поляков</i>	598
Может ли рекомбинантный химозин тупайи (<i>Tupaia belangeri chinensis</i>) коагулировать молоко коровы (<i>Bos taurus</i>)? <i>Д. В. Балабова, С. В. Беленькая, Е. А. Волосникова, Т. Гермес, В. Ю. Чиркова, Е. А. Шарлаева, Д. Н. Щербаков, А. Н. Белов, А. Д. Коваль, В. В. Ельчанинов</i>	607
Особенности физиологической адаптации полиэкстремофильного штамма дрожжей <i>Yarrowia lipolytica W29</i> в ходе продолжительного культивирования <i>Н. Н. Гесслер, Н. О. Иванова, А. С. Кокорева, О. И. Кляйн, Е. П. Исакова, Ю. И. Дерябина</i>	619
Очистка и некоторые кинетические характеристики изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы при солевом стрессе <i>А. Т. Епринцев, Д. Н. Федорин, О. Х. Флорес Каро</i>	629
Микроводоросли как объекты биомедицинских технологий: пробиотики, пребиотики, метабиотики <i>А. В. Олескин, Цао Боян</i>	635

CONTENTS

Vol. 58, No. 6, 2022

Solid-Phase Biodegradation of Polylactide (Review)

*V. V. Mironov, E. S. Trofimchuk, N. A. Zagustina, O. A. Ivanova, A. V. Vanteeva,
E. A. Bochkova, V. V. Ostrikova, and S. Zhang* 537

Flavin-Dependent Monooxygenases Involved in Bacterial Degradation of Chlorophenols

N. V. Zharikova, V. V. Korobov, and E. I. Zhurenko 551

Bacterial Violacein: Properties, Biosynthesis and Application Prospects

N. S. Lyakhovchenko, V. M. Travkin, V. Yu. Senchenkov, and I. P. Solyanikova 568

Polymer Micelles for Drug Delivery System (Review)

*O. I. Guliy, S. A. Staroverov, A. S. Fomin, E. G. Zhnichkova, S. V. Kozlov,
L. G. Lovitsova, and L. A. Dykman* 578

New FRET-pairs of Fluorescent Proteins for *in vitro* Caspase Activity Determination

N. K. Marynich, I. E. Granovsky, and A. P. Savitsky 592

Thermostability of Nucleoside Phosphorylases from Prokaryotes. I. The Role of the Primary Structure of the N-terminal Fragment of the Protein in the Thermostability of Uridine Phosphorylases

*V. P. Veiko, A. N. Antipov, N. N. Mordkovich, N. A. Okorokova,
T. N. Safonova, and K. M. Polyakov* 598

Can Recombinant Tree Shrew's (*Tupaia belangeri chinensis*) Chymosin Coagulate Cow (*Bos taurus*) Milk?

*D. V. Balabova, S. V. Belenkaya, E. A. Volosnikova, T. Hermes, V. Y. Chirkova,
E. A. Sharlaeva, D. N. Schherbakov, A. N. Belov, A. D. Koval, and V. V. Elchaninov* 607

Physiological Adaptation Features of the Poly-Extremophilic *Yarrowia lipolytica* Yeast W29 During Long-Lasting Cultivation

N. N. Gessler, N. O. Ivanova, A. S. Kokoreva, O. I. Klein, E. P. Isakova, and Y. I. Deryabina 619

Purification and Some Kinetic Characteristics of Succinate Dehydrogenase Isoenzymes from Corn Leaves under Salt Stress

A. T. Eprintsev, D. N. Fedorin, and O. Kh. Flores Karo 629

Microalgae in Terms of Biomedical Technology: Probiotics, Prebiotics, and Metabiotics

A. V. Oleskin and Cao Boyang 635

ТВЕРДОФАЗНАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ ПОЛИЛАКТИДА (ОБЗОР)

© 2022 г. В. В. Миронов^{1, *}, Е. С. Трофимчук³, Н. А. Загустина², О. А. Иванова³, А. В. Вантеева¹,
Е. А. Бочкова¹, В. В. Острикова¹, Ш. Чжан⁴

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

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

³Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

⁴Институт городской среды Китайской Академии наук, Сямынь, 361021 Китай

*e-mail: 7390530@gmail.com

Поступила в редакцию 02.06.2022 г.

После доработки 26.06.2022 г.

Принята к публикации 04.07.2022 г.

Основной проблемой, связанной с использованием полилактида (ПЛ) в различных областях, является требование контролируемой деградации его в составе отходов. Однако в настоящее время возможности биодеструкции ПЛ не изучены в достаточной степени. Предполагается, что микроорганизмы могут разлагать полимер только после его предварительного химического гидролиза и уменьшения его молекулярной массы до 10000 Да и менее. В обзоре рассмотрено влияние различных факторов на абиотическую и биотическую стадии деструкции ПЛ. Особое внимание уделено особенностям биоразложения полимера в условиях промышленного компостирования как наиболее перспективного способа его переработки в составе пищевых отходов. Приведены микроорганизмы, участвующие в деструкции ПЛ, а также их ферменты.

Ключевые слова: биопластики, полилактид, биодegradация, промышленное компостирование, пищевые отходы, микробное сообщество

DOI: 10.31857/S0555109922060101

Ежегодно образуется практически 400 млн. т отходов из пластика, и только 18% в среднем по миру из них перерабатывается и 24% сжигается [1]. Остальные 58% либо отправляются на свалки, либо попадают в естественную среду [2, 3]. Хорошо известное так называемое “большое тихоокеанское мусорное пятно”, которое в основном состоит из пластика (около 80000 тонн), занимает площадь более 1.6 млн км² и является ярким свидетельством масштабов глобальной проблемы [4]. Ситуация усугубляется тем, что основная масса пластиковой упаковки продуктов питания после использования становится практически неотделима от потока пищевых отходов и соответственно должна утилизироваться совместно. Согласно последнему исследованию ООН в 2019 г. примерно 931 млн. т продуктов питания было выброшено в мусорные баки домашних хозяйств, пунктов розничной торговли и предприятий общественного питания (<https://www.unep.org/ru/resources/doklad/doklad-yunep-ob-indekse-pischevykh-otkhodov-za-2021-god>).

Поиск биоразлагаемых, получаемых из возобновляемых ресурсов материалов привлекает все

больше внимание для решения глобальной угрозы загрязнения отходами из трудноразлагаемых полимеров и, в частности, формируемых частиц, так называемого, микропластика [5, 6]. Разработка методов создания биодegradируемых полимерных материалов, которые обычно называют биопластиками, и изучение особенностей процессов их деструкции остаются актуальными [7].

Мировое производство биопластика в настоящее время составляет более 2 млн. т ежегодно с тенденцией увеличения [8]. Переход изготовления одноразовой посуды и упаковки продуктов питания на биоразлагаемые материалы хорошо укладывается в концепцию устойчивого развития.

Среди биоразлагаемых полимеров особое внимание привлекают термопластичные сложные полиэфиры алифатического ряда, такие как полилактид (ПЛ), который может разлагаться микроорганизмами как в окружающей среде, так и в условиях промышленного компостирования [9–13]. Отсутствие токсичности позволяет широко применять ПЛ для разработки различных упаковочных материалов [14]. Молочная кислота, необхо-

димая для производства ПЛ путем поликонденсации, в основном получается в результате микробной ферментации отходов производства таких сельскохозяйственных культур, как пшеница и кукуруза [15].

В настоящее время ПЛ является одним из наиболее коммерчески производимых биопластиков, на долю которого приходится 25% мирового производства [10], а также самым распространенным биоразлагаемым упаковочным материалом для пищевых продуктов [8, 16]. Потребление ПЛ за 2015–2019 гг. выросло на 63%: со 168 до 273 тыс. т (<https://marketing.rbc.ru/articles/11659/>). Рост потребления ПЛ связан с повышением спроса на биоразлагаемые материалы на основе возобновляемого сырья.

Полимерный материал должен обладать стабильными характеристиками в течение всего срока службы, но достаточно быстро разлагаться при попадании в категорию отходов. Тем не менее использование изделий из ПЛ имеет некоторые ограничения, поскольку полимер характеризуется довольно продолжительными сроками деградации [17]. Так, в работе [18] сообщается, что для его естественного разложения требуется до 2 лет. Медленная деградация ПЛ в окружающей среде является значимой проблемой и может ограничить его применение.

В связи с общей рекомендацией выбрасывать биопластики совместно с твердыми коммунальными отходами концентрация этих продуктов в потоке отходов быстро увеличивается и, как ожидается, достигнет высоких значений в ближайшие годы: по прогнозу, в 2030 г. концентрация составит 8–10% по массе [19]. Таким образом, оценка влияния биопластиков на процесс и качество продуктов компостирования становится актуальной задачей.

В то же время постоянное улучшение технических свойств ПЛ, в том числе термостабильности и механических характеристик, приводит к значительному снижению его способности к микробному разложению. Таким образом, возникает противоречие между необходимостью улучшения потребительских свойств ПЛ и сохранением его способности к биоразложению.

Целью настоящего обзора является систематизация данных о механизмах биodeградации ПЛ, в том числе при компостировании в составе других органических отходов.

Деградации ПЛ в окружающей среде. В природных условиях сосуществуют как биотические, так и абиотические факторы разложения ПЛ [20]. На скорость деградации ПЛ в окружающей среде влияют: надмолекулярная структура, молекулярная масса, химический состав (содержание D-изомера), степень кристалличности, температуры стеклования T_g и плавления T_m , пористость, размеры изде-

лия, наличие наполнителя и др., а также факторы окружающей среды, такие как влажность, температура, pH, микроорганизмы, среда разложения (водный раствор буферов, почва, компост, биологические жидкости, *in vivo*) [20, 21].

Обычно биоразложению предшествует частичная деструкция полимера в результате различных физико-химических воздействий (температура, влажность, УФ-излучение, др.) [18, 22]. Механизмы разложения ПЛ в окружающей среде можно формально разделить на: 1) физические, относящиеся к таким изменениям, как растрескивание, охрупчивание, отслаивание, др.; 2) химические, относящиеся к изменениям на молекулярном уровне, таким как разрыв связей в основной цепи или их окисление, что зачастую приводит к снижению молекулярной массы полимера [3]. Как правило, химическое разложение при температурах, близких к температуре окружающей среды, происходит через гидролиз или окисление, которые могут быть ускорены микробной активностью, теплом, светом или их комбинацией. ПЛ может подвергаться гидролитическому, термическому, окислительному, бактериальному, ферментативному расщеплению и фотodeградации [4, 23]. В зависимости от вида воздействия, вызывающего процессы деградации, их можно разделить на небиотические (гидролиз, термическая деградация, окисление, фотолиз) и биотические процессы (потребление микроорганизмами).

Гидролитическая деструкция ПЛ включает в себя стадии водопоглощения, расщепления сложноэфирных связей и диффузии водорастворимых олигомеров из объема материала в окружающую среду [13, 16]. В процессе гидролиза вода действует как пластификатор ПЛ, тем самым повышая подвижность полимерных цепей, что приводит к кристаллизации и потере прозрачности полимера. Отмечается, что этот процесс более характерен для ПЛ с молекулярной массой менее 100 кДа. Более высокомолекулярный ПЛ в меньшей степени подвержен деградации и дольше сохраняет свою прочность и прозрачность.

В естественных условиях гидролитическая абиотическая деградация сменяется биodeградацией, при которой происходит разложение растворимых олигомеров с молекулярной массой 10000–20000 Да микроорганизмами (биотический процесс) [10, 13]. При этом на поверхностях изделия из пластика образуются биопленки, сформированные микроорганизмами [24], плотность которых может значительно возрастать при наличии оптимальных условий [18, 22]. Низкомолекулярные продукты деградации ПЛ, образующиеся при действии ферментов, относящихся к классу гидролаз (липаза, кутиназа, эстераза, др.) могут использоваться микроорганизмами с выделением CO_2 , H_2O и других продуктов метаболизма

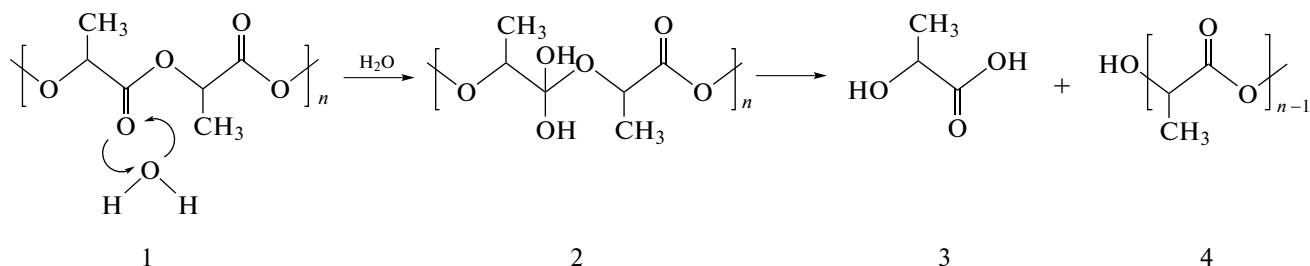


Рис. 1. Гидролитическая деструкция полимера через разрыв сложноэфирных связей макромолекул: 1 и 4 – ПЛ со степенью полимеризации n и $(n - 1)$ соответственно, 2 – промежуточный продукт реакции, 3 – молочная кислота.

[18, 22]. Исследования Ришерт и Домбровской [24] показали, что консорциумы микроорганизмов, присутствующие в компосте и иле, достаточно активно участвуют в биодegradации полимерных материалов.

Абиотическая деградация. Необходимо отметить, что именно абиотический гидролиз считается лимитирующей стадией деградации ПЛ [4, 29]. Разрыв химических связей в макромолекулах является лишь начальной стадией разрушения (эрозии) полимера, которое в итоге приводит к его полному “исчезновению” в окружающей среде. По способу разрушения выделяют поверхностную (гетерогенная) и объемную (гомогенная) эрозию в зависимости от соотношения скоростей химической деструкции, протекающей на поверхности и в объеме полимерного изделия. При гидролитической деструкции поверхностная эрозия имеет место, когда скорость реакции гидролиза выше, чем диффузия воды в объем материала, например, в присутствии катализаторов – сильных кислот и оснований. В этом случае полимер теряет массу на границе с окружающей средой, со временем уменьшается его объем, но форма образца сохраняется. При объемной эрозии происходит быстрая диффузия воды в структуру полимера, и реакция гидролиза происходит одновременно во всем объеме образца примерно с одинаковой скоростью. Для этого случая обычно значительно изменяется молекулярная масса полимера, но масса и размер образца обычно остаются постоянными в течение значительного времени. Механизм эрозии определяется размером и формой деградируемого изделия, а именно соотношением его объема и поверхности, контактирующей с окружающей средой. В этом случае поверхностная эрозия происходит, когда толщина полимерного изделия больше её критической величины $L_{кр}$ (для ПЛ $L_{кр} = 7.4$ см [27]), если же размеры меньше $L_{кр}$, то преобладает объемная эрозия.

Как правило, абиотическая деградация полиэфиров состоит из двух последовательных процессов: сначала происходит диффузия воды в объем полимера, а затем его гидролитическая деструкция

через разрыв сложноэфирных связей макромолекул по реакции, рис. 1.

Скорость этого процесса в значительной степени зависит от молекулярной массы полимера. Так, срок разложения высокомолекулярного частично кристаллического поли(L-лактида) составляет не менее двух лет, тогда как низкомолекулярного – всего несколько недель. Кале с соавт. [13] сообщают о снижении скорости разложения ПЛ в компосте при увеличении молекулярной массы (M_m) полимера.

Важнейшими факторами, оказывающими влияние на скорость разложения, являются степень кристалличности и размер кристаллитов [25], поскольку доступ молекул воды в более плотные кристаллические области материала затруднен, и деструкция в них проходит значительно медленнее, чем в менее плотных аморфных областях. В первую очередь разлагаются аморфные области, степень кристалличности материала по мере его деструкции сначала растет и только, когда начинают деградировать кристаллические области, она падает [26]. На ранних этапах разложения, пока процесс происходит в аморфной фазе, размер кристаллитов не оказывает значительного влияния на скорость процесса. На поздних этапах разложения во время деструкции кристаллической фазы размер кристаллитов приобретает важную роль: чем размер больше, тем более она затруднена [28].

Влияние таких характеристик как стереорегулярность и оптическая чистота на скорость разложения значительно меньше, чем молекулярной массы. При введении звеньев D- или D, L-лактида в ПЛ деструкция полимера ускоряется. Это связано с нарушением упорядоченности цепей и уменьшением степени кристалличности, что приводит к ускорению диффузионных процессов в аморфных областях [29–31]. Например, для деструкции аморфного высокомолекулярного поли(D, L-лактида) требуется не более 12–16 мес [17].

Температура играет решающую роль в гидролизе ПЛ. Сообщается Кастро-Агирре с соавт. [15], что этот процесс активизируется при температуре

выше 30°C. Значительное увеличение скорости гидролитической деструкции происходит при достижении температуры стеклования (около 60°C) [32]. В работах Иньигес-Франко и соавт. (2016) и Тейшейра и соавт. (2021) отмечается, что скорость гидролиза ПЛ выше в смесях воды с этанолом или акрилонитрилом, что связывают с пластифицирующим действием органических растворителей и ускорением диффузии воды в объем полимера [4, 33]. При этом при повышенной температуре (130–200°C) и действии микроволнового излучения в присутствии спиртов (этанол, бутанол) разрыв сложноэфирных связей ПЛ может происходить в результате реакции алкоголиза, без участия молекул воды [34].

Известно, что гидролиз сложноэфирных связей ускоряется в присутствии кислот или щелочей, а его механизм зависит от pH среды [21]. В сильноокислой среде преобладает механизм разложения, включающий отщепление концевой звена цепи, а в щелочной среде происходит отщепление линейного димера молочной кислоты с последующим разложением его до мономера. В слабкокислой или нейтральной средах имеет место случайное расщепление сложноэфирных групп, постепенная олигомеризация исходного полимера с последующим образованием растворимых продуктов [21, 35–37]. Накопление продуктов разложения в матрице вызывает эффект автокатализа, что в свою очередь влияет на кинетику и характер деструкции: могут образовываться полости внутри образца, так как скорость разложения в объеме оказывается выше, чем на поверхности [38].

По теории Питта гидролиз ПЛ описывается кинетическим уравнением реакции третьего порядка, скорость которой зависит от концентрации сложноэфирных связей, количества адсорбированной воды и концентрации кислых продуктов гидролиза [4]. Эта теория предсказывает линейную зависимость между логарифмом молекулярной массы полимера и временем разложения, но не учитывает явления переноса в процессе деструкции. В присутствии сильноокислой среды кинетика гидролиза ПЛ достаточно хорошо описывается процессом псевдопервого порядка, когда скорость процесса зависит только от концентрации сложноэфирных связей и определяется степенью полимеризации полимера.

Твердофазная деструкция. Процесс разложения ПЛ в почве происходит с существенно более низкими скоростями по сравнению с компостом из-за более низких значений температуры и влажности. В работах Караманлиоглу с соавт., а также Калмон с соавт. [39, 40] обнаружили, что через 1 г. изменения в образце ПЛ были незначительными, а через 2 г. образец ПЛ только имел некоторые признаки дегградации, хотя за это же время образец поли(ε-капролактона) разложился пол-

ностью. Это связывают с низкими скоростями гидролитической деструкции ПЛ при низких температурах – в таких условиях потребовалось бы много десятилетий, чтобы полимер разрушился до олигомерных продуктов, пригодных для утилизации микроорганизмами. Часто в результате деятельности мезо- и микрофауны, например, дождевых червей, происходит механическая дегградация и фрагментация полимерных отходов, что приводит к включению их в состав почвы.

В этой связи становятся актуальными исследования, посвященные поиску подходов изменения скорости биодегградации ПЛ, которые бы позволили контролировать протекание этого процесса в том числе в окружающей среде и в условиях компостирования.

Методы изменения скорости разложения ПЛ. Для увеличения скорости гидролитической деструкции наиболее часто используют подход, связанный с изменением геометрии цепи ПЛ. Например, введение звездообразного ПЛ (представляет собой разветвленный полимер, в котором разветвления как “лучи” выходят из одного центра) в смесь с линейным ПЛ (макромолекула, не имеющая разветвлений) приводит к снижению способности такого материала к кристаллизации. В работе [41] было показано, что с увеличением количества звездообразного ПЛ в смесевых образцах происходило значительное ускорение их дегградации: до 50% (по массе) вместо 10% – на основе линейного ПЛ. В качестве других причин увеличения скорости разложения в присутствии звездообразного ПЛ указывается его достаточно низкая молекулярная масса и большая концентрация концов с полярными ОН-группами.

Для получения материалов с контролируемыми сроками разложения часто проводят сополимеризацию исходных мономеров (лактидов) с другими лактонами [42] или аспарагиновой кислотой [43]. Например, меняя соотношение звеньев лактида и гликолида в сополимере, можно регулировать сроки разложения в диапазоне от нескольких месяцев до нескольких лет. Сополимер лактида с аспарагиновой кислотой показывает достаточно высокую скорость дегградации при 40°C в широком диапазоне pH (3.4–12.0) даже в растворах с высокой концентрацией соли NaCl вплоть до полного разложения за 30–40 сут (pH 10.4) [43].

Другой подход – синтез привитого сополимера полиакриловой кислоты на ПЛ. Для подобного сополимера уже через 7 сут при 37°C наблюдали интенсивные процессы деструкции, которые сопровождались выделением олигомерных и низкомолекулярных веществ, хотя для исходного непривитого ПЛ подобные явления наблюдали только спустя 130 сут [44]. Ускорение дегградации ПЛ происходит также при введении в него соевого

масла, которое химически подшивают к основной цепи полимера как небольшие ответвления [45]. Оригинальный подход, позволяющий не только контролировать и варьировать сроки разложения ПЛ от 2 нед. до 2 лет, но и места его деструкции, предложен в работе [46]. Для этого при синтезе полимера в основную цепь включаются звенья, содержащие легко гидролизующуюся фосфоэфирную связь, которые становятся точками разрыва макромолекулы. Необходимо отметить, что синтез сополимеров строго определенного состава представляет собой достаточно сложную задачу, решение которой требует привлечения сложного оборудования и значительных экономических затрат.

Эффективный путь к регулированию кинетики деградации – введение в полимерную матрицу функциональных добавок, ускоряющих или замедляющих разложение [47]. Обычно введение гидрофильных наполнителей (частицы металлов и их оксидов, древесный уголь, водорастворимые полимеры, слоистые силикаты, др.) повышает гидрофильность полимерной матрицы, увеличивает площадь ее поверхности, контактирующей с водой и тем самым приводит к ускорению процессов гидролитической деструкции [48–52]. Важно отметить, что контакт микроорганизмов с полимером в компосте или почве происходит на границе раздела сред, поэтому свойства поверхности играют значительную роль. Так, шероховатая поверхность с большим количеством полярных гидрофильных функциональных групп гораздо более подвержена биоразложению, чем гладкая и гидрофобная. Действительно, добавление в ПЛ ацетата целлюлозы приводило к резкому росту потери массы образцом при выдерживании в почве [51]. Влияние на деструкцию ПЛ гидрофильных частиц неорганической природы в значительной мере определяется их дисперсностью и качеством смеси. Так, в работе [53] было отмечено, что введение компатибилизатора в смесь полимера с частицами слоистого силиката (монтмориллонит) дополнительно приводит к ускорению биоразложения ПЛ в компосте и почве. В работе [54] для получения волокнистых материалов из ПЛ с ускоренными сроками разложения авторы предложили использовать молекулярный йод в качестве функциональной добавки. Исследование процесса гидролитической деструкции подобных волокон показало, что такие образцы деградируют быстрее по сравнению с незаполненными матрицами.

Важно отметить, что введение наполнителей щелочной природы, например, карбонатов натрия, кальция или цинка в сополимер L-лактида и гликолида замедляет его разложение вследствие нейтрализации карбоксильных групп кислот, образующихся в ходе гидролиза, а также устранению автокаталитического эффекта продуктов разложения [55]. Наполнители, снижающие чувстви-

тельность ПЛ к влаге, также препятствуют его быстрой деградации. Например, добавление 30–40% (по массе) карбида кремния SiC приводит к увеличению срока разложения композита в нейтральной среде при 50°C до 140 сут (для исходного ПЛ этот срок составлял около 60 сут) [56], что авторы связывали с уменьшением влагопоглощения и коэффициента диффузии для наполненных образцов. Похожее действие наблюдали при добавлении частиц наноглин и графеновых нанопластинок [26]. Другой механизм, позволяющий снизить скорость биоразложения ПЛ, основан на введении в него веществ, обладающих антибактериальными свойствами, например, наночастиц серебра [57], что препятствует образованию на поверхности такого материала биопленки из микроорганизмов, осуществляющих биотическую деградацию.

Пленки из ПЛ, содержащие наночастицы лигнина, были предложены в качестве пищевых упаковочных материалов [58]. Сообщается, что добавление до 3% (по массе) наночастиц лигнина придавало пленкам ПЛ УФ-защитные, антиоксидантные и антибактериальные свойства, при этом термическая стабильность ПЛ не изменялась, и пленки разлагались при лабораторном компостировании до уровня распада выше 90% за 17 сут.

Важным способом изменения эксплуатационных свойств ПЛ и увеличения его теплостойкости является введение в полимер зародышеобразователей, которые ускоряют процесс кристаллизации [15]. Например, Corbion Purac® (Нидерланды) производит ударопрочную и термостойкую посуду на основе ПЛ (Puralact®), которую можно использовать в микроволновой печи. Ожидается, что термостойкая посуда для пищевых продуктов из ПЛ станет более доступной в ближайшие годы. В то же время необходимо помнить, что при достижении улучшенной прочности и увеличения степени кристалличности модифицированных ПЛ необходимо сохранять способность к биологическому разложению [59].

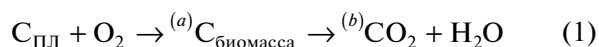
Компостирование ПЛ. Компостирование используется как универсальный подход к обработке биоразлагаемых твердых отходов [13]. В связи с недавней коммерциализацией ПЛ для продуктов с коротким сроком хранения его деградация в условиях промышленного компостирования все чаще становится предметом исследований. Однако механизмы деградации ПЛ и понимание роли микроорганизмов все еще недостаточно изучены [20]. Компостирование – экзотермический процесс биологического окисления, в котором органический субстрат подвергается биодеградации смешанной популяцией микроорганизмов, включающей бактерии, археи и грибы [60]. При этом происходит повышение температуры в компостируемом материале до 50–60°C и выше при

относительно низкой массовой доли влаги: около 60% в начале процесса и 40–50% в конце созревания компоста.

Механизм деградации. При компостировании необходимо учитывать, что на субстрат оказывают воздействие как биотические, так и абиотические факторы [13]. Предполагается, что микроорганизмы могут разлагать полимер только после его предварительного химического гидролиза и уменьшения его молекулярной массы до 10000 Да и менее [20]. Это отличительная особенность полученных промышленно полимеров, поскольку природные биоразлагаемые полимеры деградируют под воздействием микроорганизмов за одну стадию.

Возможный процесс разложения ПЛ при компостировании включает следующие стадии: адсорбция воды, расщепление сложноэфирных связей с образованием водорастворимых олигомерных продуктов и мономеров, разложение растворимых олигомеров с молекулярной массой до 10000 Да микроорганизмами [13, 20]. Биоразложение начинается с адгезионного закрепления на поверхности ПЛ микробных клеток, которые выделяют экзоферменты, разрушающие материал [23].

Реакцию биodeградации ПЛ при компостировании можно описать следующим образом [61]:



$C_{\text{ПЛ}}$ превращается в биомассу $C_{\text{биомасса}}$ с кинетикой (а), а затем $C_{\text{биомасса}}$ превращается в CO_2 с кинетикой (б).

Лучший способ мониторинга и количественной оценки биоразложения состоит в измерении реагента (O_2) или конечного продукта (CO_2) энергетического метаболизма. Процент биodeградации представляет собой отношение между выделенным диоксидом углерода C_{CO_2} и теоретическим CO_2 , то есть количеством CO_2 , ожидаемым в случае полного окисления углерода, присутствующего в образце ПЛ ($C_{\text{ПЛ}}$)

$$\text{Биodeградация } \% = \frac{C_{CO_2}}{C_{\text{ПЛ}}} \times 100. \quad (2)$$

Продукты гидролиза и пути гидролиза, влияние продуктов гидролиза на процесс компостирования, глубина гидролиза. Первоначально биodeградация ПЛ происходит на поверхности и в конечном итоге распространяется внутри материала, способствуя полной его деградации [23]. Поверхностный гидролиз приводит к увеличению количества трещин на поверхности образцов ПЛ. Далее, за диффузией воды внутрь материала следует рост микроорганизмов и секреция ферментов.

Наличие сложноэфирных связей в основной цепи ПЛ делает полимер чувствительным к гидролизу как химическому, так и ферментативному [62]. В зависимости от рН среды механизм гидро-

лиза различный: ПЛ разлагается быстрее в щелочных условиях, поскольку во время гидролиза расщепление сложноэфирных групп катализируется гидроксид-ионами [20]. Также сообщается, что при разложении пластиков смешанными культурами возможно воздействие на полимер агрессивных продуктов метаболизма (например, кислот), продуцируемых компонентами сообщества, растущими на доступных источниках углерода и энергии, и не образующих ферментов прямого воздействия на полимер [63]. Так при компостировании, в результате метаболизма молочнокислых бактерий, дрожжей и плесневых грибов рН отходов может снижаться от 7 до 4–5 и затем повышаться до 8–9 рН в результате разложения органических кислот и образования аммиака [64, 65].

Значимым является то, что побочные продукты разложения ПЛ могут изменять компостную среду и микробную популяцию [13]. Аурас и соавт. [66] было продемонстрировано, что не более 10% (по массе) образца ПЛ следует вносить в компостируемый материал, чтобы избежать подкисления из-за образования молочной кислоты в процессе гидролиза. По другим данным, при увеличении содержания ПЛ в компосте до 30% (по массе) происходило замедление разложения полимера вследствие снижения рН компоста с 6.0 до 4.0 через 4 нед. [67]. Таким образом, следует учитывать общее количество ПЛ, вносимого при компостировании, а также рН отходов.

Скорость гидролиза заметно возрастает с ростом температуры, особенно при превышении температуры стеклования [68]. Ранее было показано, что при компостировании как органической фракции твердых коммунальных отходов (**ОФТКО**), так и пищевых отходов, температура саморазогрева, превышающая температуру стеклования аморфного ПЛ (~60°C), наблюдалась в течение 10–12 сут [64, 65].

Микроорганизмы, участвующие в деградации ПЛ. На сегодняшний день опубликовано достаточно большое количество работ, посвященных микроорганизмам – деструкторам ПЛ, табл. 1. В лабораторных экспериментах исследованы и описаны, главным образом, монокультуры бактерий и грибов, разлагающих ПЛ. Вместе с тем, относительно мало работ по изучению активности бинарных культур и более сложных микробных сообществ, синергии и взаимодействия разных микроорганизмов при деградации ПЛ, кворум-сенсингу в таких сообществах. Все перечисленные вопросы станут новыми важными направлениями в исследованиях микробной деградации этого полимера [23, 69].

Способность к деградации ПЛ могут проявлять микробные сообщества из различных мест обитания, с разной степенью антропогенной нагрузки. В лабораторных условиях наибольшую эффек-

тивность демонстрируют микроорганизмы сообщества компоста и активного ила [24]. В сообществе компоста, включающего как бактерии, так и микромицеты, при разложении ПЛ наблюдалась синергия между этими группами микроорганизмов [70]. Микроорганизмы способны осуществлять деструкцию даже модифицированного ПЛ, включающего различные антибактериальные добавки. Возможность последующей деструкции такого полимера позволит создавать, к примеру, упаковки для пищевых продуктов с антибактериальными свойствами для пролонгирования сроков хранения [57, 71].

Большинство известных видов бактерий, разрушающих ПЛ, относятся к филумам *Actinomycetota*, *Pseudomonadota*, *Bacillota* и *Bacteroidota*, виды грибов – в основном относятся к *Basidiomycota* и *Ascomycota* [11, 62, 70, 72–80].

Сообщается, о выявленной способности к деградации ПЛ некоторых представителей таких родов, как *Bacillus* sp. (*B. smithii*, *B. licheniformis*), *Pseudomonas* sp. (*P. geniculata*), *Pseudonocardia* sp., *Serratia* sp. (*S. plymuthica*), *Stenotrophomonas* sp. (*S. maltophilia*), *Brevibacillus*, *Geobacillus* и др. [72–74]. Некоторые виды грибов: *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Paecilomyces variotti*, *Penicillium pinophilium* и *Trichoderma viride*, были использованы для увеличения скорости биодegradации ПЛ, в том числе за счет синергетического взаимодействия с бактериями из почвы или компоста [70].

Использование консорциума *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Serratia marcescens* и *Rhodotorula mucilaginosa* позволяло достичь 44%-ной потери массы ПЛ за 30 сут компостирования [74]. С действием гриба *Thermomyces lanuginosus* из компоста связывают быстрое разложение композитов на основе ПЛ при 50°C [11].

Семейство *Bacillaceae*, в том числе бактерии родов *Brevibacillus*, *Geobacillus* и *Bacillus*, является одним из основных в прокариотическом сообществе микроорганизмов компостируемых пищевых отходов, а также ОФТКО, составляя 16–44% в термофильную стадию [64, 65]. Актиномицеты, а именно представители рода *Actinomadura*, представлены примерно в той же степени, что и бациллы. Основными представителями родов грибов, доминирующих при компостировании пищевых отходов – *Penicillium* и *Cladosporium*, а при высокотемпературном компостировании ОФТКО – *Thermomyces*. Таким образом, как прокариоты, так и грибы в составе микробиоты пищевых отходов и ОФТКО потенциально могут быть активными деструкторами ПЛ.

Обнаружено, что большинство актинобактерий, разлагающих ПЛ, принадлежат к семейству *Pseudonocardiaceae*. Из тайской лесной почвы был выделен и исследован штамм актинобактерий *Actinomadura keratinolytica* T16-1, который показал

способность к разложению ПЛ при температуре 50°C в жидкой среде с добавлением пленки полимера в качестве источника углерода [76].

Сообщается также о трех бактериальных штаммах, выделенных из компоста и обладающих способностью разлагать ПЛ при температуре окружающей среды, – *Pseudomonas aeruginosa* S3 и *Sphingobacterium* S2, а при повышенных температурах – *Geobacillus* EC-3 [62]. Эти штаммы были способны использовать полимер в качестве единственного источника углерода при температуре ~30°C или 58°C соответственно. Все изоляты образовывали био пленку на ПЛ, что, по-видимому, сопровождалось оптимизацией секреции ферментов на поверхности полимера. Были также идентифицированы катаболические гены, ответственные за биодegradацию различных соединений (ксенобиотиков), гены транспорта и утилизации лактата, а также нескольких ферментов, которые, возможно, принимают участие также в деградации многих органических загрязнителей.

Как было указано выше, некоторые микромицеты принимают участие в разложении ПЛ, хотя работ, посвященных роли грибов в данном процессе, меньше, чем посвященных бактериям [69]. Среди микромицетов, способных к деградации ПЛ, можно отметить представителей родов *Aspergillus*, *Penicillium* и *Parengyodontium* (*Tritirachium*) из микробных сообществ почвы и компоста [70, 81]. Степень и скорость деградации ПЛ грибами во многом определяется температурой среды, а также кристалличностью самого полимера [82, 83].

В ряде работ изучали инокуляцию отдельными микроорганизмами для ускорения разложения ПЛ в компосте [75, 76]. *Geobacillus thermoleovorans* был выделен и идентифицирован как микробный штамм из компоста, способный разлагать ПЛ при 58°C [75]. В работе Паттанасуттичонлакул с соавт. [76] микробный консорциум осадка сточных вод молочного производства (преобладали представители рода *Actinomadura*) и чистая культура *Pseudomonas geniculata* при совместной инокуляции и по отдельности ускоряли разложение ПЛ при выдерживании в почве.

Калита и соавт. [10] показали, что разложение ПЛ ускоряется в условиях компостирования при увеличении содержания источников азота для роста микробного сообщества. В работе Бунлуксир и соавт. [77] показано значительное ускорение разложения ПЛ: потеря массы ПЛ до 99% наблюдалась после 60 сут выдерживания в почве при использовании штамма *Pseudomonas geniculata* и внесении соевого экстракта в качестве добавки. Быстрое разложение поли(L-лактида) смешанной культурой микроорганизмов компоста наблюдали авторы в работе [78]: после 5 недель пленки фрагментировались до мелкого порошка.

Таблица 1. Ключевые микроорганизмы и ферменты, разрушающие ПЛ

Вид, штамм	Ссылка	Фермент
Бактерии		
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	[79, 84]	Сериновая протеаза
<i>Actinomadura keratinilytica T16-1</i>	[76, 80]	ПЛ-разрушающие протеазы
<i>Pseudomonas aeruginosa S3</i>	[62]	Н.о.
<i>Pseudomonas geniculata</i>	[72, 76, 77]	Н.о.
<i>Brevibacillus</i> sp.	[62]	Н.о.
<i>Serratia plymuthica</i>	[72]	Н.о.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	[73]	Н.о.
<i>Bacillus smithii</i>	[74]	Эстераза
<i>Bacillus licheniformis</i>	[11, 74]	Н.о.
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> , <i>Geobacillus EC-3</i>	[62, 74, 75]	Н.о.
<i>Sphingobacterium S2</i>	[62]	Н.о.
<i>Cryptococcus</i> sp. штамм S-2	[84]	Кутиназа (от 12 до 20%, гомологи с белками, принадлежащими к семейству кутиназ)
Грибы		
<i>Engyodontium album</i> (<i>Tritirachium album</i>)	[70, 79, 81, 84]	Протеиназа К (сериновая протеаза)
<i>Aspergillus niger</i>	[70, 72]	Липаза
<i>Paecilomyces variotti</i>	[70]	Н.о.
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	[11, 20]	Н.о.
<i>Trichoderma viride</i>	[70]	Н.о.
<i>Chaetomium globosum</i>	[70]	Н.о.
<i>Penicillium pinophilium</i>	[70]	Н.о.

Примечание: Н.о. – не определено.

Ферменты, участвующие в деструкции ПЛ. Биодegradация сложных биополимеров может осуществляться двумя типами ферментов: внеклеточными ферментами, которые расщепляют длинноцепочечные полимеры на короткие олигомеры или мономеры, которые впоследствии могут потребляться клетками микроорганизмов, и внутриклеточными ферментами, которые дополнительно расщепляют небольшие олигомерные транспортируемые в клетку единицы субстрата [62].

К микробным ферментам, потенциально участвующим в деградации ПЛ, относят карбоксиэстеразы, кутиназу, липазы, сериновые протеазы (*Tritirachium album*, *Amycolatopsis orientalis* и *Actinomadura* sp.), табл. 1. Для деструкции полимеров микроорганизмы выделяют в окружающую среду экзоферменты – деполимеразы, обладающие гидролитической активностью, для разрушения сложноэфирной связи в структуре ПЛ. С помощью внутриклеточных ферментов происходит деградация микроорганизмами олиго- и мономерных продуктов деполимеризации ПЛ с образованием в качестве конечных продуктов воды, углекислого

газа или метана [82]. Процесс индуцируется такими веществами, как желатин, эластин, фиброин, а также некоторыми белками, пептидами и аминокислотами [20]. Большинство индукторов имеют субъединицу L-аланина, схожую с субъединицей L-молочной кислоты в стереохимической позиции хирального углерода. Активность ферментов, разрушающих ПЛ, зависит от значений температуры и pH среды, кристалличности матриала, стереохимии полимерной цепи [23].

Первым описанным в литературе ферментом, разлагающим ПЛ, была протеиназа К (сериновая протеаза), выделенная из микромицета *Engyodontium album* (*Tritirachium album*) [85]. Сообщается также, что у актинобактерий рода *Amycolatopsis* идентифицирована сериновая протеаза, которая может осуществлять гидролиз ПЛ в качестве субстрата и расщеплять сложноэфирную связь [79]. В геноме *Pseudomonas aeruginosa S3*, разрушающего ПЛ, было обнаружено 75 различных типов протеиназ, 50 эстераз и 25 различных типов липаз [62].

В работе [84] было показано, что фермент (от 12 до 20%, гомологи с белками, принадлежащими к семейству кутиназ), экстрагированный из дрож-

жей *Cryptococcus* sp. штамм S-2, значительно ускорил разложение высокомолекулярного ПЛ. Так, при концентрации фермента 0.8 мкг мл^{-1} полное разложение высокомолекулярного ПЛ (M_m 140 кДа) происходило за 60 ч, тогда как протеиназа К полностью гидролизовала ПЛ при концентрации 400 мкг мл^{-1} за 88 ч.

Эффективность компостирования. Компостирование начинается с мезофильной фазы, в которой температура постепенно повышается до 45°C . При этом, при компостировании ОФТКО, в первые 7 сут из-за деятельности молочнокислых микроорганизмов происходит закисление среды до pH 4–5 [64]. За этим этапом следует термофильная фаза, которая протекает при температурах, оптимальных для проявления микробной активности (между 45 и 70°C) и сопровождается образованием аммиака в газовых порах до $6 \text{ мг NH}_3 \text{ сут}^{-1} \text{ кг}^{-1}$ сухого органического вещества. К окончанию активной фазы разложения ОФТКО (первые 28 сут) pH и электропроводность повышаются до 8–9 и $2000 \text{ мкСм см}^{-1}$ соответственно. Такая динамика, возможно, обеспечивает сравнительно быструю деградацию ПЛ в составе ОФТКО.

Обычно на разложение упаковки из ПЛ в компосте требуется не более 90 дней [13]. Сравнительные результаты биodeградации ПЛ при компостировании представлены в табл. 2 [13, 15, 58, 86–90]. Подавляющее большинство испытаний на биоразлагаемость ПЛ проведено в лабораторных условиях при постоянной температуре 58°C , pH ~ 7 и использовании в качестве субстрата стабильного компостного материала из растительных и животноводческих отходов. Несмотря на близкие условия результаты биоразложения сильно разнятся – от 30 до 100% за время от 17 до 98 сут. В настоящее время отсутствуют результаты исследования биodeградации ПЛ в составе пищевых отходов в контролируемых условиях промышленного компостирования.

Наряду с так называемым термофильным компостированием, нередки случаи дальнейшего повышения температуры саморазогрева до 80°C и выше в течение 5–7 сут и более, что является критерием отнесения процесса к гипертермофильному компостированию (ГТК) [91]. Некоторые исследователи считают, что ГТК способствует более быстрому созреванию компоста, удержанию азота в системе, а также в большей степени снижает содержание антибиотиков и микропластика в отходах [92–94]. Запуск такого процесса с внесением культур гипертермофильных микроорганизмов показан в работе [95].

Компостирование приводит к значительному снижению молекулярной массы ПЛ (рис. 2). Гил-Кастелл с соавт. [86] показали уменьшение M_m ПЛ с 57000 до 5000–10000 Да. Причем это снижение было обнаружено уже на 15 сут нахождения

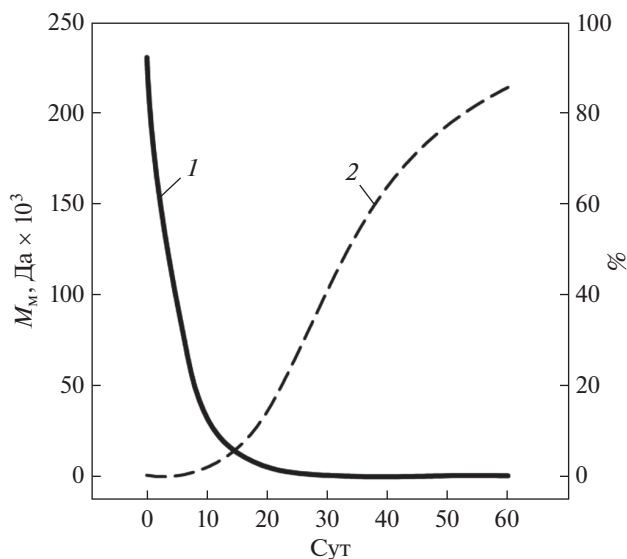


Рис. 2. Динамика молекулярной массы M_m (1) и биodeградации ПЛ (2) при компостировании (на основе [13, 15]).

ПЛ в компосте как при 58°C , так и при 80°C . Последующая выдержка не приводила к дальнейшему снижению M_m вплоть до полного разрушения образцов. Такое поведение характерно для материалов на основе ПЛ, подвергающихся биodeградации при температуре выше температуры стеклования, которая также усиливается за счет более высокой активности молекул воды. Температура является решающим фактором для снижения M_m . Более высокие температуры увеличивают как подвижность полимерных цепей, так и активность молекул воды, что приводит к усиленному гидролизу полимеров за счет разрыва сложноэфирной связи. Между тем, если такую сверхвысокую температуру ($>80^\circ\text{C}$) отходы приобретают при компостировании в результате естественного микробного экзотермического разложения, то это может быть действенным инструментом ускорения биodeградации ПЛ.

ASTM D5338 и ISO 14855 являются основными стандартами, которые используют для измерения аэробного биоразложения пластиковых материалов в условиях компостирования путем подсчета, выделяющегося CO_2 [15]. Определение степени дезинтеграции пластиковых материалов в лабораторных моделируемых условиях компостирования проводятся согласно ISO 20200. Согласно этому методу, используемый компост должен быть от 2 до 4 мес зрелости с pH 7–9. При испытании поддерживается постоянная температура $58 \pm 2^\circ\text{C}$. В то же время условия при реальном компостировании значительно отличаются от условий испытаний [64, 65]: сукцессия микробного сообщества, pH меняется от 4–5 до 8–9, темпера-

Таблица 2. Сравнительные результаты биодegradации ПЛ при компостировании

Вид ПЛ, размер образца	Субстрат	Условия, метод	Время компостирования, сут	Температура, массовая доля влаги, рН	Разложение	Источник
Аморфный ПЛ, нд	нд	Лабораторные, без перемешивания	60	58 ± 5°C, нд	75%	[15]
Аморфный ПЛ, 200 × 65 × 1 мм	Компост (3 мес) из коровьего навоза, древесной стружки и отходов корма	Лабораторные ASTM D5338, перемешивание 2 раза в неделю	58	58 ± 5°C, нд	77.8–84.2%	[13]
Аморфный ПЛ, 25 × 25 × 1 мм	Компост (нет данных о составе)	Производственные, без перемешивания	30	65 ± 5°C, 63 ± 5% по массе, рН 8.5 ± 0.5	снижение M_m до 4100 Да	[86]
Аморфный ПЛ + галлуазит (нанотрубки), 1–5% по массе, 10 × 5 × 1 мм	Смесь листьев, древесной щепы, травы, почвы, компоста	Лабораторные ISO 20200, без перемешивания	90	58 ± 2°C, н.д. 80 ± 2°C, н.д.	100% 100%	[87]
Аморфный ПЛ + водоросли, 5% по массе, пластины толщиной 0.45мм	Пищевые отходы	Лабораторные ASTM D5338, без перемешивания	98	34–65 °C (max 72°C), 50–60% по массе, 6.7 рН 34–80°C (max 87°C), 50–60% по массе, 6.7 рН	90% 100%	[88]
Аморфный ПЛ + лигнин 1–3% по массе, пленка 25 × 25мм	Компост, опилки, корм для кроликов, крахмал, сахара, масла и мочевины	Лабораторные ISO 20200, с перемешиванием	17	58 ± 5°C, 50% по массе, нд	90%	[58]
Аморфный ПЛ + тальк/мел, 30 × 60 × 2 мм	Компост (нд. о составе)	Лабораторные ISO 16929, с перемешиванием	84	60°C, нд, >5 рН	30–40%*	[89]
Аморфный ПЛ + LLDPE**, 1–5% по массе, пластины толщиной 0.45мм	Шлам бумажной фабрики, листья, навоз коровий, опилки	Лабораторные ASTM D5338, с перемешиванием	90	58 ± 5°C, 60% по массе, нд	50–80%	[90]

Примечание: нд – нет данных; *оценивали фрагментацию образцов; **LLDPE – линейный полиэтилен низкой плотности на биологической основе с различной концентрацией микрокристаллической целлюлозы.

тура от 20 до 75°C. Так, по мнению Кале с соавт. [13], время биodeградации в смоделированных и реальных условиях промышленного компостирования может сильно различаться. По сведениям Тосин и соавт. [96], методы испытаний с использованием зрелого компоста в качестве субстрата могут не соответствовать скорости биodeградации, происходящей в свежих отходах.

Следует учитывать также, что разложение термоустойчивых кристаллических ПЛ протекает медленнее, чем аморфных [20, 97]. При этом скорость ферментативной деградации в 7 раз ниже для высококристаллического ПЛ по сравнению с аморфными образцами. Таким образом, улучшение физических свойств ПЛ, с одной стороны, расширяет области применения этого материала, с другой стороны, ухудшает биоразлагаемость и перспективу утилизации отработанной массы полимера.

В обзоре обобщены результаты современных исследований по биodeградации ПЛ. Анализ литературных данных показал, что изменение или химическая модификация ПЛ его молекулярных и структурных характеристик и материалов на его основе, природы вводимых функциональных добавок и изменения условий разложения обуславливают возможность изменять скорость деградации биопластика в широких пределах. При разработке новых подходов, которые направлены на улучшение потребительских свойств биопластика и их сохранение в течение всего срока службы в условиях окружающей среды необходимо находить баланс между обеспечением сохранения и улучшения свойств материала и необходимостью быстрой деградации после его использования, когда биопластик становится отходом.

Детальное изучение процесса деградации структурно различных ПЛ и композитов на его основе представляется актуальным, поскольку открывает возможности регулирования скорости деградации изделий, изготовленных из ПЛ, и расширения областей их применения. Разработка биопластиков с контролируемым периодом разложения остается приоритетной задачей.

Компостирование является наиболее действенным способом быстрой деградации ПЛ в составе пищевых отходов. Динамика изменения физико-химических и биологических свойств пищевых отходов при компостировании обуславливает достаточно высокие скорости гидролиза и микробной деградации ПЛ. В отличие от стандартных, в реальных условиях ПЛ претерпевает воздействие меняющихся величин рН (от 3–5 до 8–9), высоких температур 65–75°C, высоких концентраций аммиака и широкого спектра различных микроорга-

низмов и синтезируемых ими ферментов. Все эти факторы влияют на деструкцию полимера и обуславливают совершенно другие скорости процесса и возможные механизмы. Также необходимы дополнительные исследования влияния увеличения содержания ПЛ в составе отходов на биологические и физико-химические параметры процесса и качество компоста, получаемого в коммерческих потоках компостирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumagai Sh., Nakatani J., Saito Y., Fukushima Y., Yoshioka T. // J. Japan Petroleum Institute. 2020. V. 63. № 6. P. 345–364.
2. Geyer R., Jambeck J.R., Law K.L. // Sci. Adv. 2017. V. 3. № 7. Art. 1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
3. Chamas A., Moon H., Zheng J., Qiu Y., Tabassum T., Jang J.H., Abu-Omar M., Scott S.L., Suh S. // ACS Sustainable Chem. Eng. 2020. V. 8. P. 3494–3511.
4. Teixeira S., Eblagon K.M., Miranda F., R. Pereira M.F., Figueiredo J.L. // J. Carbon Research. 2021. V. 7. P. 42.
5. Arpia A.A., Chen W.H., Ubando A.T., Naqvi S.R., Cula-ba A.B. // J. Hazardous Materials. 2021. V. 418. Art. 126381. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126381>
6. Ivleva N.P. // Chem. Rev. 2021. V. 121. P. 11886–11936.
7. Friedrich D. // Sustainable Development. 2021. V. 29. P. 915–929.
8. Shaikh S., Yaqoob M., Aggarwal P. // Current Research in Food Science. 2021. V. 4. P. 503–520.
9. Tsuji H., Daimon H., Fujie K. // Biomacromolecules. 2003. V. 4. P. 835–840.
10. Kalita N.K., Damare N.A., Hazarika D., Bhagabati P., Kalamdhad A., Katiyar V. // Environmental Challenges. 2021. V. 3. Art. 100067. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2021.100067>
11. Al Hosni A.S., Pittman J.K., Robson G.D. // Waste Manag. 2019. V. 97. P. 105–114.
12. Narancic T., Verstichel S., Reddy Chaganti S., Morales-Gomez L., Kenny S.T., De Wilde B., Babu Padamati R., O'Connor K.E. // Environ. Sci. Technol. 2018. V. 52. P. 10441–10452.
13. Kale G., Auras R., Singh S.P. // Packag. Technol. Sci. 2007. V. 20. P. 49–70.
14. Mysiukiewicz O., Barczewski M., Skórczewska K., Maty-kiewicz D. // Polymers. 2020. V. 12. № 6. Art. 1333. <https://doi.org/10.3390/polym12061333>
15. Castro-Aguirre E., Iñiguez-Franco F., Samsudin H., Fang X., Auras R. // Adv. Drug Delivery Rev. 2016. V. 107. P. 333–366.
16. Musioł M., Sikorska W., Adamus G., Janeczek H., Richert J., Malinowski R., Jiang G., Kowalczyk M. // Waste Manag. 2016. V. 52. P. 69–76.

17. Cameron R.E., Kamvari-Moghaddam A. // In: Durability and Reliability of Medical Polymers. / Eds. M. Jenkins, A. Stamboulis. Woodhead Publishing, 2012. P. 96–118. ISBN: 9780857096517.
18. Kaushal J., Khatri M., Arya Sh.K. // Cleaner Engineering and Technology. 2021. V. 2. Art. 100083. <https://doi.org/10.1016/j.clet.2021.100083>
19. Cucina M., de Nisi P., Tambone F., Adani F. // Biore-sour. Technol. 2021. V. 337. Art. 125459. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.08.016>
20. Karamanlioglu M., Preziosi R., Robson G.D. // Polym. Degrad. Stab. 2017. V. 137. P. 122–130.
21. Van Nostrum C.F., Veldhuis T.F.J., Bos G.W., Hennink W.E. // Polymer. 2004. V. 45. P. 6779–6787.
22. Tokiwa Y., Calabia B.P., Ugwu C.U., Aiba S. // Int. J. Mol. Sci. 2009. V. 10. P. 3722–3742.
23. Zaaba N.F., Jaafar M. // Polym. Eng. Sci. 2020. V. 60. P. 2061–2075.
24. Richert A., Dąbrowska G.B. // Int. J. Biol. Macromol. 2021. V. 176. P. 226–232.
25. Miao Yu., Cui H., Dong Zh., Ouyang Yi, Li Yi., Huang Q., Wang Z. // ACS Omega. 2021. V. 6. P. 29254–29266.
26. Tripathi N., Misra M., Mohanty A.K. // ACS Eng. 2021. V. 1. P. 7–38.
27. Von Burkersroda F., Schedlb L., Göpferich A. Biomateri-als. 2002. V. 23. P. 4221–4231.
28. Tsuji H., Ikarash K., Fukuda N. // Polym. Degrad. Stab. 2004. V. 84. P. 515–523.
29. Lee W.K., Gardella J.A. // Langmuir. 2000. V. 16. P. 3401–3406.
30. Tsuji H., Suzuyoshi K. // Polym. Degrad. Stab. 2002. V. 75. P. 347–355.
31. Tsuji H., Suzuyoshi K. // Polym. Degrad. Stab. 2002. V. 75. P. 357–365.
32. Mitchell M.K., Hirt D.E. // Polymer Engineering & Sci-ence. 2014. V. 55. № 7. P. 1652–1660.
33. Iñiguez-Franco F., Auras R., Burgess G., Holmes D., Fang X., Rubino M., Soto-Valdez H. // Polymer. 2016. V. 99. P. 315–323.
34. Hirao K., Nakatsuchi Y., Ohara H. // Polym. Degrad. Stab. 2010. V. 95. № 6. P. 925–928.
35. Elsayy M.A., Kim K.-H., Park J.-W., Deep A. // Renew. Sust. Energ. Rev. 2017. V. 79. P. 1346–1352.
36. De Jong S., Arias E., Rijkers D.T., van Nostrum C., Hen-nink W. // Polymer. 2001. V. 42. P. 2795–2802.
37. Yoon S.-D., Kwon Y.-S., Lee K.-S. // Int. Neurorol. J. 2017. V. 21. P. 48–54.
38. Rezwan K., Chen Q.Z., Blaker J.J., Boccaccini A.R. // Biomaterials. 2006. V. 27. № 18. P. 3413–3431.
39. Karamanlioglu M., Robson G.D. // Polym. Degrad. Stab. 2013. V. 98. P. 2063–2071.
40. Calmon A., Guillaume S., Bellon-Maurel V., Feuilloley P., Silvestre F. // J. Polym. Environ. 1999. V. 7. P. 157–166.
41. Scoponi G., Guzman-Puyol S., Caputo G., Ceseracciu L., Athanassiou A., Heredia-Guerrero J.A. // Polymer. 2020. V. 193. Art. 122371. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122371>
42. Middleton J.C., Tipton A.J. // Biomaterials. 2000. V. 21. P. 2335–2346.
43. Oyama H.T., Kimura M., Nakamura Y., Ogawa R. // Polym. Degrad. Stab. 2020. V. 178. Art. 109216. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109216>
44. Höglund A., Hakkarainen M., Edlund U., Albertsson A.-C. // Langmuir. 2010. V. 26. P. 378–383.
45. Li P., Zhu X., Kong M., Lv Y., Huang Y., Yang Q., Li G. // Intern. J. Biol. Macromol. 2021. V. 183. P. 222–234.
46. Rheinberger T., Wolfs J., Paneth A., Gojzewski H., Paneth P., Wurm F.R. // J. Am. Chem. Soc. 2021. V. 143. P. 16673–16681.
47. Raquez J.-M., Habibi Y., Murariu M., Dubois Ph. // Progress in Polymer Science. 2013. V. 38. P. 1504–1542.
48. Rincón-Iglesias M., Salado M., Lanceros-Mendez S., Lizundia E. // Polymer. 2022. V. 249. Art. 124804. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2022.124804>
49. Haryńska A., Janik H., Sienkiewicz M., Mikolaszek B., Kucińska-Lipka J. // ACS Sustainable Chem. Eng. 2021. V. 9. P. 6923–6938.
50. Zhang H.Y., Jiang H.B., Kim Ji-E., Zhang Sh.X., Kim K.-M., Kwon J.-S. // J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 2020. V. 112. Art. 104061. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104061>
51. El Assimi T., Blažić R., Vidović E., Raihane M., El Me-ziane A., Baouab M.H. V., Khouloud M., Beniazza R., Kricheldorf H., Lahcini M. // Progress in Organic Coat-ings. 2021. V. 156. Art. 106255. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2021.106255>
52. Chen H., Wang Y., Chen J., Yang J., Zhang N., Huang T., Wang Y. // Polym. Degrad. Stab. 2013. V. 98. № 12. P. 2672–2679.
53. Olewnik-Kruszkowska E., Burkowska-But A., Tarach I., Walczak M., Jakubowska E. // International Biodeteri-oration & Biodegradation. 2020. V. 147. Art. 104840. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104840>
54. Khavpachev M., Trofimchuk E., Nikonorova N., Garina E., Moskvina M., Efimov A., Demina V., Bakirov A., Sedush N., Potseliev V., Cherdyntseva T., Chvalun S. // Macromo-lecular Materials and Engineering. 2020. V. 305. № 7. P. 2000163.
55. Zhang Y., Zale S., Sawyer L., Bernstein H. // J. Biomed. Mater. Res. 1997. V. 34. № 4. P. 531–538.
56. Kakanuru P., Pochiraju K. // Additive Manufacturing. 2020. V. 36. Art. 101529. <https://doi.org/10.1016/j.addma.2020.101529>
57. Gorrasi G., Sorrentino A., Pantani R. // J. Polymers and the Environment. 2015. V. 23. № 3. P. 316–320.
58. Cavallo E., He X., Luzi F., Dominici F., Cerrutti P., Ber-nal C., Foresti M.L., Torre L., Puglia D. // Molecules. 2021. V. 26. Art. 126. <https://doi.org/10.3390/molecules26010126>
59. Su S., Kopitzky R., Tolga S., Kabasci S. // Polymers. 2019. V. 11. № 7. Art. 1193. <https://doi.org/10.3390/polym11071193>

60. *Ножневникова А.Н., Миронов В.В., Бочкова Е.А., Литти Ю.В., Русскова Ю.И.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 3. С. 211–221.
61. *Chinaglia S., Tosin M., Degli-Innocenti F.* // Polym. Degrad. Stab. 2018. V. 147. P. 237–244.
62. *Satti S.M., Castro-Aguirre E., Shah A.A., Marsh T.L., Auras R.* // International J. Molecular Sciences. 2021. V. 22. № 14. Art. 7385.
<https://doi.org/10.3390/ijms22147385>
63. *Котова И.Б., Тактарова Ю.В., Цавкелова Е.А., Егорова М.А., Бубнов И.А., Малахова Д.В., Ширинкина Л.И., Соколова Т.Г., Бонч-Осмоловская Е.А.* // Микробиология. 2021. Т. 90. № 6. С. 627–659.
64. *Mironov V., Vanteeva A., Sokolova D., Merkel A., Nikolaev Y.* // Microorganisms. 2021. V. 9. Art. 1877.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9091877>
65. *Mironov V., Vanteeva A., Merkel A.* // Agronomy. 2021. V. 11. Art. 928.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11050928>
66. *Auras R., Harte B., Selke S.* // Macromol. Biosci. 2004. V. 4. P. 835–864.
67. *Ghorpade V.M., Gennadios A., Hanna M.* // Bioresour. Technol. 2001. V. 76. P. 57–61.
68. *Trofimchuk E.S., Moskvina M.A., Nikonorova N.I., Efimov A.V., Garina E.S., Grokhovskaya T.E. et al.* // European Polymer J. 2020. V. 139. Art. 110000.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110000>
69. *Qi X., Ren Y., Wang X.* // International Biodeterioration & Biodegradation. 2017. V. 117. P. 215–223.
70. *Saadi Z., Rasmont A., Cesar G., Bewa H., Benguigui L.* // J. Polymers and the Environment. 2011. V. 20. № 2. P. 273–282.
71. *Richert A., Kalwasińska A., Brzezinska M.S., Dąbrowska G.B.* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 19. Art. 10228.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910228>
72. *Janczak K., Dąbrowska G.B., Raszewska-Kaczor A., Kaczor D., Hryniewicz K., Richert A.* // International Biodeterioration & Biodegradation. 2020. V. 155. Art. 105087.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105087>
73. *Yuan J., Ma J., Sun Y., Zhou T., Zhao Y., Yu F.* // Science of the Total Environment. 2020. V. 715. Art. 136968.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136968>
74. *Nair N.R., Sekhar V.C., Nampoothiri K.M.* // Indian J Microbiol. 2016. V. 56. P. 59–63.
75. *Castro-Aguirre E., Auras R., Selke S., Rubino M., Marsh T.* // Polym. Degrad. Stab. 2018. V. 154. P. 46–54.
76. *Pattanasuttichonlakul W., Sombatsompop N., Prapagdee B.* // International Biodeterioration & Biodegradation. 2018. V. 132. P. 74–83.
77. *Boonluksiri Y., Prapagdee B., Sombatsompop N.* // Polym. Degrad. Stab. 2021. V. 188. Art. 109562.
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2021.109562>
78. *Hakkarainen M., Karlsson S., Albertsson A.-C.* // Polymer. 2000. V. 41. P. 2331–2338.
79. *Hedstrom L.* // Chem. Rev. 2002. V.102. № 12. P. 4501–4524.
80. *Sukkhum S., Tokuyama S., Tamura T., Kitpreechavanich V.* // J Gen Appl Microbiol. 2009. V. 55. № 6. P. 459–467.
81. *Tertyshnaya Y.V., Shibryaeva L.S., Levina N.S.* // Fibre Chemistry. 2020. V. 52. № 1. P. 43–47.
82. *Lipsa R., Tudorachi N., Darie-Nita R.N., Oprică L., Vasile C., Chiriac A.* // Int. J. Biol. Macromol. 2016. V. 88. P. 515–526.
83. *Antipova T.V., Zhelifonova V.P., Zaitsev K.V. et al.* // J. Polym. Environ. 2018. V. 26. P. 4350–4359.
84. *Masaki K., Kamini N.R., Ikeda H., Iefuji H.* // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 11. P. 7548–7550.
85. *Williams D.F.* // Engineering in Medicine. 1981. V. 10. № 1. P. 5–7.
86. *Gil-Castell O., Andres-Puche R., Dominguez E., Verdejo E., Monreal L., Ribes-Greus A.* // Polym. Degrad. Stab. 2020. V. 180. Art. 109288.
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109288>
87. *Czarnecka-Komorowska D., Tomasik M., Thakur V.K., Kostecka E., Rydzkowski T., Jursa-Kulesza J., Bryll K., Mysłowski J., Gawdzińska K.* // Industrial Crops and Products. 2022. V. 183. Art. 114974.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114974>
88. *Kalita N.K., Hazarika D., Kalamdhad A., Katiyar V.* // Bioresource Technology Reports. 2021. V. 15. Art. 100705.
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100705>
89. *Tolga S., Kabasci S., Duhme M.* // Polymers. 2021. V. 13. № 1. Art. 10.
<https://doi.org/10.3390/polym13010010>
90. *Kalita N.K., Bhasney S.M., Kalamdhad A., Katiyar V.* // J. Environmental Management. 2020. V. 261. Art. 110211.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110211>
91. *Wang S., Wu Y.* // Processes. 2021. V. 9. Art. 675.
<https://doi.org/10.3390/pr9040675>
92. *Chen X.-H., Huang Y.-H., Lü H., Mo C.-H., Xiang L., Feng N.-X., Zhao H.-M., Li H., Li Y.-W., Cai Q.-Y.* // Bioresour. Technol. 2022. V. 347. Art. 126702.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126702>
93. *Liu X., Hou Y., Li Z., Yu Z., Tang J., Wang Y., Zhou S.* // Waste Manag. 2020. V. 103. P. 342–351.
94. *Liao H., Zhao Q., Cui P., Chen Z., Yu Z., Geisen S., Friman V.-P., Zhou S.* // Environment International. 2019. V. 133. Art. 105203.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105203>
95. *Yu Z., Tang J., Liao H., Liu X., Zhou P., Chen Z., Rensing C., Zhou S.* // Bioresour. Technol. 2018. V. 265. P. 146–154.
96. *Tosin M., Degli-Innocenti F., Bastioli C.* // J. Environ. Polym. Degr. 1996. V. 4. P. 55–63.
97. *Saeidlou S., Huneault M.A., Li H., Park C.B.* // Progress in Polymer Science. 2012. V. 37. P. 1657–1677.

Solid-Phase Biodegradation of Polylactide (Review)

V. V. Mironov^{a, *}, E. S. Trofimchuk^c, N. A. Zagustina^b, O. A. Ivanova^c, A. V. Vanteeva^a,
E. A. Bochkova^a, V. V. Ostrikova^a, and S. Zhang^d

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

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

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

^d*Institute of Urban Environment Chinese Academy of Sciences, Xiamen, 361021 China*

*e-mail: 7390530@gmail.com

The main problem associated with the use of polylactide (PLA) in various fields is the requirement of controlled degradation of it in the composition of waste. However, at present, the possibilities of biodegradation of PLA have not been sufficiently studied. It is assumed that microorganisms can decompose the polymer only after its preliminary chemical hydrolysis and reduction of its molecular weight to 10,000 and less. The review examines the influence of various factors on the abiotic and biotic stages of the destruction of PLA. Special attention is paid to the peculiarities of polymer biodegradation in the conditions of industrial composting as the most promising method of its processing as part of food waste. The microorganisms involved in the destruction of PLA, as well as their enzymes, are given.

Keywords: bioplastics, polylactide, biodegradation, industrial composting, food waste, microbial community

УДК 579.2

ФЛАВИНЗАВИСИМЫЕ МОНООКСИГЕНАЗЫ ПУТЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДЕГРАДАЦИИ *para*-ЗАМЕЩЕННЫХ ФЕНОЛОВ

© 2022 г. Н. В. Жарикова¹, *, В. В. Коробов¹, Е. Ю. Журенко¹¹Уфимский институт биологии – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: puzzle111@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.05.2022 г.

После доработки 27.06.2022 г.

Принята к публикации 04.07.2022 г.

Аэробная деградация хлорпроизводных фенола у бактерий происходит двумя основными путями и, в первую очередь, зависит от степени галогенированности субстрата. При конверсии моно- и дихлорфенолов наблюдается гидроксилирование субстрата до соответствующего (хлор)катехола, после чего происходит *орто*-расщепление его ароматического кольца. Второй путь, в котором субстрат превращается через гидрохинон/гидроксигидрохинон или его хлорпроизводные в малеилацетат и далее в β -кетоадипат, характерен для бактерий, метаболизирующих полигалогенированные фенолы. Большинство исследований сосредоточено на организмах и путях, которые связаны с деградацией (хлор)ароматических субстратов через катехолы, в то время как альтернативный путь гидрохинона остается слабо описанным. В обзоре представлена информация по путям метаболизма *para*-замещенных хлорфенолов, где особое внимание уделяется флавинзависимым монооксигеназам, катализирующим первичные реакции окисления субстратов.

Ключевые слова: флавинзависимая монооксигеназа, биodeградация, 4-хлорфенол, 2,4,5-трихлорфенол, 2,4,6-трихлорфенол, пентахлорфенол, гидрохинон, гидроксигидрохинон

DOI: 10.31857/S0555109922060174

Хлорфенолы – синтетические органические соединения, получаемые в крупных промышленных и коммерческих масштабах путем хлорирования фенола или гидролиза хлорбензолов. Как побочные продукты они образуются при хлорировании питьевой воды, в процессе коксования угля, во время отбеливания при производстве бумаги, а также в качестве интермедиатов на некоторых стадиях производства хлорфеноксисукусных гербицидов. Смеси хлорфенолов, благодаря их фунгицидным и бактерицидным свойствам, широко используются в качестве антисептиков, пропиток для дерева и кожи, а также химикатов для защиты растений. Соединения этой группы могут образовываться в результате естественных реакций в почвах и поверхностных водах при хлорировании гуминовой кислоты и фенолов хлорпероксидазами некоторых бактерий и грибов. Другими природными источниками хлорфенолов в окружающей среде являются процессы неполного биоразложения пестицидов и гербицидов, в том числе 2,4,5-трихлорфеноксисукусной (2,4,5-Т) и 2,4-дихлорфеноксисукусной (2,4-Д) кислот. Для удаления хлорфенолов используются физико-химические и биологические методы, при этом полная бактериальная деграда-

ция считается экономичным и экологически чистым методом очистки окружающей среды [1–3].

До настоящего времени в литературе описаны два основных метаболических пути аэробной деградации галогенированных фенолов. У бактерий, которые разлагают моно- и дихлорфенолы, наблюдается путь разложения, в котором замещенный фенол гидроксилируется до соответствующего катехола, после чего происходит *орто*-расщепление его ароматического кольца. Хотя было показано, что встречаются пути продуктивного *мета*-расщепления, большинство известных штаммов используют именно модифицированный *орто*-путь. При этом атомы хлора из молекулы ароматического субстрата удаляются уже после раскрытия ароматического кольца [3]. С другой стороны, были обнаружены пути биodeградации, главным образом у бактерий, растущих на полигалогенированных фенолах, в которых хлор в *para*-положении замещается гидроксильной группой с образованием гидрохинона или его производных [2, 4–7]. При этом один или несколько атомов хлора элиминируются из молекулы субстрата до раскрытия ароматического кольца. Исключением из этого правила является метаболизм монохлорфенола, замещенного

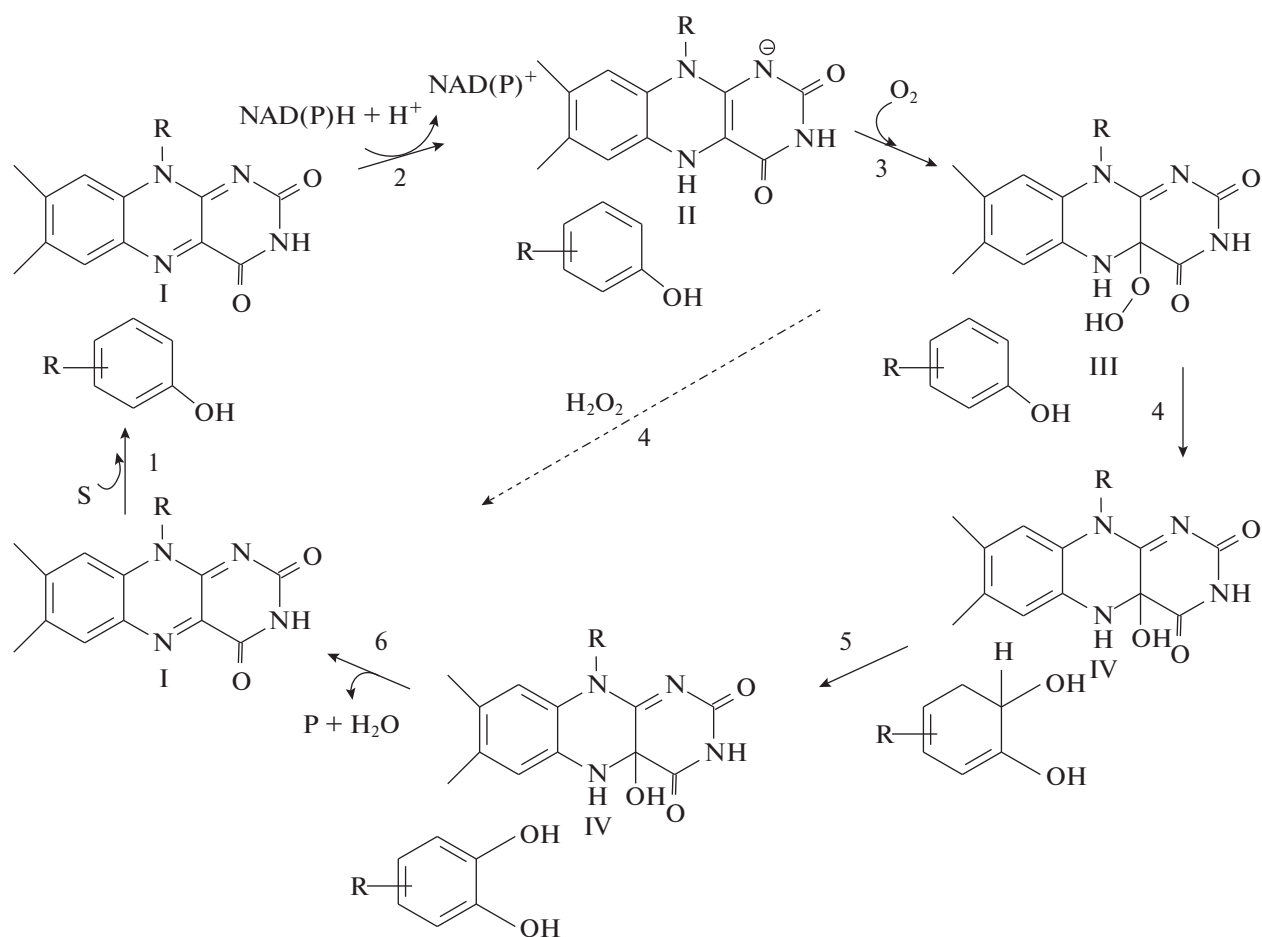


Рис. 1. Типичный каталитический цикл гидроксилирования фенолов, катализируемый флавинозависимыми монооксигеназами (гидроксилазами) [9]. I – окисленный флавин, II – восстановленный флавин, III – C4a-гидропероксифлавин, IV – C4a-гидроксиламин, S – субстрат, P – продукт, 1–5 – стадии каталитического цикла. 1–7 – пути действия фермента.

в *para*-положении, который протекает по пути гидрохинона, а не хлоркатехола [8].

Монооксигенирование ароматического субстрата, имеющего хлор-заместитель в *para*-положении, приводит к одновременному гидроксилированию и дегалогенированию, в результате которого образуется гидрохинон или его производные. Такое окислительно-дегалогенирование катализируют флавинозависимые монооксигеназы, замещающие хлор гидроксильной группой, атом кислорода которой происходит из O₂. Флавинозависимые монооксигеназы (гидроксилазы) (КФ 1.14.13), рассматриваемые в данном обзоре, используют в качестве кофактора флавин и требуют для его восстановления НАДН или НАДФН (рис. 1, стадия 2). Восстановленный флавин реагирует с молекулярным кислородом с образованием промежуточного соединения C4a-гидропероксифлавина (стадия 3), который является активной формой флавина – ключевого промежуточного соединения всех флавинозависимых монооксигеназ. Действуя как электрофил, этот

интермедиат встраивает гидроксильную группу в ароматические субстраты, в результате чего образуется гидроксилированный продукт и C4a-гидроксиламин (стадии 4, 5). Последний затем дегидратируется до первоначального окисленного флавина (стадия 6). В отсутствие фенольного субстрата промежуточное соединение C4a-гидропероксифламин отщепляет H₂O₂, чтобы вернуться к первоначальному окисленному флавину (стадия 7) [9–11].

Все флавинозависимые гидроксилазы по количеству белковых компонентов, участвующих в реакции, могут быть разделены на две группы: одно- и двухкомпонентные монооксигеназы. Однокомпонентные ферменты (класс А) катализируют восстановление флавина и окислительную реакцию субстрата в одной и той же единственной полипептидной цепи, тогда как эти реакции у двухкомпонентных флавинозависимых монооксигеназ (класс D) происходят в двух отдельных белках: восстановление флавина происходит в активном центре компонен-

та редуктазы, а оксигенация субстрата – в активном центре компонента оксигеназы. Хотя однокомпонентные и двухкомпонентные монооксигеназы катализируют аналогичные реакции гидроксирования фенольных соединений, между этими двумя типами ферментов есть некоторые отличия, диктуемые их строением. Так, у однокомпонентных монооксигеназ флаavin (причем исключительно ФАД) – это простетическая группа, прочно связанная с белком, в то время как у двухкомпонентных флаvин (может быть ФАД, ФМН, рибофлаvин), легко диффундируя между компонентами, действует скорее как косубстрат. Первая стадия рис. 1, в которой происходит связывание окисленного флаvина с субстратом, характерна больше для однокомпонентных монооксигеназ [9–11].

Монооксигенирование ароматического соединения, имеющего электроноакцепторный *n*-заместитель, такой как нитро-группа или хлор, по сравнению с незамещенным субстратом имеет свои особенности. Атака монооксигеназы на ароматическое кольцо в незамещенном положении приводит к образованию хинолов, а в положении, занимаемом электроноакцепторной группой – хинонов (рис. 2).

Ароматический субстрат, имеющий электроноакцепторный *n*-заместитель, может метаболизироваться аэробными бактериями двумя путями, которые коррелируют с типом использованной монооксигеназы и, в меньшей степени, с таксономической принадлежностью деструктора.

У грамотрицательных бактерий преимущественно однокомпонентные флаvинзависимые монооксигеназы с одновременным выделением ионов электроноакцепторного *n*-заместителя преобразуют *n*-замещенный фенол через *n*-бензохинон (ПБХ) в гидрохинон (ГХ), который затем подвергается *мета*-расщеплению [13–16]. Второй путь встречается в основном у грамположительных бактерий, где деградация первоначального субстрата в результате активности двухкомпонентных флаvинзависимых монооксигеназ происходит через образование 2-гидрокси-*n*-бензохинона, с последующим его восстановлением до гидросигидрохинона (ГГХ), бензойное кольцо которого затем раскрывается в *орто*- позиции [17–21].

До настоящего момента большинство исследований сосредоточено на организмах и путях, которые связаны с деградацией (хлор)ароматических субстратов через катехолы, в то время как альтернативные пути гидрохинона остаются слабо описанными. В обзоре представлена информация по путям метаболизма *пара*-замещенных хлорфенолов, где особое внимание уделяется флаvинзависимым монооксигеназам, катализирующим первичные реакции окисления субстратов. Вопросы образования хлоркатехола и дальнейшего

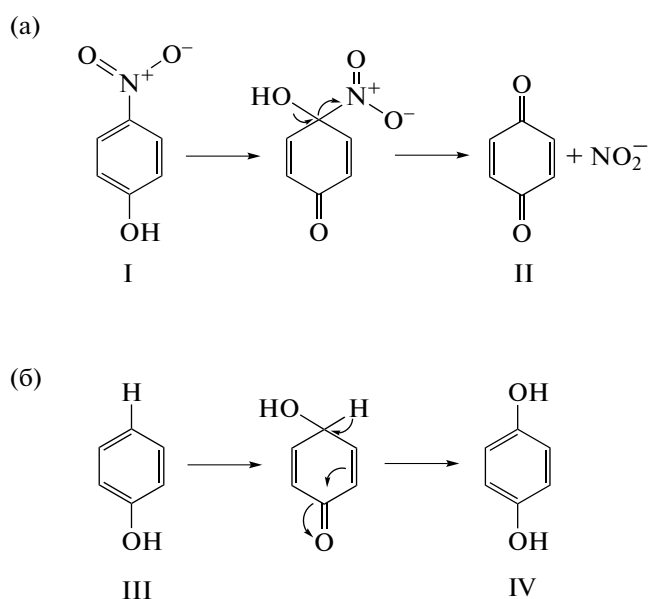


Рис. 2. Превращение гипотетических интермедиатов монооксигеназной реакции [12]: а – атака монооксигеназой по сайту, занятому электроноакцепторным заместителем; б – монооксигеназа атакует сайт, занятый электронодонорным заместителем: I – 4-нитрофенол, II – *пара*-бензохинон, III – фенол, IV – гидрохинон.

расщепления по модифицированному *орто*-пути остаются за рамками данного обзора.

КОНВЕРСИЯ 4-ХЛОРФЕНОЛА КАК ЧАСТНЫЙ СЛУЧАЙ ПУТИ ДЕГРАДАЦИИ *пара*-ЗАМЕЩЕННЫХ ФЕНОЛОВ

Монохлорфенолы представляют собой простейшую форму хлорированных фенолов и содержат только один атом хлор заместителя в бензойном кольце. 4-Хлорфенол (4-ХФ) широко используется в качестве антисептика для домашнего, больничного и сельскохозяйственного применения. Кроме того он может поступать в окружающую среду и естественным путем в результате деятельности бактерий, грибов и насекомых [2, 3].

В аэробных условиях успешная минерализация монозамещенных в *мета* и *орто* положениях хлорфенолов бактериями обычно осуществляется путем их первоначального окисления до 3- или 4-хлоркатехолов с последующим раскрытием ароматического кольца в *орто*-положении. Хлор в результате спонтанно удаляется, а углеродный скелет превращается в продукты, которые ассимилируются в центральном метаболизме клетки. Иначе обстоит дело, с конверсией монохлорфенола, замещенного в *пара*-положении [3, 22, 23].

Монооксигенирование фенолов, имеющих электроноакцепторный *n*-заместитель, такой как

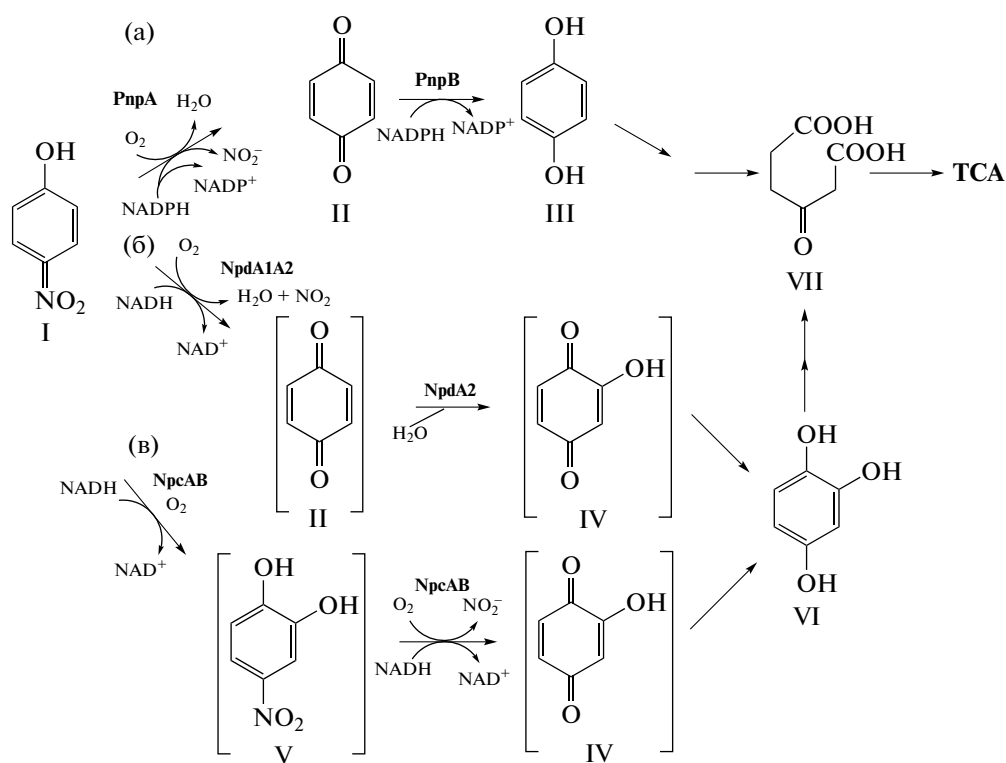


Рис. 3. Альтернативные пути деградации 4-НФ с ферментами, ответственными за стадию инициации у штаммов *Pseudomonas* sp. WBC-3 (а); *Arthrobacter* sp. JS443 (б); *R. opacus* SAO101 (в). I – 4-нитрофенол, II – *para*-бензохинон, III – гидрохинон, VI – 2-гидрокси-1,4-бензохинон; V – 4-нитрокатехол, VI – гидросигидрохинон, VII – β-кетоадипат, TCA – цикл трикарбоновых кислот [12].

хлор, приводит к одновременному гидроксилированию и дегалогенированию. При этом в результате проявления монооксигеназной активности сначала образуется промежуточный хинон, который затем восстанавливается. В зависимости от того, что служит субстратом для диоксигеназ, расщепляющих ароматическое кольцо ГХ или ГГХ, различают два альтернативных пути. Преимущественно у грамположительных бактерий, таких как *Bacillus* spp., *Rhodococcus* spp. и *Arthrobacter* spp., деградация первоначального субстрата происходит через образование ГГХ [17–21]. Монооксигеназы, ответственные за эту трансформацию, принадлежат к семейству двухкомпонентных флавинзависимых монооксигеназ [12, 18, 19, 24], так называемое TC-FDM-семейство [25]. Бензойное кольцо ГГХ затем расщепляется с образованием МА и далее β-кетоадипата. Второй путь встречается в основном у грамотрицательных бактерий, например у штаммов рода *Pseudomonas*, и иницируется однокомпонентной монооксигеназой [13–16], которая, преобразует *para*-замещенный фенол в ГХ. Бензойное кольцо последнего расщепляется с образованием γ-гидроксимуконического полуальдегида, который трансформируется до малеата, а затем до β-кетоадипата [16, 26].

Поскольку многие бактериальные деструкторы способны к расщеплению нескольких фенольных субстратов, имеющих электроноакцепторный заместитель, рассмотрим деградацию *para*-замещенных фенолов сначала на примере *para*-нитрофенола (4-НФ), биохимический и генетический аспекты которого достаточно хорошо известны. Аэробная конверсия 4-НФ может осуществляться бактериями как через ГХ, так и ГГХ, причем последний путь имеет два варианта (рис. 3).

Как видно из рис. 3, в результате проявления активности однокомпонентной 4-нитрофенол-4-монооксигеназы (КФ 1.14.13.167) PnpA штамма *Pseudomonas* sp. WBC-3 происходит трансформация 4-НФ до ПБХ [13]. Затем редуктаза PnpB (КФ 1.6.5.6) восстанавливает ПБХ до ГХ, бензойное кольцо которого расщепляется в следующей реакции. Классический ГХ-путь, катализируемый однокомпонентными гидроксилазами, описан также для штаммов *Moraxella* sp. [27], *Pseudomonas* sp. NyZ402 [28] и *Pseudomonas* sp. 1-7 [14].

Две грамположительные культуры *Arthrobacter* sp. JS443 [12] и *Rhodococcus opacus* SAO101 [18] метаболизуют 4-НФ до ГГХ под действием двухкомпонентных монооксигеназ NpdA1A2 (КФ 1.14.13.167) и NpcAB (КФ 1.14.13.29). После расщепления кольца и образования β-кетоадипата

метаболиты обоих альтернативных путей поступают в ЦТК.

Интересно, что для штамма *Pseudomonas* sp. 1-7 был выявлен побочный ГГХ-путь через 4-нитрокатехол (4-НК), причем в кластере генов деградации 4-НФ *pdcABDEFG* не было обнаружено гена специфичной двухкомпонентной монооксигеназы, катализирующей образование ГГХ. Вероятно, однокомпонентная монооксигеназа *PdcA* способна катализировать трансформации 4-НФ как до ПБХ, так и до 4-НК [14]. При исследовании другого штамма *Pseudomonas* sp. WBC-3 обнаружили, что очищенная однокомпонентная 4-нитрофенол-4-монооксигеназа (*PnpA*) трансформировала 4-НК в ГГХ, что является первым случаем такого катализа для однокомпонентных монооксигеназ. Штамм WBC-3 фактически не мог расти на 4-НК, однако был способен полностью разлагать как 4-НФ, так и 4-НК, когда 4-НФ использовался в качестве индуктора [15]. Гены деградации 4-НФ *pnpABCDEF* штамма WBC-3 показали высокое сходство с кластером *pdcABCDEF* штамма 1-7, что предполагает одинаковый механизм проявления активности однокомпонентных монооксигеназ этих двух культур.

Генетические детерминанты деградации 4-НФ были идентифицированы для ГХ- и ГГХ-путей в нескольких географически отдаленных изолятах, включая *R. opacus* SAO101 [18], *Arthrobacter* sp. JS443 [12] и *Pseudomonas* sp. штаммы WBC-3, 1-7 и NyZ402 [13, 15, 28]. С одной стороны, последовательности генов являются консервативными для каждого пути, поскольку были обнаружены высокие уровни их сходства между кластерами деградации из штаммов SAO101 и JS443, а также между штаммами WBC-3, 1-7 и NyZ402. С другой стороны, как последовательности генов, так и их организация значительно различались у ГГХ- и ГХ-путей, что подразумевало их различное происхождение [15, 28].

4-ХФ по пути гидрохинона способны метаболизировать несколько штаммов-деструкторов, принадлежащих к группе актинобактерий, в том числе: *Arthrobacter* sp. JS443 [12], *Arthrobacter ureafaciens* CPR706 [29], *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 [8], *Nocardioides* sp. NSP41 [30]. Еще одна актинобактерия *Arthrobacter* sp. IF1 осуществляет конверсию другого фенола, галогенированного в *пара*-положении – 4-фторфенола (4-ФФ) (рис. 4) [31].

Установлено, что конверсия соответствующих *n*-галогенфенолов актинобактериями *Nocardioides* sp. NSP41, *A. ureafaciens* CPR706, *A. chlorophenolicus* A6 и *Arthrobacter* sp. IF1 идет через ГХ. У первого штамма дальнейший метаболизм не описан, а по культуре CPR706 имеются данные, основанные на анализе ферментативной активности. Эксперименты с неочищенными 4-ХФ-ин-

дуцированными клеточными экстрактами показали отсутствие 4-хлоркатехол- или катехолдиоксигеназной активностей. В то же время, гидрохинон трансформировался в промежуточное соединение с УФ-спектром, аналогичным 4-гидроксиумуковому полуальдегиду [29]. В данном случае, несмотря на то, что для грамположительных бактерий такой путь нехарактерен, деградация 4-ХФ у штамма CPR706 идет через гидрохинон с последующим расщеплением его ароматического кольца (рис. 4).

У штаммов *A. chlorophenolicus* A6 и *Arthrobacter* sp. IF1 ГХ гидроксилируется до ГГХ [31]. Хлоркатехольный путь был исключен для этих культур экспериментами с бесклеточными экстрактами, выращенных на 4-ХФ и 4-ФФ бактерий соответственно, которые не выявили активности катехол-1,2-диоксигеназы. Присутствия 4-хлоркатехолдиоксигеназы (для штамма A6), катехол-2,3-диоксигеназы и 4-фторкатехолдиоксигеназы (для штамма IF1) также не было обнаружено. Следовательно, у штаммов A6 и IF1 не реализуется классический метаболизм замещенного катехола путем его *ortho*-расщепления. Для штамма IF1 также была исключена возможность *meta*-расщепления 4-фторкатехола [8, 31].

При спектрофотометрическом контроле реакций из клеточных экстрактов культур A6 и IF1, индуцированных соответствующими *n*-галогенфенолами, типичный для ГГХ пик при 287 нм замещался пиком при 245 нм, который характерен для МА, что указывает на участие ГГХ-диоксигеназы, которая превращает ГГХ через МА в β -кетoadипат (рис. 4) [8, 31].

В эксперименте с 2,2'-дипиридилем, ингибитором диоксигеназ, расщепляющих ароматическое кольцо [32], подтвердилось, что именно ГГХ является субстратом для раскрытия кольца при разложении 4-ХФ у штамма A6. Растущая на 4-ХФ культура через несколько минут после добавления 2,2'-дипиридила меняла цвет и, в конце концов, становилась темно-красной, что указывало на накопление ГГХ в условиях хелатирования железа, при которых ингибируется фермент, расщепляющий ароматическое кольцо [8]. В то же время клетки культуры IF1, выращенные на ГГХ, показали полную конверсию этого соединения, как в присутствии, так и в отсутствие 2,2'-дипиридила, следовательно, предполагаемая ГГХ-оксигеназа не нуждалась в активных ионах железа, поэтому дальнейшее окисление этого соединения не ингибировалось хелатообразователем [31].

По-видимому, конверсия *n*-галогенфенолов у штаммов A6 и IF1 идет по пути ГГХ, поскольку именно последний является субстратом для диоксигеназ, расщепляющих ароматическое кольцо (рис. 4) [8, 31].

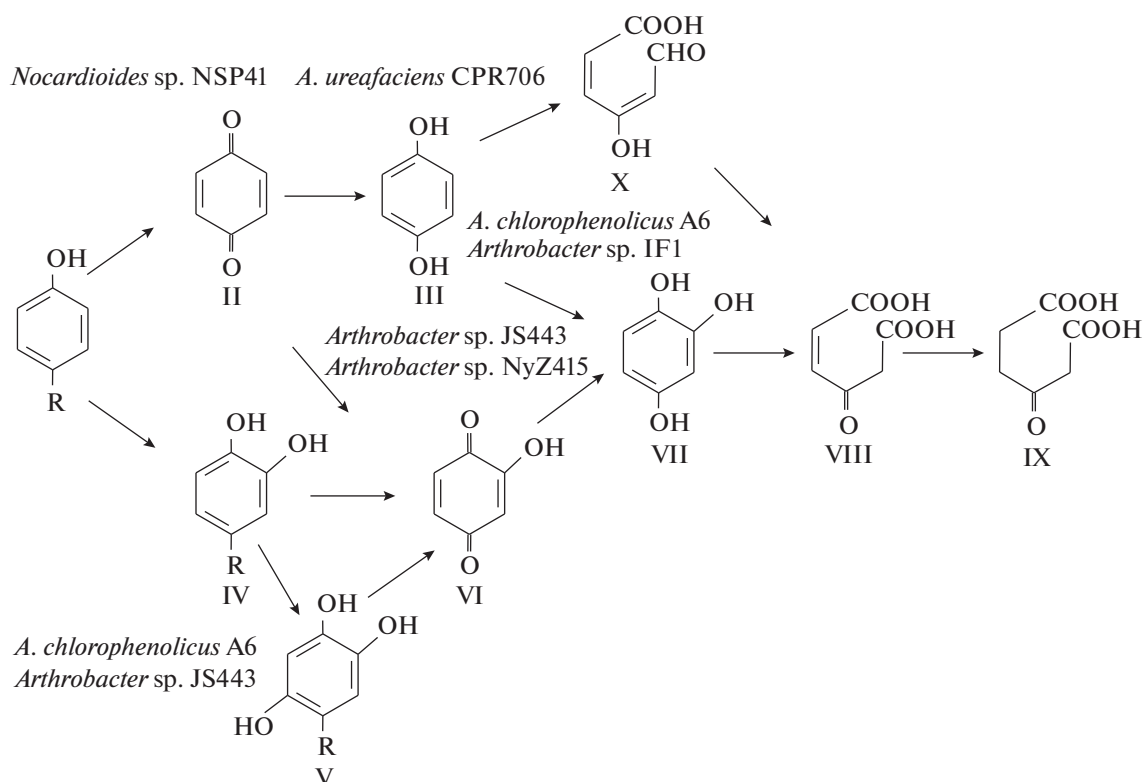


Рис. 4. Пути конверсии фенолов, галогенированных в *para*-положении у бактерий [8, 13, 27, 29, 31]: I – *para*-замещенный галогенфенол, II – *para*-бензохинон, III – гидрохинон, IV – *para*-замещенный катехол, V – замещенный в 5-м положении гидроксигидрохинон, VI – 2-гидрокси-1,4-бензохинон; VII – гидроксигидрохинон, VIII – малеилацетат, IX – β -кетoadипат, X – гидроксимуконовый полуальдегид. R – электроноакцепторный заместитель.

Необходимо отметить, что из бесклеточных экстрактов штамма А6, выращенных на сукцинате, удаление ГГХ не происходило. Тогда как в бесклеточных экстрактах штамма IF1, выращенного на глюкозе, наблюдалось лишь падение активности ГГХ-диоксигеназы (0.156 ед./мг) по сравнению с 4-ФФ-индуцированными бесклеточными экстрактами (0.195 ед./мг). Таким образом, только у штамма А6 наблюдалась явная индукция конверсии ГГХ, когда 4-ХФ являлся субстратом для роста вместо альтернативного субстрата [8, 31].

Для культуры А6 были идентифицированы еще два потенциальных метаболита конверсии 4-ХФ, а именно: 4-хлоркатехол (4-ХК) и 5-хлоргидрокси-гидрохинон (5-ХГГХ). Вероятно, по аналогии с 4-НК, они являются метаболитами альтернативной ветви пути (рис. 3, 4). Хотя *A. chlorophenolicus* А6 разлагает 4-ХК приблизительно в два раза медленнее, чем гидрохинон, все же альтернативный путь значительно способствует деградации 4-ХФ [8]. Интересно, что продуктами действия монооксигеназы NpdA2 штамма JS443 на 4-хлоркатехол, когда он использовался в качестве субстрата, также оказались ГГХ и 5-ХГГХ. Поскольку штаммы *A. chlorophenolicus* А6 и *Arthrobacter* sp. JS443 способны конвертировать как 4-НФ, так и 4-ХФ,

вероятно у обоих штаммов для деструкции этих соединений используется одна и та же ферментная система, что было подтверждено сравнением генов конверсии *para*-замещенных фенолов этих двух культур.

Гены деградации 4-ХФ (*cph*-гены) у штамма *A. chlorophenolicus* А6 распределены по двум кластерам – *cph I* и *cph II*, которые разделены псевдогеном резольвазы. Оказалось, что кластер I ответственен за катаболизм 4-ХФ, так как инсерционный мутант по гену *cphA-I* накапливает ГГХ и не способен расти на 4-ХФ [8]. Данный кластер имеет почти одинаковую организацию и на 80.5% идентичен кластеру генов *npd*, кодирующего ферменты катаболического пути 4-НФ штамма *Arthrobacter* sp. JS443 [12].

В кластеры *cph I* и *npd* входят гены монооксигеназ (*cphC-I* и *npdA2*), аминокислотные последовательности которых идентичны на 96%, что предполагает одинаковый механизм их действия. Монооксигеназы CphC-I и NpdA2 являются компонентами TC-FDM-семейства, отвечающими за окисление субстрата. Скорее всего, эти ферменты обладают слабой позиционной специфичностью в отношении 4-хлоркатехола, и гидроксилируют его в *para*-позиции по отношению к любой из

двух его гидроксильных групп, вследствие чего и образуются ГГХ и 5-ХГГХ [12].

Гены второго компонента ферментов ТС-FDM-семейства – НАДН-зависимых флавинредуктаз (*cphB* и *npdA1*), а также ГГХ 1,2-диоксигеназ (*cphA-I* и *npdB*) (КФ 1.13.11.37) и МА-редуктаз (КФ 1.3.1.32) (*npdC* и *cphF-I*) также были локализованы в кластерах *cph I*, и *npd* [8, 12]. Идентичность продуктов трех ключевых генов *npdB*, *npdA1* и *npdA2* штамма А6 была подтверждена путем их независимой экспрессии в клетках *Escherichia coli*.

Таким образом, аэробная конверсия *n*-хлорфенола для рассмотренных выше актинобактерий идет по ГГХ-пути и инициируется двухкомпонентными флавинзависимыми монооксигеназами с широкой субстратной специфичностью.

ВАРИАНТЫ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ТРИХЛОРФЕНОЛОВ

2,4,5- и 2,4,6-трихлорфенолы (**2,4,5-ТХФ** и **2,4,6-ТХФ**) относятся к экологически стойкому классу загрязнителей, известных как полихлорированные фенолы [1]. В то время как монохлорфенолы и дихлорфенолы естественным образом могут производиться некоторыми бактериями, грибами и насекомыми, природные источники полихлорфенолов не известны [2].

2,4,5-ТХФ и 2,4,6-ТХФ широко используются в качестве клея и консервантов, особенно для пиломатериалов и кожи, а их производные – в качестве гербицидов и фунгицидов [33]. Соответственно, при биодеградации таких соединений бактериями трихлорфенолы часто являются метаболическими интермедиатами. Так, 2,4,5-ТХФ – это первый промежуточный продукт деградации 2,4,5-трихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4,5-Т) в результате проявления активности 2,4,5-Т-оксигеназы (TftAB) (рис. 5а) у штамма *Burkholderia phenoliruptrix* (ранее *Pseudomonas cepacia*, *Burkholderia cepacia*) АС1100. На последующих стадиях 2,4,5-ТХФ-4-монооксигеназа (TftD) (КФ 1.14.13.-) катализирует две реакции окислительного дехлорирования, где 2,4,5-ТХФ сначала трансформируется в 2,5-дихлорбензохинон (2,5-ДХБХ), который химически восстанавливался с помощью либо НАДН либо ФАДН₂ в 2,5-дихлоргидрохинон (2,5-ДХГХ), а затем последний превращается в 2-гидрокси-5-хлор-*n*-бензохинон, который аналогичным образом восстанавливался до 5-ХГГХ (рис. 3а) [34, 35].

Как видно из рис. 5а, монооксигеназа TftD осуществляет две последовательные стадии гидроксирования, как и описанная выше монооксигеназа NpdA2 штамма *Arthrobacter* sp. JS443, и принадлежит к тому же ТС-FDM-семейству. Генерируемый вторым компонентом НАДН, а именно: ФАД-оксидоредуктазой (TftC), флавин

(ФАДН₂) свободно диффундирует к TftD и используется последней скорее в качестве субстрата, а не кофактора, что характерно для всех двухкомпонентных флавинмонооксигеназ. TftD также может окислять 2,4,6-ТХФ до 2,6-дихлорбензохинона (2,6-ДХБХ), но не может далее преобразовывать ни его, ни его восстановленную форму – 2,6-дихлоргидрохинон (2,6-ДХГХ) (рис. 5б) [33].

TftD и TftC показывают сходство последовательностей (идентичности 28 и 40% соответственно) с 4-гидроксифенилацетат-3-монооксигеназой (HpaB) штамма *Thermus thermophilus* HB8 (2YYL) и корринредуктазой (CobR) штамма *Brucella melitensis* (3CB0), другими флавинзависимыми монооксигеназами и флавинредуктазами ТС-FDM-семейства, участвующими в конверсии фенольных соединений [33, 36].

Дальнейший метаболизм промежуточного соединения 5-ХГГХ у штамма АС1100 контролирует кластер генов *fftEFGH*. TftG (КФ 4.5.1.-) дехлорирует 5-ХГГХ с образованием 2-гидрокси-*n*-бензохинона, который затем восстанавливается редуктазой (КФ 1.6.5.7) до ГГХ. TftH расщепляет ароматическое кольцо последнего с образованием МА, а TftE восстанавливает МА до β-кетoadипата [4].

2,4,5-Т-индуцибельная 2-гидрокси-*n*-бензохинонредуктаза, по-видимому, отличается специфичностью субстрата от других хиноновых редуктаз. Продукт гена *fftG*, также представляет собой новый фермент дегидрохлориназу и принадлежит к YCII-суперсемейству, группе мало исследованных белков. Поиск по базам данных выявил несколько белков с неизвестной функцией со сходной структурой, но с относительно низкой идентичностью последовательностей с TftG [37].

Конверсия второго хлорфенола – 2,4,6-ТХФ – подробно изучена для двух штаммов: *Ralstonia pickettii* ДТР0602 [7, 38] и *Cupriavidus necator* JMP134 (ранее *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* и *Wauteria eutropha*) [5, 6].

За использование 2,4,6-ТХФ в качестве единственного источника углерода и энергии у *R. pickettii* ДТР0602 ответственны два генетических кластера *hadRXABC* и *hadSYD*, разделённые участком размером 146 т.п.н. и отдельно регулируемые белками HadR и HadS, соответственно. Сначала 2,4,6-ТХФ преобразуется в 2-хлормалеилацетат (2-ХМА) под действием генов *hadRXABC*, а затем в β-кетoadипат с помощью *hadSYD* (рис. 6).

2,6-ДХБХ был определен в качестве первого метаболического интермедиата конверсии 2,4,6-ТХФ. Эта реакция катализируется флавинмонооксигеназой ТС-FDM-семейства HadA – фермент, который обладает двойной активностью, в катализе гидроксирования и групповой элиминации, как хлорзаместителей, так и нитрогрупп с образованием хинонового продукта. HadX представляет собой второй компонент ТС-FDM-семейства –

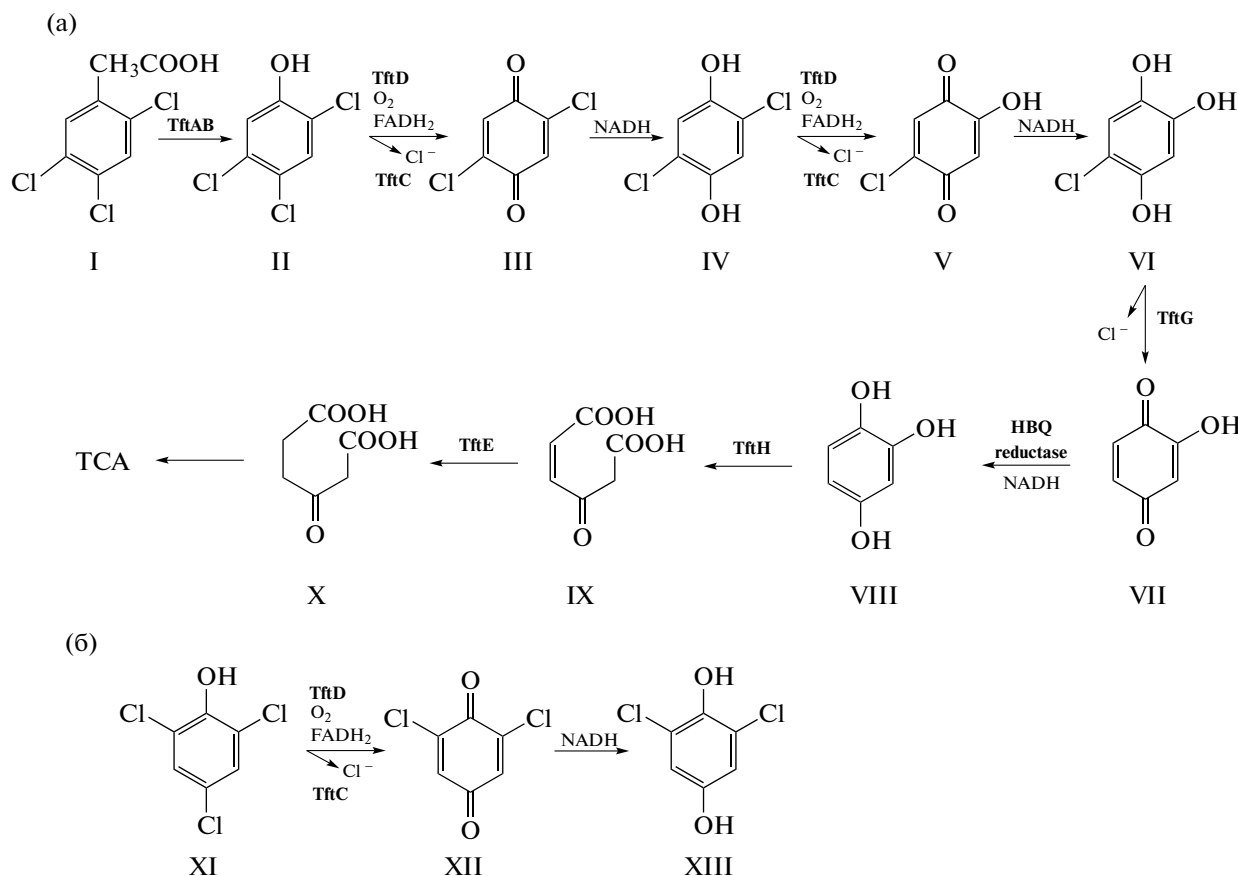


Рис. 5. Пути аэробной деградации 2,4,5-ТХФ (а) и 2,4,6-ТХФ (б) штамма *B. phenoliruptrix* AC1100 [4, 34, 35]. I – 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота; II – 2,4,5-трихлорфенол; III – 2,5-дихлор-*n*-бензохинон, IV – 2,5-дихлоргидрохинон; V – 2-гидрокси-5-хлор-*n*-бензохинон; VI – 5-хлоргидрокси-*n*-бензохинон; VII – 2-гидрокси-*n*-бензохинон; VIII – гидроксигидрохинон, IX – малеиллацетат; X – β-кетoadипат; XI – 2,4,6-трихлорфенол, XII – 2,5-дихлор-*n*-бензохинон, XIII – 2,5-дихлоргидрохинон, TCA – цикл трикарбоновых кислот.

флавинредуктазу, генерирующую ФАДН₂, который передается к NadA посредством свободной диффузии. ФМН-зависимая хинонредуктаза NadB восстанавливает 2,6-ДХБХ в 2,6-ДХГХ. Затем монооксигеназа NadA катализирует второе последовательное гидроксирование 2,6-ДХГХ с образованием 6-ХГГХ, ароматическое кольцо которого расщепляется 6-ХГГХ-1,2-диоксигеназой NadC. В результате еще двух реакций фермент MA-редуктаза генерирует β-кетoadипат [7, 38].

Бактериальный штамм *S. necator* JMP134 может расти на нескольких хлорированных ароматических загрязнителях, включая 2,4-Д и 2,4,6-ТХФ. В то время как катаболизм 2,4-Д является классическим хлоркатехольным путем деградация 2,4,6-ТХФ осуществляется через производные гидрохинона (рис. 6 б), кодируется кластером генов *tcpRXABCYD* [5, 39].

В начале пути 2,4,6-ТХФ-монооксигеназа (TcrA) (КФ 1.14.14.173) заменяет два хлор заместителя на две гидроксильные группы с образованием 6-ХГГХ и с незначительным образованием

2,6-ДХГХ. Для этих реакций второй компонент флавинредуктазы TcrX, чей ген располагается рядом с *tcpA*, используя НАДН в качестве восстановителя, поставляет TcrA восстановленный флавин (ФАДН₂) [6].

2,6-Дихлоргидрокси-*n*-бензохинон (2,6-ДХГХ) для TcrA, также как и для NadA, является логическим промежуточным метаболитическим продуктом, однако некоторые факты свидетельствуют против данного предположения.

Так, TcrA окисляет 2,6-ДХФ до 2,6-ДХГХ, но не далее до 6-ХГГХ. Разница между окислениями TcrA 2,6-ДХФ и 2,4,6-ТХФ состоит в непосредственном продукте. Поскольку монооксигеназы после удаления электроноакцепторной группы (такой как хлор) из фенольных соединений образуют бензохиноны [6], то прямым продуктом окисления 2,4,6-ТХФ TcrA должен быть 2,6-ДХБХ. В то время как гидроксирование четвертого положения 2,6-дихлорфенола происходит посредством простой монооксигеназной реакции с про-

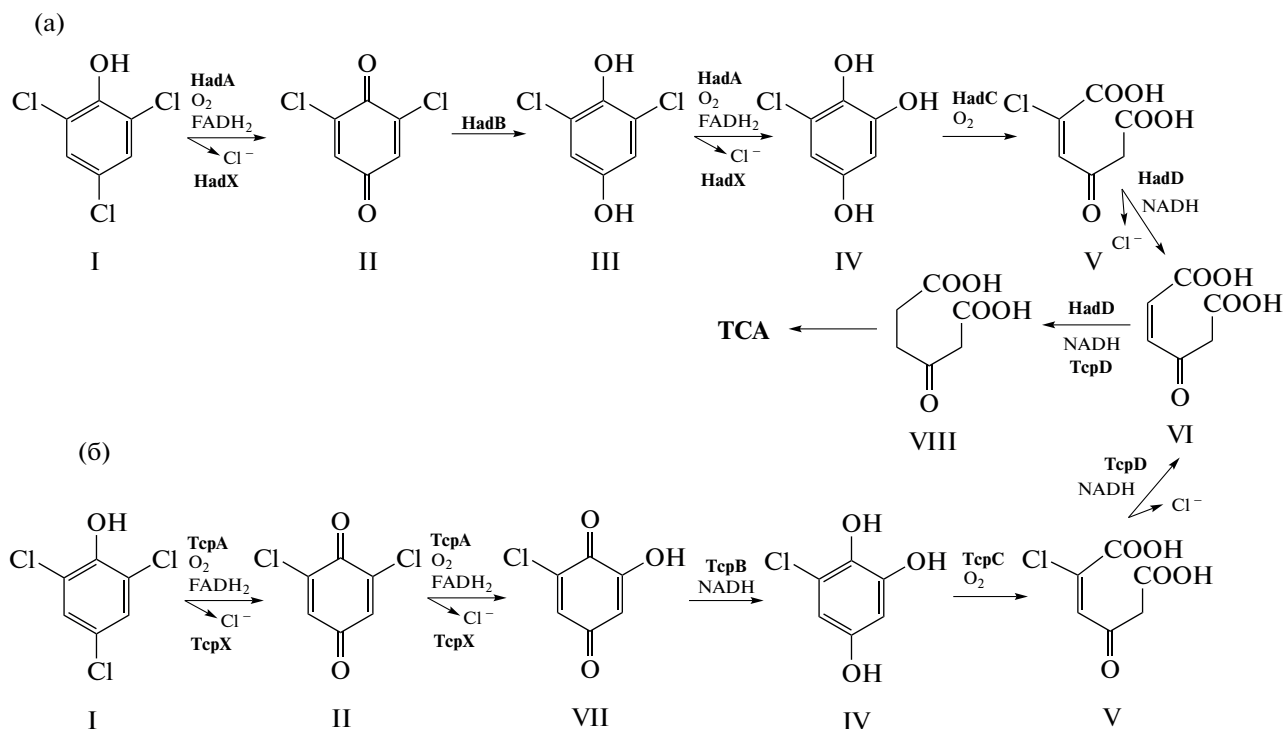


Рис. 6. Пути аэробной деградации 2,4,6-ТХФ штаммов *R. pickettii* DTP0602 (a) [7, 38] и *Cupriavidus necator* JMP134 (б) [5, 6]: I – 2,4,6-трихлорфенол; II – 2,6-дихлор-*n*-бензохинон; III – 2,6-дихлоргидрохинон; IV – 6-хлоргидрокси-2-гидрокси-6-хлор-*n*-бензохинон; V – 2-хлормалеилацетат; VI – малеилацетат, VII – 2-гидрокси-6-хлор-*n*-бензохинон; VIII – β-кетоадибат; TCA – цикл трикарбоновых кислот.

дукцией сразу 2,6-ДХГХ без образования бензохинона в качестве промежуточного соединения.

Кроме того, стехиометрический анализ и эксперименты с ¹⁸O-меткой показали потребление только одной молекулы O₂ на 2,4,6-ТХФ, превращенного в 6-ХГГХ, свидетельствуя в пользу того, что для общей конверсии используется только одна окислительная реакция, а удаление второго хлора происходит с помощью неокислительного процесса. Следовательно, первая реакция является окислительной с образованием 2,6-ДХБХ. Затем фермент использует первый продукт в качестве своего второго субстрата и удаляет второй хлор путем гидролиза с образованием 2-гидрокси-6-хлор-*n*-бензохинона. Последним восстанавливается аскорбатом и НАДН в реакционной смеси до 6-ХГГХ. Образование небольшого количества 2,6-ДХГХ в результате активности TcrA также можно объяснить действием на 2,6-ДХБХ этих восстановителей.

Как и TcrA, рассмотренные выше монооксигеназы HadA и TftD катализируют две последовательные стадии гидроксилирования 2,4,6-ТХФ и 2,4,5-ТХФ, соответственно. Предполагается, что все последовательные гидроксилирования, о которых было известно, осуществляются посредством двух аналогичных окислительных реакций.

Однако, 2,4,6-ТХФ-монооксигеназа (TcrA) штамма JMP134 катализирует гидроксилирование как окислительным, так и гидролитическим способами [6]. Ранее такой каталитический механизм предположили у другой двухкомпонентной флавино-монооксигеназы NpdA2 штамма *Arthrobacter* sp. JS443, фермент также не мог использовать в качестве субстрата восстановленный бензохинон [12].

Способность монооксигеназы TcrA осуществлять реакции двух типов, скорее всего, не связана с наличием второго функционального домена, а обусловлена каталитической разнородностью фермента [6]. Подтверждением данной гипотезы являются эксперименты молекулярного докинга с ФАДН₂ и субстратами (2,4,5-ТХФ, 2,4,6-ТХФ, 2,5-ДХГХ и 2,6-ДХГХ) двух гомологичных монооксигеназ TftD и TcrA. Монооксигеназы показали 65% идентичность их аминокислотных последовательностей и высокое сходство во вторичных структурных элементах, а всего от нескольких ключевых аминокислотных остатков зависят очевидные различия в их каталитической активности и субстратной специфичности. Из-за более гидрофобной природы связывающего кармана TcrA, продукт первой реакции в виде хинона может дольше оставаться в его активном сайте, чем у TftD, что дает достаточно времени, позволяя атаковать молекуле воды. Кроме того, водородная

связь между остатком Arg₁₀₁ и *para*-гидроксильной группой приводит к стабилизации заряда во время атаки молекулы воды на хлор во 2 положении. В конечном итоге это приводит к гидролитическому дехлорированию сразу после оксигеназного дехлорирования без переориентации субстрата или необходимости для него покинуть активный сайт. Положение 2,4,6-ТХФ в активном центре TftD также позволяло хлор заместителю в *para*-положении находиться в пределах расстояния водородной связи от His₂₈₉, что делало возможным продуктивное дехлорирование в 4 положении, в то время как для второго дехлорирования 2,6-ДХ-ГХ было необходимо изменение ориентации субстрата [40].

В процессе дальнейшего метаболизма 2,4,6-ТХФ-хинонредуктаза TcrB (КФ 1.14.14.172) штамма JMP134 восстанавливала 6-хлоргидроксибензохинонхинон до 6-ХГГХ, а ароматическое кольцо последнего расщеплялось под действием 6-ХГ-ГХ-1,2-диоксигеназы TcrC (КФ 1.13.11.-). Два других гена *tcpD* и *tcpR* катаболического кластера *tcpRXABCYD* кодировали МА-редуктазу и транскрипционный регулятор LysR-типа, который контролировал экспрессию *tcp*-генов, используя 2,4,6-ТХФ в качестве индуктора [39].

Таким образом, стадии расщепления ароматического кольца в путях деградации 2,4,6-Т у штаммов *R. pickettii* DTP0602 [7] и *S. necator* JMP134 происходят одинаково: 6-ХГГХ трансформируется в 2-хлормалеилацетат. В то время как у штамма *B. phenoliruptrix* AC1100 5-ХГГХ не подвергается расщеплению кольца напрямую. Два дополнительных фермента — дехлориназа и ГГХ-редуктаза, сначала трансформировали 5-ХГ-ГХ в ГГХ. При этом TftH — диоксигеназа штамма *B. phenoliruptrix* AC1100, может использовать только ГГХ, а не 5-ХГГХ или 6-ХГГХ, в качестве субстрата для *ortho*-расщепления его ароматического кольца [35]. Некоторая «избыточность» пути деградации 2,4,5-Т у *B. phenoliruptrix* AC1100 может быть связана с тем, что штамм был получен искусственно, методом так называемого плазмид-ассоциированного молекулярного бридинга [41].

Сравнение выведенных аминокислотных последовательностей катаболических генов *had*, *tcp* и *tft* трех деструкторов трихлорфенолов *R. pickettii* DTP0602, *S. necator* JMP134 и *B. phenoliruptrix* AC1100 показало их значительную гомологию. Причем более высокая гомология наблюдалась для монооксигеназ и гидроксигидрохинон-1,2-диоксигеназ. Так, идентичность аминокислотных последовательностей монооксигеназ NadA с TcrA и TftD составила 87 и 64%, а ГГХ-1,2-диоксигеназ NadC с TcrC и TftH — 73 и 57% соответственно. 6-ХГГХ-редуктазы NadV и TcrB также показали высокую гомологию (идентичность 75%) аминокислотных последовательностей. И наобо-

рот, меньшее сходство продемонстрировали повсеместно распространенные бактериальные ферменты: флавинредуктазы NadX с TcrX и TfdC — 60 и 55% идентичности и МА редуктазы NadD с TcrD и TftE — 66 и 58% соответственно [7].

Таким образом, несмотря на некоторые отличия в путях деградации трихлорфенолов штаммов *R. pickettii* DTP0602, *S. necator* JMP134 и *B. phenoliruptrix* AC1100 наблюдается общая тенденция, заключающаяся в том, что на начальных стадиях двухкомпонентные монооксигеназы катализируют две последовательные реакции замены хлора на гидроксильную группу сначала в *para*-, а затем в *ortho*-положениях по отношению к фенольной ОН-группе. Впоследствии субстратами для диоксигеназ, расщепляющих ароматическое кольцо, служат или гидроксигидрохинон или его хлорированные в 5 или 6 положении производные, то есть метаболизм трихлорфенолов идет по ГГХ-пути.

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ДЕГРАДАЦИЯ ПЕНТАХЛОРФЕНОЛА КАК МОДЕЛЬ ВНОВЬ ВОЗНИКШЕГО И ЕЩЕ НЕ ОПТИМИЗИРОВАННОГО ПУТИ КОНВЕРСИИ КСЕНОБИОТИКОВ

Пентахлорфенол (ПХФ) — это синтетическое соединение, которое с 20-х гг. прошлого столетия широко используется в качестве действующего агента пестицидов и антисептиков-консервантов древесины от ее поражения грибком. Так как природных источников ПХФ не существует, следовательно, пути, используемые бактериями для его разложения, возникли примерно за 60 лет с момента начала его применения человеком. За это время, вследствие своей токсичности и стойкости, ПХФ стал одним из приоритетных загрязнителей окружающей среды [42].

Известно, что введение антропогенных химикатов в окружающую среду создает селективное давление, которое может способствовать развитию новых путей, позволяющим бактериям получать доступ к новым источникам углерода, азота или фосфора и/или детоксицировать опасные соединения. Однако разложение антропогенных химических веществ часто оказывается медленным и неполным, поскольку бактерии еще не выработали ферменты, которые эффективно катализируют шаги, необходимые для преобразования таких соединений в метаболиты центрального углеводного обмена [2, 43].

ПХФ из-за присутствия пяти атомов хлора на фенольном кольце более стоек к бактериальной деградации, чем менее хлорированные аналоги [3]. Штамм *Sphingobium* (ранее *Sphingomonas*) *chlorophenolica* ATCC 39723 относится к немногим бактериям, способным полностью минерализовать ПХФ, хотя разложение происходит медлен-

но и деструктор не может расти при высоких концентрациях этого субстрата [2, 43–47].

Деградация ПХФ у *S. chlorophenolicum* ATCC 39723 начинается с гидроксирования субстрата однокомпонентной ПХФ-монооксигеназой (PcpB) (КФ 1.14.13.50) с образованием тетрахлор-*n*-бензохинона (ТХБХ) (рис. 5). Интересно, что фермент способен к удалению из 4 положения широкого ряда заместителей у полигалогенированных фенолов, но при этом необходимо, чтобы во 2 положении присутствовал галоген.

Затем ТХБХ-редуктаза (PcpD) (КФ 1.1.1.404) восстанавливает ТХБХ до тетрахлоргидрохинона (ТХГХ) [45]. Мутантный штамм, лишенный функциональной PcpD, обладал нарушенной способностью разлагать ПХФ, но в то же время удалял из среды 2,3,5,6-тетрахлорфенол с той же скоростью, что и штамм дикого типа, следовательно, PcpD катализирует стадию, необходимую для разложения ПХФ, но не для разложения 2,3,5,6-тетрахлорфенола. Основываясь на известных механизмах действия флавиномоноксигеназ, к которым относится и PcpB, гидроксирование ПХФ приводит к образованию ТХБХ, который PcpD и восстанавливает до ТХГХ. Последний затем превращается в 2,6-ДХГХ посредством двух реакций дегалогенирования, катализируемых дегалогеназой (глутатион-S-трансферазой) PcpC (КФ 1.21.4.5) [48]. Каждая стадия восстановительного дегалогенирования приводит к окислению двух молекул глутатиона до дисульфида глутатиона.

Необходимо отметить, что PcpC подвержен окислительному стрессу, а поврежденный фермент продуцирует глутатионильные конъюгаты (S-глутатионил-трихлоргидрохинон и S-глутатионил-дихлоргидрохинон), которые он не может далее дегалогенировать. Эти конъюгаты могут быть восстановлены и возвращены на путь дегградации действием другой глутатионтрансферазы, PcpF (КФ 1.8.5.7), которая превращает конъюгаты в 2,5,6-трихлор- и 2,6-дихлоргидрохинон, возвращая их на путь дегградации [49].

Fe(II)-зависимая экстрадиольная диоксигеназа (PcpA) (КФ 1.13.11.66) расщепляет 2,6-ДХГХ [50–52] с образованием 2-хлормалеилацетат (2-ХМА). Фермент МА-редуктаза (PcpE) ответственен за восстановление 2-ХМА до МА, а затем до β -кетoadипата.

У штамма ATCC 39723 первоначально были известны пять катаболических генов: *pcpB*, *pcpD*, *pcpC*, *pcpA* и *pcpE*, а также один регуляторный ген *pcpR*, участвующих в дегградации ПХФ. Еще один ген глутатионтрансферазы *pcpF* был описан позже [49]. Гены разбросаны по двум фрагментам: *pcpB*, *pcpD* и *pcpR* организованы как кластер с одинаковой ориентацией, при этом с генов *pcpB* и *pcpD* экспрессируется единый транскрипт. Остальные гены *pcpC*, *pcpA*, *pcpE* и *pcpF* (обозначенный изна-

чально как *orf19*) находятся на другом фрагменте рядом друг с другом, но не внутри оперона. Наличие консервативных сайтов связывания для регуляторного белка PcpR в промоторных областях *pcpB*, *pcpA* и *pcpE* показывает, что гены действуют как единый регулон с PcpR в качестве активатора, однако неизвестно, выступает в качестве коиндуктора сам ПХФ или его последующие продукты. Гены глутатионтрансфераз *pcpC* и *pcpF* экспрессируются конститутивно, вероятно механизм их регуляции с помощью ПХФ бактерия еще не работала [43–45, 49].

Теоретически гены, кодирующие ферменты дегградации ПХФ, могли возникнуть в результате: 1) привлечения предкового фермента без дубликации генов, что требует разделения новых и исходных функций; 2) рекрутированием уже существующего фермента с последующим дублированием и дивергенцией исходного гена с получением для дегградации ПХФ одной специализированной, хотя возможно, и не оптимизированной копии; и 3) горизонтальным переносом генов, кодирующих либо ферменты, которые уже специализированы для расщепления ПХФ, либо ферменты с широкой субстратной специфичностью и часто слабой эффективностью, которые стали полезными, когда бактерия столкнулась с этим субстратом. [43].

Для понимания происхождения ферментов разложения ПХФ сравнили всю последовательность геномов *S. chlorophenolicum* ATCC 39723 и *S. japonicum*, близкородственной сфингомонады, которая разлагает другой хлорорганический пестицид – линдан (γ -гексахлорциклогексан) [53].

Первый фермент пути штамма ATCC 39723 PcpB принадлежит к семейству однокомпонентных флавинозависимых монооксигеназ, к которому также относятся хорошо изученные ферменты фенолгидроксилаза (КФ 1.14.13.7) штамма *Trichosporon cutaneum* [54] и *n*-гидроксibenзоатгидроксилаза (КФ 1.14.13.2) представителей рода *Pseudomonas* [55]. Такие ферменты распространены у почвенных бактерий, поскольку фенольные соединения, полученные в результате разложения лигнина, являются важным источником углерода. Отсутствие близкого гомолога у *S. japonicum* позволяет предположить, что гена *pcpB* не было у последнего общего предка *S. chlorophenolicum* и *S. japonicum*. Близкие гомологи *pcpB* также не обнаружены у другой сфингомонады *Sphingomonas wittichii*, поэтому маловероятно, что этот ген произошел от предкового, утерянного у *S. japonicum*. Низкая парная идентичность последовательностей между ПХФ гидроксилазой и другими флавиномоноксигеназами штамма *S. chlorophenolicum* показывает, что *pcpB* не возник в результате недавней дубликации и дивергенции ранее существовавшего гена. Эти данные, наряду с наблюдением, что *pcpB* и *pcpD* находятся в области с относительно низким

ГС-составом, свидетельствуют о том, что ген *pcpB* был приобретен путем горизонтального переноса из неизвестного источника. Эта гипотеза подтверждается наблюдением, что ферменты, показывающие высокую гомологию с PcpB (72–98% идентичность последовательностей), обнаружены у *Novosphingobium lentum* [56], нескольких разлагающих полихлорфенол сфингомонад из Финляндии [57], *Sphingomonas* sp. UG30 [58], а также у некоторых некультивируемых бактерий из проб окружающей среды, собранных с почв, загрязненных ПХФ [59]. Высокая гомология последовательностей этих генов позволяет предположить, что *pcpB* был передан путем горизонтального переноса генов. В то же время, PcpB имеет низкую гомологию (<35% идентичности) с большинством флавиномоноксигеназ бактерий, не разрушающих ПХФ. Высокий уровень дивергенции последовательностей затрудняет идентификацию исходного субстрата PcpB до его вовлечения в путь деградации ПХФ [43].

Второй фермент ТХБХ-редуктаза PcpD не имеет близкого родства с каким-либо другим ферментом в геномах *S. chlorophenolicum* или *S. japonicum*, что позволяет предположить, что она, как и *pcpB*, была приобретена путем горизонтального переноса генов. Хотя существует несколько семейств известных хинонредуктаз, фермент PcpD не входит ни в одну из них. Скорее, ТХБХ-редуктаза наиболее близка белкам, которые служат редуктазными компонентами двухкомпонентных оксигеназ, инициирующих аэробную деградацию ароматических соединений, не имеющих гидроксильных или аминных заместителей [43, 45].

PcpC катализирует стадии восстановительного дегалогенирования, которое также происходит во время деградации линдана у *S. japonicum* [60]. Дегалогеназы PcpC и LinD являются членами семейства глутатион-S-трансфераз (GST) (КФ 2.5.1.18), большинство ферментов которого катализируют нуклеофильную атаку глутатиона на электрофильный субстрат с образованием конъюгата глутатиона. Хотя в геномах штаммов *S. chlorophenolicum* и *S. japonicum* есть многочисленные члены GST-семейства, ТХГХ-дегалогеназа не имеет значительной гомологии любому из них (<25% идентичности парных последовательностей), в том числе LinD, катализирующему восстановительное дегалогенирование 2,5-ДХГХ до 2-хлоргидрохинона в пути деградации линдана [60]. Таким образом, *pcpC*, скорее всего, был приобретен путем горизонтального переноса генов. PcpC и LinD – единственные известные восстановительные дегалогеназы аэробных бактерий, которые действуют на ароматические соединения. Значительное расхождение между этими ферментами предполагает, что они происходят независимо от разных предков – членов GST-семейства. Остатки в активных центрах PcpC и LinD напоминают остатки в ак-

тивных центрах некоторых малеилпируватизомераз, а ТХГХ-дегалогеназа имеет низкую активность с малеилацетоном, аналогом малеилпирувата [61]. Следовательно, ТХГХ-дегалогеназа могла происходить от малеилпируватаизомеразы.

Первые три рассмотренных фермента этого метаболического пути удивительно неэффективны. ПХФ-гидроксилаза (PcpB) имеет очень низкую каталитическую константу (k_{cat} 0.02 с⁻¹) и демонстрирует существенное разобщение – фермент часто не может гидроксилировать субстрат и вместо этого высвобождает H₂O₂ по мере разложения промежуточного продукта С4а-гидроперокси-флавина. ТХБХ-редуктаза (PcpD) показывает низкую скорость оборота (0.7 с⁻¹ при 50 мкМ ТХБХ) [45, 47], а ТХГХ-дегалогеназа (PcpC) подвергается глубокому субстратному ингибированию, ее ароматические субстраты действуют как неконкурентные ингибиторы реакции тиол-дисульфидного обмена, которая необходима для регенерации свободной формы фермента [62]. Эти данные согласуются с гипотезой о том, что ферменты в пути деградации ПХФ еще не эволюционировали до уровня функции, типичной для большинства метаболических энзимов [43]. Поскольку первые детерминанты деградации ПХФ (*pcpB*, *pcpD* и *pcpC*) были обнаружены в двух разных локусах генома штамма ATCC 39723, следовательно, были задействованы как минимум два разных события горизонтального переноса генов.

При исследовании четвертого фермента PcpA оказалось, что его последовательность на 93% идентична другой диоксигеназе LinEb штамма *S. japonicum*, расщепляющей ароматическое кольцо 2,6-ДХГХ. Несмотря на свое название, фермент LinEb не участвует в деградации линдана [63], в котором 2-хлоргидрохинон расщепляет его гомолог LinE. Последовательности диоксигеназ LinE и LinEb имеют 53, а PcpA и LinE – 52% идентичности.

Изучение пятого фермента пути (PcpE) показало, что его последовательность на 91% идентична МА-редуктазе (LinF) штамма *S. japonicum*. Следовательно, последние два гена пути деградации ПХФ, PcpA и PcpE были унаследованы от ближайшего предка *S. chlorophenolicum* и *S. japonicum*.

Таким образом, конверсию ПХФ можно рассматривать, как модель вновь возникшего и еще не оптимизированного пути конверсии ксенобиотиков. Моноксигенирование первичного субстрата осуществляется однокомпонентной гидроксилазой однократно в *n*-положении, в результате чего отщепляется хлор-заместитель и образуется тетрахлор-*p*-бензохинон, который в следующей реакции восстанавливается до тетрахлоргидрохинона. Большинство хлор-заместителей элиминируется из молекулы субстрата до раскрытия ароматического кольца. Субстратом для диокси-

геназы, катализирующей это *мета*-расщепление, является дихлорированный гидрохинон.

Флавінзависимые монооксигеназы, гидроксилирующие субстрат, играют основную роль в гидрохиноновом пути бактериальной деградации хлорфенолов. Монооксигенирование фенолов, содержащих хлор в *пара*-положении, приводит к одновременному гидроксилированию и выделению ионов этого заместителя. При этом атака монооксигеназы на такой субстрат производит сначала хинон, который затем восстанавливается до гидрохинона или гидроксигидрохинона. Соответственно от того какое из этих двух соединений служит субстратом для дальнейшего воздействия диоксигеназ, расщепляющих ароматическое кольцо, различают два альтернативных метаболических пути конверсии этих соединений. Довольно часто наблюдается корреляция пути метаболизма монозамещенных *n*-фенолов с таксономической принадлежностью штамма-деструктора. Преимущественно у грамотрицательных бактерий в результате активности однокомпонентных флавінзависимых монооксигеназ образуется гидрохинон, ароматическое кольцо которого в последствие расщепляется. В то время как у грамположительных бактерий двухкомпонентные флавінзависимые монооксигеназы трансформируют первоначальный субстрат в результате двух последовательных реакций гидроксилирования до гидроксигидрохинона, который служит субстратом для диоксигеназ, расщепляющих ароматическое кольцо.

Однокомпонентные гидроксилазы принадлежат к классу А флавінзависимых монооксигеназ и проявляют узкую субстратную специфичность по отношению к ароматическим соединениям, содержащим активирующую гидроксильную или аминогруппу. Это важное отличие всех флавінсо-держащих оксигеназ от ферментов P_{450} , которые могут гидроксилировать также неактивированные ароматические соединения [11]. Поскольку конечным продуктом катализа однокомпонентных гидроксилаз является гидроксихинон, логично, что эти ферменты выполняют только одно гидроксилирование фенольного субстрата. Однако, скорее всего, это ограничение не является функциональным и второе гидроксилирование вполне возможно для этого класса ферментов. Так, в альтернативном ГХ-пути деградации 4-НФ штаммами *Pseudomonas* sp. 1-7 и *Pseudomonas* sp. WBC-3, однокомпонентные 4-НФ-монооксигеназы PdcA и PnpA скорее всего выполняют второе гидроксилирование субстрата [14, 15].

Однокомпонентная ПХФ монооксигеназа (PcpB) штамма *S. chlorophenolicum* ATCC 39723 катализирует одно гидроксилирование субстрата в 4 положении с образованием ТХБХ. Близкие гомоло-

ги гена этого фермента с 72–98% идентичностью обнаружены у некоторых других – разлагающих ПХФ сфингомонад [57, 58]. С большинством флавінмонооксигеназ бактерий, не способных к конверсии ПХФ, PcpB имеет <35% идентичности последовательностей [43]. Кроме того, при исследовании влияния полихлорфенолов на видовое разнообразие бактерий сообщалось, что добавление ПХФ в почвенную суспензию приводило к избирательному ее обогащению бактериями рода *Sphingomonas* [59]. Таким образом, наблюдается корреляция способности разлагать ПХФ с таксономической принадлежностью бактерии деструктора к сфингомонадам и родственным им видам.

Бактериальная деградация пентахлорфенола может считаться классическим примером нового пути, вновь возникшего и эволюционирующего за 60 лет его активного использования человеком. Бактерии еще не оптимизировали и не отрегулировали ферменты начальных стадий, необходимые для преобразования этого антропогенного соединения в метаболиты центрального углеродного обмена, вследствие чего первые три фермента пути PcpB, PcpD и PcpC штамма *S. chlorophenolicum* функционируют с различными ошибками. Диоксигеназа PcpA катализирует расщепление кольца 2,6-дихлоргидрохинона, то есть метаболизм ПХФ идет по ГХ-пути, что характерно при использовании бактериями однокомпонентных флавінмонооксигеназ.

Двухкомпонентные гидроксилазы принадлежат к классу D флавінзависимых монооксигеназ, ферментом-прототипом для которого является 4-гидроксифенилацетат-3-монооксигеназа (КФ 1.14.13.3), которая была идентифицирована у ряда бактерий. Подобно флавомонооксигеназам класса А, члены класса D обычно активны в отношении ароматических субстратов, таких как 4-гидроксифенилацетат, фенол [64–66], 4-НФ [17] и др. Представители этого класса, по-видимому, ограничены только одним типом оксигенации: (регионселективным) гидроксилированием [11].

Как следует из приведенных выше данных, бактериальные аэробные катаболические пути хлорированных фенолов чаще инициируются двухкомпонентными монооксигеназами, что, возможно, связано с характерной для них широкой субстратной специфичностью. Большинство монооксигеназных компонентов TC-FDM-семейства попадают в одну из двух гомологичных групп [18]. Первая группа – фенол-2-монооксигеназная, состоит из ферментов, которые гидроксилируют фенолы в *орто*-положении к исходной гидроксильной группе и включает 4-гидроксифенилацетатмонооксигеназу HpaB [25], нитрофенолмонооксигеназу NphA1 (КФ 1.14.13.29) [24] и фенолмонооксигеназу PheA [67].

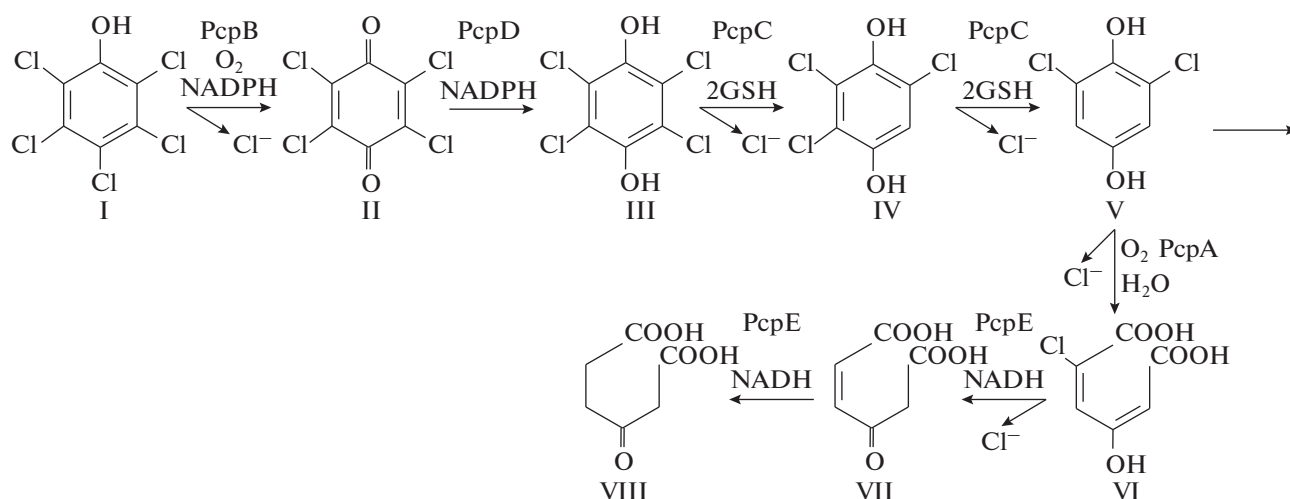


Рис. 7. Путь конверсии ПХФ у штамма *S. chlorophenolicum* ATCC 39723: I – пентахлорфенол; II – тетрахлор-*n*-бензохинон; III – тетрахлоргидрохинон; IV – 2,5,6-трихлоргидрохинон; V – 2,6-дихлоргидрохинон; VI – 2-хлормалеилацетат; VII – малеилацетат; VIII – β-кетoadипат [2].

Вторая – основная гомологичная группа содержит фенол-4-монооксигеназы, которые гидроксилируют фенолы в *para*-положении по отношению к исходной гидроксильной группе. Эта группа включает 4-ХФ-монооксигеназу *SphC-I* [8], 4-НФ монооксигеназу *NrcA* [18] и *NpdA2* [12], 2,4,5-ТХФ-монооксигеназу *TftD* [68] и 2,4,6-трихлорфенолмонооксигеназу *TrpA* [5] и *NadA* [69]. Природные субстраты всех ферментов в группе фенол-4-монооксигеназ имеют электроноакцепторный заместитель (нитро или хлор) в *para*-положении, который замещается в результате катализируемого монооксигеназой гидроксилирования. Все члены группы фенол-4-монооксигеназы дважды гидроксилируют свои природные субстраты.

При разложении трихлорфенолов сначала всегда происходит гидроксилирование в *para*-, а потом в *ortho*-позиции к первоначальной гидроксильной группе. 2,4,6-ТХФ-монооксигеназа *TrpA* [6] катализирует последовательное дехлорирование посредством окислительных и гидролитических реакций, при этом субстрат не покидает активного сайта фермента [11, 12]. Второе гидроксилирование субстрата 4-НФ-монооксигеназой *NpdA2* [12], по аналогии с *TrpA* также, скорее всего, осуществляется посредством гидролитической реакции без выхода субстрата из активного центра фермента. Подтверждением этого предположения является то, что как *TrpA*, так и *NpdA2* не могут использовать как субстраты восстановленные бензохиноны – 2,6-ДХГХ и гидрохинон соответственно. Причем второго функционального домена у этих монооксигеназ нет, так что скорее имеет место каталитическая разнородность (неразборчивость) фермента.

Иная каталитическая неразборчивость ферментов была выявлена при конверсии 4-ХК культурами А6 и JS443. Идентификация промежуточного метаболита 5-хлоргидрокси-2-хлоргидрохинона в результате активности монооксигеназ *SphC-I* и *NpdA2*, свидетельствует о слабой позиционной специфичности этих ферментов в отношении субстрата, вследствие чего происходит гидроксилирование его в *para*-позиции по отношению к любой из двух гидроксильных групп [8, 12].

Рассмотренные пути бактериальной деградации хлорированных фенолов показывают, что чем больше хлора содержит молекула ароматического субстрата, чем менее она похожа на природный структурный аналог, тем более проблематично для бактерии выстроить и оптимизировать путь его начальной конверсии. Токсичность хлорированных фенолов кроме количества атомов хлора в молекуле субстрата зависит и от их положения. Известно, что трудность в утилизации субстрата бактериями увеличивается при наличии хлор-заместителя в 3-, 4- и 5-ой позициях [1].

Таким образом, эволюция новых субстратных специфичностей идет через рекрутирование перспективных генов/ферментов посредством дубликаций и мутаций, уже имеющихся в геноме, или путем горизонтального переноса из геномов других бактерий. На первых этапах ферменты, обладающие слабой или даже неспецифичной активностью по отношению к целевым субстратам, показывают низкую эффективность. Затем приходит пора “обкатки” фермента, исправления его ошибок, увеличение специфичности к субстрату, устранение каталитической неразборчивости и оптимизация регуляции.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Czaplicka M.* // *Sci. Total Environ.* 2004. V. 322. № 1–3. P. 21–39.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.09.015>
2. *Crawford R.L., Jung C.M., Strap J.L.* // *Biodegradation.* 2007. V. 18. № 5. P. 525–539.
<https://doi.org/10.1007/s10532-006-9090-6>
3. *Arora P.K., Bae H.* // *Microb. Cell Fact.* 2014. V. 13. № 1. P. 31.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-31>
4. *Zaborina O., Daubaras D.L., Zago A., Xun L., Saido K., Klem T., Nikolic D., Chakrabarty A.M.* // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. № 17. P. 4667–4675.
<https://doi.org/10.1128/JB.180.17.4667-4675.1998>
5. *Louie T.M., Webster C.M., Xun L.* // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 13. P. 3492–3500.
<https://doi.org/10.1128/JB.184.13.3492-3500.2002>
6. *Xun L., Webster C.M.* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 8. P. 6696–6700.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M312072200>
7. *Hatta T., Fujii E., Takizawa N.* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012. V. 76. № 5. P. 892–899.
<https://doi.org/10.1271/bbb.110843>
8. *Nordin K., Unell M., Jansson J.K.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 11. P. 6538–6544.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6538-6544.2005>
9. *Chenprakhon P., Wongnate T., Chaiyen P.* // *Protein Science.* 2019. V. 28. № 1. P. 8–29.
<https://doi.org/10.1002/pro.3525>
10. *Chenprakhon P., Pimviriyakul P., Tongsook C., Chaiyen P.* // *Enzymes.* 2020. V. 47. P. 283–326.
<https://doi.org/10.1016/bs.enz.2020.05.008>
11. *van Berkel W.J.H., Kamerbeek N.M., Fraaije M.W.* // *J. Biotechnol.* 2006. V. 124. № 4. P. 670–689.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.03.044>
12. *Perry L.L., Zylstra G.J.* // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 21. P. 7563–7572.
<https://doi.org/10.1128/JB.01849-06>
13. *Zhang J.J., Liu H., Xiao Y., Zhang X.E., Zhou N.Y.* // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191. № 8. P. 2703–2710.
<https://doi.org/10.1128/JB.01566-08>
14. *Zhang S., Sun W., Xu L., Zheng X., Chu X., Tian J., Wu N., Fan Y.* // *BMC Microbiology.* 2012. V. 12. P. 27.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-27>
15. *Wei M., Zhang J.-J., Liu H., Zhou N.-Y.* // *Biodegradation.* 2010. V. 21. № 6. P. 915–921.
<https://doi.org/10.1007/s10532-010-9351-2>
16. *Shen W., Liu W., Zhang J., Tao J., Deng H., Cao H., Cui Z.* // *Bioresour. Technol.* 2010. V. 101. № 19. P. 7516–7522.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.052>
17. *Kadiyala V., Spain J.C.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. № 7. P. 2479–2484.
<https://doi.org/10.1128/AEM.64.7.2479-2484.1998>
18. *Kitagawa W., Kimura N., Kamagata Y.* // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 15. P. 4894–4902.
<https://doi.org/10.1128/JB.186.15.4894-4902.2004>
19. *Takeo M., Murakami M., Niihara S., Yamamoto K., Nishimura M., Kato D., Negoro S.* // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. № 22. P. 7367–7374.
<https://doi.org/10.1128/JB.00742-08>
20. *Liu P.P., Zhang J.J., Zhou N.Y.* // *Int. Biodeter. Biodegr.* 2010. V. 64. № 4. P. 293–299.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.03.001>
21. *Yamamoto K., Nishimura M., Kato D.I., Takeo M., Negoro S.* // *J. Biosci. Bioeng.* 2011. V. 111. № 6. P. 687–694.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.01.016>
22. *Moiseeva O.V., Solyanikova I.P., Kaschabek S.R., Gröning J., Thiel M., Golovleva L.A., Schlömann M.* // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 19. P. 5282–5292.
<https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5282-5292.2002>
23. *Field J.A., Sierra-Alvarez R.* // *Biodegradation.* 2008. V. 19. № 4. P. 463–480.
<https://doi.org/10.1007/s10532-007-9155-1>
24. *Takeo M., Yasukawa T., Abe Y., Niihara S., Maeda Y., Negoro S.* // *J. Biosci. Bioeng.* 2003. V. 95. P. 139–145.
25. *Galan B., Diaz E., Prieto M.A., Garcia J.L.* // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. № 3. P. 627–636.
<https://doi.org/10.1128/JB.182.3.627-636.2000>
26. *Min J., Zhang J.J., Zhou N.Y.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. № 19. P. 6212–6222.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02093-14>
27. *Spain J.C., Gibson D.T.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1991. V. 57. № 3. P. 812–819.
<https://doi.org/10.1128/aem.57.3.812-819.1991>
28. *Wei Q., Liu H., Zhang J.J., Wang S.H., Xiao Y., Zhou N.Y.* // *Biodegradation.* 2010. V. 21. № 4. P. 575–584.
<https://doi.org/10.1007/s10532-009-9325-4>
29. *Bae H.S., Lee J.M., Lee S.-T.* // *FEMS Microbiol. Lett.* 1996. V. 145. № 1. P. 125–129.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08566.x>
30. *Cho Y.-G., Yoon J.-H., Park Y.-H., Lee S.-T.* // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1998. V. 44. № 5. P. 303–309.
<https://doi.org/10.2323/jgam.44.303>
31. *Ferreira M.I.M., Marchesi J.R., Janssen D.B.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 78. P. 709–717.
<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1343-3>
32. *Chapman P.J., Hopper D.J.* // *Biochem J.* 1968. V. 110. № 3. P. 491–498.
<https://doi.org/10.1042/bj1100491>
33. *Webb B.N., Ballinger J.W., Kim E., Belchik S.M., Lam Ka-Sum, Youn B., Nissen M.S., Xun L., Kang C.* // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 3. P. 2014–2027.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.056135>
34. *Danganan C.E., Ye R.W., Daubaras D.L., Xun L., Chakrabarty A.M.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. V. 60. № 11. P. 4100–4106.
<https://doi.org/10.1128/aem.60.11.4100-4106.1994>
35. *Daubaras D.L., Saido K., Chakrabarty A.M.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. № 11. P. 4276–4279.
<https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4276-4279.1996>

36. *Gisi M.R., Xun L.* // J. Bacteriol. 2003. V. 185. № 9. P. 2786–2792.
<https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2786-2792.2003>
37. *Hayes R.P., Lewis K.M., Xun L., Kang C.* // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 40. P. 28447–28456.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.499368>
38. *Pimviriyakul P., Chaiven P.* // J. Biol. Chem. 2018. V. 293. № 48. P. 18525–18539.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005538>
39. *Sánchez M.A., González B.* // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 9. P. 2769–2776.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02584-06>
40. *Hayes R.P., Webb B.N., Subramanian A.K., Nissen M., Popchock A., Xun L., Kang C.* // Int. J. Mol. Sci. 2012. V. 13. № 8. P. 9769–9784.
<https://doi.org/10.3390/ijms13089769>
41. *Kilbane J.J., Chatterjee D.K., Karns J.S., Kellogg S.T., Chakrabarty A.M.* // Appl. Environ. Microbiol. 1982. V. 44. № 1. P. 72–78.
<https://doi.org/10.1128/aem.44.1.72-78.1982>
42. *Lopez-Echartea E., Macek T., Demnerova K., Uhlik O.* // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2016. V. 13. № 11. P. 1146.
<https://doi.org/10.3390/ijerph13111146>
43. *Copley S.D., Rokicki J., Turner P., Daligault H., Nolan M., Land M.* // Genome Biol. Evol. 2012. V. 4. № 2. P. 184–198.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evr137>
44. *Cai M., Xun L.* // J. Bacteriol. 2002. V. 184. № 17. P. 4672–4680.
<https://doi.org/10.1128/JB.184.17.4672-4680.2002>
45. *Dai M., Rogers J.B., Warner J.R., Copley S.D.* // J. Bacteriol. 2003. V. 185. № 1. P. 302–310.
<https://doi.org/10.1128/JB.185.1.302-310.2003>
46. *Dai M., Copley S.D.* // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 4. P. 2391–2397.
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2391-2397.2004>
47. *Hlouchova K., Rudolph J., Pietari J.M., Behlen L.S., Copley S.D.* // Biochemistry. 2012. V. 51. № 18. P. 3848–3860.
<https://doi.org/10.1021/bi300261p>
48. *Xun L., Topp E., Orser C.S.* // J. Bacteriol. 1992. V. 174. № 24. P. 8003–8007.
<https://doi.org/10.1128/jb.174.24.8003-8007.1992>
49. *Huang Y., Xun R., Chen G., Xun L.* // J. Bacteriol. 2008. V. 190. № 23. P. 7595–7600.
<https://doi.org/10.1128/JB.00489-08>
50. *Xun L., Bohuslavek J., Cai M.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. V. 266. № 2. P. 322–325.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1805>
51. *Xu L., Lawson S.L., Resing K., Babbitt P.C., Copley S.D.* // Biochemistry. 1999. V. 38. № 24. P. 7659–7669.
<https://doi.org/10.1021/bi990103y>
52. *Ohtsubo Y., Miyauchi K., Kanda K., Hatta T., Kiyohara H., Senda T., Nagata Y., Mitsui Y., Takagi M.* // FEBS Lett. 1999. V. 459. № 3. P. 395–398.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01305-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01305-8)
53. *Nagata Y., Ohtsubo Y., Endo R., Ichikawa N., Ankaï A., Oguchi A., Fukui S., Fujita N., Tsuda M.* // J. Bacteriol. 2010. V. 192. № 21. P. 5852–5853.
<https://doi.org/10.1128/JB.00961-10>
54. *Neujahr H.Y., Gaal A.* // Eur. J. Biochem. 1973. V. 35. № 2. P. 386–400.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb02851.x>
55. *van Berkel W., Westphal A., Eschrich K., Eppink M., de Kok A.* // Eur. J. Biochem. 1992. V. 210. № 2. P. 411–419.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17436.x>
56. *Tirola M.A., Mannisto M.K., Puhakka J.A., Kulomaa M.S.* // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 1. P. 173–180.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.173-180.2002>
57. *Tirola M.A., Wang H., Paulin L., Kulomaa M.S.* // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 9. P. 4495–4501.
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4495-4501.2002>
58. *Cassidy M.B., Lee H., Trevors J.T., Zablotowicz R.B.* // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 23. № 4–5. P. 232–241.
<https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900749>
59. *Beaulieu M., Becaert V., Deschenes L., Villemur R.* // Microb. Ecol. 2000. V. 40. № 4. P. 345–355.
<https://doi.org/10.1007/s002480000055>
60. *Miyauchi K., Suh S.K., Nagata Y., Takagi M.* // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 6. P. 1354–1359.
<https://doi.org/10.1128/JB.180.6.1354-1359.1998>
61. *Anandarajah K., Kiefer P.M., Donohoe B.S., Copley S.D.* // Biochemistry. 2000. V. 39. № 18. P. 5303–5311.
<https://doi.org/10.1021/bi9923813>
62. *Warner J.R., Copley S.D.* // Biochemistry. 2007. V. 46. № 14. P. 4438–4447.
<https://doi.org/10.1021/bi0620104>
63. *Endo R., Kamakura M., Miyauchi K., Fukuda M., Ohtsubo Y., Tsuda M., Nagata Y.* // J. Bacteriol. 2005. V. 187. № 3. P. 847–853.
<https://doi.org/10.1128/JB.187.3.847-853.2005>
64. *Duffner F.M., Kirchner U., Bauer M.P., Müller R.* // Gene. 2000. V. 256. № 1–2. P. 215–221.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00352-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00352-8)
65. *Kirchner U., Westphal A.H., Müller R., van Berkel W.J.* // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 48. P. 47545–47553.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M307397200>
66. *van den Heuvel R.H., Westphal A.H., Heck A.J., Walsh M.A., Rovida S., van Berkel W.J., Mattevi A.* // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 13. P. 12860–12867.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M313765200>
67. *Duffner F.M., Müller R.* // FEMS Microbiol. Lett. 1998. V. 161. № 1. P. 37–45.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12926.x>
68. *Hübner A., Danganan C.E., Xun L., Chakrabarty A.M., Hendrickson W.* // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 6. P. 2086–2093.
<https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2086-2093.1998>
69. *Takizawa N., Yokoyama H., Yanagihara K., Hatta T., Kiyohara H.* // J. Ferment. Bioeng. 1995. V. 80. № 4. P. 318–326.
[https://doi.org/10.1016/0922-338X\(95\)94198-Z](https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)94198-Z)

Flavin-Dependent Monooxygenases Involved in Bacterial Degradation of Chlorophenols

N. V. Zharikova^{a, *}, V. V. Korobov^a, and E. I. Zhurenko^a

^a Ufa Institute of Biology of Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences RAS, Ufa, 450054 Russia

*e-mail: puzzle111@yandex.ru

There are two central pathways for aerobic bacterial degradation of chlorophenols mainly depends on the degree of halogenation of the substrate. Mono- and dichlorophenols are hydroxylated to (chloro)catechols, were further metabolized by *ortho*-cleavage pathway. Polychlorinated phenols are utilized by bacteria via hydroquinone/hydroxyhydroquinone followed by *meta*-cleavage of its aromatic ring with the formation of maleyl acetate and then β -keto adipate. Most research has focused on organisms and catabolic pathways that involve the degradation of (chloro)aromatic substrates via catechols, while alternative hydroquinone pathway remain poorly understood and described. The review provides information on the metabolic pathways of *p*-chloro-substituted phenols, where special attention is paid to flavin-dependent monooxygenases that catalyze the primary reactions of substrate oxidation.

Keywords: flavin-dependent monooxygenase, biodegradation, 4-chlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, pentachlorophenol, hydroquinone, hydroxyhydroquinone

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ВИОЛАЦЕИН: СВОЙСТВА, БИОСИНТЕЗ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ

© 2022 г. Н. С. Ляховченко¹, В. М. Травкин¹, В. Ю. Сенченков¹, И. П. Соляникова¹, *

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, 308015 Россия

*e-mail: solyanikova@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 22.01.2022 г.

После доработки 24.05.2022 г.

Принята к публикации 04.07.2022 г.

В обзоре рассматриваются свойства виолацеина – хромогенного вторичного метаболита бактерий, обладающего широким спектром биологической активности, а также вопросы его микробного синтеза и перспективы применения. Синтезирующие виолацеин бактерии выделены из различных источников, среди которых ризосфера культурных растений, почвы, болота, морское побережье, пруды, талые воды ледников. Исследование антибактериальных, антимикозных, инсектицидных и противоопухолевых свойств виолацеина ставит его в ряд чрезвычайно перспективных биологически-активных соединений и обуславливает неуклонно возрастающий интерес как к самому соединению, так и к группе бактерий, его продуцирующих, для разработки новых лекарственных и ветеринарных средств, а также средств защиты растений. Целью данного обзора является попытка обобщения значительного массива данных об этом соединении, особенно касающихся его анти-микробных и противораковых свойств.

Ключевые слова: вторичные метаболиты, пигменты, виолацеин, антимикробная активность, цитотоксичность, инсектициды, биотехнологическая значимость

DOI: 10.31857/S0555109922060071

Бактерии многих родов, в том числе наиболее изученные *Chromobacterium* [1–3], *Janthobacterium* [4–6], *Iodobacter*, *Collimonas* [7, 8], а также некоторые представители таких родов, как *Alteromonas* и *Pseudomonas* [9–11], способны синтезировать пигмент фиолетового цвета – виолацеин или [3-(1,2-дигидро-(5-гидрокси-1*H*-индол-3-ил)-2-оксо-3*H*-пиррол-3-илидена)-1,3-дигидро-2*H*-индол-2-он] (рис. 1), обладающий чрезвычайно широким спектром биологической активности [12–15].

Интерес исследователей к виолацеину и синтезирующим это соединение микроорганизмам неуклонно растет. Так, на запрос о виолацеине в базах даются ссылки на более чем 5.5 тыс. публикаций, на запрос “*C. violaceum*” – на более, чем 15 тыс. публикаций в период с 2012 по 2022 гг. [NCBI PubMed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed 20 Jan 2021].

Вместе с этим, работ в русскоязычных журналах остается относительно немного, в этой связи настоящий обзор посвящен общей характеристике данного соединения, путям его биосинтеза, некоторым свойствам и перспективам использования.

Биосинтез виолацеина. Биосинтез виолацеина осуществляется экспрессией *vio* оперона при участии считываемых в одном направлении пяти ге-

нов *vioA*, *vioB*, *vioC*, *vioD*, и *vioE*, обеспечивающих конденсацию двух молекул L-триптофана, являющегося универсальным метаболитом ряда вторичных метаболических путей у микроорганизмов [17], что приводит к образованию молекулы пигмента (рис. 1, табл. 1). Приоритет в открытии пути биосинтеза виолацеина принадлежит Пембертону с соавт. [16].

Биосинтез виолацеина начинается с образования аутоиндуктора N-гексаноил-L-гомосерин лактона (C₆-АГЛ), являющегося основным сигналом кворум сенсинга. С увеличением плотности клеточной популяции за счет каталитического превращения жирных кислот или S-аденозил-метионина с участием синтазы, находящейся под контролем гена *CviI*, образуется C₆-АГЛ и, формируя белок-лигандный комплекс с рецепторным белком *CviR*, изменяет его конфигурацию, что обуславливает возможность связываться с ДНК. Образовавшийся комплекс запускает кворум-зависимую транскрипцию целевых генов *vio ABEDC*-оперона, связываясь с его промоторным сайтом [19–21] (рис. 2).

Продукт гена, *VioA*, флавиновзависимая триптофан 2-монооксигеназа, катализирует окислительную трансформацию L-триптофана в индол-3-пи-

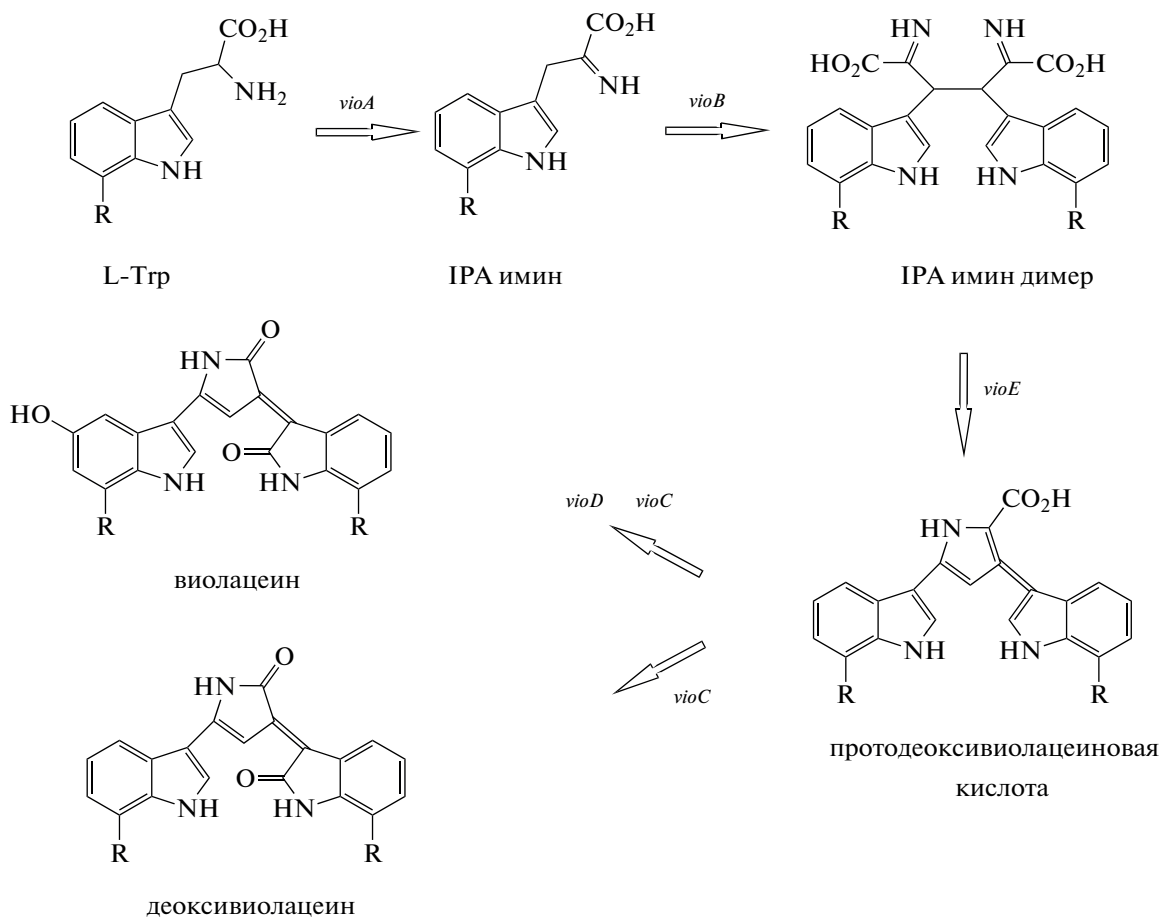


Рис. 1. Пути биосинтеза бактериального виолацеина.

руватимин (IPA) в процессе, сопряженном с восстановлением флавинадениндинуклеотида (FAD) [22, 23].

На следующем этапе две молекулы IPA с участием гемсодержащей синтазы, кодируемой *vioB*, превращаются в короткоживущий димер [24–26], который с участием фермента *VioE* превращается далее в протодеоксивиолацеиновую кислоту. Индольное кольцо протодеоксивиолацеиновой кислоты в пятой позиции гидроксيليруется с участием

монооксигеназы *VioD* с образованием провиолацеина. Окончательный этап биосинтеза заключается в образовании виолацеина из провиолацеина под контролем флавинзависимой монооксигеназы *VioC*. Детальные характеристики пути биосинтеза представлены в базе данных *MetaCyc*: <https://bio-cyc.org/META/NEW-IMAGE?object=PWY-7040>.

Виолацеин продуцируется широким кругом бактерий, населяющих практически все типы природных экосистем — от морских вод до сель-

Таблица 1. Гены *vio* оперона [18]

Ген	Обозначение	Функция	Молекулярная масса	Размер (п.о.)	Номер в PDB
<i>vioA</i>	CV_RS16140	Флавинзависимая триптофан 2-монооксигеназа	48	1257	5G3S
<i>vioB</i>	CV_RS16135	Синтаза димера иминофенил-пируват	111	2997	—
<i>vioC</i>	CV_RS16130	FAD-зависимая монооксигеназа	48	1290	2WBO
<i>vioD</i>	CV_RS16125	Флавин-зависимая монооксигеназа	42	1122	3C4A
<i>vioE</i>	CV_RS16120	Изомераза, отвечающая за конверсию флаванона в изофлаван	22	576	2ZF3

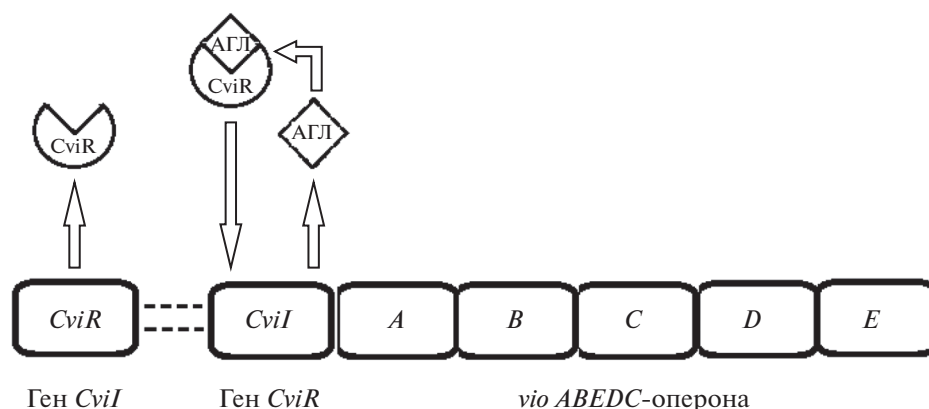


Рис. 2. Кворум-зависимый синтез виолацеина у *C. violaceum* [21].

скохозяйственных почв и ледников. В этой связи представляется достаточно затруднительно дать однозначное определение биологической роли виолацеина. Например, как и для ряда других пигментов бактерий, его роль может заключаться в защите клетки от ультрафиолетового излучения [27]. В то же время было показано, что *C. violaceum* синтезирует виолацеин в качестве агента конкурентной борьбы в межмикробных взаимодействиях. На такую же мысль наводит и тот факт, что продуценты виолацеина – в основном виды, ведущие прикрепленный образ жизни и являющиеся в силу этого легкой добычей для хищников [28].

В 2003 г. вышла публикация об осуществлении полногеномного секвенса *C. violaceum* [29]. Анализ генома привел авторов работы к выводу о том, что очень высокая степень адаптивности и универсальность, которые демонстрирует *C. violaceum*, обусловлены большим и сложным геномом бактерии, включающим значительную долю открытых рамок считывания (ORF), специфически связанных со способностью организма взаимодействовать и реагировать на окружающую среду. Сложность генома может иметь большое практическое значение в силу того, что бактерия является важным потенциальным источником биотехнологически пригодных генов, в частности биосинтеза виолацеина.

Биологические эффекты виолацеина. Антибактериальные свойства виолацеина, по-видимому, одна из первых особенностей, на которую обратили внимание исследователи [30–34]. Так, в работе Барич с соавт. [35] был показан антимикробный эффект экстракта культуральной жидкости выделенной в Антарктике бактерии *Janthinobacterium lividum* – ROICE173 по отношению к 200 бактериальным штаммам природного и клинического происхождения, обладающим множественной лекарственной устойчивостью. Экстракт показал бактерицидный эффект в отношении 40% штаммов, бактериостатический эффект в отношении 12%,

на 48% изучаемых штаммов виолацеина не оказывал эффекта. Примечательно, что был отмечен значительный эффект ингибирования по отношению к таким микроорганизмам, как стафилококки, энтерококки, энтеробактерии.

Антимикробные свойства виолацеина исчерпывающе освещены в обзоре [36]. В частности, одним из клинически значимых штаммов, который в последнее время привлекает наибольшее внимание, является *Staphylococcus aureus*, отчасти из-за его статуса патогена с множественной лекарственной устойчивостью. Несколькими исследовательскими коллективами [37–39] было установлено, что виолацеин способен подавлять рост *S. aureus* в концентрациях от 5.7 до 15 мг/л, или приблизительно от 17 до 43 мкмоль/л.

Видеолацеин является гидрофобным соединением, коэффициент липофильности которого составляет 3.34 [40], в связи с чем возникает вопрос о том, каким образом он может поступать в окружающую среду и оказывать воздействие на другие организмы. В определенной степени это может быть объяснено работами, описывающими транспортные системы для виолацеина. Достаточно подробно описан механизм доставки виолацеина для подавления жизнедеятельности бактерий – потенциальных конкурентов с использованием везикул наружной мембраны (ВНМ) в работе Батиста с соавт. [41]. Было установлено, что ВНМ бактерии *C. violaceum* являются транспортным средством доставки виолацеина на большие расстояния для уничтожения конкурентов. Высвобождение ВНМ *C. violaceum* является кворум-сенсинг (QS)-регулируемым процессом, необходимым для межбактериальной конкуренции с использованием доставки антимикробного соединения. При этом виолацеин индуцирует биогенез ВНМ для собственной доставки и способствует формированию биопленки. ВНМ без виолацеина безвредны для бактерий. Образование везикул обусловлено накоплением фосфолипидов во внешней мем-

бране и регулируется фосфолипидным транспортером VacJ/Yrb. При низкой плотности клеток скорость высвобождения ВНМ снижается из-за увеличенной экспрессии системы VacJ/Yrb. Напротив, отмечено, что экспрессия VacJ/Yrb снижается на ранних стадиях инфицирования хозяина, что стимулирует везикуляцию и, соответственно, адаптацию к условиям среды. Таким образом, двухкомпонентная система “кворум сенсинга” CviI/CviR активирует выработку виолацеина.

Являясь структурным компонентом биопленки, виолацеин-содержащие везикулы играют роль защиты популяции виолацеин-синтезирующих бактерий от простейших, которую обнаружили и описали Матз с соавт. [42]. Авторы показали, что виолацеин подавляет жизнедеятельность жгутиков, инфузорий и амёб. В экспериментах с нематодой *Caenorhabditis elegans* было обнаружено, что виолацеин нарушает функционирование сигнального пути IIS, включающего инсулиноподобный фактор роста, что опосредует апоптоз клеток [43]. В этой же работе было показано, что апоптоз у нематоды вызывался и присутствием в кишечнике хозяина *E. coli*, в которой были экспрессированы гены синтеза виолацеина. В заключение авторы, сопоставляя полученные ими результаты с данными других исследований по токсическому воздействию виолацеина на клетки млекопитающих и простейших, делают предположение о наличии общего молекулярного апоптозоподобного механизма клеточной смерти у отдаленно-родственных эукариотических систем как мишени для токсического воздействия виолацеина.

Некоторые молекулярные механизмы воздействия виолацеина на простейших представлены в работе [44], результаты которой показали, что виолацеин нарушает функции шаперонов у малярийного плазмодия *Plasmodium falciparum*, что приводит к нарушению структуры белков, протеосомальной деградации и нарушению развития паразита.

Негативный эффект виолацеин оказывает и на грибные культуры [45]. Являясь по своей химической структуре алкалоидом, виолацеин, как и многие другие алкалоиды, обладает очень широким спектром физиологической активности. Уже упоминалось об антибактериальной активности виолацеина, позволяющей виолацеин-синтезирующим бактериям выигрывать конкурентную борьбу. При этом было показано, что у многоклеточных организмов виолацеин может оказывать стимулирующее и регулирующее влияние на микробное сообщество ЖКТ. Пауэр с соавт. [46] при оценке влияния разных доз виолацеина, 50 и 500 мкг/мл, перорально вводимого крысам в течение месяца, выяснили, что маленькие дозы виолацеина были связаны с обнаружением большего таксономического разнообразия кишечной мик-

робиоты по сравнению с контрольной группой и высокими дозами виолацеина. В группе, обрабатываемой низкой дозой виолацеина, доминировали представители классов *Bacilli* и *Clostridia*, как полагают авторы, в результате снижения конкурентноспособности других групп бактерий, в том числе, протеобактерий.

В экспериментах с лабораторными мышами и крысами был продемонстрирован значительный иммуномодулирующий, противовоспалительный и обезболивающий эффекты виолацеина, полученного из штамма *Chromobacterium violaceum* [47]. Авторы предположили, что эффект обусловлен тем, что виолацеин в дозах 10, 20 и 40 мг/кг веса способен ингибировать синтез/высвобождение медиаторов воспаления.

Веринауд с соавт. [48] показали в экспериментах с мышами, у которых вызывали острый или хронический воспалительный процесс, что интраперитонеальное введение мышам 3.5 мг/кг веса виолацеина приводило к подавлению выработки цитокинов (при остром воспалении) и оказывало стимулирующий эффект в отношении регуляторных Т-клеток (при хроническом воспалении), что в значительной степени сглаживало картину воспалительного эффекта.

Располагая противоречивыми данными о влиянии виолацеина на экспрессию фактора некроза опухоли (TNF- α) (до этого было сообщение Альшатви с соавт. об индукции экспрессии фактора некроза опухоли в клеточной культуре рака молочной железы MCF-7 [49], в то время, как Феррейра с соавт. [50] не обнаружили индукции при исследовании клеток пораженной эндомитозной слизистой оболочки желудка крыс), Венегас с соавт. [51] выяснили, что виолацеин способен оказывать непосредственное влияние на клетки макрофаги. Прежде всего, авторы на примере клеточной линии макрофагов мыши Raw 264.7 показали, что виолацеин не влияет на динамику выделения оксида азота макрофагами. Далее они установили, что виолацеин непосредственно повышает уровень иммунного ответа, индуцируя экспрессию провоспалительных цитокинов в клетках Raw 264.7 и ANA-1 за счет активации сигнального пути TLR. Используя в работе линию клеток почек эмбриона человека HEK-293, авторы установили, что в концентрации 15 мкмоль/л виолацеин активирует тол-подобные рецепторы hTLR8, функция которых состоит в активации клеточного иммунного ответа за счет распознавания молекулярных структур патогенов и запуска сигнального каскада, ведущего к синтезу цитокинов и других ассоциированных с воспалением молекул. Была отмечена экспрессия генов, вовлеченных в воспалительный ответ и сигнальную систему, хемотаксис, а также изменение уровня экспрессии генов, связанных с регуляцией клеточной проли-

ферации. В работе получены доказательства того, что виолацеин может связываться с hTLR8 аналогично имидазохинолиновым соединениям. Имидазохинолиновые соединения с низкой молекулярной массой являются агонистами TLR8-рецепторов и демонстрируют противовирусные и противораковые свойства. В свете полученных доказательств становится очевидно, что виолацеин обладает потенциалом для использования в будущих стратегиях иммунной терапии. Рецептор TLR8 участвует в распознавании одноцепочечной РНК (ssRNA) и инициирует иммунный ответ, который может передаваться через два различных механизма с участием различных адаптерных белков, а именно MyD88 или TRIF.

Значительный объем информации накоплен относительно противораковой активности виолацеина. Ряд исследований показал, что виолацеин способен вызывать апоптоз в различных типах раковых клеток, включая линии клеток лейкемии. Авторы работы [52] использовали неопухолевые (CHO-K1 and MRC-5) и опухолевые (HeLa) клеточные линии для оценки влияния виолацеина как окислителя. Не установив взаимосвязи между появлением биомаркеров окислительного стресса в ответ на обработку клеток виолацеином (3 и 5 мкМ) и индукцией апоптоза, авторы тем не менее пришли к заключению о том, что виолацеин вызывает гиперполяризацию митохондриальных мембран, вызывая тем самым гибель клеток. Наибольший эффект наблюдался для линий MRC-5 и HeLa.

В работе [53] описаны молекулярные механизмы воздействия виолацеина на клетки меланомы: виолацеин вызывает значительное снижение экспрессии гистоновой ацетилазы 6, активатора пролиферации клеток меланомы. Кроме того, было обнаружено ингибирование виолацеином сигнальных путей (рецептор тирозинкиназы AXL и киназы АКТ), отвечающих за уход от апоптоза. Сверхэкспрессия AXL характерна для многих типов раковых опухолей. Эти молекулярные события обуславливают ингибирование аутофагии и, как следствие, гибели клеток меланомы в результате апоптоза.

Несмотря на значительные успехи в изучении механизмов антираковой активности виолацеина, многие аспекты остаются неизученными. Так, лишь в недавней работе [54] были установлены механизмы воздействия виолацеина на клетки гепатоцеллюлярной карциномы. В данном исследовании впервые показано, что виолацеин ингибирует пролиферацию линии клеток гепатокарциномы Huh7 и Hep3B. Антипролиферативный эффект виолацеина был связан с остановкой клеточного цикла на стадии интерфазы sub-G1 и индукцией апоптотической гибели клеток. Виолацеин менял потенциал митохондриальной мембраны

(MMP), увеличивал генерацию реактивных видов кислорода (ROS), активировал каспазный каскад и повышал уровень p53 и p21. Белок p21 является внутриклеточным ингибитором циклин-зависимой киназы. Динамика p21, в зависимости от внутриклеточной локализации белка, коррелирует с агрессивностью опухоли и ее способностью к метастазированию. Белок p53 индуцирует апоптоз – программируемую смерть клетки. Белок p53 находится в цитоплазме в латентном состоянии, активация его происходит не только в ответ на поражение ДНК, но также может явиться следствием многих других процессов, происходящих в клетке, в том числе активации онкогенов, гипоксии, дефицита питания, старения и др. При активации белок p53 способен инициировать независимо друг от друга 2 программы: 1 – временную остановку клеточного цикла в G1-фазе с помощью белка p21W AFI, ингибирующего циклин-зависимые киназы; 2 – стимуляцию апоптоза путем активации генов Bax или Bid – проапоптотических генов семейства Bcl-2 и/или активации образования свободных форм кислорода, способствующих выходу цитохрома из митохондрий. Виолацеин подавлял пролиферацию и образование опухолевых клеток гепатокарциномы Huh7, раковых стволовых клеток гепатомы Hep3B, снижал экспрессию ключевых маркеров стволовых клеток рака, включая CD133, Sox2, Oct4 и Nanog, путем ингибирования путей сигнала трансдуктора и активатора транскрипции-3 (STAT3)/АКТ/ЕРК.

Исследованиями также было показано, что виолацеин повышает уровень отрицательных регуляторов прогрессии клеточного цикла p53, p27 и p21 [55] и вызывает опосредованный реактивными видами кислорода апоптоз на примере клеток рака толстой кишки [56]. Отталкиваясь от полученных Мело [57] результатов, показавших, что клетки линии HL60 промиелоцитарной лейкемии реагируют на виолацеин как повышенной гибелью клеток, так и снижением клеточной пролиферации, Феррейра с соавт. [50] раскрыли механизм этого действия, показав, что виолацеин активирует сигнал фактора некроза опухоли (TNF). Поскольку данный эффект оказался специфичен для этих клеток (авторы не обнаружили аналогичного эффекта в клетках линий U937 или K562), был сделан вывод о том, что виолацеин является представителем нового класса цитотоксических препаратов, которые опосредуют апоптоз путем специфической активации сигнальной трансдукции рецептора TNF 1. В клетках HL60 воздействие виолацеина привело к фосфорилированию p38 MAP-киназы, повышению регуляции пути NF-κB и активации каспазы.

MAP-киназа p38 играет основную роль во множестве сигнальных путей, которые вовлечены в инициацию и поддержание хронического длительного воспаления при заболеваниях человека. MAP-киназу p38 активирует ряд провоспалитель-

ных цитокинов. Эта активация приводит к накоплению и высвобождению дополнительных провоспалительных цитокинов. Окислительный стресс является наиболее сильным специфическим стрессом, активирующим p38 MAPK. Аномальная активность (выше или ниже физиологической) p38 вызывает патологические стрессы в некоторых тканях, включая нейроны, кости, легкие, сердечные и скелетные мышцы, эритроциты и ткани плода. Белковый продукт протоонкогена RAS может увеличивать активность p38 и тем самым вызывать чрезмерно высокую активность фактора транскрипции NF-κB. Этот фактор транскрипции обычно регулируется внутриклеточными путями, которые интегрируют сигналы от окружающей ткани и иммунной системы. В свою очередь, эти сигналы координируют выживаемость и гибель клеток. Нарушение регуляции активности NF-κB может активировать гены, которые вызывают выживание раковых клеток, а также могут активировать гены, которые способствуют метастазированию раковых клеток в другие ткани. Таким образом, считается, что ингибиторы, направленные против MAPK p38α/β, являются эффективными в отношении снижения различных параметров воспаления в клетках и тканях.

Высокий потенциал виолацеина как антиракового агента показали исследования Мехта с соавт. [58], с использованием раковых клеточных линий U87 (глиобластома), A549 (легочная ткань) and MCF7 (молочная железа). Обработка клеток U87, A549 и MCF7 виолацеином в концентрации 1 мкМ привела к снижению клеточной пролиферации всех трех клеточных линий в течение 5 дней. В этих же клеточных линиях был проанализирован уровень экспрессии нескольких внутриклеточных сигнальных белков при воздействии виолацеином в различных концентрациях. В клеточных линиях U87, A549 и MCF7, подвергшихся воздействию виолацеина, были исследованы белки выживания и про-апоптотические белки Akt и PARP. В результате обнаружилось существенное повышение уровня расщепленного PARP в клетках опухоли мозга U87, обработанных виолацеином в концентрации 500 нМ, а также в клетках рака легких A549, обработанных 1 мкМ виолацеином. Эта же доза виолацеина достоверно повышала уровень p-44/42 MAPK в клетках линии U87, но при этом не было отмечено изменений в экспрессии про-апоптотического белка Akt. Также виолацеин не менял уровень экспрессии рибосомального белка pS6. Указанные наблюдения позволили авторам заключить, что виолацеин не оказывает влияния на сигнальную сеть трансляционного контролера, но ингибирует миграцию клеток опухоли мозга, вероятно, в результате разрушения субклеточных доменных структур актиновой filamentной сети, включая ламеллиподии и филоподии, что приводит к изменению фенотипа клеток,

нарушающему их подвижность. То, что виолацеин реализует различные механизмы воздействия на клетки, подтверждается и данными Квайроса с соавт. [59], обнаружившими, что виолацеин показал селективную цитотоксичность для клеточных линий HL60 и TF1, но пути, приводящие к клеточной гибели, оказались разными для этих двух линий.

Как было упомянуто ранее [50], в клетках HL60 воздействие виолацеина привело к фосфорилированию p38 MAP-киназы, повышению регуляции пути NF-κB и активации каспазы. В клетках же TF1, по-видимому, канонический апоптотический путь не реализуется [59]. В данном случае гибель лейкозных клеток не была опосредована апоптозом и/или аутофагией, поскольку динамика биомаркеров обоих типов клеточной смерти не менялась под воздействием виолацеина. Методом профилирования кинома с использованием пептидных массивов авторы получили картину клеточной киназной активности, согласно которой про-апоптотическая активность виолацеина фактически осуществляется путем ингибирования кальпаина и DAPK1 и активации PKA, AKT и PDK, за которыми следуют структурные изменения, вызванные стрессом эндоплазматического ретикулума и разрушением аппарата Гольджи, что приводит к гибели клетки. Результаты этого исследования убедительно свидетельствуют о том, что виолацеин вызывает перепрограммирование кинома, преодолевая дисфункции сигналов смерти в устойчивых к внутреннему воздействию клетках лейкемии человека. Виолацеин оказался способен обойти естественную резистентность клеток TF1, за счет активации киназ, способствующих стрессу ретикулума [59]. Противораковая активность виолацеина и близкого к нему по свойствам продигозина достаточно полно описана в обзоре [36].

Несмотря на огромное внимание исследователей всего мира к виолацеину, однозначные выводы о механизмах его действия на данный момент отсутствуют. Однако тот факт, что виолацеин оказывает цитотоксическое действие на широкое разнообразие организмов и клеток, указывает на вероятное существование общей мишени или пути. Изучение влияния виолацеина и подобных ему соединений (бисиндолов) на генетическом уровне на модельных эукариотических организмах, таких как *C. elegans*, поможет в выяснении механизма его действия и позволит оценить его перспективность и потенциал в качестве клинического терапевтического средства.

Получение виолацеина. В связи с возможностью и перспективностью применения виолацеина как антиканцерогенного агента, значительный интерес представляет вопрос микробного синтеза виолацеина в масштабах, достаточных для его коммерческого использования. Это касается как

подбора штаммов-продуцентов, так и, что не менее важно, условий культивирования.

Уже в достаточно ранних сообщениях подчеркивалась необходимость оптимизации состава культуральной среды и условий культивирования для оптимального выхода виолацеина. Мендес с соавт. [60] использовали так называемую методологию поверхности отклика с целью установления оптимальных параметров культивирования штамма *C. violaceum*. Оказалось, что триптон и дрожжевой экстракт в культуральной среде положительно коррелируют с выходом биомассы и содержанием виолацеина, в то же время использование глюкозы приводит к отрицательной корреляции.

Также изучалось влияние на продуктивность культур таких параметров, как температура, освещение, величина рН, наличие витаминов. В частности, показано, что для *C. violaceum* штамма ВВ-78 критичным для биосинтеза фактором явилось наличие в среде культивирования метионина [61].

Используя методы многофакторного эксперимента, авторы [62] определили оптимальное содержание в культуральной среде основных компонентов — мясного бульона, триптофана, нитрата калия, величины рН, объёма среды и инокулята. В результате им удалось получить выход 1.62 г/л сырого виолацеина, что значительно превысило известные до этого показатели.

Вместе с этим, при выборе продуцента необходимо учитывать тот факт, что значительная часть известных природных продуцентов виолацеина — патогенны для человека. Так, к II классу патогенности отнесены *C. violaceum* [63, 64] и *Janthinobacterium lividum* [65]. В этой связи внимание исследователей было направлено как на отбор природных непатогенных штаммов-продуцентов, так и, что более перспективно, на возможность создания безопасных генноинженерных конструкций для производства виолацеина. Так, в работе [66] детально описана процедура культивирования дрожжей *Yarrowia lipolytica*, несущей плазмиду *rYaliA1-vioDCBAE*, оптимизация процесса биосинтеза, выделение и очистка виолацеина. Клонирование генов синтеза виолацеина в дрожжах открыло перспективу эффективного масштабирования лабораторного процесса наработки этого соединения. Тонг с соавт. [67] использовали метод сборки Golden Gate для создания библиотеки штаммов, продуцирующих виолацеин в дрожжах *Yarrowia lipolytica*, где каждый ген в пути синтеза виолацеина контролировался тремя различными промоторами с различной силой транскрипции. Результаты показали, что сильная экспрессия генов, кодирующих *VioB*, *VioC* и *VioD*, способствовала наработке виолацеина с минимальным побочным продуктом дезоксивиолацеином. Оптимизации состава среды и условий культивирования позволила достичь выхода виолацеина 70.04 мг/л. Разработанные про-

токолы клонирования позволяют, по мнению авторов, получить доступ в том числе и к промежуточным продуктам пути биосинтеза виолацеина и использованию *Y. lipolytica* в качестве промышленно значимого продуцента для биосинтеза.

Фанг с соавт. [68] реконструировали метаболический путь биосинтеза виолацеина непосредственно из глюкозы в *E. coli*. Генный кластер пути синтеза виолацеина они скомбинировали с модифицированным триптофановым путем и получили в результате высокий уровень выхода готового продукта. В 5-литровом биореакторе при периодическом культивировании с глюкозой в качестве источника углерода использование рекомбинантной *E. coli* В2/рED + рVio позволило получать сырой виолацеин с выходом 1.75 г л⁻¹ и производительностью 36 мг л⁻¹ ч⁻¹.

Создание генноинженерных конструкций с использованием различных подходов для микробного синтеза вторичных метаболитов, биологически активных соединений привлекает все большее внимание исследователей. Произошедшие за последнее десятилетие прорывы в области геномики и развитие системной биологии дали возможность развитию методик модифицирования так называемого микробного шасси — рабочей платформы микроорганизма-продуцента, на основе которой будут создаваться новые микробные метаболические пути как с целью фундаментальных исследований, так и практического использования — для развития биотехнологических, фармацевтических, биомедицинских и др. направлений [69]. Вей Лиу с соавт. [70] экспрессировали гетерологичный путь синтеза β-каротина и виолацеина. Обычно гетерологичный метаболический путь конструируют путем генной инженерии шасси и оптимизации экзогенного пути. Зачастую это метод проб и ошибок. Авторы использовали комбинаторный метод на основе рекомбиназы (названный “SCRaMbLE-in”) для одновременного решения обеих задач. Метод включает набор рекомбиназ *in vitro* для быстрого создания прототипов и диверсификации экспрессии генов на уровне путей и систему перестановки генома *in vivo* для интеграции собранных путей в синтетический геном дрожжей, при этом комбинаторно вызывая массивные геномные перестройки в шасси хозяина. В результате были успешно собраны, диверсифицированы и интегрированы пути биосинтеза β-каротина и виолацеина в дрожжевом продуценте. Авторы позиционируют этот метод как быстрый, эффективный и универсальный для ускорения цикла манипуляций в инженерной биологии.

Часто низкий выход продукта, а также относительно ограниченный спектр природных соединений обусловлен, в том числе, их сложной химической структурой и, соответственно, непростой

генетической организацией путей биосинтеза. Авторы работы [71], апеллируя к успешно используемым генетическим манипуляциям [72–74], полагают, что интеграция синтетической биологии с синтетической химией позволяет получить доступ к гораздо более разнообразному спектру не имеющих прямых аналогов в природе активных соединений, и это должно ускорить открытие новых терапевтических средств. Так, учитывая тот факт, что фермент VioA обладает достаточно широкой субстратной специфичностью по отношению к аналогам триптофана, авторы, используя неочищенный клеточный экстракт и галогенированные производные триптофана, получили в конечном итоге 26 новых аналогов виолацеина или дезоксивиолацеина, обладающих высокой биологической активностью.

Применение последних технологических достижений в области написания и редактирования генома, имитирующих процесс естественной эволюции на геномном уровне, методологии структурных перестроек, перспективность таких подходов отражены в ряде интересных работ [36, 75, 76].

В данном обзоре представлены некоторые направления исследований в области изучения продуцируемого бактериями бисиндола виолацеина. Уникальные характеристики виолацеина привлекли к нему внимание многих исследовательских групп. Перспективность этого соединения для использования в области медицины, ветеринарии, сельского хозяйства является несомненной.

Широкий спектр биологической активности, включая антимикробные, противовоспалительные, иммуностимулирующие, противораковые и другие свойства, ожидаемо делает виолацеин и его производные объектом клинических исследований. Имеющиеся пока сложности, связанные с производством виолацеина, такие как низкая продуктивность штаммов, высокая стоимость продукта должны быть преодолены с развитием синтетической биологии и химии, которые уже позволяют разрабатывать эффективные протоколы и новые штаммы-продуценты, что приведет в итоге к возможности получения биологически активных соединений, включая виолацеин, в количествах, необходимых для глубокого изучения и практического применения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hoshino T.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 91. № 6. P. 1463–1475.
2. *Moss M.O., Ryall C., Logan N.A.* // *J. General Microbiol.* 1978. V. 105. № 1. P. 11–21.
3. *Duran N.D., Menck C.F.M.* // *Crit. Rev. Microbiol.* 2001. V. 27. № 3. P. 201–222.

4. *Jude B.A., Tanner J., Koko T., McLaughlin E.C.* // *Abstr. Papers Am. Chem. Soc.* 2012. V. 244. 1155.
5. *Lu Y., Wang L., Xue Y., Chong Z.* // *Biochem. Engin. J.* 2009. V. 43. № 2. P. 135–141.
6. *Pantanella F., Berlutti F., Passariello C., Sarli S., Morea C., Schippa S.* // *J. Appl. Microbiol.* 2007. V. 102. № 4. P. 992–999.
7. *Hakvag S., Fjærvik E., Klinkenberg G., Borgos S.E.F., Josefsen K.D., Ellingsen T.E., Zotchev S.B.* // *Marine Drugs.* 2009. V. 7. № 4. P. 576–588.
8. *Wang H.S., Jiang P.X., Lu Y., Ruan Z., Jiang R., Xing X.-H., Lou K., Wei D.* // *Biochem. Engin. J.* 2009. V. 44. № 2–3. P. 119–124.
9. *Yang L.H., Xiong H., Lee O.O., Qi S.-H., Qian P.-Y.* // *Lett. Appl. Microbiol.* 2007. V. 44. № 6. P. 625–630.
10. *Zhang X., Enomoto K.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 90. № 6. P. 1963–1971.
11. *Mccarthy S.A., Johnson R.M., Kakimoto D., Sakata T.* // *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 1985. V. 51. № 7. P. 1115–1121.
12. *De Carvalho J.C., Cardoso L.C., Ghiggi V., Woiciechowski A.L., de Souza Vandenberghe L.P., Soccol C.R.* // *Microbial Pigments. In: Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals.* / Eds. S.K. Brar, G.S. Dillon, C.R. Soccol. N.Y.: Springer, 2014. P. 73–97. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8005-1_4
13. *Adzzie-Shazleen A., Mawang Ch-I., Sazaly A.* // *Natur. Product Comm.* 2018. V. 13. № 12. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801301240>
14. *Choi S.Y., Yoon K-hye., Lee J., Mitchell R.J.* // *BioMed Res. Intern.* 2015. V. 2015. P. 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/465056>
15. *August P.R., Grossman T.H., Minor C., Draper M.P., MacNeil I.A., Pemberton J.M. et al.* // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2000. V. 2. № 4. P. 513–519.
16. *Pemberton J.M., Vincent K.M., Penfold R.J.* // *Curr. Microbiol.* 1991. V. 22. P. 355–358. <https://doi.org/10.1007/BF02092154>
17. *Ryan K.S., Drennan C.L.* // *Chem. Biol.* 2009. V. 16. № 4. P. 351–364. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.01.017>
18. *Kothari V., Sharma S., Padia D.* // *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2017. V. 10. № 8. P. 744–752. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.022>
19. *Stauff D.L., Bassler B.L.* // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 3871–3878.
20. *Devescovi G., Kojic M., Covaceuszach S., Miguel C., Williams P., Bertani I., Subramoni S., Venturi V.* // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 349. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00349>
21. *Инчагова К.С.* // “Симбиоз-Россия 2020”. Сборник статей XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием. Пермь: Пермский государственный национальный исследовательский университет, 2020. С. 106–108.
22. *Füller J.J., Röpke R., Krausz J., Rennhack K.E., Nils P.D., Blankenfeldt W., Schulz S., Jahn D., Moser J.* // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. № 38. P. 20068–20084. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.741561>

23. *Shinoda K., Hasegawa T., Sato H., Shinozaki M., Kuramoto H., Takamiya Y., Sato T., Nikaidou N., Watanabe T., Hoshino T.* // Chem. Commun. (Camb). 2007. V. 28. № 40. P. 4140–4142.
<https://doi.org/10.1039/b705358d>
24. *Balibar C.J., Walsh C.T.* // Biochemistry. 2006. V. 45. P. 15444–15457.
25. *Kameya M., Onaka H., Asano Y.* // Anal. Biochem. 2013. V. 438. P. 124–132.
26. *Sanchez C., Brana A.F., Mendez C., Salas J.A.* // Chem-BioChem. 2006. V. 7. № 8. P. 1231–1240.
<https://doi.org/10.1002/cbic.200600029>
27. *Antônio R.V., Creczynski-Pasa T.B.* // Genet. Mol. Res. 2004. V. 3. № 1. P. 85–91.
28. *Matz C., Webb J.S., Schupp P.J., Phang S.Y., Penesyan A., Egan S., Steinberg P., Kjelleberg S.* // PLoS One. 2008. V. 3. № 7. P. 2744–2751. doi.org/10.1371
29. *Brazilian National Genome Project Consortium / Ed. R. Haselkorn* // PNAS. 2003. V.100. № 20. P. 11660–11665.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1832124100>
30. *Nakamura Y., Sawada T., Morita Y., Tamiya E.* // Biochem. Engin. J. 2002. V. 12. № 1. P. 79–86.
[https://doi.org/10.1016/s1369-703x\(02\)00079-7](https://doi.org/10.1016/s1369-703x(02)00079-7)
31. *Duran N., Menck C.F.M.* // Crit. Rev. Microbiol. 2001. V. 27. № 3. P. 201–222.
<https://doi.org/10.1080/20014091096747>
32. *Duran N., Erazo S., Campos V.* // Anais da Academia Brasileira de Ciências. Rio De Janeiro. 1983. P. 231–234.
33. *Nakamura Y., Asada C., Sawada T.* // Biotechnol. Bioproc. Eng. 2003. V. 8. № 1. P. 37–40.
<https://doi.org/10.1007/BF02932896>
34. *Pauer H., Hardoim C.C.P., Teixeira F.L., Miranda K.R., Barbirato D.D.S., Carvalho D.P.D.L. et al.* // PLoS ONE. 2018. V. 13. № 9. P. 203748. doi.org/10.1371
35. *Baricz A., Teban A., Chiriac C.M., Szekeres E., Farkas A., Nica M. et al.* // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 15272–15283.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33691-6>
36. *Choi S.Y., Lim S., Yoon Kh., Lee J.I., Mitchell R.J.* // J. Biol. Eng. 2021. V. 15. № 10.
<https://doi.org/10.1186/s13036-021-00262-9>
37. *Nakamura Y., Sawada T., Morita Y., Tamiya E.* // Biochem. Engin. J. 2002. V. 12. № 1. P. 79–86.
[https://doi.org/10.1016/s1369-703x\(02\)00079-7](https://doi.org/10.1016/s1369-703x(02)00079-7)
38. *Cazoto L., Martins D., Ribeiro M. Garcia M., Nelson D., Gerson N.* // J. Antibiot. 2011. V. 64. № 5. P. 395–397.
<https://doi.org/10.1038/ja.2011.13>
39. *Subramaniam S., Ravi V., Sivasubramanian A.* // Pharm. Biol. 2014. V. 52. № 1. P. 86–90.
40. *Choi S.Y., Lim S., Cho G., Kwon J., Mun W., Im H., Mitchell R.J.* // Environ. Microbiol. 2020. V. 22. № 2. P. 705–713.
41. *Batista J.H., Leal F.C., Fukuda T.T.H., Diniz J.A., Almeida F., Pupo M.T., da Silva J.F.N.* // Environm. Microbiol. 2020. V. 22. № 6. P. 1462–15033.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15033>
42. *Matz C., Webb J.S., Schupp P.J., Phang S.Y., Penesyan A., Egan S. et al.* // PLoS ONE. 2008. V. 3. № 7. e2744.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002744>
43. *Ballestrero F., Daim M., Penesyan A., Nappi J., Schleheck D., Bazzicalupo P. et al.* // PLoS ONE. 2014. V. 9. № 10. e109201.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109201>
44. *Tavella T.A., da Silva N.M., Spillman N., Kayano A.C.A.V., Cassiano G.C., Vasconcelos A.A. et al.* // ACS Infectious Diseases. 2021. V. 7. № 4. P. 759–776.
<https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.0c00454>
45. *Durán M., Ponezi A.N., Faljoni-Alario A., Teixeira M.F.S., Justo G.Z., Durán N.* // Med. Chem. Res. 2012. V. 21. P. 1524–1532.
<https://doi.org/10.1007/s00044-011-9654-9>
46. *Pauer H., Hardoim C.C.P., Teixeira F.L., Miranda K.R., Barbirato D.D.S., Carvalho D.P.D. et al.* // PLoS ONE. 2018. V. 13. № 9. e0203748.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203748>
47. *Antonisamy P., Ignacimuthu S.* // Phytomedicine. 2010. V. 17. P. 300–304.
48. *Verinaud L., Lopes S.C.P., Prado I.C.N., Zanucoli F., Alves da Costa T., Di Gangi R. et al.* // PLoS ONE. 2015. V. 10. № 5. e0125409.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125409>
49. *Alshatwi A.A., Subash-Babu P., Antonisamy P.* // Exp. Toxicol. Pathol. 2016. V. 68. 89–97.
<https://doi.org/10.1016/j.etp.2015.10.002>
50. *Ferreira C.V., Bos C.L., Versteeg H.H., Justo G.Z., Durán N., Peppelenbosch M.P.* // Blood. 2004. V.104. № 5. P. 1459–1464.
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0594>
51. *Venegas F. A., Köllisch G., Kerstin M., Wibke D., Kaufmann A., Bauer S.* // Scientific Reports. 2019. V. 9. № 1. P. 13661–13678.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-50038-x>
52. *Leal A.M.D.S., de Queiroz J.D.F., de Medeiros S.R.B., Lima T.K.D.S., Agnez-lima L.F.* // BMC Microbiology. 2015. V. 15. P. 115–122.
<https://doi.org/10.1186/s12866-015-0452-2>
53. *Goncalves P.R., Rocha-Brito K.J.P., Fernandes M.R.N., Abrantes J.L., Duran N., Ferreira-Halder C.V.* // Tumor Biol. 2016. V. 37. № 10. P. 14049–14058.
<https://doi.org/10.1007/s13277-016-5265-x>
54. *Kim Y.J., Yuk N., Shin H.J., Jung H.J.* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 10731–10745.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910731>
55. *Kodach L.L., Bos C.L., Durán N., Peppelenbosch M.P., Ferreira C.V., Hardwick J.C.* // Carcinogenesis. 2006. V. 27. № 3. P. 508–516.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgi307>
56. *de Carvalho D.D., Costa F.T., Duran N., Haun M.* // Toxicol In Vitro. 2006. V. 20. № 8. P. 1514–1521.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.06.007>
57. *Melo P.S., Justo G.Z., De Azevedo M.B.M., Dura'n N., Haun M.* // Toxicology. 2003. V. 186. № 3. P. 217–225.
[https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00751-5](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00751-5)
58. *Mehta T., Vercruyse K., Johnson T., Ejiiofor A., Myles E., Quincy Q.* // Mol. Med. Reports. 2015. V. 12. P. 1443–1448.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3525>
59. *Queiroz K.C.S., Milani R., Ruela-de-Sousa R.R., Fuhler G.M., Justo G.Z., Zambuzzi W.F. et al.* // PLoS ONE. 2012. V. 7. № 10. e45362.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045362>

60. Mendes A.S., de Carvalho J.E., Duarte M.C.T., Duran N., Bruns R.E. // *Biotechnol. Lett.* 2001. V. 23. № 23. P. 1963–1969.
<https://doi.org/10.1023/A:1013734315525>
61. Riveros R., Haun M., Duran N. // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1989. V. 22. № 5. P. 569–577.
62. Wang H.S., Jiang P. X., Lu Y., Ruan Z., Jiang R., Xing Xin-H. et al. // *Biochem. Engin. J.* 2009. V. 44. № 2–3. P. 119–124.
63. Aruldass C.A., Masalamany S.R.L., Venil C.K., Ahmad W.A. // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2018. V. 25. № 6. P. 5164–5180.
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-8855-2>
64. Martyanov S.V., Letarov A.V., Ivanov P.A., Plakunov V.K. // *Microbiology.* 2018. V. 87. № 3. P. 437–440.
65. Baricz A., Teban A., Chiriac C.M., Szekeres E., Farkas A., Nica M. et al. // *Sci Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 15272–15284.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33691-6>
66. Tong Y., Zhou J., Zhang L., Xu P. // *bioRxiv.* 2019.
<https://doi.org/10.1101/687012>
67. Tong Y., Zhou J., Zhang L., Xu P. // *ACS Synth. Biol.* 2021. V. 10. P. 115–124.
68. Fang M.-Y., Zhang C., Yang S., Cui J.-Yu., Jiang P.-Xia., Lou K., Wachi Masaaki., Xing X.-H. // *Microb. Cell Fact.* 2015. V. 14. № 1. P. 8–20.
<https://doi.org/10.1186/s12934-015-0192-x>
69. Chi H., Wang X., Shao Y., Qin Y., Deng Z., Wang L., Chen S. // *Synth. Sys. Biotechnol.* 2019. V. 4. P. 25–33.
<https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.12.001>
70. Liu W., Luo Z., Wang Y., Pham N.T., Tuck L., Pi I.P. et al. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 1936.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04254-0>
71. Lai H.-En., Obled. A.M.C., Chee1 S.M., Morgan R.M., Lynch R., Sharma S.V. et al. // *ACS Chem. Biol.* 2021. V. 16. № 11. P. 2116–2123.
<https://doi.org/10.1101/202523>
72. Jones J.A., Vernacchio V.R., Lachance D.M., Lebovich M., Fu L., Shirke A.N., et al. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 11301.
<https://doi.org/10.1038/srep11301>
73. Jeschek M., Gerngross D., Panke S. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11163.
<https://doi.org/10.1038/ncomms11163>
74. Zalatan J.G., Lee M.E., Almeida R., Gilbert L.A., Whitehead E.H., La Russa M. et al. // *Cell.* 2015. V. 160. № 1–2. P. 339–350.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.052>
75. Zhou S., Wu Y., Xie Ze-X., Jia Bin., Yuan Y.-J. // *Chem. Soc. Rev.* 2021.
<https://doi.org/10.1039/d1cs00722j>
76. Wu X., Kazakov A.E., Gushgari-Doyle S., Yu X., Trotter V., Stuart R.K., Chakraborty R. // *Microbiol. Spectr.* 2021. V. 9. № 3. e01414-21.
<https://doi.org/10.1128/Spectrum.01414-21>

Bacterial Violacein: Properties, Biosynthesis and Application Prospects

N. S. Lyakhovchenko^a, V. M. Travkin^a, V. Yu. Senchenkov^a, and I. P. Solyanikova^a, *

^aBelgorod State National Research University, Belgorod, 308015 Russia

*e-mail: solyanikova@bsu.edu.ru

The review discusses the properties of violacein, a chromogenic secondary metabolite of bacteria with a wide range of biological activity, as well as the issues of its microbial synthesis and prospects for application. Violacein-synthesizing bacteria have been isolated from various sources, including the rhizosphere of cultivated plants, soils, marshes, sea coasts, ponds, and glacier melt waters. The study of the antibacterial, antimycotic, insecticidal and antitumor properties of violacein puts it in a number of extremely promising biologically active compounds and causes a steadily increasing interest both in the compound itself and in the group of bacteria that produce it, in terms of the development of new drugs and veterinary drugs, as well as plant protection products. The purpose of this review is to attempt to summarize the considerable amount of data on this compound, especially regarding its antimicrobial and anticancer properties.

Keywords: secondary metabolites, pigments, violacein, antimicrobial activity, cytotoxicity, insecticides, biotechnological significance

УДК 579.6

ПОЛИМЕРНЫЕ МИЦЕЛЛЫ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ (ОБЗОР)

© 2022 г. О. И. Гулий¹ *, С. А. Староверов^{1, 2}, А. С. Фомин¹, Е. Г. Жничкова², С. В. Козлов², Л. Г. Ловцова², Л. А. Дыкман¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН” (ИБФРМ РАН), Саратов, 410049 Россия

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

*e-mail: guliy_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 24.03.2022 г.

После доработки 03.06.2022 г.

Принята к публикации 04.07.2022 г.

Для повышения эффективности взаимодействия лекарственного средства и мишени все большую актуальность приобретает метод направленного транспорта лекарств, позволяющий увеличить его концентрацию в определенном месте и заблокировать или сильно ограничить их накопление в здоровых органах и тканях. Нанопрепараты на основе мицелл можно рассматривать как систему с уникальными характеристиками по сравнению с другими наноносителями, поскольку меньший размер обеспечивает возможность пассивного нацеливания на органы мишени (даже плохо проникаемые) и эффективную интернализацию клетками. Полимерные мицеллы находят все более широкое применение для создания систем доставки лекарств. В работе представлен краткий обзор по применению полимерных мицелл-носителей в системах доставки лекарственных средств, основных принципах их приготовления, характеристики, фармакокинетики мицеллярных препаратов и возможности их практического применения.

Ключевые слова: полимерные мицеллы, система доставки лекарств, поверхностно-активные вещества, амфифильность, солюбилизация, фармакокинетика

DOI: 10.31857/S0555109922060058

Биологическое действие лекарства зависит от его фармакологических свойств, которые обусловлены взаимодействием между лекарством и рецепторами в месте действия медикамента. Для повышения эффективности взаимодействия лекарства и мишени в медицине и фармакологии все большую актуальность приобретает использование методов направленного транспорта лекарственных средств (ЛС), обеспечивающих их адресную доставку в целевые органы, ткани и клетки, в частности, за счет модификации поверхности носителя различными векторами. Направленный транспорт позволяет увеличить концентрацию доставляемых средств в определенном месте и заблокировать или сильно ограничить их накопление в здоровых органах и тканях. По существу, полимерные транспортные средства позволяют доставить лекарства в течение короткого временного промежутка к локальному участку действия. Такие транспортные средства разработаны для того, чтобы увеличить не только безопасность и эффективность препарата, но и улучшить его совместимость с организмом пациента. Важным является достижение желаемого терапевтического воздей-

ствия при минимальных побочных эффектах. Направленный транспорт позволяет не только повысить продолжительность и эффективность действия лекарства, но и значительно снизить его побочные эффекты [1–5]. Основные преимущества системы адресной доставки ЛС представлены на рис. 1 [6]. Современное состояние получения и использования разнообразных средств направленного транспорта представлено в обзорах [7–11].

Системы доставки лекарств на основе микро- и наночастиц подразделяются на следующие классы:

- микросферы, представляющие собой частицы размером 1–100 мкм;
- наночастицы, представляющие собой коллоидные частицы с размером от 10 до 1000 нм;
- стеклоподобные сахарные матрицы;
- липосомы;
- клеточные частицы, такие как эритроциты, лейкоциты и тромбоциты [12].

Полимерные наночастицы являются идеальными кандидатами для доставки ЛС, поскольку они биоразлагаемы, растворимы в воде, биосов-

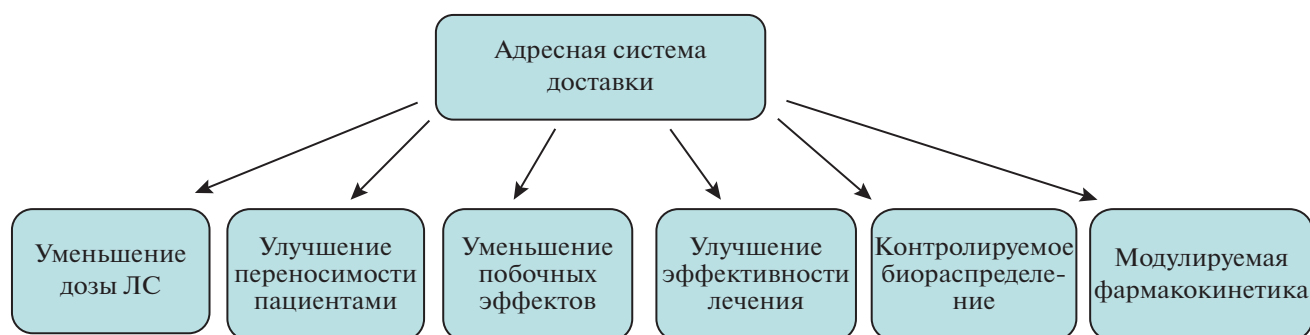


Рис. 1. Основные преимущества адресной системы доставки ЛС.

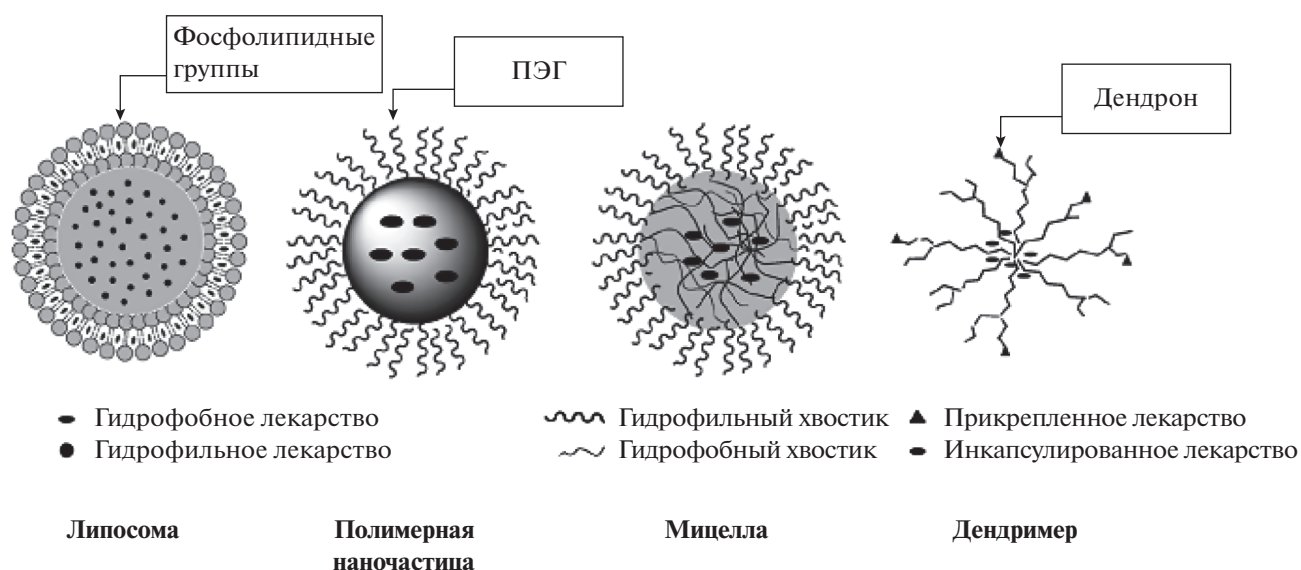


Рис. 2. Общая конструкция наночастиц для доставки ЛС в форме липосомы, полимерных наночастиц, мицелл и дендримеров [19].

местимы и стабильны при хранении [13]. Поверхности полимерных наночастиц можно легко модифицировать для дополнительного нацеливания и доставки не только ЛС, но и белков и генетического материала к целевым органам и тканям [14]. Благодаря указанным качествам полимерные наночастицы являются перспективными для применения в онкологической медицине, генной терапии и диагностике [15, 16]. К недостаткам полимерных наночастиц можно отнести повышенный риск агрегации частиц и проявление токсичности [17].

Наиболее распространенными формами полимерных наночастиц являются нанокапсулы (полости, окруженные полимерной мембраной или оболочкой) и наносферы (системы твердых матриц) [18]. Наночастицы для доставки ЛС подразделяются на такие формы, как липосомы, полимерные наночастицы, мицеллы и дендримеры, общая конструкция которых представлена на рис. 2 [19].

Среди наночастиц, применяемых для транспортной системы доставки, определенные преимущества имеют полимерные мицеллы, поскольку в их состав входят амфифильные полимеры, которые самоорганизуются в водной среде. Эти амфифильные полимеры построены с использованием различных полимерных блоков. Таким образом, полимерные мицеллы представляют собой наноразмерные структуры ядро/оболочка, образованные амфифильными блок-сополимерами. Блоки могут быть адаптированы в зависимости от требований оптимального гидрофобного/липофильного баланса, размера, способности загружать лекарство, способности мицеллообразования и стабильности в большом круге кровообращения. Наноразмер мицелл позволяет более эффективно выходить через сосудистую сеть по сравнению с другими системами доставки лекарств. Гидрофильное полимерное покрытие позволяет оставаться нераспознанными ретикулоэндотелиальной системой [20].

Нанопрепараты на основе мицелл можно рассматривать как систему с уникальными характеристиками по сравнению с другими наноносителями, обладающую меньшими размерами, обеспечивающую пассивное нацеливание на органы мишени (даже плохо проницаемые) [21] и более эффективную интернализацию клетками [22], хорошие солюбилизирующие свойства гидрофобных соединений, ассимилированных в липофильном ядре, и увеличенное время циркуляции в крови, обеспечиваемое гидрофильной короной [23, 24].

Целью настоящей работы является демонстрация основных этапов приготовления полимерных мицелл, характеристики и возможности их применения в качестве носителя при адресной доставке ЛС.

Адресная доставка лекарственного препарата. Адресная доставка ЛС приводит к преимущественным накоплениям препарата в целевой зоне, которая не зависит от способа и пути введения препарата. С другой стороны, таргетная терапия или таргетная медицина означает специфическое взаимодействие между ЛС и его рецептором на молекулярном уровне. Эффективные целевые системы доставки лекарств подразумевают четыре основных требования:

- сохранение терапевтической дозы,
- отсутствие предварительной деградации препарата,
- направленность к мишени,
- высвобождение инкапсулированного препарата.

В настоящее время доступны три контролируемых технологии высвобождения [25–28]:

- периодическое высвобождение, при котором постоянное количество препарата выделяется с постоянным интервалом времени,
- высвобождение по принципу обратной связи, при котором препарат высвобождается по команде от физического сигнала,
- непрерывное высвобождение – лекарство высвобождается с постоянной скоростью.

Способы высвобождения ЛС из полимера подразделяются на физические и химические. При физическом способе высвобождение контролируется диффузией ЛС/растворителя или проникновения ЛС через мембрану [29]. ЛС помещается в контейнер со стенкой-мембраной. Скорость выделения ЛС из диффузионно-контролируемых систем зависит от физических свойств и размера молекул ЛС, а также от уровня нагрузки, площади поверхности мембраны и длины пути диффузии.

Химический способ заключается в гидролитическом или ферментативном расщеплении основной цепи или отщеплении боковой цепи биоразлагаемого полимера.

Высвобождение ЛС из системы доставки контролируется за счет диффузии. Функционализация поверхности системы доставки и выбор правильного материала для мембраны играют решающую роль в кинетике высвобождения ЛС. Материал каркаса/мембраны с контролируемым высвобождением должен быть неиммуногенным, нетоксичным и биосовместимым, иметь пониженную прочность на растяжение, удерживать необходимое количество лекарственного средства и, что наиболее важно, материал должен обеспечивать контролируемое высвобождение препарата. Как правило, состав наночастиц с конкретным лекарственным средством загружают в пространство резервуара, а затем поверхность резервуара покрывают мембраной с программируемой скоростью, которая может быть дополнительно спроектирована для управления поведением высвобождения лекарственного средства.

Высвобождение ЛС из системы адресной доставки может модулироваться внешними или внутренними раздражителями. Это связано с тем, что разные органы имеют разную биологическую среду с характерными физическими, химическими, электрическими и биохимическими параметрами. Например, разные органы/части тела имеют разный рН, например, кровь (рН 7.4), опухолевые ткани (рН 6.5–7.2), лизосомы (рН 4.5–5.0), желудочно-кишечный тракт (рН 6.2–7.9), поэтому рН-чувствительный носитель ЛС высвобождает лекарство только в той области, на которую оно направлено. Таким образом, рН становится внутренним стимулом для адресной доставки терапевтических агентов [30–32]. Особенно этот стимул важен для опухолевых тканей из-за эффекта Варбурга (активный аэробный гликолиз в клетках быстро растущих злокачественных опухолей), обуславливающего дисбаланс внутриклеточного рН раковых клеток [33, 34].

Восстановленная среда цитозоля клеток становится стимулом для редокс-чувствительных систем доставки ЛС к высвобождению активных агентов только в цитозоле, но не в жидкостях организма [35]. Опухолевая ткань страдает от гипоксии из-за нарушения метаболизма, поэтому нечувствительный к гипоксии носитель ЛС будет отличной моделью для его доставки [36].

Магнитные наночастицы, загруженные терапевтическими агентами, могут направляться с помощью внешнего магнитного поля к определенному органу и стимулировать высвобождение ЛС только в определенном месте. Данное обстоятельство является идеальным примером внешне контролируемой/модулируемой адресной системы доставки ЛС [37].

Разрабатываются наноразмерные системы, которые способны контролировать биораспределение ЛС в ответ на определенные сигналы, как экзогенные (вариации температуры, магнитного поля,

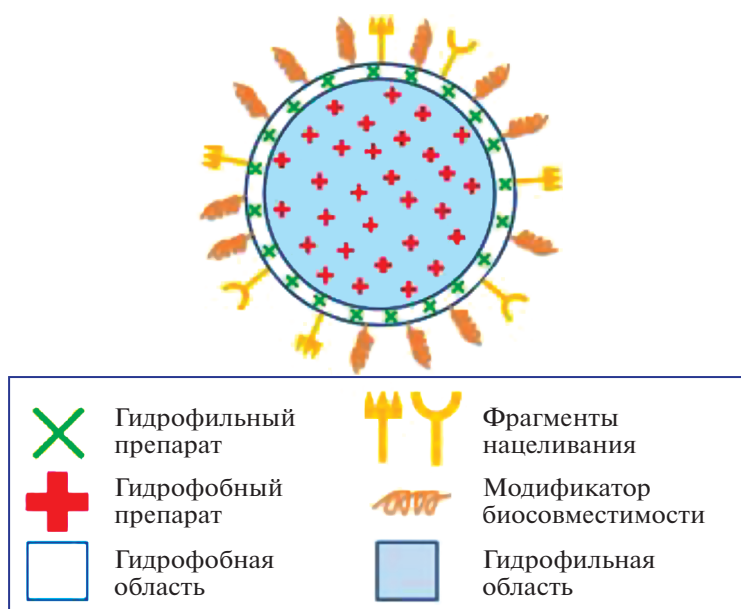


Рис. 3. Общий вид носителя с ЛС. Структура, состоящая из основного материала, содержит как гидрофобные, так и гидрофильные участки [44].

интенсивности ультразвука, световые или электрические импульсы), так и эндогенные (изменения рН, концентрации ферментов или окислительно-восстановительные градиенты) [38, 39].

Недавние достижения в области микропроизводства дали возможность разработать современные системы с контролируемым высвобождением для доставки лекарств. Наиболее популярны два типа устройств доставки: микрорезервуары и микро/нанофлюидные устройства [40]. Большие перспективы возлагаются на контролируемые системы доставки лекарств на основе чипов [41] и полимерных мицелл [42].

Полимерные мицеллы-носители в системах доставки. Полимерные мицеллы представляют собой наноразмерные коллоидные частицы с гидрофобной внутренней частью (ядром) и гидрофильной поверхностью (оболочкой). Лекарства и контрастные вещества могут быть либо встроены в липидное ядро мицеллы, либо ковалентно связываться с ее поверхностью [43]. Важнейшее преимущество полимерных мицелл — это их способность растворять в своем ядре малорастворимые в воде или гидрофобные лекарственные средства, повышая тем самым их биодоступность. В зависимости от типа межмолекулярных сил, вызывающих образование мицелл, мицеллы блок-сополимеров можно разделить на несколько категорий, включая гидрофобно собранные амфифильные мицеллы, мицеллы полиионного комплекса и мицеллы, возникающие в результате комплексообразования металлов. Общий вид мицеллярного носителя с ЛС представлен на рис. 3 [44]. Мицел-

лы имеют преимущества в качестве наноносителей для доставки лекарств и лечения благодаря их физико-химическим свойствам, способности загружать и высвобождать ЛС, простым методам приготовления, биосовместимости и направляемости на опухоль [45, 46]. В обзоре [47], посвященном сравнительным экспериментальным данным о биосовместимости различных наноносителей для доставки лекарств, отмечается низкая токсичность и высокая биоразлагаемость полимерных мицелл.

Из-за присутствия в молекулярных цепях мицелл с различными функциональными группами, такими как гидроксильные, карбоксильные и аминогруппы, эти сополимеры могут быть легко химически изменены и модифицированы боковыми цепями. Включение гидрофобных ЛС в мицеллярное ядро может дополнительно повысить стабильность мицелл. Это важная особенность для инъекционных биомедицинских применений.

Среди всех существующих систем доставки ЛС полимерные мицеллы представляют интерес в связи с тем, что гидрофобное лекарство, загруженное в ядро мицелл, защищено внешней гидрофильной короной, которая дополнительно препятствует удалению мицелл мононуклеарной фагоцитарной системой. Структурные особенности полимерных мицелл (гидрофильная оболочка) помогают избежать как неожиданной потери лекарства из компонентов сыворотки, так и предотвращения опсонизации системой комплемента, которая обычно приводит к быстрому выведению

лекарств из большого круга кровообращения [48, 49]. Данное обстоятельство повышает стабильность активного вещества и продлевает время его циркуляции *in vivo*.

Термодинамически движущей силой мицеллообразования являются гидрофобные взаимодействия: углеводородная часть дифильной молекулы выталкивается из водной среды, чтобы избежать, насколько это возможно, контакта с водой. Вследствие этого образуются мицеллы, ядро которых состоит из жидкого углеводорода (плотно упакованных углеводородных цепей), а внешняя часть — из полярной группы.

Важным фактором доставки ЛС является носительная термодинамическая (возможность разборки) и кинетическая (скорость разборки) стабильность вещества.

Относительно небольшой размер мицелл по сравнению с другими наночастицами [50] позволяет им пассивно накапливаться в неоваскуляризованных или плохо васкуляризованных опухолях, что может привести к снижению системной токсичности [51, 52].

Получение полимерных мицелл. Термин “мицелла” был впервые введен канадским химиком Дж.У. МакБейном 1913 г., и на сегодняшний день большинство сообщений в литературе касается образования мицелл в растворах поверхностно-активного материала. Согласно современным представлениям, мицеллы представляют собой агрегаты длинноцепочечных амфифильных молекул или ионов поверхностно-активных веществ, спонтанно возникающих в их растворах при определенной концентрации. Последнее свойство существенно зависит от природы полярной группы и, особенно, от длины молекулярной цепи [53].

В последние десятилетия полимерные мицеллы исследуются для использования в нанотехнологиях, биотехнологиях, биомедицинской инженерии и экологических технологиях [54–56]. В биомедицине, особенно при обнаружении и лечении рака, мицеллярные системы на основе полимеров широко изучаются благодаря их успеху в клинических испытаниях. В 1984 г. полимерные мицеллы были впервые использованы для доставки противораковых молекул [57].

Упоминание в публикациях такого понятия как мицеллярные наночастицы, начинается с середины 1990-х гг. [58], особенно в трансдермальной терапии [59]. В работе [60] авторы показали, что инсулин в сочетании со смешанными мицеллами полностью всасывается у собак, однако, его биодоступность оказалась намного ниже, чем в аналогичных исследованиях на крысах. В работе [61] показано, что скорость высвобождения инсулина из мицелл можно контролировать путем изменения концентрации глюкозы. Отметим, что простое объединение в препарате ЛС и мицеллы

может в некоторых случаях обеспечить самопроизвольное формирование структур, замедленно высвобождающих лекарственное средство в организме. Так, спонтанно образующаяся *in situ* мицеллярная система с программируемым высвобождением химиотерапевтических препаратов, была предложена для терапии анапластического рака щитовидной железы [62].

Мицеллярные наночастицы обладают большей нагрузочной способностью и превосходной стабильностью, их использование считается более безопасным для парентерального введения, поэтому ведутся исследования по оптимизации их приготовления и применению в медицине и ветеринарии.

Основные принципы приготовления полимерных мицелл. Лекарства могут быть инкапсулированы в зависимости от метода, используемого для приготовления, и от физико-химических характеристик лекарства. Самый простой метод приготовления — прямое растворение; другие методы — диализ, испарение эмульсии с растворителем (или соразтворителем) и заливка раствора с последующей гидратацией пленки. Выбор метода приготовления полимерных мицелл зависит как от характеристик полимера, так и от лекарственного средства. Подробности получения мицелл можно найти в обзорах [63, 64]. Учитывая, что свойства мицелл, такие как полярность и степень гидратации, неоднородны внутри носителя, лекарство может размещаться в разных местах, близко к поверхности или во внутреннем ядре, в зависимости от его свойств. В большинстве случаев, гидрофобные препараты загружаются и размещаются во внутреннем ядре. В определенных случаях, лекарство также может быть ковалентно связано с полимером (конъюгат полимер-ЛС).

При создании мицелл в качестве полимеров используют амфифильные диблок-сополимеры, например полистирол и полиэтиленгликоль (ПЭГ), триблок-сополимеры, (например поллоксамеры), G-хитозан, полиэтиленгликоль, сополимеры поли(ε-капролактон)-g-полиэтиленмин) и др. [46].

Гидрофильная часть обычно состоит из ПЭГ, но также используются другие полимеры, такие как поливинилпирролидон, полиакрилоилморфолин или поли триметиленкарбонат; гидрофобный сегмент может состоять из полипропиленоксида или сложных полиэфиров, таких как поли-ε-капролактон, или полимеров и сополимеров гликолевой и молочной кислот, а также поли-L-аминокислот [46].

Большая часть клинически одобренных полимерных мицеллярных лекарств применяются при терапии рака. Также имеются сообщения о многочисленных исследованиях на доклинических моделях животных, с использованием низкомолекулярных препаратов в полимерных мицеллах

амфифильных блок-сополимеров, например, лечения аутоиммунных и сердечнососудистых заболеваний, деменции, микробных инфекций, глазных и кожных болезней, легочной артериальной гипертензии, травм спинного мозга и заживления ран [65].

Неоднократно показано, что полимерные мицеллы значительно улучшают растворимость и стабильность ЛС, улучшают его биодоступность в целевом участке, повышают специфическую фармакологическую активность лекарства и уменьшают токсичность и нежелательные побочные эффекты лечения. Отмечается биоэквивалентность мицеллярных форм клинически одобренным формам лекарства [66].

Устойчивость полимерных мицелл. Количество ЛС, загруженного в мицеллы, может влиять на стабильность, морфологию и размер мицелл в водном растворе. Сложная взаимозависимость блочной структуры и длины блоков обеспечивает легко настраиваемые свойства, с уникальными способностями к солюбилизации лекарств. Гидрофобные взаимодействия между лекарствами и гидрофобным блоком амфифильных блок-сополимеров известны как один из основных факторов солюбилизации лекарств в полимерных мицеллах. Такие взаимодействия помогают удерживать лекарство в ядре и могут замедлять скорость высвобождения лекарства во внешний раствор. Дополнительные молекулярные взаимодействия, существующие в ядре, такие как водородные связи, не менее значимы, поскольку они могут усиливать молекулярные взаимодействия между полимером и ЛС в ядре.

Высвобождение лекарства из полимерных мицелл может происходить либо за счет диффузии лекарства из интактных мицелл, либо за счет разборки мицелл. В любом случае, чтобы избежать неконтролируемого высвобождения лекарства при введении, мицеллы должны обладать хорошей термодинамической, а также кинетической стабильностью [67–69]. Было предложено несколько физико-химических стратегий, позволяющих избежать быстрой дезагрегации системы или стабилизировать инкапсулированное лекарство в мицеллярном ядре [70]. Эти стратегии заключаются, в частности, в подборе длины гидрофобного блока, а также типа и уровня заместителей, степени агрегации блок-сополимеров, соотношения гидрофобность/гидрофильность, способа взаимодействия с ЛС (электростатическое взаимодействие или ковалентная сшивка).

Другие стратегии повышения устойчивости мицелл включают функционализацию гидрофобного блока, сшивание ядра мицеллы или образование конъюгата между полимером и лекарством, чтобы высвобождение лекарства происходило только после разрыва связи [71]. Структурную

стабильность мицелл следует исследовать также в биорелевантных условиях, поскольку белки плазмы или внутриклеточных жидкостей могут абсорбироваться на поверхности мицелл, что приводит к образованию так называемой белковой короны, которая частично маскирует функциональные группы внешней оболочки, модифицируя физиологический ответ наноносителей [22, 72]. В частности, было продемонстрировано, что сывороточные белки играют ключевую роль в стабильности мицелл, способствуя их разрушению или агрегации [73]. Другие источники нестабильности мицелл были обнаружены после их местного нанесения на кожные и слизистые ткани [74, 75]. Можно наблюдать дезагрегацию мицелл в результате взаимодействия со слизью, эпителием, липидами рогового слоя и подкожным жиром, тогда как взаимодействие мицелл со слезной жидкостью может вызвать осаждение лекарства в результате конкуренции с растворенными веществами, присутствующими в слезной пленке.

Использование гидрофильных блоков, обладающих “противообрастающими” свойствами, уменьшает связывание компонентов сыворотки (белков сыворотки и системы комплемента) и защищает инкапсулированное лекарство, что позволяет избежать неожиданной потери груза во время системного кровообращения. Поэтому полимерные мицеллы должны быть сконструированы таким образом, чтобы минимизировать подобные взаимодействия. В противном случае, полимерные мицеллы могут быть легко выведены из организма за счет адсорбции белков плазмы и/или активации комплемента, что приводит к удалению всей мицеллы вместе с ЛС внутри ее ядра ретикуло-эндотелиальной системой [76]. Чтобы избежать незапланированного выведения ЛС из мицелл, в структуру блок-сополимеров вводят несколько гидрофильных блоков [77]. Функциональные возможности гидрофильных оболочек тщательно изучены и установлено, что физико-химические свойства гидрофильных полимеров (молекулярная масса и поверхностная плотность) тесно связаны со стабильностью, временем системной циркуляции и биораспределением полимерных мицелл *in vivo* [78].

Фармакокинетика мицеллярных препаратов. Целью исследования фармакокинетики мицеллярных препаратов является количественная характеристика процессов его всасывания, распределения и элиминации (метаболизм и экскреция). Фармакокинетические данные необходимы для установления зависимости “концентрация/эффект”, которая характеризуется меньшими видовыми различиями, чем зависимость “доза/эффект”, и поэтому может быть использована для прогнозирования действия фармакологического средства у человека. Отметим, что направленный транспорт позволяет повысить продолжительность и эф-

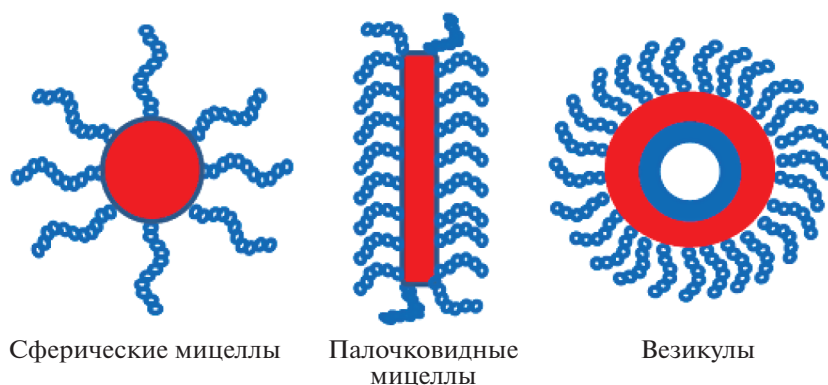


Рис. 4. Основные морфологические типы мицеллярных носителей с ЛС [52].

эффективность действия лекарства, снизить побочные эффекты. По результатам экспериментального анализа фармакокинетики мицеллярных препаратов возможно предсказать концентрацию препарата в крови (плазме) или, по меньшей мере, скорость ее снижения у человека. Данная информация помогает выбрать ориентировочную схему дозирования с возможностью уточнения в ходе последующих клинических исследований [79, 80].

Фармакокинетическое поведение блок-сополимерных мицеллярных лекарственных препаратов может сильно отличаться от такового действующего вещества, вводимого без носителя, что способно существенно влиять на эффективность и безопасность, поэтому важны характеристики препаратов *in vivo*. Поскольку такие физико-химические параметры, как размер, поверхностный заряд и морфология, способны влиять на распределение блок-сополимерного мицеллярного лекарственного препарата, необходимо исследовать влияние варибельности этих параметров на распределение мицеллярного лекарственного препарата. Также необходимо оценить следующие специфичные для блок-сополимерной мицеллы фармакокинетические параметры как для общего, так и для свободного действующего вещества в крови, плазме или сыворотке: максимальная концентрация (C_{max}), период полувыведения ($t_{1/2}$), площадь под фармакокинетической кривой [79, 80].

Лекарственные препараты и контрастные агенты могут либо помещаться в липидное ядро мицеллы, либо ковалентно связываться с ее поверхностью. Мицеллы имеют несколько меньшие размеры (5–100 нм, обычно ~50 нм) чем липосомы. Была показана корреляция между размером мицелл и их клеточной интернализацией *in vitro* и проникновением в опухоль *in vivo* [81]. Установлено, что мицеллы размером 40 нм демонстрировали наиболее эффективное поглощение опухолевыми клетками. Для обеспечения продолжительной циркуляции мицелл в кровотоке, были

предложены различные модификации их оболочки, делающие их термодинамически стабильными и биосовместимыми [82].

Отметим, что форма мицеллярных наночастиц значительно влияет на биоциркуляцию, биораспределение, клеточное поглощение и общую эффективность ЛС. Показано, что несферические формы имеют большие перспективы в качестве векторов доставки лекарств. Основные морфологические типы мицеллярных носителей с ЛС представлены на рис. 4 [52]. Нитевидные или червеобразные мицеллы вместе с другими редкими морфологиями, такими как иглы или диски, могут стать нормой для носителей лекарств следующего поколения. В настоящее время традиционные сферические мицеллы остаются доминирующей формой наноносителей, описанных в литературе [83].

Кинетика высвобождения лекарств из полимерных мицелл сильно зависит от многих факторов, включая размер мицелл, длину, кристалличность и полярность гидрофобного блока, а также совместимость между ядром мицеллы и молекулами лекарства. На рис. 5 представлены способы взаимодействия полимерных мицелл с клеточными мембранами и высвобождения ЛС из полимерных матриц.

Чем больше размер мицелл, тем медленнее происходит высвобождение препарата [84]. Так, более длинные гидрофобные блоки, характеризуются низкой скоростью высвобождения лекарственного средства. Более длинный основной блок также будет иметь более высокий переход в стеклообразное состояние [85], чем ближе к комнатной температуре, тем выше вязкость среды, поэтому высвобождение препарата происходит медленнее. Наконец, больший диаметр ядра может привести к высокой кристалличности ядра, по сравнению с ядром меньшего диаметра, а более высокая кристалличность замедлит высвобождение препарата [86]. Мицеллы с длинными гидрофобными блоками показали более низкую скорость высвобождения ЛС, по сравнению с мицеллами с ко-

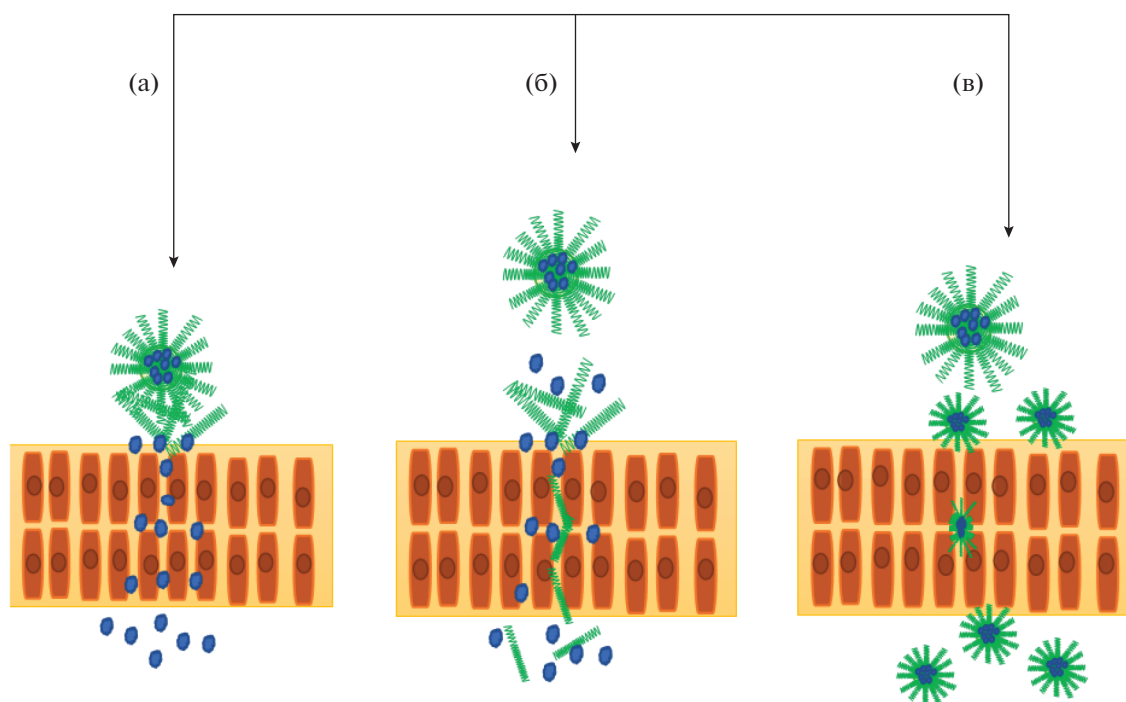


Рис. 5. Способы взаимодействия полимерных мицелл с клеточными мембранами: высвобождение ЛС из полимерных матриц вне клеток и проникновение его в цитозоль (а); высвобождение ЛС из полимерных матриц на поверхности клеточной мембраны (б); проникновение полимерных мицелл в цитозоль клеток в интактной форме (в).

роткими гидрофобными блоками [87–89]. Обнаружено, что скорость высвобождения лекарства из мицелл, уменьшалась с увеличением соотношения лекарственное средство/полимер при постоянной концентрации сополимера [90].

Высвобождение лекарства зависит от того, где расположены молекулы лекарства [91]. Если ЛС располагается преимущественно в короне, то длина ядра образующего блока, размер мицеллы и молекулярный объем лекарственного средства менее важны для определения скорости высвобождения, как, например, показано в работе [92] при высвобождении дауномицина.

С другой стороны, количество ЛС, загруженного в ядро мицеллы, является определяющим фактором для скорости его высвобождения, и чем выше концентрация ЛС, тем медленнее скорость высвобождения [87]. Кристалличность лекарства замедляет высвобождение, так как высвобождение из частиц возможно только после того, как лекарство кристаллизуется и растворится [93].

При сравнительном исследовании биодинамических показателей в эритроцитах барана и плазмы крови овец водной формы диминазена и диминазена, заключенного в водно-дисперсные мицеллы, показано, что поверхностно-активные вещества улучшают внутриклеточное проникновение диминазена за счет взаимодействия с клеточной мембраной [94, 95].

Биодоступность и фармакокинетические параметры тилмикозина (полусинтетического противомикробного средства) изучены на цыплятах-бройлерах, путем перорального введения с использованием ряда различных мицеллярных наночастиц, таких как, твердые липидные наночастицы, наноструктурированные липидные носители и нанокapsулы с липидным ядром. Авторами [96] показано, что тилмикозин с липидными наночастицами, улучшал биодоступность и фармакокинетические параметры препарата при использовании у цыплят-бройлеров. Группа исследователей [97] описали важность применения различных наночастиц в качестве антимикробных агентов в ветеринарии.

Несмотря на проведенные исследования, до сих пор нет четкой картины того, как мицеллы высвобождают лекарство: молекулы лекарственного средства свободно диффундируют из ядра интактной мицеллы или после разрыва мицеллы. Некоторые исследователи сообщают о двухфазном профиле высвобождения [86, 98]. Проведены исследования по анализу высвобождения ЛС *in vitro* в среде, имитирующей физиологические условия, в изотоническом буферном растворе (с pH 7.4 при 37°C) [84, 87] в присутствии липазы или белков [85]. Рациональная устойчивость мицелл, их совместимость с основным ЛС и молярный объем ЛС, а также физиологические условия являются

решающими факторами, влияющими на кинетику высвобождения ЛС из полимерной мицеллы.

Тем не менее, механические силы, действующие на полимерные мицеллы в венах и в мелких капиллярах, могут также оказывать сильное влияние на скорость высвобождения лекарства. До настоящего времени не проводилось исследований по изучению этого вопроса, что крайне необходимо для более точного определения скоростей высвобождения лекарств и оптимизации получения лекарственных форм. Фактически при оценке освобождения ЛС из полимерной мицеллы необходимо учитывать еще один фактор: высвобождение ЛС в потоке, что поможет добиться понимания реальной кинетики высвобождения лекарств [52].

Перспективы применения мицелл в терапии. Полимерные мицеллы представляют интерес в первую очередь, как переносчики гидрофобных лекарственных препаратов. Полимерная мицеллярная основа впервые была использована для противораковых препаратов проф. Казунори Катаока в конце 1980 гг. или начале 1990 гг. для увеличения накопления лекарств в опухолевых тканях [82]. Размер мицелл можно регулировать в диапазоне диаметров 20–100 нм, чтобы гарантировать, что мицеллы не проходят через нормальные стенки сосудов, что позволяет ожидать снижения частоты побочных эффектов препаратов [99].

Большинство полимерных мицелл разработаны для доставки гидрофобных противораковых препаратов, в которые часто приходится вводить поверхностно-активные вещества и органические растворители. При системном введении такие низкомолекулярные противоопухолевые агенты распределяются по всему организму, снижая эффективную дозу в тканях-мишенях и вызывая интоксикацию. Быстрый клиренс противоопухолевых лекарств из организма приводит к повторным введениям в поддерживающей эффективной концентрации препарата в опухолях, что может еще больше усиливать хроническую токсичность и даже приводить к приобретенной устойчивости к лекарству. Таким образом, полимерные мицеллы значительно выгоднее для стабилизации гидрофобных лекарств, что защищает эти агенты внутри ядра от внешней среды, стабильно циркулируя в кровотоке и избирательно накапливаясь в солидных опухолях, где они могут высвобождать загруженные ЛС в запрограммированном порядке [82].

Например, пероральный прием природного витамина *E*, заключенного в мицеллы у скаковых лошадей, эффективно увеличивал концентрацию α -токоферола в плазме крови по сравнению с немиецеллярным использованием витамина [100]. Другое исследование, проведенное теми же авторами у взрослых поросят и поросят-отъемышей,

показало, что пероральное введение свиноматкам и пороссятам мицеллизированного природного витамина *E* изменяет профиль жирных кислот в тканях поросят и улучшает их окислительный статус по сравнению с немиецеллярным препаратом [101]. В работе [102] описана возможность применения мицелл для пероральной доставки витамина B_{12} .

Полимерные мицеллы можно сконструировать так, чтобы они реагировали на определенные сигналы для высвобождения своего груза. Такие сигналы могут эндогенно присутствовать в организме и усиливаться в пораженных тканях. Например, микроокружение опухолей представляет собой уникальные стимулы по сравнению со здоровыми тканями для избирательной активации мицеллы, включая кислые рН между 6.5 и 7.2 за счет аэробного гликолиза и производства лактата и измененного окислительно-восстановительного потенциала. Более того, эндосомальный/лизосомальный рН (рН 6.5–4.5), ферменты, АТФ, внутриклеточные активные формы кислорода и окислительно-восстановительный потенциал, могут дополнительно использоваться для контроля действия мицелл внутри клеток [82].

Описана перспективность терапевтического потенциала мицелл, нагруженных олигонуклеотидами, особенно для терапии рака на основе РНК-интерференции [103]. Авторы [104] разработали систему доставки олигонуклеотидов с использованием рН-чувствительных полимерных мицеллоподобных наночастиц и показали, что данная система эффективно доставляет в клетки олигонуклеотиды различной длины (20–100 п.н.) и обладает значительным потенциалом для лечения рака.

Кроме упомянутых выше, исследователями разрабатываются мицеллярные формы для ряда противоопухолевых и противоинфекционных препаратов, гормонов и т.д. Некоторые ЛС, предложенные для создания мицеллярных форм, представлены в табл. 1.

Кроме того, разрабатываются мицеллярные формы препаратов для малых органических молекул, siРНК, аптамеров, пептидов, углеводов и антител [122].

В последние несколько десятилетий, полимерные мицеллы стали одной из самых перспективных систем нанодоставки для лечения рака. Несмотря на разногласия, между учеными относительно степени накопления нанолекарств в опухоли [123], важно отметить, что несколько клинически успешных препаратов, таких как доксил (Doxil, Johnson & Johnson, США), абраксан (Abraxane, Celgene Corporation, США), генексол (Genexol, Samyang, Корея), паксел (Pascal, Oasmia Pharmaceutical, Швеция) применяются для терапии рака, эффективно доставляя достаточное количество

Таблица 1. Лекарственные средства, разрабатываемые для создания мицелярных форм препаратов

Группа препаратов	Наименование активного вещества	Литературный источник
Противораковые	Доксорубин (<i>Doxorubicin</i>)	[19]
	Камптотецин (<i>Camptothecin</i>) и Карбоплатин (<i>Carboplatin</i>)	[43]
	Паклитаксел (<i>Paclitaxel</i>)	[105, 106]
	Доцетаксел (<i>Docetaxel</i>)	[107]
	Цисплатин (<i>Cisplatin</i>)	[108]
	Метотрексат (<i>Methotrexate</i>)	[109]
	Этаселен (<i>Ethaselen</i>)	[110]
	5-фторурацил (<i>5-fluorouracil</i>)	[111]
	Индисулам (<i>Indisulam</i>)	[112]
	Дисульфирам (<i>Disulfiram</i>)	[113]
	Амифостин (<i>Amifostine</i>)	[114]
	Циклоспорин (<i>Cyclosporine</i>)	[115]
Гемцитабин (<i>Gemcitabine</i>)	[116]	
Гормоны	Эстрадиол (<i>Estradiol</i>)	[107]
	Дексаметазон (<i>Dexamethasone</i>)	[117]
Противовирусные, антибактериальные, противогрибковые, противопаразитарные	Адамантан (<i>Adamantane</i>)	[118]
	Ципрофлоксацин (<i>Ciprofloxacin</i>)	[119]
	Амфотерицин В (<i>Amphotericin B</i>)	[120]
	Ивермектин (<i>Ivermectin</i>)	[121]

активных препаратов в опухолевые ткани-мишени [104, 124, 125].

Помимо первичного пассивного таргетинга наблюдается явный сдвиг в сторону использования мицелл, которые можно модифицировать для активного нацеливания, контролируемой доставки терапевтических агентов в зависимости от уникальности опухоли, микросреды около опухоли, внешней среды, а также сочетание более чем одного типа терапевтической полезной нагрузки.

Тем не менее, нельзя забывать о безопасности разрабатываемых новых концепций, поскольку имеются данные, связанные не только с их токсичностью [126], но и способностью вызывать нейроэндокринные нарушения [127].

Несмотря на то, что способность молекул поверхностно-активных веществ в растворе образовывать мицеллы известна уже более ста лет [128], активное использование мицелл для адресной доставки ЛС началось с конца прошлого века. Полимерные мицеллы, используемые для доставки лекарств, продемонстрировали способность ослаб-

лять токсичность, улучшать доставку к целевым органам и тканям и улучшать терапевтическую эффективность активных фармацевтических ингредиентов [129].

Таким образом, среди наночастиц, применяемых в фармацевтике, определенные преимущества имеют полимерные мицеллы, поскольку в их состав входят амфифильные полимеры, которые самоорганизуются в водной среде. Мицеллы характеризуются простым приготовлением и высокой возможностью масштабирования, по сравнению с другими наноносителями, такими как полимерные наночастицы и липосомы, требующие более сложных, длительных и дорогостоящих производственных процедур [22, 24]. Однако полимерные мицеллы все еще нуждаются в тщательном изучении на животных моделях перед тем, как могут быть рекомендованы для лечения человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного Фонда проект № 19-14-00077-II.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rhee Y.-S., Mansour H.M. // *Int. J. Nanotechnol.* 2011. V. 8. № 1–2. P. 84–114.
2. Kiparissides C., Kammona O. // *Can. J. Chem. Eng.* 2013. V. 91. № 4. P. 638–651.
3. Hossen S., Hossain M.K., Basher M.K., Mia M.N.H., Rahman M.T., Uddin M.J. // *J. Adv. Res.* 2019. V. 15. P. 1–18.
4. Huda S., Alam M.A., Sharma P.K. // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2020. V. 60. 102018. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102018>
5. Chariou P.L., Ortega-Rivera O.A., Steinmetz N.F. // *ACS Nano.* 2020. V. 14. № 3. P. 2678–2701.
6. Mishra N., Pant P., Porwal A., Jaiswal J., Samad A.M., Tiwari S. // *Am. J. PharmTech Res.* 2016. V. 6. № 1. P. 1–24.
7. Basinska T., Gadzinowski M., Mickiewicz D., Slomkowski S. // *Polymers (Basel).* 2021. V. 13. № 12. 2022. <https://doi.org/10.3390/polym13122022>
8. Xia W., Tao Z., Zhu B., Zhang W., Liu C., Chen S., Song M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 17. 9118. <https://doi.org/10.3390/ijms22179118>
9. Adepu S., Ramakrishna S. // *Molecules.* 2021. V. 26. № 19. 5905. <https://doi.org/10.3390/molecules26195905>
10. Hwang S.R., Chakraborty K., An J.M., Mondal J., Yoon H.Y., Lee Y.-K. // *Pharmaceutics.* 2021. V. 13. № 11. 1875. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111875>
11. Veselov V.V., Nosyrev A.E., Jicsinszky L., Alyautdin R.N., Cravotto G. // *Cancers (Basel).* 2022. V. 14. № 3. 622. <https://doi.org/10.3390/cancers14030622>
12. Varde N.K., Pack D.W. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2004. V. 4. № 1. P. 35–51.
13. Subramani K. // *Int. J. Nanotechnology.* 2006. V. 3. № 4. P. 557–580.
14. Valcourt D.M., Dang M.N., Scully M.A., Day E.S. // *ACS Nano.* 2020. V. 14. № 3. P. 3378–3388.
15. Liu D., Yang, F., Xiong F., Gu N. // *Theranostics.* 2016. V. 6. № 9. P. 1306–1323.
16. Abdellatif A.A.H., Mohammed H.A., Khan R.A., Singh V., Bouazzaoui A., Yusuf M., Akhtar N., Khan M., Al-Subaiyel A., Mohammed S.A.A., Al-Omar M.S. // *Nanotechnol. Rev.* 2021. V. 10. № 1. P. 1493–1559.
17. Mitchell M.J., Billingsley M.M., Haley R.M., Wechsler M.E., Peppas N.A., Langer R. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021. V. 20. P. 101–124.
18. Timin A.S., Gao H., Voronin D.V., Gorin D.A., Sukhorukov G.B. // *Adv. Mater. Interfaces.* 2017. V. 4. № 1. 160338. <https://doi.org/10.1002/admi.201600338>
19. Ganta S., Devalapally H., Shahiwala A., Amiji M. // *J. Control. Release.* 2008. V. 126. № 3. P. 187–204. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.12.017>
20. Sawant R.R., Torchilin V.P. // *Mol. Membr. Biol.* 2010. V. 27. № 7. P. 232–246.
21. Zhang Y., Huang Y., Li S. // *AAPS PharmSciTech.* 2014. V. 15. № 4. P. 862–871.
22. Lu Y., Zhang E., Yang J., Cao Z. // *Nano Res.* 2018. V. 11. P. 4985–4998.
23. Yousefpour M.M., Yari K.A. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2017. V. 79. № 4. P. 637–649.
24. Paliwal R., Babu R.J., Palakurthi S. // *AAPS PharmSciTech.* 2014. V. 15. № 6. P. 1527–1534.
25. Farokhzad O.C., Langer R. // *ACS Nano.* 2009. V. 3. № 1. P. 16–20.
26. Bae Y.H., Park K. // *J. Control. Release.* 20. V. 153. № 3. P. 198–205.
27. Grobmyer S.R., Moudgil B.M. *Cancer Nanotechnology: Methods and Protocols.* N.Y.: Humana Press, 2010. 396 p.
28. Torchilin V.P. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005. V. 4. № 2. P. 145–160.
29. Rajagopalan R., Yakhmi J.V. In: *Nanostructures for Cancer Therapy*, Eds. A. Ficai, A.M. Grumezescu, Amsterdam: Elsevier, 2017. P. 211–240.
30. Beloqui A., Coco R., Memvanga P.B., Ucakar B., des Rieux A., Pr at V. // *Int. J. Pharm.* 2014. V. 473. № 1–2. P. 203–212.
31. Beloqui A., Solin s M. ., des Rieux A., Pr at V., Rodr guez-Gasc n A. // *Int. J. Pharm.* 2014. V. 468. № 1–2. P. 105–111.
32. Beloqui A., Solin s M. ., Rodr guez-Gasc n A., Almeida A.J., Pr at V. // *Nanomedicine.* 2016. V. 12. № 1. P. 143–161. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.004>
33. Schiliro C., Firestein B.L. // *Cells.* 2021. V. 10. № 5. 1056. <https://doi.org/10.3390/cells10051056>
34. Liu C., Jin Y., Fan Z. // *Front. Oncol.* 2021. V. 11. 698023. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.698023>
35. Duan C., Gao J., Zhang D., Jia L., Liu Y., Zheng D. et al. // *Biomacromolecules.* 2011. V. 12. № 12. P. 4335–4343.
36. Jin C., Bai L., Wu H., Song W., Guo G., Dou K. // *Pharm. Res.* 2009. V. 26. № 7. P. 1776–1784.
37. Schleich N., Po S., Jacobs D., Ucakar B., Gallez B., Danhier F., Pr at V. // *J. Control. Release.* 2014. V. 194. P. 82–91.
38. Mura S., Nicolas J., Couvreur P. // *Nat. Mater.* 2013. V. 12. P. 991–1003.
39. Wong P.T., Choi S.K. // *Chem. Rev.* 2015. V. 115. № 9. P. 3388–3432.

40. Ma Z., Li B., Peng J., Gao D. // *Pharmaceutics*. 2022. V. 14. № 2. 434.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020434>
41. Geraili A., Xing M., Mequanin K. // *View*. 2021. V. 2. №5. 20200126.
<https://doi.org/10.1002/VIW.20200126>
42. Kubiak T. // *Polim. Med.* 2022.
<https://doi.org/10.17219/pim/145513>
43. Mishra B., Patel B.B., Tiwari S. // *Nanomedicine*. 2010. V. 6. № 1. P. 9–24.
44. Webster D.M., Sundaram P., Byrne M.E. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013. V. 84. № 1. P. 1–20.
45. Yadav H.K.S., Almokdad A.A., Shaluf S.I.M., Debe M.S. In: *Nanocarriers for Drug Delivery*. Eds. S.S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R.K. Mishra, S. Thomas. Amsterdam: Elsevier, 2019. 674 p.
46. Fluksman A., Benny O. // *Anal. Methods*. 2019. V. 11. № 30. P. 3810–3818.
47. Naahidi S., Jafari M., Edalat F., Raymond K., Khademhosseini A., Chen P. // *J. Control. Release*. 2013. V. 166. № 2. P. 182–194.
48. Owens D.E. III, Peppas N.A. // *Int. J. Pharm.* 2006. V. 307. № 1. P. 93–102.
49. Photos P.J., Bacakova L., Discher B., Bates F.S., Discher D.E. // *J. Control. Release*. 2003. V. 90. № 3. P. 323–334.
50. Ghezzi M., Pescina S., Padula C., Santi P., Del Favero E., Cantù L., Nicoli S. // *J. Control. Release*. 2021. V. 332. P. 312–336.
51. Hussein Y.H.A., Youssry M. // *Materials*. 2018. V. 11. № 5. 688.
<https://doi.org/10.3390/ma11050688>
52. Atanase L.I., Riess G. // *Polymers* 2018. V. 10. № 1. 62.
<https://doi.org/10.3390/polym10010062>
53. Osborne D.W., Ward A.J., O'Neill K.J. // *J. Pharm. Pharmacol.* 1991. V. 43. № 6. P. 450–454.
54. Nath N., Hyun J., Ma H., Chilkoti A. // *Surf. Sci.* 2004. V. 570. № 1–2. P. 98–110.
55. Wang S., Lu L., Gruetzmacher J.A., Currier B.L., Yaszemski M.J. // *Biomaterials*. 2006. V. 27. № 6. P. 832–841.
56. Kim J.-Y., Shim S.-B., Shim J.-K. // *J. Hazard. Mater.* 2004. V. 116. № 3. P. 205–212.
57. Bader H., Ringsdorf H., Schmidt B. // *Macromol. Chem.* 1984. V. 123. № 1. P. 457–485.
58. Simon J.A. // *Menopause*. 2006. V. 13. № 2. P. 222–231.
<https://doi.org/10.1097/01.gme.0000174096.56652.4f>
59. Lee A.L., Wang Y., Pervaiz S., Fan W., Yang Y.Y. // *Macromol. Biosci.* 2011. V. 11. № 2. P. 296–307.
60. Scott-Moncrieff J.C., Shao Z., Mitra A.K. // *J. Pharm. Sci.* 1994. V. 83. № 10. P. 1465–1469.
61. Wang B., Ma R., Liu G., Li Y., Liu X., An Y., Shi L. // *Langmuir*. 2009. V. 25. № 21. P. 12522–12528.
62. Yang X., Zhang L., Zheng L., Wang Y., Gao L., Luo R., Li X., Gong C., Luo H., Wu Q. // *J. Mater. Chem. B*. 2022. V. 10. № 8. P. 1236–1249.
63. Thipparaboina R., Chavan R.B., Kumar D., Modugula S., Shastri N.R. // *Colloids Surf. B*. 2015. V. 135. P. 291–308.
64. Makhmalzade B.S., Chavoshy F. // *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2018. V. 9. № 1. P. 2–8.
65. Hwang D., Ramsey J.D., Kabanov A.V. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2020. V. 156. P. 80–118.
66. Kulthe S.S., Choudhari Y.M., Inamdar N.N., Mourya V. // *Des. Monomers Polym.* 2012. V. 15. № 5. P. 465–521.
67. Trivedi R., Kompella U.B. // *Nanomedicine*. 2010. V. 5. № 3. P. 485–505.
68. Imran M., Shah M.R. Shafiullah in *Design and Development of New Nanocarriers*. Ed. A.M. Grumezescu. Amsterdam: Elsevier, 2018. P. 365–400.
69. Ahmad Z., Shah A., Siddiq M., Kraatz H.-B. // *RSC Adv*. 2014. V. 4. № 33. P. 17028–17038.
70. Shi Y., Lammers T., Storm G., Hennink W.E. // *Macromol. Biosci.* 2017. V. 17. № 1. 1600160.
<https://doi.org/10.1002/mabi.201600160>
71. Lee J., Cho E.C., Cho K. // *J. Control. Release* 2004. V. 94. № 2–3. P. 323–335.
72. Zeng L., Gao J., Liu Y., Gao J., Yao L., Yang X. et al. // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 118. P. 303–314.
73. Zhu Y., Meng T., Tan Y., Yang X., Liu Y., Liu X., Yu F., Wen L., Dai S., Yuan H., Hu F. // *Mol. Pharm.* 2018. V. 15. № 11. P. 5374–5386.
74. Pepić I., Lovrić J., Filipović-Grčić J. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013. V. 50. № 1. P. 42–55.
75. Grimaudo M.A., Pescina S., Padula C., Santi P., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C., Nicoli S. // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2019. V. 16. № 4. P. 397–413.
76. Xiao K., Li Y., Luo J., Lee J.S., Xiao W., Gonik A.M., Agarwal R.G., Lam K.S. // *Biomaterials*, 2011. V. 32. № 13. P. 3435–3446.
77. Logie J., Owen S.C., McLaughlin C.K., Shoichet M.S. // *Chem. Mater.* 2014. V. 26. № 9. P. 2847–2855.
78. Shiraishi K., Sanada Y., Mochizuki S., Kawano K., Maitani Y., Sakurai K., Yokoyama M. // *J. Control. Release*. 2015. V. 203. P. 77–84.
79. Moffitt M., Khougaz K., Eisenberg A. // *Acc. Chem. Res.* 1996. V. 29. № 2. P. 95–102.
80. Cheng F.R., Yang Y.J., Liang Y., Yan J.Q., Cao J., Su T., Jiang L., He B., Luo X.L., Gu Z.W. // *RSC Adv*. 2014. V. 4. № 107. P. 62708–62716.
81. Zhang L., Eisenberg A. // *Polym. Adv. Technol.* 1998. V. 9. № 10–11. P. 677–699.
82. Cabral H., Miyata K., Osada K., Kataoka K. // *Chem. Rev.* 2018. V. 118. № 14. P. 6844–6892.
83. Truong N.P., Whittaker M.R., Mak C.W., Davis T.P. // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2015. V. 12. № 1. P. 129–142.
84. Görner T., Gref R., Michenot D., Sommer F., Tran M.N., Dellacherie E. // *J. Control. Release*. 1999. V. 57. № 3. P. 259–268.
85. Lee H., Zeng F., Dunne M., Allen C. // *Biomacromolecules*. 2005. V. 6. № 6. P. 3119–3128.
86. Soo P.L., Lovric J., Davidson P., Maysinger D., Eisenberg A. // *Mol. Pharm.* 2005. V. 2. № 6. P. 519–527.

87. Jeong Y.-I., Cheon J.-B., Kim S.-H., Nah J.-W., Lee Y.-M., Sung Y.-K., Akaike T., Cho C.-S. // *J. Control. Release* 1998. V. 51. № 2–3. P. 169–178.
88. Huh K.M., Lee S.C., Cho Y.W., Lee J., Jeong J.H., Park K. // *J. Control. Release*. 2005. V. 101. № 1–3. P. 59–68.
89. Huh K.M., Min H.S., Lee S.C., Lee H.J., Kim S., Park K. // *J. Control. Release*. 2008. V. 126. № 2. P. 122–129.
90. Allen C., Eisenberg A., Mrcic J., Maysinger D. // *Drug Deliv.* 2000. V. 7. № 3. P. 139–145.
91. De Jaeghere F., Allémann E., Leroux J.-C., Stevels W., Feijen J., Doelker E., Gurny R. // *Pharm. Res.* 1999. V. 16. № 6. P. 859–866.
92. Gorshkova M.Y., Stotskaya L.L. // *Polym. Adv. Technol.* 1998. V. 9. № 6. P. 362–367.
93. Soo P.L., Luo L., Maysinger D., Eisenberg A. // *Langmuir*. 2002. V. 18. № 25. P. 9996–10004.
94. Staroverov S.A., Pristensky D.V., Yermilov D.N., Gabalov K.P., Zhemerichkin D.A., Sidorkin V.A., Shcherbakov A.A., Shchyogolev S.Y., Dykman L.A. // *Drug Deliv.* 2006. V. 13. № 5. P. 351–355.
95. Staroverov S.A., Sidorkin V.A., Fomin A.S., Shchyogolev S.Y., Dykman L.A. // *J. Vet. Sci.* 2011. V. 12. № 4. P. 303–307.
96. Al-Qushawi A., Rassouli A., Atyabi F., Peighambari S.M., Esfandyari-Manesh M., Shams G.R., Yazdani A. // *Iran. J. Pharm. Res.* 2016. V. 15. № 4. P. 663–676.
97. Troncarelli M.Z., Brandão H.M., Gern J.C., Guimarães A.S., Langoni H. In *Microbial Pathogens and Strategies for Combating them: Science, Technology and Education*, Ed. A. Méndez-Vilas. Badajoz: Formatex Research Center, 2013. P. 543–556.
98. Hussein I.D., Youssry M. // *Materials*. 2018. V. 11. № 5. 688.
<https://doi.org/10.3390/ma11050688>
99. Matsumura Y. // *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2008. V. 38. № 12. P. 793–802.
100. Rey A.I., Segura J., Arandilla E., López-Bote C.J. // *J. Anim. Sci.* 2013. V. 91. № 3. P. 1277–1284.
101. Rey A., Amazan D., Cordero G., Olivares A., López-Bote C.J. // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2014. V. 84. № 5–6. P. 229–243.
102. Francis M.F., Cristea M., Winnik, F.M. // *Biomacromolecules*. 2005. V. 6. № 5. P. 2462–2467.
103. Tabernero J., Shapiro G.I., LoRusso P.M., Cervantes A., Schwartz G.K., Weiss G.J. et al. // *Cancer Discov.* 2013. V. 3. № 4. P. 406–417.
104. Shen Y., Zhang J., Hao W., Wang T., Liu J., Xie Y., Xu S., Liu H. // *Int. J. Nanomedicine*. 2018. V. 13. P. 537–553.
105. Vail D.M., Von Euler H., Rusk A.W., Barber L., Clifford C., Elmslie R., et al. // *J. Vet. Intern. Med.* 2012. V. 26. № 3. P. 598–607.
106. Sutton D., Nasongkla N., Blanco E., Gao J. // *Pharm. Res.* 2007. V. 24. № 6. P. 1029–1046.
107. Castillo P.M., Jimenez-Ruiz A., Carnerero J.M., Prado-Gotor R. // *ChemPhysChem*. 2018. V. 19. № 21. P. 2810–2828.
108. Xu P., Van Kirk E.A., Li S., Murdoch W.J., Ren J., Hus-sain M.D., Radosza M., Shen Y. // *Colloids Surf. B*. 2006. V. 48. № 1. P. 50–57.
109. Ren S., Wang M., Wang C., Wang Y., Sun C., Zeng Z., Cui H., Zhao X. // *Polymers*. 2021. V. 13. № 19. 3307.
<https://doi.org/10.3390/polym13193307>
110. Li X., Yang Z., Yang K., Zhou Y., Chen X., Zhang Y., Wang F., Liu Y., Ren L. // *Nanoscale. Res. Lett.* 2009. V. 4. P. 1502.
<https://doi.org/10.1007/s11671-009-9427-2>
111. Bhadra D., Bhadra S., Jain S., Jain N.K. // *Int. J. Pharm.* 2003. V. 257. № 1–2. P. 111–124.
112. Cesur H., Rubinstein I., Pai A., Onyuksel H. // *Nano-medicine*. 2009. V. 5. № 2. P. 178–183.
113. Duan X., Xiao J., Yin Q., Zhang Z., Yu H., Mao S., Li Y. // *ACS Nano*. 2013. V. 7. № 7. P. 5858–5869.
114. Tagami T., Ozeki T. // *J. Pharm. Sci.* 2017. V. 106. № 9. P. 2219–2226.
115. Bu H.Z., Gukasyan H.J., Goulet L., Lou X.J., Xiang C., Koudriakova T. // *Curr. Drug Metab.* 2007. V. 8. № 2. P. 91–107.
116. Norouzi P., Amini M., Dinarvand R., Arefian E., Seyed-jafari E., Atyabi F. // *Mater. Sci. Eng. C*. 2020. V. 116. 111161.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111161>
117. Chopra P., Hao J., Li S.K. // *J. Control. Release*. 2012. V. 160. № 1. P. 96–104.
118. Ren S., Chen D., Jiang M. // *J. Polym. Sci. A*. 2009. V. 47. № 17. P. 4267–4278.
119. Liu L.H., Venkatraman S.S., Yang Y.Y., Guo K., Lu J., He B.P., Moochhala S., Kan L.J. // *Biopolymers*. 2008. V. 90. № 5. P. 617–623.
120. Weissig V., Pettinger T.K., Murdock N. // *Int. J. Nano-medicine*. 2014. V. 9. P. 4357–4377.
121. Pristensky D.V., Staroverov S.A., Ermilov D.N., Shchyogolev S.Y., Dykman L.A. // *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B*. 2007. V. 1. № 3. P. 249–253.
122. Gao Y., Xie J., Chen H., Gu S., Zhao R., Shao J., Jia L. // *Biotechnol. Adv.* 2014. V. 32. № 4. P. 761–777.
123. Wilhelm S., Tavares A.J., Dai Q., Ohta S., Audet J., Dvorak H.F., Chan W.C.W. // *Nat. Rev. Mat.* 2016. V. 1. 16014.
<https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>
124. van der Meel R., Lammers T., Hennink W. // *Expert Opin. Drug Delivery* 2017. V. 14. № 1. P. 1–5.
125. Wang J., Li S., Han Y., Guan J., Chung S., Wang C., Li D. // *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9. 202.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00202>
126. Rollerova E., Jurcovicova J., Mlynarcikova A., Sadlon-ova I., Bilanicova D., Wsolova L. et al. // *Reprod. Toxicol.* 2015. V. 57. P. 165–175.
127. Scsukova S., Mlynarcikova A., Kiss A., Rollerova E. // *Neuro Endocrinol. Lett.* 2015. V. 36. P. 88–94.
128. McBain J.W. // *Trans. Faraday Soc.* 1913. V. 9. P. 99–101.
129. Croy S.R., Kwon G.S. // *Curr. Pharm. Des.* 2006. V. 12. № 36. P. 4669–4684.

Polymer Micelles for Drug Delivery System (Review)**O. I. Guliy^{a, *}, S. A. Staroverov^{a, b}, A. S. Fomin^a, E. G. Zhnichkova^b, S. V. Kozlov^b,
L. G. Lovtsova^b, and L. A. Dykman^a**^a *Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), Saratov, 410049 Russia*^b *Saratov State Agrarian University, Saratov, 410012 Russia***e-mail: guliy_olga@mail.ru*

To increase the efficiency of interaction between a drug and a target, the method of directed transport of drugs, which allows increasing the concentration of delivered drugs in a certain place and blocking or severely limiting their accumulation in healthy organs and tissues, is becoming increasingly important. Micelle-based nanopreparations can be considered as a system with unique characteristics compared to other nanocarriers, since the smaller size allows passive targeting of target organs (even poorly permeable ones) and efficient internalization by cells. Polymer micelles are increasingly being used to create drug delivery systems. The paper presents a brief overview of the production of polymer micelles, the release of the drug and the possibility of their practical application.

Keywords: polymeric micelles, drug delivery, surfactants, amphiphilicity, solubilization, pharmacokinetics

УДК 577.345+57.037+57.013+57.014

НОВЫЕ FRET-ПАРЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ КАСПАЗ *IN VITRO*

© 2022 г. Н. К. Марынич¹, И. Э. Грановский^{1, 2}, А. П. Савицкий^{1, *}¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН,
Пушино, Московской области, 142290 Россия

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

Поступила в редакцию 29.04.2022 г.

После доработки 20.06.2022 г.

Принята к публикации 04.07.2022 г.

Получен мономерный сенсор на эффекторную каспазу-3 TagRFP-23-Ultramarine (TR-23-U). Рассчитаны интегралы перекрытия новых пар красного флуоресцентного белка TagRFP с четырьмя хромобелками. Методами гель-фильтрации и динамического рассеяния света подтверждено мономерное состояние белка Ultramarine и сенсора TR-23-U. Инкубация с каспазой-3 показала возможность применения нового белка слияния в качестве FRET-сенсора для детекции апоптоза.

Ключевые слова: флуоресцентные белки, хромобелки, FRET-сенсоры, апоптоз, каспаза-3

DOI: 10.31857/S0555109922060083

Детекция процессов, происходящих в организме и отдельной клетке играет ключевую роль в создании лекарств и терапии различных заболеваний [1]. Целью многих лекарственных препаратов является инициация апоптоза. Каспаза-3 хорошо известна своей ролью в осуществлении специфического расщепления многих клеточных белков при запрограммированной гибели клеток, а также в регуляции клеточного гомеостаза [2, 3]. Явление ферстеровского резонансного переноса энергии внутри пары флуоресцентных белков широко применяется в FRET-сенсорах для определения активности каспазы-3, благодаря возможности их непосредственной экспрессии в живой клетке [4, 5].

Ферстеровский резонансный перенос энергии (Förster resonance energy transfer, FRET) – это процесс взаимодействия двух хромофоров, при котором происходит безызлучательный перенос энергии возбужденного состояния от донора к акцептору. При таком переносе происходит снижение интенсивности и уменьшение времени жизни флуоресценции донора. В случае флуоресцирующего акцептора при FRET одновременно происходит возбуждение флуоресценции акцептора. Наиболее важные параметры, определяющие эффективность резонансного переноса это:

- 1) степень перекрытия спектров эмиссии флуоресценции донора и поглощения акцептора;
- 2) расстояние между хромофорами во FRET-паре, поскольку эффективность переноса энер-

гии обратно пропорциональна расстоянию в шестой степени [6].

Использование сенсоров, в которых в качестве донора выступает красный флуоресцентный белок позволяет работать в области спектра с наименьшим поглощением и автофлуоресценцией тканей животных [7]. Использование в качестве акцептора не флуоресцирующих хромобелков исключает необходимость спектрального разделения флуоресценции донора и акцептора, что облегчает детекцию изменения FRET [8, 9]. Использование таких сенсоров позволит детектировать активность каспазы 3 не только спектрофотометрически, но и на основании изменения времени жизни флуоресценции донора. Обнаружение протеолиза является одним из самых важных применений FRET-сенсоров, поскольку роль различных ферментов в молекулярной онкологии при прогрессировании опухоли находится в стадии тщательного изучения. Практическим применением таких сенсоров является скрининг новых противоопухолевых препаратов, направленных на активацию апоптоза.

Цель работы – проанализировать эффективность переноса энергии в новых FRET-парах красного флуоресцентного белка TagRFP с хромобелками путем расчета интегралов перекрытия, получить мономерный сенсор TagRFP-23-хромобелок и показать возможность применения

нового белка слияния в качестве FRET-сенсора для детекции апоптоза.

МЕТОДИКА

Молекулярное клонирование. Последовательности ДНК хромобелков (gfasCP [10], spisCP [10], anm2CP [11], Ultramarine [12]) были синтезированы компанией “Synbio Technologies” (Китай) и клонированы в вектор pET29a (NdeI/Sall) (плазмида любезно предоставлена И.Э. Грановским, Пушкинский научный центр биологических исследований РАН). Конструкция pTR23U-22b была получена на основе конструкции pTR23K, созданной в работе [13] (на основе вектора pET-22b, плазмида любезно предоставлена И. Э. Грановским): ген акцепторного хромобелка KFP [14] замещен на ген акцепторного белка Ultramarine [12] NcoI/Sall.

Экспрессия в *Escherichia coli*, выделение и очистка белков из клеточного лизата. Экспрессию хромобелков и биосенсора проводили в клетках *E.coli* BL21(DE3). Штамм впервые получен в работе [15] и был любезно предоставлен Ивашиной Т.В. (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН). По окончании экспрессии клетки осаждали центрифугированием при 5000 g на центрифуге (Optima XPN-100 Ultracentrifuge, “Beckman Coulter”, Германия), разрушали с помощью ультразвука и отеляли лизат с целевым белком центрифугированием при 15000 g (Optima XPN-100 Ultracentrifuge, “Beckman Coulter”, Германия). Очистку хромобелков и биосенсора проводили хроматографическими методами, как описано для флуоресцентного белка SAASoti [16]. Для нового биосенсора подобраны время и температура инкубации клеток *E. coli* после добавления индуктора транскрипции изопропил-β-тиогаалактозида (ИПТГ): 20 ч при 20°C и 4 ч при 37°C.

Определение олигомерного состояния. Определение олигомерного состояния проводили методом гель-фильтрации на носителе Superdex 200 100/20 GL, (“GE Healthcare”, Германия), как описано ранее [17] с использованием метода динамического рассеяния света (ДРС) на анализаторе молекулярной массы и размера частиц DynaPro Titan (“Wyatt Technology Corporation”, США) при 25°C в 20 mM Tris-HCl/150 mM NaCl, pH 7.4 при лазерном освещении 800 нм в кварцевой кювете 1.5 мм (“Hellma”, Германия).

Измерение спектральных характеристик. Спектры поглощения хромобелков и биосенсора регистрировали на спектрофотометре Cary 60 (“Agilent”, США) при постоянной температуре 22°C в кварцевой кювете 3 мм (“Hellma”, Германия) в буфере 20 mM Tris-HCl с 150 mM NaCl, pH 7.4.

Спектры испускания флуоресценции регистрировали на флуоресцентном спектрофотометре Cary Eclipse (“Varian”, США) при комнатной тем-

пературе в кварцевой кювете диаметром 3 мм (“Hellma”) в 20 mM Tris-HCl буфере с 150 mM NaCl, pH 7.4.

Определение эффективности гидролиза белка слияния TR-23-U каспазой-3. Гидролиз сенсора TR-23-U ферментом каспазой-3 PorcCasp3 WT (любезно предоставлен И.Э. Грановским) в 20 mM HEPES буфере, pH 7.4, с 2 mM ЭДТА, 0.1%-ным CHAPS, 5 mM ДТТ, 1 мг/мл БСА при 37°C в течение ночи.

Регистрация времени жизни флуоресценции. Время жизни флуоресценции TagRFP регистрировали с помощью флуоресцентного спектрометра FluoTime 200 (“PicoQuant”, Германия) и анализировали с помощью программного обеспечения FluoFit 4.2 (“PicoQuant”, Германия).

Определение кинетик фотоактивации флуоресценции. Фотоактивацию флуоресценции регистрировали для растворов белков с оптической плотностью 0.1 в максимуме поглощения в буфере 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) с 150 mM NaCl с помощью установки, собранной из спектрометра Spectra-Cluster (Россия) и источника света Spectra X LED (“Lumencor”, США) в термостатируемой (25°C) микрокювете (“Hellma”, Германия), оптический путь 3 × 3 мм. Возбуждение флуоресценции проводилось на длине волны 550 ± 15 нм мощностью 0.5 мВт/см². Интенсивность флуоресценции регистрировалась для KFP при длине волны 600 нм [14], для Ultramarine – при 626 нм [12], anm2CP – при 597 нм [11], gfasCP и spisCP максимум флуоресценции не определен [10] и в эксперименте их флуоресценция полностью отсутствовала на длинах волн от 580 до 630 нм.

Расчет интегралов перекрытия и ферстеровских радиусов. Интегралы перекрытия были рассчитаны с использованием программного обеспечения aJe – UV-Vis-IR Spectral Software 2.2 (FluorTools, www.fluortools.com) согласно формуле (1).

$$J(\lambda) \equiv \int_0^{\infty} \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 F_D(\lambda) d\lambda. \tag{1}$$

Ферстеровские радиусы вычислялись по формуле (2):

$$R_0 = 0.211 \left[\frac{\kappa^2 \Phi_D J(\lambda)}{n^4} \right]^{1/6}, \tag{2}$$

где κ² – коэффициент, описывающий взаимную ориентацию дипольных моментов переходов донора и акцептора, и равный 2/3 для свободно вращающихся диполей; Φ_D – квантовый выход флуоресценции донора в отсутствие акцептора (Φ_D (TagRFP) = 0.48); J(λ) – интеграл перекрытия нормированных спектров флуоресценции донора

Таблица 1. Спектральные и физико-химические характеристики хромобелков согласно литературным источникам

Хромобелок	Олигомерное состояние*	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$	$\epsilon, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
Ultramarine	Мономер	586/626 (QY = 0.001)	64000
gfasCP	Тетрамер	580/н.о.	205000
anm2CP	Мономер	566/н.о.	120000
spisCP	Тетрамер	564/н.о.	61000

Таблица 2. Теоретические значения интегралов перекрытия $J(\lambda)$ и ферстеровских радиусов R_0 для пар TagRFP-хромобелок

Параметр	FRET-пара			
	TagRFP-Ultramarine	TagRFP-gfasCP	TagRFP-anm2CP	TagRFP-spisCP
$J(\lambda), \text{nm}^4/\text{M cm}$	4.511×10^{15}	1.208×10^{16}	6.233×10^{15}	2.537×10^{15}
$R_0, \text{\AA}$	59	69	62	53

и поглощения акцептора; n – показатель преломления растворителя (для воды он равен 1.33).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания пары “красный флуоресцентный белок–хромобелок” необходимо выбрать пару с максимальным перекрытием спектров эмиссии флуоресценции донора и поглощения акцептора. В качестве донора был выбран яркий красный флуоресцентный белок TagRFP [18] (молекулярная яркость – 48000), который уже успешно применялся в качестве донора во FRET-сенсорах [13, 19]. На роль нового нефлуоресцирующего акцептора были отобраны несколько хромобелков с высокими значениями коэффициентов молярного поглощения: Ultramarine [12], anm2CP [11], gfasCP [10], spisCP [10], спектральные и физико-химические характеристики которых приведены в табл. 1.

Для выбранных хромобелков были рассчитаны значения интегралов перекрытия $J(\lambda)$ их спектров поглощения со спектром эмиссии флуоресценции красного белка TagRFP, количественно демонстрирующие потенциальную эффективность переноса энергии в этих парах. Также для полученных пар рассчитаны ферстеровские радиусы (R_0), показывающие расстояние, на котором эффективность переноса энергии будет составлять 50% (табл. 2).

Все 4 FRET-пары имели высокие значения интегралов перекрытия и ферстеровских радиусов, что делает их перспективными кандидатами для создания FRET-сенсоров. Также экспериментально показано, что выбранные хромобелки не флуоресцируют при возбуждении мощными световыми потоками на длине волны 530 нм, в отличие от ранее применявшегося во FRET-сенсоре с TagRFP белка KFP (рис. 1) [14]. Таким образом,

еще одним преимуществом новых FRET-пар является отсутствие фоновой флуоресценции акцептора.

Все 4 хромобелка были экспрессированы в клетках *E. coli*, очищены, и их олигомерное состояние охарактеризовано методами гель-фильтрации (ГФ) и динамического рассеяния света (ДРС). Полученные результаты отличались от данных, приведенных в литературных источниках: anm2CP присутствовал в растворе в димерной форме с примесью тетрамерной фракции, белки gfasCP и spisCP имели только димерную форму, Ultramarine – мономерную (табл. 3). При очистке хромобелков хроматографическими методами было замечено, что их связывание с носителями отличалось

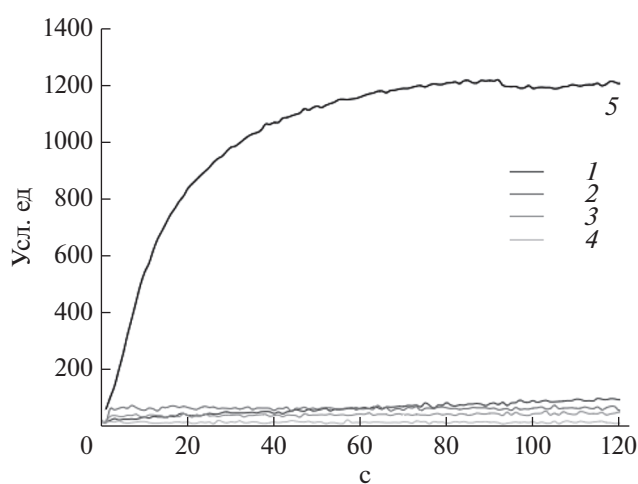


Рис. 1. Кинетические кривые фотоактивации флуоресценции (усл. ед.) хромобелков при облучении их светом с длиной волны 530 нм (мощность 0.5 Вт/см^2): 1 – Ultramarine, 2 – anm2CP, 3 – gfasCP, 4 – spisCP, 5 – KFP.

Таблица 3. Результаты характеристики олигомерного состояния хромобелков методами ГФ на носителе Superdex 200 и ДРС

Белок	$V_{эл}$, мл	Мм (ГФ), кДа	R , нм	Мм (ДРС), кДа
Ultramarine	17.35	11	2.2	20
gfasCP	15.04	42	3.4	58
spisCP	15.40	34	3.1	47
anm2CP	15.04	42	4.0	89
	12.94	144		

от других GFP-подобных белков: с гидрофобным носителем связывание слабее, в то время как с анионообменным сильнее. Поскольку при гель-фильтрации могут быть слабые ионные и гидрофобные взаимодействия, то при определении молекулярной массы такие данные представляются менее достоверными, чем результаты, полученные методом ДРС. Однако данные ДРС в достаточной степени согласовывались с результатами гель-фильтрации, указывая на одинаковое олигомерное состояние выделенных хромобелков. Отличие полученных результатов от литературных данных может быть связано с различием методов, использованных для определения олигомерного состояния и концентраций белковых растворов. Для gfasCP и spisCP в работе [10] олигомерность была определена методом электрофореза в полунативных условиях [20]. Для anm2CP использовалась гель-фильтрация, однако, отличался носитель.

В первую очередь, был получен FRET-сенсор на основе мономерных белков TagRFP-23-Ultramarine (TR-23-U), в котором 23 обозначает гибкий линкер из 23 аминокислот, содержащий сайт распознавания каспазы-3 DEVD [13].

Подобраны условия оптимальной экспрессии и созревания (фолдинга и формирования хромосома) обоих белков в сенсоре. После добавления индуктора ИПТГ клетки *E. coli*, экспрессирующие сенсор, инкубировали в среде LB при 20°C в течение 20 ч для созревания TagRFP, а затем при 37°C в течение 4 ч для созревания Ultramarine. Сенсор был выделен и очищен последовательно проведенными гидрофобной и анионообменной хроматографиями, как описано ранее [16]. На этапе гидрофобной хроматографии было отмечено разделение образца на две фракции (рис. 2а), при элюировании которых обнаружено, что в первой фракции отсутствовало поглощение, соответствующее белку Ultramarine (586 нм). На спектрах поглощения фракций также видно, что у фракции 1 присутствовало плечо на 586 нм, а у фракции 2 оно отсутствовало (рис. 2б). Таким образом, метод гидрофобной хроматографии позволил отделить сенсор с созревшим белком Ultramarine от его фракций с незрелым.

Методами гель-фильтрации и ДРС показано, что химерный белок ведет себя в растворе как димер (ГФ: $V_{эл} = 15.5$ мл, Мм = 32 кДа, ДРС: $R = 2.8 \pm 0.2$ нм, Мм = 37 ± 8 кДа), следовательно оба белка в сенсоре находятся в мономерном состоянии и сам сенсор можно охарактеризовать как мономерный.

Свойства нового белка слияния в качестве FRET-сенсора были подтверждены на основании измерений времени жизни и интенсивности флуоресценции TagRFP до и после инкубации сенсора с каспазой-3 *in vitro*. Сенсор инкубировали с каспазой-3 в буфере (20 мМ HEPES, pH 7.4, 2 мМ ЭДТА, 0.1%-ный CHAPS, 5 мМ дитиотреитол; 1 мг/мл БСА) в течение ночи для измерения максимального динамического диапазона флуоресцентного ответа сенсора при 37°C. После инкубации интенсивность флуоресценции TagRFP возросла более чем в 2 раза (рис. 3), что свидетельствовало об эффективном гидролизе сенсора каспазой-3.

Для характеристики активности каспазы-3 на клетках млекопитающих более показательным параметром является время жизни флуоресценции донора, поскольку этот параметр не зависит от концентрации белка. Время жизни TagRFP в сенсоре TR-23-U описывается биэкспоненциальной зависимостью (3):

$$I = I_1 \exp(-t/\tau_1) - I_2 \exp(-t/\tau_2) + c, \quad (3)$$

где I_1, I_2 – предэкспоненциальные коэффициенты, характеризующие соотношение фракций сенсора с τ_1 и τ_2 ; $\tau_1 = 2.4$ нс соответствует времени жизни флуоресценции свободного TagRFP, $\tau_2 = 1.1$ нс характеризует TagRFP в паре с акцептором Ultramarine, поскольку наличие FRET снижает время жизни [19]; c – фоновый сигнал, включающий остаточную флуоресценцию.

Наличие долгоживущей компоненты для TR-23-U может свидетельствовать о наличии белковой конформации сенсора с минимальным FRET. Значения параметров, измеренные до и после инкубации с каспазой-3 представлены в табл. 4. Соотношение времени жизни свободного TagRFP и TagRFP-23-Ultramarine, в котором есть FRET, после ночной инкубации с каспазой-3 изменилось более чем в 5.8 раза (табл. 4), а значение

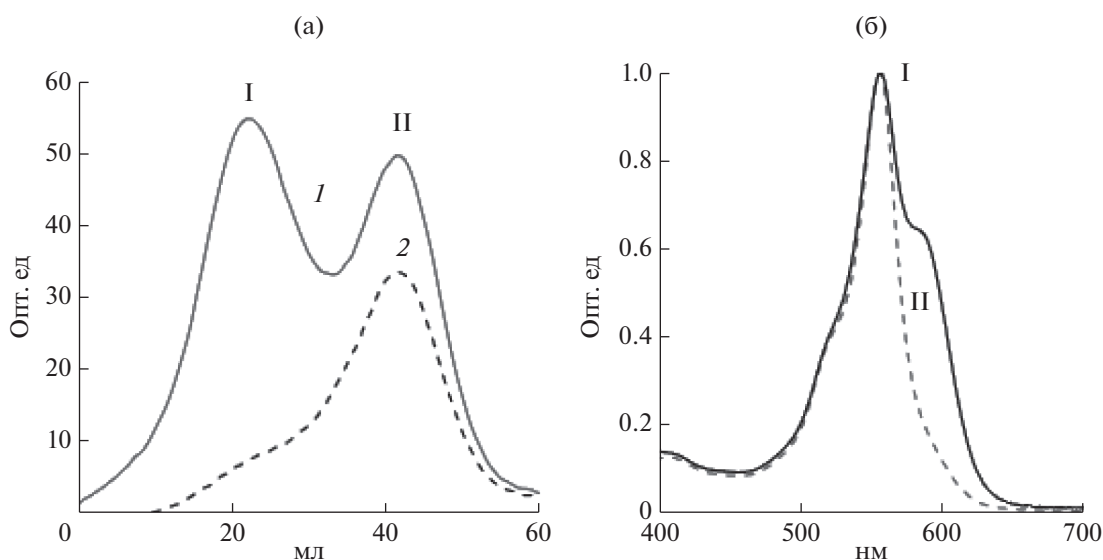


Рис. 2. Профили элюирования сенсора TR-23-U при гидрофобной хроматографии (а): 1 – профиль элюирования при 586 нм, 2 – при длине волны 556 нм. Спектры поглощения, соответствующие собранным фракциям (б): I и II.

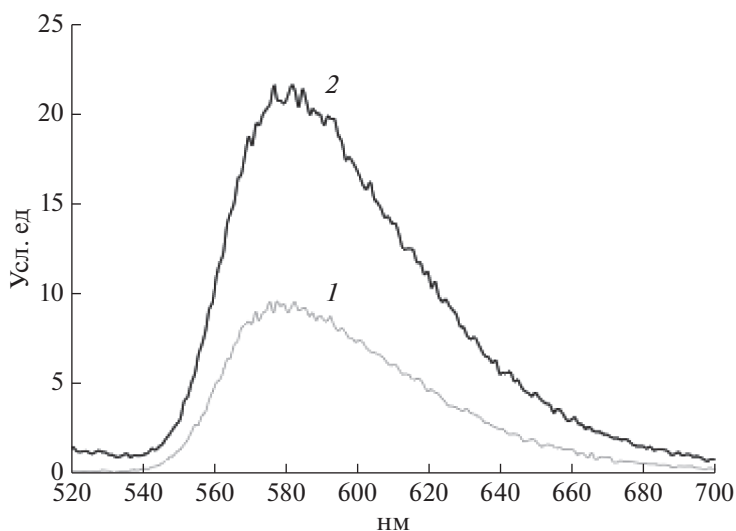


Рис. 3. Спектры эмиссии флуоресценции TagRFP (интенсивность флуоресценции, усл. ед.) в сенсоре TR-23-U до и после инкубации с каспазой-3 в течение ночи: 1 – спектр флуоресценции TagRFP до инкубации с каспазой-3, 2 – после инкубации.

I_2 до и после, что соответствует фракции с высоким FRET, уменьшилось в 7 раз.

Таким образом, были экспрессированы и выделены четыре хромобелка: Ultramarine, gfasCP, anm2CP, spisCP, имеющие высокие значения интегралов перекрывания и ферстеровских радиу-

сов с красным флуоресцентным белком TagRFP. Методами ГФ и ДРС показано, что Ultramarine является мономерным белком, gfasCP и spisCP – димерными, а anm2CP димерным с примесью более крупных агрегатов. На основе белков TagRFP и Ultramarine создан FRET-сенсор TagRFP-23-U1-

Таблица 4. Параметры времени жизни флуоресценции белка TagRFP в сенсоре TR-23-U до и после инкубации с каспазой-3

Условия	I_1	τ_1 , нс	I_2	τ_2 , нс	I_1/I_2
До инкубации	17200	2.4	30200	1.1	0.57
После инкубации	14400	2.4	4300	1.1	3.35

tramarine, содержащий в линкере сайт узнавания каспазы-3. Показано, что сенсор является мономерным. Также новый сенсор является субстратом каспазы-3. После инкубации интенсивность флуоресценции TagRFP увеличилась более чем в 2 раза, а соотношение времен жизни флуоресценции свободного и связанного TagRFP изменялось в 5.8 раз в сторону свободного TagRFP. Возрастание этих двух показателей говорит о нарушении FRET между TagRFP и Ultramarine, то есть об эффективном расщеплении сенсора каспазой-3, что позволит применить новый белок слияния TR-23-U в качестве FRET-сенсора на каспазу-3 для детекции ранних стадий апоптоза.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (Грант № 19-54-06008 МНТИ_a)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Turk B. // Nature Reviews Drug Discovery. 2006. V. 5. № 9. P. 785–799.
2. McIntosh A., Meikle L.M., Ormsby M.J., McCormick B.A., Christie J.M., Brewer J.M., Roberts M., Wall D.M. // Infect. Immun. 2017. V. 85. P. e00393-17.
3. Suresh K., Carino K., Johnston L., Servinsky L., Machamer C.E., Todd K. et al. // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2019. V. 316. P. 1118–1126.
4. Piston D.W. // Trends in Biochemical Sciences, 2007. V. 32. № 9. P. 407–414.
5. Rajoria S., Zhao L., Intes X., Barroso M. // Curr. Mol. Imaging. Bentham Science Publishers Ltd. 2014. V. 3. № 2. P. 144–161.
6. Förster T. // Annalen der Physik. 1948. V. 6. P. 55–75.
7. Lin M.Z., McKeown M.R., Ng H., Leung A., Todd A., Shaner N.C. et al. // Chem. Biol. Cell Press, 2009. V. 16. № 11. P. 1169–1179.
8. Bastiaens P.I.H., Squire A. // Trends Cell Biol. Elsevier Current Trends, 1999. V. 9. № 2. P. 48–52.
9. Goryashchenko A.S., Khrenova M.G., Savitsky A.P. // Methods Appl. Fluoresc. 2017. V. 6. № 2. P. 022001.
10. Alieva N., Konzen K., Field S., Meleshkevitch E., Hunt M., Beltran-Ramirez V. et al. // PLoS One. 2008. V. 3. № 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002680>
11. Shagin D., Barsova E., Yanushevich Y., Fradkov A., Lukyanov K., Labas Y. et al. // Mol. Biol. Evol. 2004. V. 21. № 5. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh079>
12. Pettikiriarachchi A., Gong L., Perugini M.A., Devenish R.J., Prescott M. // PLoS One. 2012. V. 7. № 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041028>
13. Savitsky A.P., Rusanov A.L., Zherdeva V.V., Gorodnicheva T.V., Khrenova M.G., Nemukhin A.V. // Theranostics. 2012. V. 2. № 2. P. 215–226.
14. Grigorenko B., Savitsky A., Topol I., Burt S., Nemukhin A. // J. Phys. Chem. B. 2006. V. 110. P. 18635–18640.
15. Studier W.F., Moffat B.A. // J. Molecular Biology, 1986. V. 1. № 189. P. 113–130.
16. Gavshina A.V., Marynich N.K., Khrenova M.G., Solovyev I.D., Savitsky A.P. // Sci. Rep. Nature Publishing Group UK, 2021. V. 11. № 1. P. 1–11.
17. Solovyev I.D., Gavshina A.V., Katti A.S., Chizhik A.I., Vinokurov L.M., Lapshin et al. // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. P. 1–14.
18. Merzlyak E., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M., Shcheglov A., Fradkov A. et al. // Nat. Methods. 2007. V. 4. № 7. P. 555–557.
19. Rusanov A., Ivashina T., Vinokurov L., Fiks I., Orlova A., Turchin I., Meerovich I., Zherdeva V., Savitsky A. // J. Biophotonics. 2010. V. 3. № 12. P. 774–783.
20. Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2000. V. 97. P. 11984–11989.

New Fret-pairs of Fluorescent Proteins for *in vitro* Caspase Activity Determination

N. K. Marynich^a, I. E. Granovsky^{a, b}, and A. P. Savitsky^{a, *}

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

^b Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Puschino Moscow region, 142290 Russia

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

In this work, the overlap integrals of new pairs of the red fluorescent protein TagRFP with chromoproteins were calculated. Monomeric sensor TagRFP-23-Ultramarine (TR-23-U) was obtained. Gel filtration and dynamic light scattering methods confirmed the monomeric state of the Ultramarine protein and the TR-23-U sensor. Incubation with caspase-3 showed the possibility of using a new fusion protein as a FRET sensor for apoptosis detection.

Keywords: fluorescent proteins, chromoproteins, FRET-sensors, apoptosis, caspase-3

УДК 577.145.622+577.27+615.37

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ИЗ ПРОКАРИОТ. I. РОЛЬ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА БЕЛКА В ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ УРИДИНФОСФОРИЛАЗ

© 2022 г. В. П. Вейко^{1, 2, *}, А. Н. Антипов¹, Н. Н. Мордкович¹, Н. А. Окорокова¹,
Т. Н. Сафонова¹, К. М. Поляков³

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

²Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: vladveiko@yahoo.com

Поступила в редакцию 09.06.2022 г.

После доработки 23.06.2022 г.

Принята к публикации 04.07.2022 г.

Методом сайт-направленного мутагенеза сконструированы мутантные гены уридинфосфоорилазы (SoUDP) из *Shewanella oneidensis* MR-1 и на основе клеток *Escherichia coli* получены штаммы-продуценты соответствующих рекомбинантных (F5I и F5G) белков. Белки очищены и изучены их физико-химические и ферментативные свойства. Показано, что N-концевой фрагмент уридинфосфоорилазы выполняет важную роль в термостабилизации фермента в целом. Выявлена роль аминокислотного остатка фенилаланина (F5) в формировании термотолерантности уридинфосфоорилаз из гамма-протеобактерий.

Ключевые слова: нуклеозидфосфоорилаза, сайт-направленный мутагенез, термостабильность, *Shewanella oneidensis* MR-1

DOI: 10.31857/S0555109922060150

Термостабильность белковых структур подразумевает сохранение способности к неискаженному выполнению их основных природных функций при повышенных (часто непермиссивных для организма или микроорганизма-хозяина) температурах. В случае ферментов, этим функциональным признаком является сохранение структуры его активного центра в неизменном (в пределах допустимого для проявления функциональной активности) виде или способности к быстрому восстановлению белком своей ферментативной активности при возвращении его в “стандартные” буферные, субстратные и температурные условия. Следует отметить, что термостабильность ферментов не всегда сопровождается значительным увеличением температурного оптимума ($T_{\text{опт}}$) функционирования этих белков [1]. Более того, само значение $T_{\text{опт}}$ не может служить надежным признаком, указывающим на термостабильность самой белковой молекулы в целом [1, 2]. В цитируемых работах справедливо утверждается, что в настоящее время развитие математических методов надежного предсказания $T_{\text{опт}}$ и термостабильности существенно лимитируется отсутствием данных о

свойствах мутантных форм одного и того же класса белков.

Действительно, если кратко суммировать расчетные методические подходы к исследованиям термостабильности белков, то можно выделить следующие направления, в числе которых, безусловно, доминируют чисто теоретические:

– разработка компьютерных алгоритмов, анализирующих, в аспекте термостабильности, гидрофобные и электростатические взаимодействия как в самих белках, так и взаимодействия белка с компонентами буферных систем, в которых они находятся [3–6];

– создание компьютерных алгоритмов, анализирующих физико-химические причины проявления термостабильности у белков [7, 8];

– сравнение первичных структур белков из мезофильных и термофильных микроорганизмов с целью определения закономерностей формирования термостабильных белковых структур [9–11] и роли в этом процессе отдельных аминокислотных остатков.

Обозначенные выше подходы математического анализа белковых структур с целью предска-

ния и искусственного повышения их термостабильности достаточно полно представлены в обзорах [11–16].

Однако предсказательный потенциал этих алгоритмов всякий раз необходимо проверять с помощью широкого спектра достаточно трудоемких экспериментальных подходов (включая и сравнительный рентгеноструктурный анализ исходных и мутантных форм белков), что приводит к определенным ограничениям этой важной информации в научной литературе. В связи с вышесказанным, для исследования принципов формирования термостабильных белков важно выбрать полипептиды одного класса и, с помощью введения отдельных аминокислотных замен (точечные мутации) или протяженных белковых фрагментов (гибридные белки), выявить вклад этих изменений в придании белкам устойчивости к температурному воздействию.

В качестве таких белков в данном исследовании были выбраны нуклеозидфосфоорилазы (NP) – ферменты катаболизма нуклеозидов, осуществляющие фосфорилиз нуклеозидов до рибозо-(дезоксирибозо)-1-фосфата и соответствующего гетероциклического основания [17]. NP обнаруживаются в клетках практически всех организмов и являются объектом достаточно пристального внимания исследователей что обусловлено, по крайней мере, двумя причинами:

– выяснением роли этих ферментов в генезисе, развитии и протекании различных патологических процессов в клетках млекопитающих (онкология, ревматоидный артрит, подагра, остеоартроз, системная склеродермия и др.) [18–22];

– высоким биотехнологическим потенциалом NP при ферментативном синтезе производных нуклеозидов, применяющихся в практической медицине (противоопухолевые и противовирусные агенты, ингибиторы репликации клеточной ДНК и т.д.) [23–28].

В настоящее время клонировано множество генов NP из различных (включая и экстремофильные) прокариотических микроорганизмов, определены их первичные и пространственные структуры, а также исследованы ферментативные и физико-химические свойства соответствующих белков [29–37].

Этот факт открывает новые возможности в систематическом анализе полученных ранее экспериментальных данных при выяснении роли отдельных аминокислотных остатков (а.о.) и протяженных участков полипептидной цепи как в функционировании самих ферментов, так и формировании признака термотолерантности у этого класса белков.

Цель работы – исследование роли N-концевой части белка и, в частности, высоконсервативного остатка фенилаланина (F5) у уридинфосфоорилаз

из мезофильных микроорганизмов в формировании термостабильных форм этих ферментов.

МЕТОДИКА

В работе использовали: трис-гидрохлорид (трис-HCl), трис-основание (трис-OH), ДДС-Na, агарозу (Type I, Low EEO), ЭДТА, борную кислоту – (“Sigma”, США), бромистый этидий, аммония персульфат, N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин – “Fluka” (Швейцария). N,N'-метилен-бис-акриламид, акриламид – “Serva” (Германия), триптон, агар-агар и дрожжевой экстракт “Bacto” – “Difco” (США), ампициллин (“Appli-Chem”, Германия). Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP) и белковые маркеры молекулярной массы “Unstained Protein Molecular Weight Marker” фирмы “MBI Fermentas” (Литва). Неорганические соли – фирмы “Merck” (Германия), а также реактивы квалификации х. ч. и о. с. ч. (Россия).

Выделение ДНК, очистку, гидролиз эндонуклеазами рестрикции, лигирование фрагментов ДНК, а также трансформацию клеток *E. coli* плазмидами проводили согласно [38].

Taq-полимеразу и ДНК-лигазу фага T4 производства “MBI Fermentas” (Литва) использовали в соответствии с рекомендациями фирм-производителей.

Штаммы *E. coli* JM110 и C600Δ*udpRecA*-(*thrB leuB lacY supE tonA recA Tn10*) предоставлены Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов (НИЦ “Курчатовский институт”-ГосНИИгенетика”, Россия).

Источником рекомбинантной SoUDP из *S. oneidensis* MR-1 служил полученный нами ранее штамм-продукт этого фермента [39].

При конструировании мутантных форм гена *udp* в качестве матричной ДНК использовали бактериальный вектор pSUDP [39], содержащий в своем составе полноразмерный ген *udp* из *S. oneidensis* MR-1. После проведения, согласно [40–42], сайт-направленного мутагенеза, гены мутантных форм *udp* клонировали в составе плазмидного вектора pTZ57R/T (“Thermo Scientific”, Литва).

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов и сквенс ДНК проводился фирмой “Синтол” (Россия) на коммерческой основе. Структуры использованных в работе олигодезоксирибонуклеотидов приведены в табл. 1.

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе “Eppendorf Mastercycler gradient” (“Eppendorf”, Германия).

Выделение плазмид проводили с использованием набора “GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit” (“MBI Fermentas”, Литва).

Клетки *E. coli*, содержащие плазмиду, культивировали в течение 16–18 ч в стеклянных пробир-

Таблица 1. Структуры синтетических олигодезоксирибонуклеотидов

Наименование	Структура 5'—3'	Функция
F5Ipr	ATGGCTGATGTAATTCATTTAGG	Замена F5I в SoUDP
F5Irev	ССТАААТГААТТАСАТСАГССАТ	
F5Gpr	ATGGCTGATGTAGGCCATTTAGG	Замена F5G в SoUDP
F5Grev	ССТАААТГГССАТТАСАТСАГССАТ	
Shud1	TATAGAGCTCTGGCGTACTCCTTGTCGTC	Аmplификация фрагментов ДНК при мутагенезе
Shud2	TATAGTCGACTTACGCGAGTAATTTCTTAGCT	

ках (или колбах) со средой LB (ампициллин – 150 мкг/мл) при 37°C и 250 об./мин в шейкер-инкубаторе “Excella E25” (“New Brunswick Scientific”, США).

Выделение и очистку рекомбинантных NP и их мутантных форм проводили, как описано нами ранее для SoUDP [39].

Электрофоретическое разделение белков проводили согласно Леммли [43].

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [44] с окраской реагентом “Bio-Rad Protein Assay” (“Bio-Rad”, США). В качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (“Sigma”, США).

Ферментативную активность рекомбинантных SoUDP и ее мутантных форм определяли в К-фосфатном буфере согласно [45, 46].

Численное значение констант Михаэлиса (K_M) по уридину и неорганическому фосфату определяли как описано ранее [42].

Термостабильность белков определяли согласно [1, 47]. В качестве показателя термостабильности использовали T_{50} – значение температуры, при которой наблюдали 50%-ное снижение ферментативной активности белка при указанной температуре [48].

Четвертичную структуру рекомбинантных NP подтверждали методом аналитической гель-фильтрации на колонке Tricorn 10/300 с сорбентом Superdex 200 с использованием прибора АКТА FPLC (“GE Healthcare”, Великобритания) как описано ранее [42]. В качестве белков-маркеров использовали набор “Gel Filtration Calibration Kits” (GE Healthcare Life Sciences”, Великобритания), а также рекомбинантную SoUDP из *S. oneidensis* MR-1 [39].

Первичную структуру выделенных рекомбинантных белков дополнительно подтверждали методом MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометрического анализа их триптических гидролизатов.

Построение пространственных структур осуществляли с использованием программы PyMol (www.pymol.org).

Статистическую обработку результатов серии измерений проводили с использованием программы StatPlus2007 (<http://analystsoft.com>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование природы формирования термостабильных белков в настоящее время является одним из наиболее актуальных направлений биотехнологической инженерии, что обусловлено как стремлением выяснить молекулярные основы формирования и функционирования термотолерантных белков, так и практической целью – применением ферментов для биокатализа при синтезе [32, 49] различных органических соединений (“зеленая химия”), включая и модифицированные нуклеозиды [23, 24, 37, 50]. Использование ферментативного синтеза этих соединений имеет ряд преимуществ по сравнению с химическим вариантом их получения: практически полное исключение токсичных органических реагентов и растворителей, а также высокий уровень стерео- и регио-селективности. Последнее практически недостижимо при химическом синтезе и существенно затрудняет выделение целевого изомера из реакционной смеси.

Для увеличения растворимости исходных соединений и повышения выхода целевого вещества часто требуется проведение ферментативного синтеза при повышенной температуре [28, 51]. Соответственно, сам белок-катализатор должен быть устойчив к воздействию повышенной температуры, что может быть достигнуто внесением в структуру белка-катализатора множественных или точечных аминокислотных замен, улучшающих или даже меняющих его субстратную специфичность [52], а также повышающих его термостабильность [1, 5, 36, 48, 53].

Сравнительный анализ первичных структур UDP из различных микроорганизмов (рис. 1), опирающийся на выравнивание по функциональным участкам, например, PGDP – часть фосфат-связывающего сайта [1, 54] фермента, показал, что в первичной структуре уридинфосфорилаз обнаруживается инвариантный остаток

N-концевая часть	Микроорганизм	GenBank
(a)	MSKSDV FHL GLTKNDLQGATLAI PGDP DRV <i>Escherichia coli</i>	NC_000913
	MSKSDV FHL GLTKNDLQGATLAI PGDP ERV <i>Klebsiella pneumoniae</i>	CDO16248
	MPQSDV FHL GLTKADLQGATLAI PGDP ERV <i>Erwinia pyrifoliae</i>	CAY72523.1
	MADV FHL GLTKAMLDGATLAI PGDP ERV <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	GQ294526
	MSKSDV FHL GLTKNDLQGATLAI PGDP ERV <i>Klebsiella aerogenes</i>	NZ_LR134475
	MSKSDV FHL GLTKNDLQGAQLAI PGDP ERV <i>Salmonella typhimurium</i>	NC_003197.2
	MTKTV FHL GVTEADLNGATLAI PGDP PARV <i>Vibrio cholerae</i>	AKB06100.1
(б)	MSERLKSASRPESEEGRL YHL QVKPGDVSRYILL PGDP DRV <i>Desulfurococcus amylolyticus</i>	AFL66855*
	MER GKRLSSASAPVDESGRV YHL GVKPGDVSRYVLL PGDP GRV <i>Staphylothermus marinus</i>	WP_011838765.1*
	MVKALKSASTPETEEGR QYH LEVKPGDVSRYVLL PGDP GRV <i>Thermosphaera aggregans</i>	WP_013129600.1*
	MYSPPRFMRLLFAFYKAYDKVMEMKFVSADRPQTEEG YQH IACKPGDVARYVLL PGDP ERV <i>Thermococcus barophilus</i>	ALM74274.1*
	MGDESLRSAARPEGEGGL QYH LRVRRGDVARYVLL PGDP ERT <i>Aeropyrum pernix</i>	WP_131160395*
	MPGPRRTGGLAVTGEKVRAREPSGGGL QYH IKCRPGDVAPTLL PGDP ERV <i>Thermofilum pendens</i>	WP_011752903*

Рис. 1. Функциональное выравнивание первичных структур N-концевых частей уридинфосфорилаз из различных микроорганизмов. Желтым цветом выделен фрагмент полипептидной цепи, принимающий участие в формировании сайта связывания иона неорганического фосфата [1, 42], а красным – инвариантные аминокислотные остатки **FH** и **YH** у уридинфосфорилаз из мезофильных (а) и термофильных (б) микроорганизмов соответственно. (*Термофильные микроорганизмы).

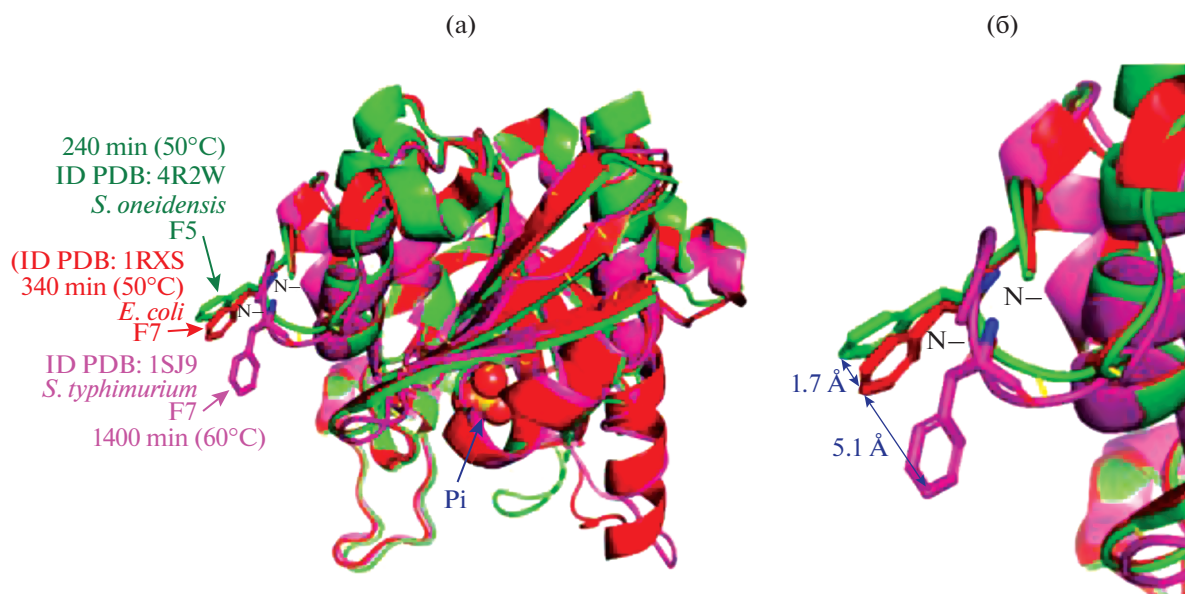


Рис. 2. Совмещение пространственных структур (субъединица А) мономеров UDP (а) из *S. oneidensis* MR-1 (ID PDB: 4R2W, зеленый цвет), *E. coli* (ID PDB: 1RXS, красный цвет), *S. typhimurium* (ID PDB: 1SJ9, бирюзовый цвет). Для ферментов приведены значения времени (T_{50}) их термальной полуинактивации [1]. Pi – ион неорганического фосфата в активном центре фермента. Увеличенное представление пространственного расположения остатков фенилаланина (б). Стрелками указаны взаимные расстояния боковых радикалов.

гистидина, принимающий участие в формировании активного центра фермента [54–56]. Этот остаток локализуется в составе малоструктурированного N-концевого участка полипептидной цепи (рис. 1, рис. 2), которому предшествует также инвариантный у уридинфосфорилаз из мезофилов остаток фенилаланина (рис. 1а, рис. 2). Ранее была исследована роль остатка гистидина (H8) в функционировании UDP из *E. coli* и было обна-

ружено, что замена H8N практически полностью отменяла ферментативную активность этого белка [55]. Эти данные во многом были подтверждены в работе [56].

К сожалению, в настоящее время в научной литературе практически отсутствуют данные по пространственной организации уридинфосфорилаз из термофильных микроорганизмов, что затрудняет прямой сравнительный кристаллографический

анализ структур этих белков в ряду мезофилов – термофилы. Однако, если предположить общность строения активных центров у нуклеозидфосфорилаз [42, 56], то инвариантный остаток гистидина UDP из термофилов (рис. 1б) также может выполнять функцию связывания углеводного остатка нуклеозида в активном центре фермента. Обращает на себя внимание, что в UDP из термофильных микроорганизмов этому остатку (рис. 1б) предшествует существенно более протяженный, по сравнению с уридинфосфорилазами из мезофилов, N-концевой фрагмент полипептидной цепи.

Этот фрагмент может вносить значительную роль в стабилизацию вторичной структуры N-концевого участка полипептидной цепи UDP, обеспечивая устойчивое и наиболее благоприятное для катализа конформационное состояние рассматриваемого остатка гистидина. Такая своеобразная “защитная” функция этого фрагмента полипептидной цепи может проявляться и в повышенной устойчивости уридинфосфорилаз из термофилов при температурном воздействии на них.

Сравнительный анализ первичных структур N-концевых частей UDP из мезофильных и термофильных микроорганизмов (рис. 1) также показывает, что рассматриваемому остатку гистидина у мезофилов предшествует остаток фенилаланина, в то время как у термофилов – остаток тирозина. Учитывая большую гидрофильность остатка тирозина по сравнению с остатком фенилаланина, а также его расположение в непосредственной близости к функционально важному остатку гистидина, можно предположить существенную роль именно этого остатка в придании уридинфосфорилазам термальной устойчивости. Следует также отметить, что, по результатам анализа, проведенном в работе [9], поверхность белков из термофильных микроорганизмов в большей степени, по сравнению с мезофилами, обогащена именно заряженными аминокислотными остатками. Эти данные также привлекали внимание к рассматриваемому гидрофобному остатку фенилаланина, расположенному на поверхности уридинфосфорилаз и осуществляющему прямой контакт с окружающим белок раствором (ID PDB: 4R2W, 1RXS, 1SJ9, 6EYP, 4NY1 и др.).

Высказанные выше предположения о роли структуры N-концевых частей UDP в термальной стабилизации во многом основываются и на ранее полученных и исследованных авторами нуклеозидфосфорилазах, в которых проводились точечные и протяженные аминокислотные замены в составе этого класса гомологичных белков [1, 41]. Анализ суммарных результатов, приведенных в цитируемых работах, показал, что именно структура N-концевых частей нуклеозидфосфо-

рилиз является одним из факторов, во многом определяющим термальную устойчивость у этого класса ферментов.

Кроме того, в работе [1] было обнаружено, что термостабильность (T_{50}) нативных уридинфосфорилаз изменяется в ряду *S. typhimurium* \gg *E. coli* $>$ *S. oneidensis* MR-1. В настоящее время известны рентгеноструктурные данные кристаллических форм указанных UDP, что позволило провести сравнительный анализ их пространственных структур (рис. 2).

Обращает на себя внимание (рис. 2) существенное различие в пространственном расположении остатка фенилаланина в составе N-концевых частей рассматриваемых нуклеозидфосфорилаз. Такого рода локальные изменения расположения остатка фенилаланина могут сказываться на свойствах белка в растворе, в том числе и его термостабильности, что достаточно убедительно отмечалось в обзорной работе [57]. В случае уридинфосфорилаз прослеживается определенная корреляция удельной активности [42] и термостабильности [1] этих ферментов в зависимости от первичной структуры анализируемого фрагмента полипептидной цепи белков (рис. 2).

Вышеуказанный анализ литературных данных предопределил необходимость экспериментального исследования, на примере UDP из *S. oneidensis* MR-1, роли остатка фенилаланина (F5) в термостабилизации бактериальных уридинфосфорилаз.

С этой целью в структурной части гена уридинфосфорилазы из *S. oneidensis* MR-1 методом сайт-направленного мутагенеза [42] с использованием синтетических праймеров (табл. 1) была произведена замена кодона фенилаланина (F5) на кодоны глицина (F5G) и изолейцина (F5I). Выбор типа замещающих аминокислотных остатков был предопределен следующими причинами: остаток изолейцина обладает относительно гидрофобным боковым радикалом, частично моделирующим свойства остатка фенилаланина, несущего ароматический боковой радикал, в то время как остаток глицина вообще лишен бокового радикала.

Полученные мутантные формы гена *udp* были клонированы в составе вектора pTZ57R/T (“Thermo Scientific”, Литва) и нуклеотидную последовательность целевых генов подтверждали сиквенсом. Рекомбинантными плазмидами были трансформированы клетки *E. coli* C600Dudp (см. “Методика”). Оценка накопления мутантных форм UDP проводилась с помощью денатурирующего полиакриламидного гель-электрофореза (рис. 3).

Из рис. 3 следует, что целевые мутантные формы SoUDP в условиях гетерологичной экспрессии накапливаются в клетках *E. coli* в значительном количестве: на электрофорезе они представлены в виде мажорной полосы с примерной молекуляр-

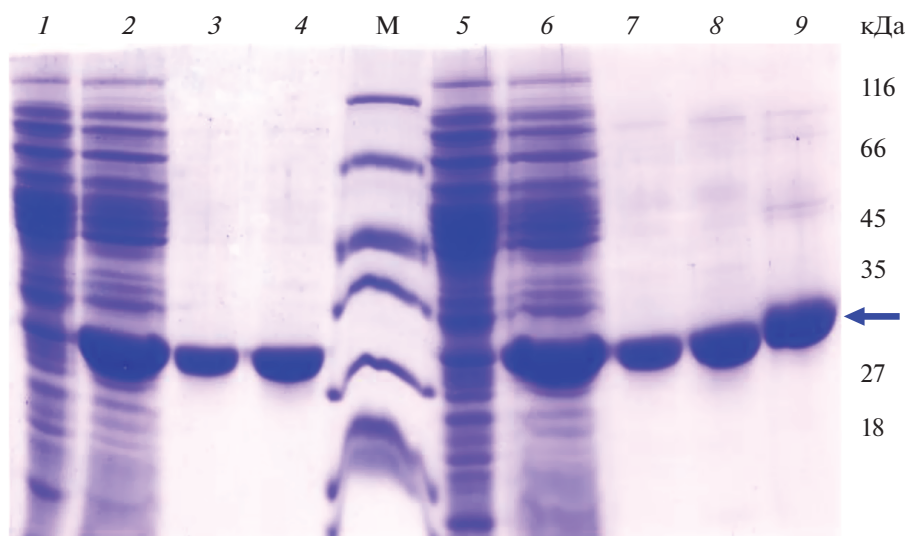


Рис. 3. Электрофоретический анализ рекомбинантных белков в клетках *E. coli* C600Δudr в 12.5%-ном ПААГ с ДСН-*Na*. М – маркеры молекулярной массы белков (116, 66, 45, 35, 27, 18 кДа); 1, 2, 5, 6 – белки растворимых фракций штамма-реципиента и штаммов-продуцентов, полученные после разрушения ультразвуком клеток *E. coli*; 3, 4, 7, 8 – очищенные рекомбинантные ферменты: F5I, F5G, 3 и 5 мкг соответственно; 9 – SoUDP из *S. oneidensis* MR-1, 5 мкг. Целевые рекомбинантные белки обозначены стрелкой.

ной массой 27.5 кДа. Мутантные формы SoUDP выделяли и очищали согласно [39], после чего с помощью ультрафильтрации (мембрана PM30, “Millipore”, США) переводили в 5.0 мМ раствор Трис-НСl, рН 8.0 и хранили при -70°C .

В настоящее время в литературе опубликованы данные по изучению свойств ряда нуклеозидфосфорилаз, включая их термостабильные и мутантные формы [1, 36, 37, 58].

Исследование термостабильности этих белков проводили с использованием не только различных буферных систем, но и часто в присутствии хотя бы одного (например, неорганический фосфат) из субстратов [58, 59]. Однако ранее было показано [1, 60], что в присутствии субстратов происходит термостабилизация нуклеозидфосфорилаз. Более того, присутствие чужеродного белка (например, БСА [60]), также повышает устойчивость нуклеозидфосфорилаз к температурному воздействию. При этом эффективность такой стабилизации малопрогнозируема как для исходной формы исследуемых белков, так и мутантов на их основе. Отдельные аспекты конформационных изменений в бактериальных уридинфосфорилазах при связывании с субстратами описаны нами ранее в работе [61]. Чтобы исключить влияние субстрата на термостабилизацию исследуемых SoUDP и ее мутантных форм (рис. 4) в настоящей работе ферменты инкубировали аналогично [1, 62] в 20 мМ Трис-НСl буфере, рН 8.0.

Приведенные на рис. 2 и 4 результаты свидетельствуют о том, что пространственное расположение бокового радикала остатка фенилаланина

может влиять на конформацию малоструктурированного N-концевого участка в целом, вследствие чего, вероятно, изменяется его доступность для окружающего белок буфера, что и выражается в повышении термостабильности рекомбинантных мутантных форм исследуемой SoUDP. При этом конформационные изменения N-концевого фрагмента могут быть и незначительными, но при этом оказывать существенное влияние на устойчивость белка к термальному воздействию [32, 57].

Четвертичная структура ряда ферментов, включая и нуклеозидфосфорилазы, представлена в растворе в виде гомоолигомеров (димеры, тримеры, гексамеры). Такого рода олигомеризация важна не только для проявления ферментативной активности этих белков, но и для увеличения их термостабильности [6, 63, 64]. В связи с этим, методом аналитической гель-фильтрации было экспериментально подтверждено сохранение мутантными формами SoUDP гексамерной четвертичной структуры (табл. 2).

Обращает на себя внимание (табл. 2) уменьшение сродства (K_M) у мутантных форм уридинфосфорилазы к субстратам по сравнению с исходной формой дикого типа. При этом указанное изменение сопровождалось существенным увеличением термостабильности мутантных белков (табл. 2, рис. 4). Этот факт во многом совпадает со сделанными ранее выводами об определяющей роли архитектурного строения фосфат-связывающей области в приобретении NP термостабильности [1]. В настоящее время получены кристаллические формы исследуемых мутантных белков и прово-

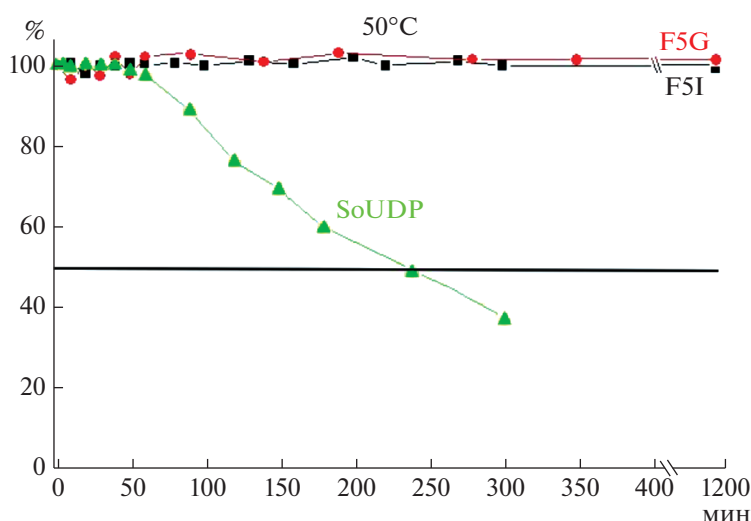


Рис. 4. Сравнительный анализ термостабильности уридинфосфорилазы (%) из *S. oneidensis* MR-1 (SoUDP) и ее мутантных (F5G и F5I) форм. Каждая точка на графике соответствует среднему значению трех независимых экспериментов.

Таблица 2. Сравнительная характеристика свойств SoUDP и ее мутантных форм

Белок	$T_{\text{опт.}}$, °C	T_{50} , 50°C, мин	T_{50} , 60°C, мин	K_M		$V_{\text{вых}}$, мл
				Urd, ммоль	Pi, ммоль	
SoUDP	60 ± 4	240 ± 4	14 ± 2	0.49 ± 0.05	5.5 ± 0.3	13.85 ± 0.05
F5I	58 ± 3	Стабилен 1200 ± 9	15 ± 3	0.77 ± 0.04	9.3 ± 0.2	14.03 ± 0.04
F5G	61 ± 2	Стабилен 1200 ± 10	18 ± 2	0.84 ± 0.08	8.9 ± 0.1	13.98 ± 0.06

дится их рентгеноструктурный анализ, который может существенно прояснить молекулярную природу наблюдаемого явления.

Таким образом, на основании сравнительного анализа литературных данных и полученных в настоящей работе экспериментальных результатов выявлена важная роль, как отдельного аминокислотного остатка F5, так и в целом N-концевого фрагмента полипептида, в формировании термостабильности у уридинфосфорилаз.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мордкович Н.Н., Антипов А.Н., Окорокова Н.А., Сафонова Т.Н., Поляков К.М., Вейко В.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 6. С. 577–586.
2. Pucci F., Dhanani M., Dehouck Y., Rooman M. // PLoS ONE. 2014. V. 9. № 3. e91659. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091659>
3. Xiao L., Honig B. // J. Mol. Biol. 1999. V. 289. № 5. P. 1435–1444.
4. Zhu S., Elcock A. // J. Chem. Theory Computat. 2010. V. 6. № 4. P. 1293–1306.
5. Spector S., Wang M., Carp S.A., Robblee J., Hendsch Z.S., Fairman R., Tidor B., Raleigh D.P. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 872–879.
6. Tanaka Y., Tsumoto K., Yasutake Y., Umetsu M., Yao M., Fukada H., Tanaka I., Kumagai I. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 31. P. 32957–32967.
7. Seeliger D., De Groot B. // Biophys. J. 2010. V. 98. № 10. P. 2309–2316.
8. Dehouck Y., Grosfils A., Folch B., Gilis D., Bogaerts P., Rooman M. // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 19. P. 2537–2543.
9. Szilagyi A., Zavodszky P. // Structure. 2000. V. 8. № 5. P. 493–504.
10. Kumar S., Tsai C., Nussinov R. // Prot. Engineering. 2000. V. 13. № 3. P. 179–191.
11. Grishin D.V., Pokrovskaya M.V., Podobed O.V., Gladilina J.A., Pokrovsky V.S., Aleksandrova S.S., Sokolov N.N. // Biomed. Khim. 2017. V. 63. № 2. P. 124–131.

12. *Matthews B.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1993. V. 62. № 1. P. 139–160.
13. *Scandurra R., Consalvi V., Chiaraluce R., Politi L., Engel P.* // *Biochimie.* 1998. V. 80. № 11. P. 933–941.
14. *Fang X., Huang J., Zhang R., Wang F., Zhang Q., Li G., Yan J., Zhang H., Yan J., Xu L.* // *J. Chem. Inf. Model.* 2019. V. 59. № 11. P. 4833–4843.
15. *Modarres H.P., Mofrad M.R., Sanati-Nezhad A.* // *PLoS ONE.* 2018. V. 13. № 1. e0191222. doi.org: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191222>
16. *Xu Z., Cen Y.K., Zou S.P., Xue Y.P., Zheng Y.G.* // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2020. V. 40. № 1. P. 83–98.
17. *Hammer-Jespersen K.* // *Metabolism of Nucleotides, Nucleosides and Nucleobases in Microorganisms* / Ed. A. Munch-Petersen London, N.Y., San Francisco: Acad. Press, 1983. P. 203–258.
18. *Liekens S., De Clercq E., Neyts J.* // *Biochem. Pharmacol.* 2001. V. 61. № 3. P. 253–270.
19. *Carmeliet P.* // *Nature.* 2005. V. 438. № 7070. P. 932–936.
20. *Furukawa T., Tabata S., Yamamoto M., Kawahara K., Shinsato Y., Minami K., Shimokawa M., Akiyama S.* // *Pharmacol. Res.* 2018. V. 132. P. 15–20.
21. *Yan R., Wan L., Pizzorno G., Cao D.* // *Front. Biosci.* 2006. V. 11. P. 2759–2766.
22. *Yu E.J., Lee Y., Rha S.Y., Kim T.S., Chung H.C., Oh B.K. et al.* // *Mol. Cancer Res.* 2008. V. 6. № 10. P. 1554–1556.
23. *Михайлопуло И.А., Мирошников А.И.* // *Acta Naturae.* 2010. T. 2. № 2. С. 38–61.
24. *Gordon G.E.R., Visser D.F., Brady D., Raseroka N., Bode M.L.* // *J. Biotechnol.* 2011. V. 151. № 1. P. 108–113.
25. *Hori N., Watanabe M., Yamazaki Y., Mikami Y.* // *Agr. Biol. Chem.* 1989. V. 53. № 1. P. 197–202.
26. *Luo W., Liu Y., Zhu X., Zhao W., Huang L., Cai J., Xu Z., Cen P.* // *Zyyme Microb. Tech.* 2011. V. 48. № 6–7. P. 438–444.
27. *Zhu S., Ren L., Wang J., Zheng G., Tang P.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012. V. 22. № 5. P. 2102–2104.
28. *Zhu S., Song D., Gong C., Tang P., Li X., Wang J., Zheng G.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 97. P. 6769–6778.
29. *Kumar S., Nussinov R.* // *Cell. Mol. Life Sci.* 2011. V. 58. P. 1216–1233.
30. *Karshikoff A., Ladenshtein R.* // *Prot. Engineering.* 1998. V. 11. № 10. P. 867–872.
31. *Gianese G., Bossa F., Pascarella S.* // *Proteins.* 2002. V. 47. P. 236–249.
32. *Vieille C., Zeikus G.J.* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001. V. 65. P. 1–43.
33. *Brock T.D.* // *Science.* 1967. V. 158. P. 1012–1019.
34. *Trivedi S., Gehlot H.S., Rao S.R.* // *Gen. Mol. Res.* 2006. V. 5. № 4. P. 816–827.
35. *Sawle L., Ghosh K.* // *Biophys. J.* 2011. V. 101. P. 217–227.
36. *Visser D.F., Hennessy F., Rashamuse J., Pletschke B., Brady D.* // *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 2011. V. 68. P. 279–285.
37. *Kamel S., Thiele I., Neubauer P., Wagner S.A.* // *BBA Prot. Proteom.* 2020. V. 1868. № 2. 140304. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140304>
38. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 545 p.
39. *Мордкович Н.Н., Манувера В.А., Вейко В.П., Дебабов В.Г.* // *Биотехнология.* 2012. № 1. С. 21–30.
40. *Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R.* // *Gene.* 1989. V. 77. № 1. P. 51–59.
41. *Чеботаев Д.В., Гулько Л.Б., Вейко В.П.* // *Биоорганическая химия.* 2001. T. 27. № 3. С. 184–190.
42. *Мордкович Н.Н., Сафонова Т.Н., Антипов А.Н., Манувера В.А., Поляков К.М., Огорокова Н.А., Вейко В.П.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2018. T. 54. № 1. С. 16–25.
43. *Laemmli U.K.* // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
44. *Bradford M.M.* // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
45. *Вейко В.П., Супрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Андрияшина Р.В., Дебабов В.Г.* // *Биотехнология.* 1994. № 4. С. 2–4.
46. *Leer J.C., Hammer-Jespersen K., Schwartz M.* // *Eur. J. Biochem.* 1977. V. 75. № 1. P. 217–24.
47. *Cacciapuoti G., Bertoldo C., Brio A., Zappia V., Porcelli M.* // *Extremophiles.* 2003. V. 7. P. 159–168.
48. *Mansfeld J., Vriend G., Dijkstra B.W., Veltman O.R., Van den Burg B., Venema G. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 17. P. 11152–11156.
49. *Straathof A.J.J., Panke S., Schmid A.* // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002. V. 13. № 6. P. 548–556.
50. *Li N., Smith T.J., Zong M.H.* // *Biotechnol. Adv.* 2010. V. 28. № 3. P. 348–366.
51. *Yeoman C.J., Han Y., Dodd D., Schroeder C.M., Mackie R.I., Cann I.K.O.* // *Adv. Appl. Microbiol.* 2010. V. 70. P. 1–55.
52. *Han R., Liu L., Shin H.D., Chen R.R., Li J., Du G., Chend J.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. № 24. P. 7562–7568.
53. *Reetz M.T., Carballeira J.D., Vogel A.* // *Angew. Chem. Int.* 2006. V. 45. № 46. P. 7745–7751.
54. *Safonova T.N., Mikhailov S.N., Veiko V.P., Mordkovich N.N., Manuvera V.A., Alekseev C.S. et al.* // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2014. V. 70. № 12. P. 3310–3319.
55. *Вейко В.П., Супрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б.* // *Биоорганическая химия.* 1995. T. 21. № 11. С. 834–837.
56. *Oliva I., Zuffi G., Barile D., Orsini G., Tonon G., De Gioias L., Ghisotti D.* // *J. Biochem.* 2004. V. 135. № 4. P. 495–499.
57. *Koshland E.D.* // *Nat. Med.* 1998. V. 4. № 10. P. 1112–1114.
58. *Szeker K., Zhou X., Schwab T., Casanuevas A., Cowanc D., Mikhailopulo I.A., Neubauer P.* // *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 2012. V. 84. P. 27–34.
59. *Liu K., Zhou Y., Zhang J., Chu J., Zhang Y., He B.* // *Biotechnol. Lett.* 2017. V. 39. № 12. P. 1903–1910.
60. *Koszalka G.W., Vanhooke J., Short S.A., Hall W.W.* // *J. Bacteriol.* 1988. V. 170. № 8. P. 3493–3498.
61. *Поляков К.М., Мордкович Н.Н., Сафонова Т.Н., Антипов А.Н., Огорокова Н.А., Дороватовский П.В., Вейко В.П.* // *Кристаллография.* 2021. T. 66. № 5. С. 759–764.
62. *Saunders P.P., Wilson B.A., Saunders G.F.* // *J. Biol. Chem.* 1969. V. 244. № 13. P. 3691–3697.
63. *Ali M.H., Imperiali B.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2005. V. 13. № 17. P. 5013–5020.
64. *Bertosa B., Mikleusevic G., Wielgus-Kutrowska B., Narczyk M., Hajnic M., Aster I.L., Tomic S., Luic M., Bzowska A.* // *FEBS J.* 2014. V. 281. P. 1860–1871.

**Thermostability of Nucleoside Phosphorylases from Prokaryotes.
I. The Role of the Primary Structure of the N-terminal Fragment
of the Protein in the Thermostability of Uridine Phosphorylases**

**V. P. Veiko^{a, b, *}, A. N. Antipov^a, N. N. Mordkovich^a, N. A. Okorokova^a,
T. N. Safonova^a, and K. M. Polyakov^c**

^a Federal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^b Research Centre for Medical Genetics (RCMG), Moscow, 115522 Russia

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

*e-mail: vladveiko@yahoo.com

Mutant uridine phosphorylase genes from *Shewanella oneidensis* MR-1 (*S. oneidensis*) were constructed by site-directed mutagenesis and strains-producers of the corresponding recombinant (F5I and F5G) proteins were obtained on the basis of *Escherichia coli* cells. The mutant proteins were purified and their physicochemical and enzymatic properties were studied. It was shown that the N-terminal fragment of uridine phosphorylase plays an important role in the thermal stabilization of the enzyme as a whole. The role of the amino acid (a.a.) residue phenylalanine (F5) in the formation of thermotolerance of uridine phosphorylases from gamma-proteobacteria was revealed.

Keywords: nucleoside phosphorylase, site-directed mutagenesis, thermal stability, *Shewanella oneidensis* MR-1

УДК 577.1

МОЖЕТ ЛИ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ХИМОЗИН ТУПАЙИ (*Tupaia belangeri chinensis*) КОАГУЛИРОВАТЬ МОЛОКО КОРОВЫ (*Bos taurus*)?

© 2022 г. Д. В. Балабова¹, С. В. Беленькая^{2, 3}, Е. А. Волосникова², Т. Гермес⁴, В. Ю. Чиркова¹, Е. А. Шарлаева¹, Д. Н. Щербаков^{1, 2, *}, А. Н. Белов⁵, А. Д. Коваль⁵, В. В. Ельчанинов⁵

¹Алтайский государственный университет, Барнаул, 656049 Россия

²Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор”
Роспотребнадзора, Кольцово, 630559 Россия

³Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

⁴Институт эволюционной антропологии общества Макса Планка, Лейпциг, 04103 Германия

⁵Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул, 656910 Россия

*e-mail: dshcherbakov@gmail.com

Поступила в редакцию 12.04.2022 г.

После доработки 09.06.2022 г.

Принята к публикации 04.07.2022 г.

Впервые получен и частично охарактеризован генно-инженерный химозин тупайи (*Tupaia belangeri chinensis*). Целевой фермент нарабатывали в системе экспрессии *Escherichia coli*, штамм BL21(DE3). Показано, что рекомбинантный химозин тупайи коагулирует молоко коровы (*Bos taurus*). Общая и удельная молокосвертывающая активность полученного фермента составила 0.7–5.3 ИМСУ/мл и 8.8–16.6 ИМСУ/мг. Неспецифическая протеолитическая активность генно-инженерного химозина тупайи по отношению к суммарному казеину коровы оказалась на 30 и 117% выше, чем у рекомбинантных химозинов коровы и одnogорбого верблюда соответственно. Обнаружено, что по сравнению с большинством известных генно-инженерных химозинов, фермент тупайи проявлял исключительно низкую термостабильность. После прогревания при 45°C коагуляционная способность рекомбинантного химозина тупайи падала более чем на 40%, а при 50°C фермент терял >90% исходной молокосвертывающей активности. Константа Михаэлиса (K_m), число оборотов фермента (k_{cat}) и каталитическая эффективность (k_{cat}/K_m) для рекомбинантного химозина тупайи, составили соответственно 6.3 ± 0.1 мкМ, 11927 ± 3169 с⁻¹ и 1968 ± 620 мкМ⁻¹ с⁻¹. Сравнительный анализ показал, что первичная структура химозин-чувствительного участка каппа-казеина коровы и предполагаемой аналогичной последовательности каппа-казеина тупайи различались на 75%. Способность рекомбинантного химозина тупайи свертывать молоко коровы наряду с низкой термостабильностью и высокой каталитической эффективностью по отношению к субстрату, имитирующему химозин-чувствительный участок коровьего каппа-казеина, позволяют предполагать, что этот фермент представляет потенциальный интерес для сыроделия.

Ключевые слова: рекомбинантный химозин, тупайя, молокосвертывающая активность, молоко коровы, термостабильность, протеолитическая активность, сыроделие

DOI: 10.31857/S0555109922060022

Представителей класса Млекопитающие (*Mammalia*) объединяет общий адаптационный механизм — способность синтезировать и секретировать молоко для вскармливания потомства. Вероятно, параллельно с лактацией, возникли и неонатальные молокосвертывающие протеиназы — химозины, под действием которых молоко в желудке новорожденного превращается в сгусток, что обеспечивает его эффективное усвоение [1]. Химозины (КФ 3.4.23.4) обладают исключительно высокой специфичностью к связи F105–M106 (или её аналогу) в молекуле κ-казеина (κ-КЗ) и, в то же время, крайне низкой неспецифической протеолитиче-

ской активностью (ПА). В результате, химозин (Хн) эффективно гидролизует единственную пептидную связь в молекуле κ-КЗ, что вызывает образование молочного сгустка. В то же время фермент не атакует иммуноглобулины (Ig) и другие защитные белки, содержащиеся в молозиве и молоке, что способствует эффективному переносу пассивного иммунитета от матери к новорожденному [2].

Благодаря способности коагулировать молоко, молокосвертывающие ферменты (МФ) и, в частности Хн, играют важную роль в практической деятельности человека и любой аспект изучения биохимических свойств этих ферментов рассмат-

ривается с точки зрения возможности их технологического применения [3].

Предположительно, люди научились использовать МФ для получения сыров около 8000 лет назад [4]. С момента возникновения промышленного производства, лучшим МФ для сыроделия считался коровий Хн – кислая аспартатная эндопептидаза, синтезируемая клетками слизистой оболочки желудка новорожденного теленка [5]. Успехи генной инженерии позволили внедрить в практику сыроделия рекомбинантный Хн (рХн) коровы (*Bos taurus*) [6]. Комплекс биохимических свойств коровьего Хн считался оптимальным для сыроделия вплоть до 2006 г., когда был получен и исследован рХн верблюда (*Camelus dromedarius*) [7]. В настоящее время верблюжий рХн широко используется в сыроделии наряду с рХн коровы [3, 8–10].

Получение рХн одногорбого верблюда положило начало новому этапу исследований, направленных на изучение и понимание механизмов субстратной специфичности неонатальных гастрильных протеиназ [9–14]. Кроме того, результаты изучения рХн *C. dromedarius* продолжают стимулировать работы, направленные на поиск и изучение новых видов Хн. Поскольку основную долю сырьевой базы сыроделия составляет молоко *B. taurus*, биохимическая характеристика любого нового Хн начинается с определения его молокосвертывающей активности (МА) именно по отношению к молоку коровы.

Ответ на вопрос, вынесенный в заголовок статьи, не является очевидным из-за парадокса “Хн коровы – молоко верблюда”. Его суть в том, что Хн коровы не коагулирует верблюжье молоко и это не позволяет использовать коровий фермент для производства сыров из молока верблюда [9, 15–20]. В то же время, рХн верблюда не только эффективно свертывает коровье молоко, но и превосходит рХн коровы по удельной МА по отношению к коровьему субстрату [7]. Предполагается, что причина парадокса кроется в различиях первичной структуры к-КЗ коровы и верблюда на участке 98–112 [13, 14, 20]. Парадокс “Хн коровы – молоко верблюда” наиболее известный, но не единственный случай межвидового “конфликта” молока и Хн. Химозин коровы не способен свертывать лошадиное (*Equus caballus*) молоко, в то время как рХн двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*) успешно справляется с этой задачей [15, 21]. Кроме верблюжьего и лошадиного молока, Хн коровы не коагулирует молоко представителя сумчатых млекопитающих – лисьего кузу (*Trichosurus vulpecula*) [22]. Намного медленнее, чем гомологичный субстрат, Хн коровы свертывает молоко крысы (*Rattus norvegicus*), кролика (*Oryctolagus cuniculus*), козы (*Capra hircus*) и северного оленя (*Rangifer tarandus*) [23]. Коагуляционная актив-

ность рХн кролика, измеренная на молоке осла (*Equus asinus*), коровы, козы, овцы (*Ovis aries*) и верблюда составляет, соответственно, 40.0, 10.0, 5.7, 3.1 и 2.7 ИМСУ/мл, т.е. минимальные и максимальные значения различается более чем на порядок [24]. Можно ожидать, что по мере получения новых видов Хн, число подобных “конфликтов” будет увеличиваться.

Парадокс “Хн коровы – молоко верблюда” позволяет условно разделить химозины на 2 типа: “универсальные”, способные одинаково эффективно коагулировать как гомологичное так и гетерологичное молоко [7, 21, 25–28] и “специализированные” – проявляющие наибольшую активность по отношению к гомологичному молоку или молоку ближайших филогенетических родственников [7, 15, 23].

Нетрудно заметить, что кроме кролика (отряд Зайцеобразные, *Lagomorpha*) [24] ни один из видов млекопитающих “за пределами” отряда Китопарнокопытные (*Cetartiodactyla*) не стал источником генов для получения и оценки биохимических свойств новых рХн. Частично охарактеризованные Хн представителей отряда Приматы (*Primates*) – игрунки (*Callithrix jacchus*) [29] и некоторых других обезьян Нового Света [30] стоят особняком, поскольку утратили важнейшую “химозиновую” функцию участия в переносе факторов пассивного иммунитета от матери новорожденному и в природе экспрессируются как пепсиноподобные ферменты с широкой протеолитической специфичностью и высокой общей ПА.

Данные о МА и специфичности Хн по отношению к гетерологичным субстратам необходимы для понимания механизма работы этих ферментов и успешного поиска высокоэффективных коагулянтов молока. В этой связи, актуальным является изучение рХн животных, относящихся к различным отрядам Млекопитающих.

Тупайи (*Scandentia*) – отряд плацентарных млекопитающих, представители которого обитают в тропических лесах Юго-Восточной Азии. Геном тупайи (*Tupaia belangeri chinensis*) или китайской древесной землеройки (Chinese tree shrew) секвенирован в 2013 году. Филогенетический анализ показал, что *Tupaia belangeri chinensis* (далее – *T. belangeri*) является весьма отдаленным родственником коровы и кластеризуется в пределах клады Эуархонты (*Euarchonta*), в которую также входят Шерстокрылы (*Dermoptera*) и Приматы. При этом структура генов тупайи имеет высокое сходство с Приматами и, в частности, с человеком [31]. По данным NCBI, аминокислотные (а.к.) последовательности Хн тупайи и коровы идентичны на 81.6%. До настоящего времени рХн тупайи не изучался.

Цель данной работы – получение рХн *T. belangeri*, определение его коагуляционной актив-

сти по отношению к молоку коровы и исследование некоторых биохимических свойств, важных для сыроделия.

МЕТОДИКА

Конструирование экспрессионного вектора. В работе использовали нуклеотидную последовательность прохимозина (**ПроХн**) тупайи, выявленную в геноме *T. chinensis* (NW_006159751.1) путем сравнения с референсной последовательностью гена Хн коровы. Кодонный состав нуклеотидной последовательности ПроХн оптимизировали для экспрессии в системе *Escherichia coli* при помощи сервиса “Codon Optimisation Tool” (“Integrated DNA Technologies”, США). Синтезированная нуклеотидная последовательность была встроена в экспрессионный вектор рЕТ21а (“Novagen”, ФРГ) по уникальным сайтам рестрикции BamHI и HindIII. В результате получали плазмидный вектор рЕТ21-СУМ-Тур.

Получение рХн тупайи. Плазмидой рЕТ21-СУМ-Тур проводили химическую трансформацию клеток *E. coli* BL21(DE3). Колонии, содержащие рекомбинантные плазмиды, культивировали в течение ночи на орбитальном шейкере (“Biosan”, Латвия) при 180 об./мин в среде LB (“AppliChem”, США) при 37°C. Инокулят в соотношении 1 : 100 переносили в колбы Эрленмейера, содержащие свежую среду LB и выращивали до оптической плотности 0.8 (при $\lambda = 600$ нм). В культуральную жидкость вносили индуктор – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (**ИПТГ**) (“Anatrace Products”, США) до конечной концентрации 1 мМ и дополнительно культивировали штамм-продуцент на шейкере (180 об./мин) в течение 12 ч при 25°C. Контролем служила культура *E. coli* штамм BL21, не трансформированная плазмидой рЕТ21-СУМ-Тур.

После завершения культивирования биомассу осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 5000 g и 4°C. Осадок ресуспендировали в буфере STET (сахароза – 8%, 50 мМ трис, 20 мМ ЭДТА, тритон X-100 – 5%, рН 8.0) из расчета 20 мл на 1 г биомассы и инкубировали в течение ночи при 4°C. По окончании инкубации суспензию клеток обрабатывали ультразвуком (2000 Вт/л и 283 Вт/см²) в течение 1 мин, после чего смесь охлаждали до 4°C. Процедуру повторяли трижды. Тельца включения осаждали центрифугированием при 20000 g в течение 20 мин при 4°C.

Солюбилизацию телец включения, рефолдинг рекомбинантного ПроХн и последующую активацию зимогена проводили в соответствии с процедурами, описанными в работе [26]. В результате активации получали препарат рХн тупайи (**рХн-Тур**).

Определение общей и удельной молокосвертывающей активности. В качестве субстрата использо-

вали сборное не пастеризованное коровье молоко, в которое вносили NaN₃ до 0.02% и доводили рН до 6.5. Субстрат (2.5 мл), прогретый на водяной бане при 35°C не менее 10 мин, быстро смешивали с 0.2 мл исследуемого рХн и регистрировали время образования первых хлопьев коагулята. В качестве стандарта использовали 0.5%-ный водный раствор сухого коммерческого препарата рХн коровы (“Chr. Hansen”, Дания) с заявленной МА 2201 IMCU/г (IMCU – International Milk Clotting Units). Все измерения повторяли не менее трех раз ($n \geq 3$). Общую МА выражали в IMCU/мл, которую рассчитывали по формуле (1):

$$МА = МА_{Ст} / 200 \times T_1 / T_2, \quad (1)$$

где: МА_{Ст} – заявленная МА стандарта в IMCU/г; 200 – фактор разведения (мл/г); T₁ – время (в с) свертывания субстрата стандартом; T₂ – время (в с) свертывания субстрата раствором исследуемого фермента.

В качестве препаратов сравнения использовали 0.5%-ный водный раствор сухого коммерческого препарата рХн коровы (**рХн-Вос**) и 0.4%-ный водный раствор сухого коммерческого препарата рХн одnogорбого верблюда (**рХн-Сам**) производства компании “Chr. Hansen” (Дания).

Удельную МА рХн-ов, рассчитывали после определения общей МА и концентрации белка по Брэдфорду [32] и выражали в IMCU/мг.

Определение неспецифической протеолитической активности. В качестве субстрата использовали 0.5%-ный раствор коровьего казеината натрия (“Sigma”, США) в 20 мМ Na-ацетатном буфере (рН 5.65). Субстрат (2.0 мл) выдерживали 15 мин на водяной бане при 35°C, вносили в него раствор исследуемого рХн (0.5 мл), быстро перемешивали и отмечали время начала инкубации. Через 30, 90 и 180 мин к 2.5 мл фермент-субстратной смеси добавляли 2.5 мл 6%-ной трихлоруксусной кислоты (**ТХУ**), перемешивали, выдерживали 30 мин при комнатной температуре и фильтровали через бумажный фильтр. В фильтрате определяли поглощение при длине волны 280 нм (A_{280}). Для подготовки спектрофотометрического контроля компоненты фермент-субстратной смеси вносили непосредственно в 6%-ную ТХУ. Неспецифическую ПА выражали в единицах A_{280} . Строили график зависимости A_{280} от продолжительности прогревания.

Коагуляционную специфичность (протеолитическую активность, направленную только на гидролиз Хн-чувствительной связи в молекуле к-КЗ) определяли, как соотношение удельной МА и неспецифической ПА (**МА/ПА**). Для оценки коагуляционной специфичности препаратов рХн за ПА принимали значения A_{280} фермент-субстратных смесей, инкубированных в течение 180 мин.

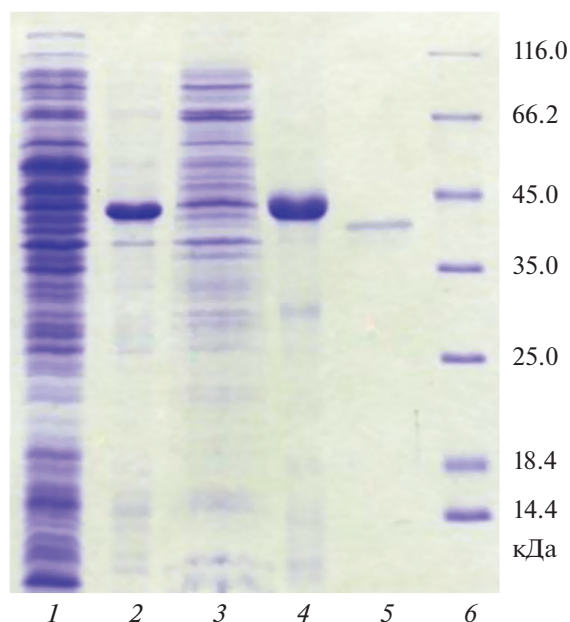


Рис. 1. Результаты ДСН-электрофореза белковых препаратов, полученных из клеток исходного штамма и штамма-продукта: 1 – биомасса клеток *E. coli* штамм BL21 после внесения индуктора (контроль); 2 – биомасса клеток продуцента *E. coli* BL21_рПроХн-Тур после внесения индуктора (опыт); 3 – растворимая фракция биомассы продуцента BL21_рПроХн-Тур после обработки буфером STET; 4 – нерастворимая фракция (тельца включения) после обработки лизирующим буфером; 5 – рХн-Тур после активации; 6 – маркеры молекулярных масс.

Определение протеолитической активности по отношению к изолированным α -, β -, и κ -казеинам коровы. Определение ПА рХн по отношению к изолированным казеинам (КЗ) коровьего молока проводили по методике, описанной в работе [33], в которую вносили изменения. Для исследования ПА рХн тупайи концентрировали методом ультрафильтрации до значений общей МА ≈ 8 ИМСУ/мл. Активность препаратов сравнения – коммерческих рХн – нормировали по МА фермента тупайи.

Готовили 0.1%-ные растворы субстратов – α -, β - и κ -КЗ (“Sigma”, С6780, С6905, С0406, США) – в 20 мМ Na-ацетатном буфере (рН 5.65). Смешивали 250 мкл субстрата с 5 мкл исследуемого рХн с активностью 8.0 ИМСУ/мл. В контрольные образцы вместо рХн вносили 5 мкл 20 мМ Na-ацетатного буфера (рН 5.65). Фермент-субстратные смеси и контрольные препараты инкубировали при 35°C в течение 1 ч. После завершения инкубации исследовали полипептидный состав смесей методом электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) по Лэммли [34]. В качестве маркеров молекулярных масс (ММ) использовали LMW-SDS Marker Kit (“GE Healthcare”, США).

Термостабильность (ТС). Растворы исследуемых МФ прогревали при температурах 30–65°C в течение 30 мин, быстро охлаждали до комнатной температуры и определяли их остаточную МА. За 100% принимали значения МА, полученные в образцах, прогретых при 30°C. Строили график зависимости остаточной МА от температуры прогревания. Порогом термоинактивации считали температуру прогревания, при которой рХн утрачивал $\geq 20\%$ от исходной МА.

Определение параметров кинетики Михаэлиса–Ментен. Константу Михаэлиса (K_m), константу скорости реакции гидролиза или число оборотов фермента (k_{cat}) и каталитическую эффективность (k_{cat}/K_m) определяли по методике, описанной в работе [35].

Статистическую обработку полученных данных проводили в вычислительной среде табличного процессора Excell 2007 (“Microsoft Corporation”, США). Результаты определения количественных переменных представлены в виде среднего арифметического (М) с указанием среднеквадратического отклонения ($\pm SD$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение препарата рХн тупайи. Для получения рекомбинантного аналога Хн тупайи использовали систему на основе штамма BL21(DE3) *E. coli* и плазмидного экспрессионного вектора серии рЕТ21. Нуклеотидная последовательность, соответствующая ПроХн тупайи, с кодонным составом, оптимизированным для экспрессии в системе *E. coli*, была клонирована в составе экспрессионного вектора рЕТ21а таким образом, чтобы N-концевая часть содержала последовательность экспрессионного тага Т7. Корректность встроенной последовательности была проверена при помощи секвенирования полученной рекомбинантной плазмиды рЕТ21-СУМ-Тур в области встройки. После трансформации сконструированной плазмидой компетентных клеток BL21(DE3) *E. coli* был получен рекомбинантный штамм-продукт. Для наработки целевого белка использовали стандартный протокол, включающий добавление индуктора ИПТГ. С целью оценки эффективности синтеза рекомбинантного ПроХн тупайи (**рПроХн-Тур**), а также определения его локализации, был проведен электрофоретический анализ различных белковых препаратов, полученных из клеток рекомбинантного штамма-продукта (рис. 1).

Анализ белкового состава клеток *E. coli*, содержащих плазмиду рЕТ21-СУМ-Тур, после добавления индуктора, показал высокое содержание протеина, по электрофоретической подвижности совпадающего с расчетной для рПроХн-Тур (41 кДа). Его содержание составило $\geq 50\%$ (рис. 1, дорожка 2) от общего количества белков клетки. Видно, что

Таблица 1. Общая и удельная молокосвертывающая активность препаратов рХн

Препарат рХн	Общая МА, ИМСУ/мл	Концентрация белка, мг/мл	Удельная МА, ИМСУ/мг	Удельная МА, %
рХн-Тур (серия 1)	5.3 ± 0.1	0.320	16.6 ± 0.3	2.6
рХн-Тур (серия 2)	0.7 ± 0.1	0.080	8.9 ± 0.3	1.4
рХн-Тур (серия 3)	1.4 ± 0.0	0.160	8.8 ± 0.0	1.4
рХн-Bos	11.0 ± 0.4	0.017	647.0 ± 23.5	100.0
рХн-Cam	10.9 ± 0.2	0.014	778.6 ± 14.3	120.3

растворимая фракция биомассы *E. coli* после обработки буфером STET и центрифугирования (рис. 1, дорожка 3) почти не содержит целевого белка, в то время как фракция телец включения практически полностью представлена рПроХн тупайи (рис. 1, дорожка 4). Таким образом, условия экспрессии гена Хн тупайи в системе *E. coli* приводят к суперпродукции целевого белка, подавляющая часть которого накапливается в нерастворимой форме в тельцах включения, поэтому следующим этапом стала ренатурация рПроХн при помощи ступенчатого диализа. Попытки провести активацию зимогена до диализа окончились неудачей: препараты не проявляли коагуляционной активности. После проведения диализа, активированные препараты рПроХн-Тур демонстрировали ферментативную активность, которая свидетельствовала о том, что зимоген восстанавливает корректную третичную структуру. В результате активации было получено 3 препарата рХн-Тур – серии 1–3 – которые различались по общей и удельной МА (табл. 1).

Молокосвертывающая активность. Оценка биохимических свойств любого нового МФ начинается с установления его МА по отношению к коровьему молоку – основному сырью для производства сычужных сыров.

Общая МА полученных препаратов рХн-Тур варьировала в пределах 0.7–5.3 ИМСУ/мл. Концентрация белка в препаратах рХн-Тур оказалась, в среднем, примерно на порядок выше, чем в препаратах сравнения. В результате, по удельной МА рХн-Тур в 50–60 раз уступал коммерческим рХн коровы и одногорбого верблюда (табл. 1).

Причиной низкой удельной МА может быть неэффективный рефолдинг рХн-Тур. Известно, что восстановление корректной трехмерной структуры является проблемным этапом при получении рХн в системах экспрессии *E. coli* [36–39]. Вероятно, часть молекул рХн-Тур после проведения ренатурации оставалась ферментативно неактивной, что и приводило к снижению удельной МА фермента.

Таким образом, установлено, что рХн-Тур, полученный в системе экспрессии *E. coli*, коагулирует гетерологичный биологический субстрат – молоко коровы, но по удельной МА уступает рХн *B. taurus* и *C. dromedarius*, синтезированным в системе продукции высшего плесневого гриба *Aspergillus niger var. Awamori*.

Пусковым механизмом, инициирующим ферментативное свертывание коровьего молока, является гидролиз Хн-чувствительной связи F105-M106 в молекуле κ-КЗ и удаление гликомакропептида с поверхности казиновых мицелл. Способность рХн-Тур коагулировать молоко *B. taurus* свидетельствует о специфичности фермента как минимум к одной из пептидных связей (предположительно, F105-M106) в молекуле κ-КЗ.

Неспецифическая протеолитическая активность и соотношение МА/ПА. Протеолитическая активность Хн лежит в основе его способности свертывать молоко. Условно ПА ферментов, коагулирующих молоко можно разделить на специфическую (молокосвертывающую) и неспецифическую. Специфическая ПА (или МА) обеспечивает гидролиз Хн-чувствительной связи F105-M106 в молекуле κ-КЗ, что приводит к дестабилизации казеиновых мицелл и образованию молочного сгустка. Неспецифическая ПА, характеризует способность МФ гидролизовать любые пептидные связи, по отношению к которым он проявляет специфичность, кроме Хн-чувствительной связи κ-КЗ.

В научной периодике, посвященной проблемам изучения и практического применения МФ, для оценки технологической эффективности коагулянта молока используется отношение его МА и неспецифической ПА (МА/ПА) [7, 28]. Соотношение характеризует активность, направленную только на гидролиз Хн-чувствительной связи в молекуле κ-КЗ и приводящую к свертыванию молока. Для того чтобы избежать путаницы с ферментативной специфичностью, мы обозначили соотношение МА/ПА термином “коагуляционная специфичность”. Идеальный коагулянт молока для сыроделия должен проявлять максимальную МА при минимальной общей ПА [5]. Чем выше коа-

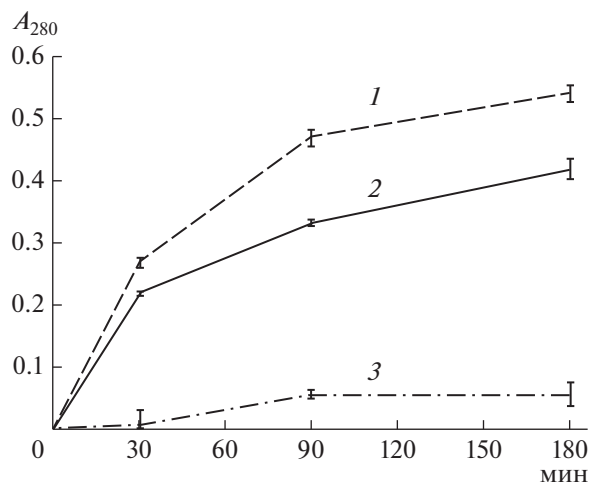


Рис. 2. Зависимость A_{280} от продолжительности прогревания фермент-субстратных смесей: 1 – рХн-Тур; 2 – рХн-Вос; 3 – рХн-Сам. На оси X указана продолжительность прогревания при 35°C.

гуляционная специфичность, тем универсальнее МФ и шире ассортимент сыров, для выработки которых он может использоваться.

Поскольку одной из задач данного исследования была оценка производственных перспектив рХн-Тур, для определения его неспецифической ПА (так же как и для определения МА) использовали субстрат коровьего происхождения. Неспецифическую ПА оценивали по A_{280} супернатантов, полученных после инкубации и осаждения компонентов фермент-субстратных смесей 3%-ной ТХУ. Пул ТХУ-растворимых компонентов содержит и продукт гидролиза Хн-чувствительной связи – гликомакропептид к-CN (f.106-169) – который не влияет на результат определения неспецифической ПА, поскольку не содержит а.к. остатков, поглощающих при 280 нм [7].

На всех стадиях инкубации фермент-субстратных смесей, рХн-Тур, проявлял более высокую ПА по отношению к коровьему КЗ, чем рХн верблюда и коровы (рис. 2).

Через 180 мин инкубации, неспецифическая ПА рХн тупайи, коровы и верблюда составляла, соответственно, 0.544, 0.418 и 0.056 ед. A_{280} . По динамике нарастания концентрации продуктов

неспецифического протеолиза рХн коровы и тупайи – похожи и заметно отличаются от рХн верблюда. Наблюдавшаяся низкая неспецифическая ПА рХн одногорбого верблюда является его характерным (маркерным) биохимическим свойством и подтверждается другими исследованиями [7, 27].

Для сравнения коагуляционной специфичности рХн-Тур и коммерческих рХн использовали данные об их удельной МА (%) и неспецифической ПА (%), при этом показатели рХн коровы принимали за 100% (табл. 2). Видно, что по соотношению МА/ПА препарат рХн-Тур с наибольшей удельной МА (серия 1) катастрофически уступал ферментам сравнения.

Низкая коагуляционная специфичность фермента тупайи стала следствием малой удельной МА, которая может быть обусловлена неполным рефолдингом его зимогена, выделенного из телец включения. Возможно, использование эукариотической системы экспрессии вместо прокариотической позволит повысить выход активного рХн-Тур, его удельную МА и, как следствие, – соотношение МА/ПА.

Таким образом, неспецифическая ПА рХн-Тур, полученного в прокариотической системе продукции, оказалась на 30 и 117% выше, чем у рХн-Вос и рХн-Сам соответственно. Высокая неспецифическая ПА ограничивает сферу использования рХн-Тур производством быстросозревающих сыров с короткими (не более 14 сут) сроками хранения.

Протеолитическая активность по отношению к α -, β - и к-казеинам коровы. Как следует из данных, представленных на рис. 3, рХн-способен гидролизовать изолированные α -, β - и к-КЗ коровы. В условиях эксперимента генно-инженерный Хн тупайи эффективно атаковал не только к-КЗ коровы, но и продукт его гидролиза – пара-к-КЗ (полоса с ММ \approx 16 кДа). В результате в фермент-субстратной смеси накапливались компоненты с ММ < 14 кДа (рис. 3, дорожка 6). Рекомбинантный Хн *V.taurus* полностью деградировал к-КЗ и частично – пара-к-КЗ. При этом в фермент-субстратной смеси появлялся продукт с ММ \approx 14 кДа (рис. 3, дорожка 7). В отличие от тупайи и коровы, ПА рХн *C. dromedarius* была направлена, преимуще-

Таблица 2. Удельная МА, неспецифическая ПА и МА/ПА препаратов рХн

Препарат рХн	Удельная МА, %	Неспецифическая ПА, %	МА/ПА
рХн-Тур (серия 1)	2.6	130.1	0.02
рХн Вос	100.0	100.0	1.00
рХн Сам	120.3	13.4	8.98

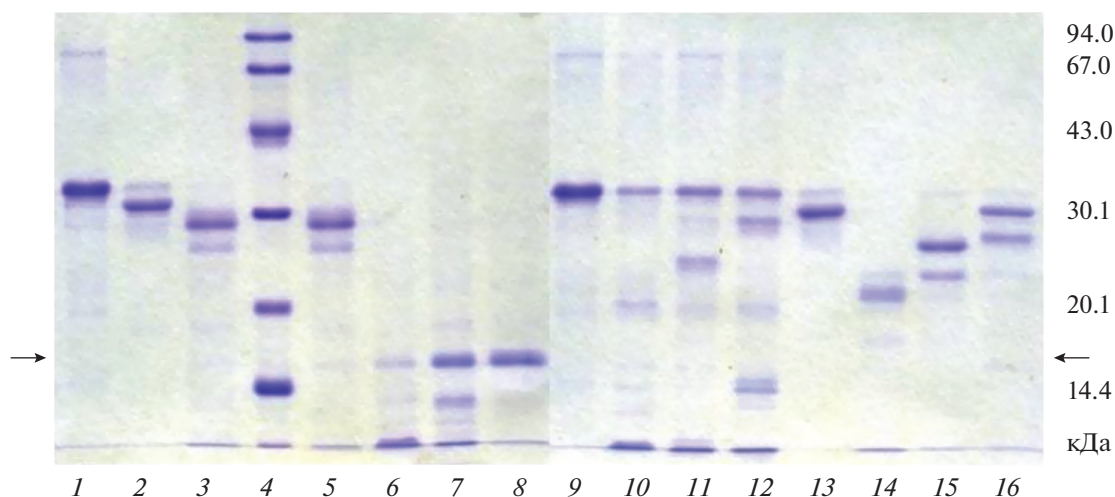


Рис. 3. Протеолитическая активность рХн тупайи, коровы и одногорбого верблюда по отношению к α -, β - и κ -КЗ коровы: 1 – α -КЗ; 2 – β -КЗ; 3 – κ -КЗ; 4 – маркеры ММ; 5 – κ -КЗ (контроль); 6 – κ -КЗ + рХн-Тур; 7 – κ -КЗ + рХн-Bos; 8 – κ -КЗ + рХн-Сам; 9 – α -КЗ (контроль); 10 – α -КЗ + рХн-Тур; 11 – α -КЗ + рХн-Bos; 12 – α -КЗ + рХн-Сам; 13 – β -КЗ (контроль); 14 – β -КЗ + рХн-Тур; 15 – β -КЗ + рХн-Bos; 16 – β -КЗ + рХн-Сам. Стрелками указано положение пара- κ -КЗ (ММ \approx 16 кДа) на дорожках 6–8.

шественно, на κ -КЗ и почти не затрагивала пара- κ -КЗ (рис. 3, 8).

Все исследованные ферменты проявляли ПА по отношению к изолированному коровьему α -КЗ. Основная полоса α -КЗ сохранялась после 60 мин инкубации со всеми ферментами, но в случае рХн-Тур ее интенсивность была наименьшей (рис. 3, дорожки 10–12). Это свидетельствует о более высокой ПА фермента тупайи по отношению к изолированному α -КЗ, по сравнению с коммерческими рХн.

Все исследованные нами рХн различались по интенсивности протеолиза свободного β -КЗ коровы. Рекombинантные химозины тупайи и коровы полностью гидролизовали β -КЗ, с образованием полипептидов с ММ в диапазоне 20–26 кДа, а рХн верблюда оказывает на этот субстрат наименьшее протеолитическое воздействие (рис. 3, дорожки 14–16).

Ранее, метод ЭФ уже использовался для изучения ПА рХн коровы и верблюда по отношению к индивидуальным фракциям коровьего КЗ [24, 33, 40]. По данным работ [33, 40] рХн коровы и верблюда, полученные в системе экспрессии *P. pastoris* проявляли ПА только по отношению к κ -КЗ, но не гидролизовали α - и β -КЗ коровы. Такое противоречие с нашими данными может объясняться различиями в постановке экспериментов по оценке специфичности рХн (чистота и МА рХн, соотношение фермента и субстрата, состав буферов, рН, температура и продолжительность инкубации фермент-субстратных смесей). В целом, полученные нами результаты хорошо согласуются с данными работы [24], авторы которой исследовали

субстратную специфичность коммерческих рХн коровы и верблюда (производства компании “Chr. Hansen”), полученных в системе экспрессии *A. niger*.

Таким образом, по сравнению с коммерческими генно-инженерными химозинами, рХн-Тур вызывает более глубокую протеолитическую деградацию изолированных фракций КЗ коровы. По интенсивности протеолитического действия на α -, β - и κ -КЗ коровы, ферменты можно расположить следующим образом: рХн-Тур > рХн-Bos > рХн-Сам.

Можно предположить, что при использовании в качестве субстратов не изолированных фракций КЗ, а препаратов суммарного (мицеллярного) КЗ или коровьего молока, картина протеолиза и оценки специфичности рХн будут выглядеть по-другому. Если субстрат находится в форме мицелл, то экспонированные наружу, С-концевые участки κ -КЗ, образующие “волосковый слой”, легко доступны для протеолитической атаки Хн (или других МФ). Напротив, МФ гораздо сложнее атаковать N-концевые участки κ -КЗ, а также молекулы α - и β -КЗ, расположенные под “волосковым слоем” и в толще мицеллы. В этой связи возникает закономерный вопрос об информативности результатов определения ПА химозинов с использованием изолированных α -, β - и κ -КЗ. Возможно, для более адекватной оценки нового рХн целесообразно исследовать его специфичность на молочном субстрате, в котором КЗ находятся в мицеллярной форме.

Термостабильность. Термостабильность является важнейшей характеристикой любого индустриального фермента. При этом для разных тех-

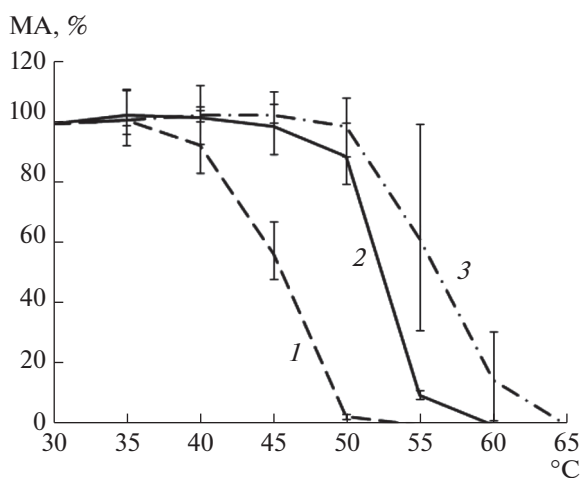


Рис. 4 Зависимость остаточной молокосвертывающей активности от температуры прогревания препаратов рХн: 1 – рХн-Тур; 2 – рХн-Вос; 3 – рХн-Сам.

нологических процессов необходимы ферментные препараты с различными диапазонами ТС. Например, при производстве сыров с высокой температурой 2-го нагревания и длительными сроками созревания и хранения, востребованы коагулянты молока стабильные при температурах $\leq 50^\circ\text{C}$. Молокосвертывающий фермент с высокой ТС, сохраняющий активность после нагревания сырного зерна до $52\text{--}58^\circ\text{C}$, может проявлять нежелательную ПА в сыре и ухудшать его физико-химические и органолептические показатели [41, 42].

Сфера применения коагулянтов молока, которые сохраняют ПА при температурах $>60^\circ\text{C}$ – ограничена и распространяется, преимущественно, на производство сыров с короткими сроками созревания и хранения. Для выработки полутвердых и твердых сыров, требующих длительных сроков созревания и хранения, предпочтительны термолабильные МФ. Снижение ТС перспективного коагулянта молока может потребовать разработки специальных технологических приемов. Например, для того, чтобы максимально адаптировать натуральные молокосвертывающие эндопептидазы (мукопепсины) плесневых грибов рода *Rhizomucor* к потребностям промышленного сыроделия, были специально разработаны методы их химической модификации для снижения исходно высокой ТС [43, 44].

Современные технологические рХн различаются по ТС. По данным [7, 45], рХн одногорбого верблюда термостабильнее, чем рХн коровы и сохраняет более высокую остаточную МА в диапазоне температур $50\text{--}60^\circ\text{C}$. Точки плавления рХн коровы и верблюда, составляя соответственно 57.7 и 60.7°C [9]. Наглядная демонстрация того, насколько важны различия в 3°C между порогами термоденатурации промышленных МФ, пред-

ставлена в работе [41]. Показано, что увеличение температуры нагревания сгустка с 50 до 56°C приводит к значительному снижению концентрации продуктов протеолиза $\alpha\text{s}1\text{-K}3$ в сырах типа Reggiano, произведенных с применением рХн коровы и верблюда, за счет более глубокой термоинактивации МФ. При этом в сырах, выработанных с температурой нагревания сгустка 56°C и с применением более термостабильного рХн верблюда, интенсивность протеолиза была выше, чем при использовании коровьего рХн [41]. Таким образом, рХн верблюда, имеющий вчетверо меньший уровень общей ПА, чем рХн коровы, но превосходящий его по ТС, проявлял более высокую неспецифическую ПА в созревающих и хранящихся сырах.

По сравнению с коммерческими и экспериментальными генно-инженерными химозинами [25], рХн-Тур выделялся необычно низкой ТС (рис. 4). Порог термоинактивации рХн-Тур составил 45°C – при этой температуре его коагуляционная способность падала более чем на 40%, а при 50°C – фермент утрачивал $>90\%$ от исходной МА. Для коммерческих коагулянтов порог термоинактивации был на 10°C выше и составлял 55°C . При этом рХн-Вос полностью инактивировался при 60°C , а рХн-Сам – при 65°C .

Возможно, экстраординарная термолабильность рХн-Тур связана с особенностями терморегуляции животных этой группы млекопитающих. По данным [46] средняя температура тела *T. belangeri* составляет 39.6°C . Известно также, что для тупайи характерны суточные колебания температуры тела, синхронизированные с ритмами активности. Амплитуда колебаний необычайно высока и составляет около 5°C , что намного больше, чем у большинства других изученных млекопитающих. Согласно данным телеметрии, минимальная температура тела тупайи составляет $35\text{--}36^\circ\text{C}$, а максимальная – $40\text{--}41^\circ\text{C}$ [47]. В этой связи, возникает вопрос: не является ли чрезвычайно низкая ТС Хн тупайи, элементом защиты факторов пассивного иммунитета от избыточной ПА этой гастральной протеиназы? Можно предполагать, что после активации зимогена в просвете желудка новорожденного, термолабильный Хн тупайи “успекает” коагулировать находящееся в нем молоко, но в дальнейшем термоинактивируется и не оказывает глубокого протеолитического действия на Ig и другие защитные белки. В результате, содержащиеся в молоке факторы пассивного иммунитета, за счет механизмов прямого трансцеллюлярного переноса в эпителии кишечника, попадают в кровь и обеспечивают иммунологическую защиту новорожденного.

Таким образом, по сравнению с рХн коровы и верблюда генно-инженерный Хн тупайи является исключительно термолабильным МФ. Что касается “сыродельных” перспектив рХн-Тур, то не

Таблица 3. Основные параметры кинетики Михаэлиса–Ментен рХн

Препарат рХн	K_m , мкМ	V_{max} , мкМ с ⁻¹	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_m , мкМ ⁻¹ с ⁻¹
рХн-Тур (серия 1)	6.3 ± 1.4	596 ± 158	11927 ± 3169	1968 ± 620
рХн-Bos	12.0 ± 1.8	238 ± 3	4759 ± 51	404 ± 67
рХн-Cam	20.3 ± 4.23	264 ± 42	5287 ± 842	265 ± 56

исключено, что его низкая ТС может, хотя бы частично, компенсировать негативный эффект высокой ПА и позволит более широко использовать этот фермент. Например, при выработке сыров со сроками созревания и хранения 30–45 сут.

Параметры кинетики Михаэлиса–Ментен. Для определения основных параметров ферментативной кинетики использовали наиболее активный из 3 препаратов рХн-Тур (серия 1).

Основные показатели кинетики Михаэлиса–Ментен рХн-Тур заметно отличаются от значений кинетических констант, полученных для коммерческих рХн (табл. 3). По сравнению с рХн-Bos и рХн-Cam фермент *T. belangeri* продемонстрировал самые низкие значения K_m , что указывает на более высокую аффинность к использованному хромогенному субстрату. В отличие от ферментов сравнения, рХн-Тур в 2.3–2.5 раза быстрее освобождался от продуктов реакции и вступал в новое взаимодействие с субстратом, на что указывали более высокие значения числа оборота фермента (k_{cat}) и его каталитической эффективности (k_{cat}/K_m). Таким образом, кинетические константы рХн-Тур свидетельствовали о том, что его ферментативная эффективность по отношению к синтетическому флуорогенному субстрату, имитирующему Хн-чувствительный участок к-КЗ коровы, выше, чем у современных коммерческих рХн.

Для того чтобы попытаться понять причины высокой каталитической эффективности генно-инженерного Хн тупайи было проведено сравнение первичной структуры к-КЗ *B. taurus*, *C. dromedarius* и *T. belangeri*. Так, зрелый к-КЗ коровы состоит из 169 а.к. (Хн-чувствительная связь расположена в позиции F105–M106), к-КЗ верблюда – из 162 а.к. (Хн-чувствительная связь – в позиции F97–I98), а к-КЗ тупайи содержит 164 а.к. остатка (предполагаемая Хн-чувствительная связь – L98–K99). Удивительно, но при 81.6% идентичности Хн тупайи и коровы сходство первичной структуры к-КЗ этих видов оказалось одним из самых низких, среди уже установленных, и составило всего 41.9%. В свою очередь, а.к. последовательности к-КЗ коровы и верблюда идентичны на 58.4%. Таким образом, к-КЗ коровы, тупайи и верблюда демонстрируют значительные межвидовые различия.

Аминокислотные последовательности Хн-чувствительных участков к-КЗ тупайи и коровы совпадают лишь на 25%. Они различаются по 18 аминокислотным остаткам из 24, включая две замены на участке “ключевой” пептидной связи: F105 (*B. taurus*) → L98 (*T. belangeri*), где неполярный ароматический радикал заменен на неполярный алифатический и M106 (*B. taurus*) → Lys99 (*T. belangeri*), где вместо гидрофобного серосодер-



Рис. 5. Аминокислотные последовательности Хн-чувствительных участков к-КЗ коровы, одногорбого верблюда и тупайи. В скобках после видового названия указана степень гомологии первичной структуры к-КЗ данного вида по отношению к к-КЗ коровы. Зеленым цветом отмечена последовательность 105–106 в молекуле к-КЗ коровы, желтым – аминокислотные замены в к-КЗ тупайи и верблюда по сравнению с к-КЗ коровы, голубым цветом выделены а.к. остатки, совпадающие во всех трех последовательностях. Стрелками указаны пептидные связи, гидролизуемые гомологичными и гетерологичными химозинами. Знаком “?” обозначена предполагаемая Хн-чувствительная пептидная связь к-КЗ тупайи. Первичные структуры к-казеинов взяты из базы данных GenBank (*T. belangeri* – XM_006142970; *B. taurus* – AY380228.1; *C. dromedarius* – NP_001290489.1).

жаемого радикала находится гидрофильный, положительно заряженный а.к. остаток (рис. 5).

Для сравнения: идентичность участков 96-119 к-КЗ коровы и верблюда составляет 62.5%. Можно было ожидать, что серьезные различия первичной структуры аналогичных участков к-КЗ коровы и тупайи приведут к снижению аффинности рХн *T. belangeri* к пептиду, имитирующему Хн-чувствительный участок гетерологичного субстрата. Однако, на практике, мы наблюдали обратное: по скорости насыщения субстратом, рХн тупайи превосходил ферменты коровы и верблюда в 1.9 и 3.2 раза соответственно. Можно предполагать, что в связывании рХн-Тур и к-КЗ коровы задействованы иные субсайты специфичности, чем в случае рХн коровы и верблюда.

Поскольку структуры Хн-чувствительных участков к-КЗ коровы и тупайи существенно различаются, вопрос о сайте гидролиза коровьего субстрата остается открытым. Известно, что МФ эндотиапепсин (КФ 3.4.23.22), ограниченно используемый в сыроделии, гидролизует в к-КЗ коровы не ключевую связь F105-M106, а предшествующую ей последовательность – S104-F105, где в положении P1 находится незаряженная полярная R-группа. И это несмотря на то, что специфичность эндотиапепсина близка к специфичности свиного пепсина, то есть предпочтительными для гидролиза являются гидрофобные R-группы аминокислот в положении P1 и P1' [48, 49], Поэтому, исходя из анализа кинетики гидролиза синтетического субстрата, можно утверждать лишь то, что рХн-Тур атакует к-КЗ коровы на участке 96-119 настолько эффективно, что вызывает свертывание молока. Для точного установления сайта гидролиза коровьего к-КЗ рХн-Тур необходимо проведение дополнительных исследований.

Особенности а.к. последовательности к-КЗ *T. belangeri* поднимают и ряд других вопросов, связанных с субстратной специфичностью Хн различной видовой принадлежности. Например: какую пептидную связь гидролизуют гомологичные и гетерологичные Хн в молекуле к-КЗ тупайи; какова специфичность рХн-Тур по отношению к Хн-чувствительным участкам к-КЗ животных, относящихся к различным отрядам Млекопитающих?

Таким образом, в системе экспрессии *E. coli* впервые получен и частично охарактеризован генно-инженерный Хн тупайи. Показано, что, несмотря на значительные различия в структуре к-КЗ *B. taurus* и *T. belangeri*, особенно в области Хн-чувствительной последовательности, рХн-Тур способен коагулировать коровье молоко. Неспецифическая ПА фермента тупайи по отношению

к суммарной фракции КЗ коровы оказалась на 30 и 117% выше, чем у рХн коровы и верблюда соответственно. В сравнении с коммерческими генно-инженерными химозинами (*C. dromedarius* и *B. taurus*) рХн тупайи проявлял повышенную ПА по отношению к изолированным α -, β - и к-КЗ коровьего молока. Порог термоинактивации рХн-Тур составлял 45°C, что значительно ниже, чем у подавляющего большинства коммерческих и экспериментальных рХн. Причины экстраординарной термолабильности рХн-Тур должны стать предметом отдельного исследования, поскольку его результаты могут иметь значение для инжиниринга промышленных МФ, с целью направленного изменения их терморезистентности. Способность генно-инженерного Хн тупайи свертывать молоко коровы, наряду с высокой каталитической эффективностью по отношению к пептиду, имитирующему Хн-чувствительный участок коровьего к-КЗ, позволяют отнести этот фермент к универсальным коагулянтам молока, которые могут представлять потенциальный интерес для сыроделия. Для полной биохимической характеристики рХн-Тур необходимо расширенное изучение его специфичности по отношению к гомологичным и гетерологичным к-КЗ.

Авторы надеются, что результаты настоящей работы активизируют поиски и исследования новых “универсальных” химозинов среди видов, не принадлежащих к отряду Китопарнокопытные.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FZMW-2020-0002, “Разработка продуцентов рекомбинантных ферментов для сыроделия”).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Foltmann B. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1992. V. 52. P. 65–79.
2. Lopes-Marques M., Ruivo R., Fonseca E., Teixeira A., Castro L.F.C. // Mol. Phylogenet. Evol. 2017. V. 116. P. 78–86.
3. Bansal N., Drake M.A., Piraino P., Broe M.L., Harboe M., Fox P.F. et al. // Int. Dairy J. 2009. V. 19. № 9. P. 510–517.
4. Fox P.F., McSweeney P.L.H. // Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 2004. V. 1. P. 1–18.
5. Harboe M., Broe M.L., Qvist K.B. // Technology of Cheesemaking. 2010. P. 98–129.

6. *Flamm E.L.* // Nat. Biotechnol. 1991. V. 9. № 4. P. 349.
7. *Kappeler S.R., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhan Z., Hansen E.B., Johansen E.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. V. 342. № 2. P. 647–654.
8. *Børsting M.W., Qvist K.B., Rasmussen M., Vindeløv J., Vogensen F.K., Ardö Y.* // Dairy Sci. Technol. 2012. V. 92. № 5. P. 593–612.
9. *Jensen J.L., Mølgaard A., Poulsen J.-C.N., Harboe M.K., Simonsen J.B., Lorentzen A.M. et al.* // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2013. V. 69. № 5. P. 901–913.
10. *Jensen J.L., Jacobsen J., Moss M.L., Rasmussen F., Qvist K.B., Larsen S. et al.* // J. Dairy Sci. 2015. V. 98. № 5. P. 2853–2860.
11. *Ansari S.M., Coletta A., Skeby K.K., Sørensen J., Schiøtt B., Palmer D.S.* // J. Phys. Chem. B. 2016. V. 120. № 40. P. 10453–10462.
12. *Ansari S.M., Sørensen J., Schiøtt B., Palmer D.S.* // Proteins Struct. Funct. Bioinforma. 2018. V. 86. № 1. P. 75–87.
13. *Sørensen J., Palmer D.S., Qvist K.B., Schiøtt B.* // J. Agric. Food Chem. 2011. V. 59. № 10. P. 5636–5647.
14. *Sørensen J., Palmer D.S., Schiøtt B.* // J. Agric. Food Chem. 2013. V. 61. № 33. P. 7949–7959.
15. *Uniacke-Lowe T., Fox P.F.* // Cheese Fourth Edi. 2017. P. 69–113.
16. *Bayoumi S.* // Kieler Milchwirtsch Forschungsberichte. 1990. V. 42. № 1. P. 3–8.
17. *Wangoh J., Farah Z., Puhan Z.* // Milchwissenschaft. 1993. V. 48. № 6. P. 322–325.
18. *Saliha B.H., Louis L.C., Farida M.M., Saliha S.A., Nasma, M., Elkhir S.O. et al.* // Emirates J. Food Agric. 2011. V. 23. № 4. P. 301–310.
19. *Farah Z., Bachmann M.R.* // Milchwissenschaft. 1987. V. 42. № 11. P. 689–692.
20. *Kappeler S., Farah Z., Puhan Z.* // J. Dairy Res. 1998. V. 65. № 2. P. 209–222.
21. *Akischev Z., Kiribayeva A., Mussakhmetov A., Baltin K., Ramankulov Y., Khassenov B.* // Heliyon. 2021. V. 7. № 5. P. e07137.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07137>
22. *Stasiuk S.J., Summers E.L., Demmer J.* // Reprod. Fertil. Dev. 2000. V. 12. № 4. P. 215–222.
23. *Kotts C., Jenness R.* // J. Dairy Sci. 1976. V. 59. № 5. P. 816–822.
24. *Alihanoglu S., Ektiren D., Karaaslan M.* // Protein Expr. Purif. 2021. V. 183. P. 105874.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105874>
25. *Belenkaya S.V., Balabova D.V., Belov A.N., Koval A.D., Shcherbakov D.N., Elchaninov, V.V.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 4. P. 363–372.
26. *Belenkaya S.V., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov, V.V.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2020 V. 56. № 6. P. 647–656.
27. *Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Kriger A.V., Belov A.N. et al.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. № 6. P. 569–576.
28. *Filkin S.Y., Chertova N.V., Zatsepin S.S., Sadykhov E.G., Fedorov A.N., Lipkin A.V.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. V. 57. № 3. P. 297–302.
29. *Kageyama T.* // Biochemistry. 2004. V. 43. № 48. P. 15122–15130.
30. *Kageyama T.* // J Biochem. 2000. V. 127. № 5. P. 761–770.
31. *Fan Y., Huang Z.-Y., Cao C.-C., Chen C.-S., Chen Y.-X., Fan D.-D., et al.* // Nat. Commun. 2013. V. 5. № 1. P. 1426.
32. *Bradford M.M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1–2. P. 248–254.
33. *Wang N., Wang K.Y., Li G., Guo W., Liu D.* // Protein. Expr. Purif. 2015. № 111. P. 75–81.
34. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
35. *Belenkaya S.V., Bondar A.A., Kurgina T.A., Elchaninov V.V., Bakulina A.Y., Rukhlova et al.* // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. № 7. P. 781–791.
36. *Wei C., Tang B., Zhang Y., Yang K.* // Biochem. J. 1999. V. 340. № 1. P. 345–351.
37. *Chen H., Zhang G., Zhang Y., Dong, Y., Yang K.* // Biochemistry. 2000. V. 39. № 40. P. 12140–12148.
38. *Wei C., Zhang, Y., Yang K.* // J. Protein Chem. 2000. V. 19. № 6. P. 449–456.
39. *Eskandari M.H., Hosseini A., Alasyvand Zarasvand S., Aminlari M.* // Food Biotechnol. 2012. V. 26. № 2. P. 143–153.
40. *Jiang X.P., Yin M.L., Chen P., Yang Q.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 28. № 5. P. 2087–2093.
41. *Costabel L.M., Bergamini C.V., Pozza L., Cuffia F., Candidi M.C., Hynes E.* // J. Dairy Res. 2015. V. 82. № 3. P. 375–384.
42. *Upadhyay V.K., McSweeney P.L.H., Magboul A.A.A., Fox P.F.* // Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 2004. V. 1. P. 391–434.
43. *Feijoo-Siota L., Blasco L., Rodríguez-Rama J.L., Barros-Velázquez J., de Miguel T., Sánchez-Pérez A. et al.* // Recent Adv. DNA Gene Seq. 2014. V. 8. № 1. P. 44–55.
44. Патент Великобритании. 1982. № 4,348,482.
45. *Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G.* // J. Dairy Sci. 2012. V. 95. № 2. P. 609–613.
46. *Wang J., Xu X-L., Ding Z-Y., Mao R-R., Zhou Q-X., Lv L.-B. et al.* // Zoological Research. 2013. V. 34. № E2. P. E69–E74.
<https://doi.org/10.3724/SP.J.1141.2013.E02E69>
47. *Refinetti R., Menaker M.* // J. Exp. Zool. 1992. V. 263. № 4. P. 453–457.
48. *Bailey D., Cooper J.B., Veerapandian B., Blundell T.L., Atrash B., Jones D.M. et al.* // Biochem. J. 1993. V. 289. № 2. P. 363–371.
49. *Whitaker J.R.* // Methods Enzymol. 1970. V. 19. P. 436–445.

Can Recombinant Tree Shrew's (*Tupaia belangeri chinensis*) Chymosin Coagulate Cow (*Bos taurus*) Milk?

D. V. Balabova^a, S. V. Belenkaya^{b, c}, E. A. Volosnikova^b, T. Hermes^d, V. Y. Chirkova^a, E. A. Sharlaeva^a,
D. N. Shcherbakov^{a, b, *}, A. N. Belov^e, A. D. Koval^e, and V. V. Elchaninov^e

^a Altai State University, Barnaul, 656049 Russia

^b State Research Center of Virology and Biotechnology L., AtrasRospotrebnadzora, Koltsovo, 630559 Russia

^c Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

^d Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Leipzig, 04103 Germany

^e Federal Altay Scientific Centre of Agrobiotechnologies, Siberian Institute of Cheese Making, Barnaul, 656910 Russia

*e-mail: dnscherbakov@gmail.com

Genetically engineered chymosin from the tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) has been obtained and partially characterized for the first time. The target enzyme was produced in *Escherichia coli*, strain BL21 (DE3). It was shown that, tree shrew recombinant chymosin coagulates milk of cow (*Bos taurus*). The total and specific milk-clotting activity of the obtained enzyme was 0.7–5.3 IMCU/mL and 8.8–16.6 IMCU/mg. The nonspecific proteolytic activity of tree shrew recombinant chymosin in relation to total bovine casein was 30% and 117% higher than that of recombinant chymosin cow and a single-humped camel respectively. It was found that in comparison with most of the known genetically engineered chymosins, the tree shrew enzyme showed exceptionally low thermal stability. After heating at 45°C, the coagulation ability of tree shrew recombinant chymosin decreased by more than 40%, and at 50°C, the enzyme lost >90% of the initial milk-clotting activity. Michaelis constant (K_m), enzyme turnover number (k_{cat}) and catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for genetically engineered chymosin from the tree shrew were $6.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$, $11927 \pm 3169 \text{ s}^{-1}$ and $1968 \pm 620 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively. Comparative analysis showed that the primary structure of the chymosin-sensitive site of cow kappa-casein and the supposed similar sequence of tree shrew kappa-casein differ by 75%. The ability of tree shrew recombinant chymosin to coagulate cow's milk, along with a low thermal stability and high catalytic efficiency with respect to the substrate, imitating the chymosin-sensitive site of cow kappa-casein, suggests that this enzyme is of potential interest for cheese making.

Keywords: recombinant chymosin, tree shrew, milk-clotting activity, bovine milk, thermal stability, proteolytic activity, cheese making

УДК 579.61.57.043

ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ ПОЛИЭКСТРЕМОФИЛЬНОГО ШТАММА ДРОЖЖЕЙ *Yarrowia lipolytica* W29 В ХОДЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2022 г. Н. Н. Гесслер¹, Н. О. Иванова¹, А. С. Кокорева¹, О. И. Кляйн¹,
Е. П. Исакова¹, Ю. И. Дерябина¹, *

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

*e-mail: yul_der@mail.ru

Поступила в редакцию 10.05.2022 г.

После доработки 24.06.2022 г.

Принята к публикации 04.07.2022 г.

Исследовали окислительно-восстановительный статус, состояние митохондрий, а также другие показатели старения клеток в ходе культивирования экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* W29 в течение 120 ч. Увеличение уровня АФК при переходе в стационарную фазу роста сопровождалось снижением скорости дыхания клеток, увеличением вклада альтернативной оксидазы, повышением уровня активности супероксиддисмутазы и каталазы. В стационарной фазе роста соотношение глутатион/дисульфид глутатиона снижалось в 2–3 раза. Цитометрические исследования с прижизненной окраской потенциометрическим красителем показало снижение митохондриального потенциала по мере старения культуры. В стадии позднего стационарного роста выявлена активация лизосомальных процессов в клетках *Y. lipolytica*, что, по-видимому, обуславливает устойчивость клетки к окислительному стрессу и способствует сохранению выживаемости на уровне 80%.

Ключевые слова: стресс, продолжительное культивирование, антиоксидантные ферменты, супероксиддисмутазы, каталаза, активные формы кислорода, *Yarrowia lipolytica*

DOI: 10.31857/S0555109922060046

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* активно используются в биотехнологии для получения органических кислот и улучшения состава липидов. Благодаря способности расти на различных органических субстратах эти дрожжи находят применение также при ремедиации почв и водных сред, загрязненных нефтепродуктами или отходами масложировой промышленности, и утилизации широкого спектра токсичных поллютантов — от *n*-алканов до тринитротолуола и лигноцеллюлозного сырья [1, 2]. *Y. lipolytica* активно используется также для секреции белков по ко-транскрипционному принципу [3] и экспрессии гетерологичных белков [4–6].

Полиэкстремофильные дрожжи *Y. lipolytica* способны расти в широком диапазоне рН, обладают гибкой системой редокс-адаптации, позволяющей эффективно переносить повышение уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках без заметных изменений параметров роста культуры, что делает их привлекательным объектом для использования в качестве промышленного продуцента [7, 8]. *Y. lipolytica* является распространённым продуцентом рекомбинантного белка, причем в работе [9] было показано, что организация произ-

водства рекомбинантного белка предпочтительна в непрерывном режиме — это позволяет повысить индукцию промоторов и выход целевого продукта. Однако, несмотря на широкие возможности *Y. lipolytica*, биотехнологический потенциал данного объекта реализуется на практике крайне мало: можно отметить лишь производство лимонной кислоты [10], а также применение этого организма в пищевой промышленности для улучшения вкусовых качеств продуктов и обработке гидрофобных отходов пищевых производств [11]. Во многом это обусловлено противоречивыми и неполными данными о физиологии *Y. lipolytica* и ее адаптивном ресурсе. Как известно, стрессовые воздействия на клетку, такие как экстремальные значения рН и температуры, лимитирование по какому-либо компоненту питания или изменение условий аэрации, зачастую являются неотъемлемым элементом биотехнологического процесса. *Y. lipolytica* проявляют чрезвычайно высокую устойчивость к различным неблагоприятным факторам, связанным с развитием окислительного стресса, например, повышению температуры и уровня этанола, внесению сублетальных доз перекиси водорода или

прооксидантов [12]. В связи с этим исследование физиологических характеристик *Y. lipolytica* в процессе продолжительного культивирования является актуальной задачей, решение которой может позволить найти новые промоторы генов, индукция которых возрастает и стабилизируется в поздней стационарной стадии роста.

Известно, что в процессе длительного культивирования на фоне истощения субстратов также наблюдается повышение уровня АФК и развитие окислительного стресса, что приводит к возникновению различных повреждений и старению культуры. В значительной степени развитие этих процессов связано с нарушением митохондриальных процессов и деэнергизации клеток [13]. Низшие эукариоты-дрожжи представляют собой прекрасную модель изучения клеточного и организменного старения на уровне одной клетки [14, 15]. На дрожжевых организмах изучены 2 модели старения: репликативная, при которой продолжительность жизни определяется числом дочерних клеток, продуцируемых материнской до физиологического старения. Хронологическая продолжительность жизни характеризует тот отрезок времени, который клетка существует в неделиющемся состоянии. Исследование старения дрожжевых клеток убедительно показало, что АФК накапливаются в период так называемого диауксического сдвига (стадии перехода в стационарную фазу роста микроорганизмов) и в стационарной фазе роста [16]. Процессы, позволяющие снижать генерацию АФК в митохондриях, замедляют старение клеток [17].

Помимо снижения уровня АФК одним из важнейших механизмов метаболической адаптации к стрессовым условиям рассматривают аутофагию [18]. В ходе аутофагоцитоза не только происходит деградация окисленных органических молекул и поврежденных органелл, но и высвобождается материал для их обновления, что позволяет поддерживать жизнеспособность клеток при истощении субстратов в процессе длительного культивирования.

Цель работы – характеристика показателей старения в ходе продолжительного культивирования дрожжей *Y. lipolytica* W29.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В работе использовали штамм экстремофильного вида *Y. lipolytica* W29 (дикий тип), полученный из коллекции типовых штаммов CIRM-Levures (Франция).

Культивирование клеток. Выращивание штамма *Y. lipolytica* W29 для проведения экспериментов проводили на синтетической среде YNB следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.3; KH_2PO_4 – 2; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; NaCl – 0.1;

CaCl_2 – 0.05; глицерин – 10; дрожжевой экстракт – 2; микроэлементы (мкг/мл): KI – 0.2; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.08; MnSO_4 – 0.08; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.08; H_3BO_3 – 1.0; витамины (мкг/мл): биотин – 0.02; фолиевая кислота – 0.02; пантотенат кальция – 0.6; инозит – 3.0; никотиновая кислота – 0.6; пара-аминобензойная кислота – 0.3; пиридоксин- HCl – 0.6; рибофлавин – 0.3; тиамин- HCl – 0.15; pH 5.5–5.6.

Долгосрочное поддержание культур, а также опыты по определению выживаемости клеток проводили на твердых средах следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт – 2.0; пептон – 5.0; солодовый экстракт – 3.0; глицерин – 10; агар-агар – 20; КОН или H_2SO_4 – по показаниям pH-метра.

Культуры выращивали в качалочных колбах Эрленмейера объемом 750 мл в 100 мл жидкой среды при 180 об./мин.

Для проведения физиологических экспериментов использовали оптимальные условия культивирования: pH 5.5 и температуру – 28°C. Все эксперименты проводили в трех аналитических и биологических повторностях, рассчитывая средние значения физиолого-биохимических показателей. Накопление биомассы оценивали по нарастанию в культуре оптической плотности (ОП) при длине волны $\lambda = 590$ нм.

Анализ выживаемости клеток. Выживаемость клеток оценивали методом Коха по их способности образовывать колонии на агаризованной полноценной среде после посева на чашках Петри.

Флуоресцентное окрашивание и проточная цитометрия. Состояние митохондрий дрожжей определяли методом проточной цитометрии после окрашивания MitoTracker™ Red CMXRos (“Invitrogen™ Thermo Scientific”, США) [19]. Клетки дрожжей отмывали в растворе фосфатно-солевого буфера, суспензию разводили до ОП, равной 2.0, и вносили краситель в равном объеме до конечной концентрации 100 нМ. Образцы инкубировали в темноте 30 мин при комнатной температуре, затем готовили разведение для достижения ОП 0.1 и анализировали в 96-луночных планшетах на цитометре Beckman Cytoflex V2B2Y2R0 (“Thermo Scientific”, США).

Цитологическое окрашивание с помощью LysoTracker Red DND 99. На этапе подготовки образцов отбирали 1–2 мл клеточной суспензии, осаждали в эппендорфах в течение 1–2 мин при 4000 g и дважды промывали фосфатно-солевым буфером. Затем ресуспендировали, доводя до ОП 0.05–0.1 ед. После этого клетки окрашивали 100 нМ LysoTracker Red DND-99 (“Invitrogen™ Thermo Scientific”, США) в ДМСО в течение 2 ч при 37°C. Образцы исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioskop 40 FL (“Carl Zeiss”, Германия) при длине волны возбуждения 543 нм.

Изображения были созданы с помощью браузера изображений “Carl Zeiss LSM”.

Дыхательная активность клеток. Скорость потребления кислорода клетками дрожжей исследовали полярографическим методом, используя многоканальную микроэлектродную установку с системой сбора информации и программой Record-4, (рабочий объем ячейки 1.0 мл) [20]. Исследования дыхательной и фосфорилирующей активности проводили в среде, содержащей 50 мМ К-фосфатный буфер, pH 5.5, и 1% глюкозы (конечный объем 1 мл). Скорость дыхания оценивали по увеличению потребления кислорода за 1 мин. Полученные количественные значения рассчитывали относительно сухой биомассы. Для определения сухой биомассы 1–2 мл суспензии отмытых клеток, используемых для полярографического анализа дыхательной активности, сушили в бюксах при 104°C до постоянного веса.

Ингибиторный анализ клеточного дыхания проводили следующим образом: к дышащей суспензии клеток добавляли ингибитор терминальной цитохромоксидазы – KCN (“Реахим”, Россия) в концентрации 1–4 мМ и фиксировали уменьшение скорости дыхания. Расчет ингибирования проводили в аналитической программе Analyse Record-4 (в %). Вклад цианид-нечувствительного дыхания (активность альтернативной оксидазы) рассчитывали в нг-атом кислорода/мин на мг сухой биомассы.

Анализ содержания восстановленной и окисленной форм глутатиона. Клетки разрушали растиранием в жидком азоте и переносили в 0.1 М калий-фосфатный буфер, pH 8.0, в соотношении 1 : 5 об. Белки осаждали внесением равного объема 5%-ной метафосфорной кислоты (“Реахим”, Россия), выдерживая смесь в течение 20 мин на льду. Далее экстракты центрифугировали в течение 20 мин при 15000 g. В полученных супернатантах, разведенных в 10 раз 0.1 М калий-фосфатным буфером, определяли содержание окисленной и восстановленной форм глутатиона. Для определения содержания глутатиона в кварцевую кювету объемом 3 мл вносили 100 мкл исследуемого экстракта и ортофталевый альдегид (“Fluca Analytical”, Германия) до конечной концентрации 0.3 мкМ, смесь инкубировали в темноте в течение 15 мин. Глутатион определяли по спектру испускания в диапазоне длин волн 360–500 нм при возбуждении светом с длиной волны 350 нм, на спектрофотометре “Shimadzu RF 5301 PC” (“Shimatsu”, Япония). О концентрации восстановленной формы глутатиона судили по площади под кривой спектра испускания. Определение окисленной формы глутатиона проводили аналогичным образом в 0.1 М NaOH. Исходные экстракты перед измерением были разведены в 10 раз 0.1 М NaOH с добавлением 1.6 мМ N-метилмалеимида (“Sigma-Aldrich”,

США), полученную смесь инкубировали в течение 30 мин. Для измерения концентраций восстановленной и окисленной форм глутатиона в каждой серии экспериментов строили калибровочные кривые с диапазоном концентраций 1–10 мкг/мл, для чего были использованы восстановленная форма глутатиона (“Serva”, Германия) и окисленная форма глутатиона (“Reagent”, Венгрия). Полученные значения рассчитывали на г сухой биомассы.

Определение уровня АФК в клетках. Общее содержание АФК в клетках определяли флуориметрическим методом с использованием флуоресцентного красителя эфира дигидро-2',7'-дихлорофлуоресцеина диацетата (ДХФДА) (“Sigma-Aldrich”, США). В клеточную суспензию дрожжей, разведенную фосфатно-солевым буфером в соотношении 1 : 2, добавляли ДХФДА в ДМСО до конечной концентрации 40 мкМ и экспонировали в течение 30 мин в темноте, после чего дважды промывали буфером того же состава. В качестве “положительного контроля” использовались клетки дрожжей, обработанные в растворе прооксиданта 600 мкМ 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорида (АМПА, “Sigma”, США). Полученную суспензию вносили по 200 мкл в ячейки 96-луночного планшета. Измерение флуоресценции проводили при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны эмиссии 528 нм каждые 5 мин на микропланшетном фотофлуориметре Synergy 2 (“Bio Teck”, США) при чувствительности 100% и 35%. Содержание АФК рассчитывали на г сухой биомассы.

Приготовление клеточных гомогенатов. Клетки дрожжей отделяли от культуральной жидкости центрифугированием, дважды отмывали охлажденной до 4°C водой, суспендировали в соотношении 1 : 1 (г/мл) в среде следующего состава: 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота – 10 мМ, сорбит – 0.5 М, манит – 0.5 М, ЭДТА – 5 мМ, фенилметилсульфонил фторид – 0.5 мМ, pH 6.5. Клетки дрожжей разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE (“Farmacia”, Швеция) в течение 2 мин (4 цикла по 30 с, с перерывом 30 с) при 4–0°C. Полученный гомогенат центрифугировали при 20000 g 30 мин. Для исследований использовали супернатант.

Определение активности каталазы. Суммарную каталазную активность определяли по скорости расщепления пероксида водорода (при ОП₂₄₀) и выражали в микромолях расщепленного H₂O₂ в мин на 1 мг белка [20]. В качестве ингибитора каталазной активности использовали аминотриазол (АТЗ).

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД). Активность СОД определяли непрямым методом, измеряя ингибирование автоокисления кверцетина при ОП₄₀₆ как описано в работе [21]. Исследование проводили в 20 мМ К-фосфатном буфере, содержащем 0.1 мМ ЭДТА, pH 7.8, добав-

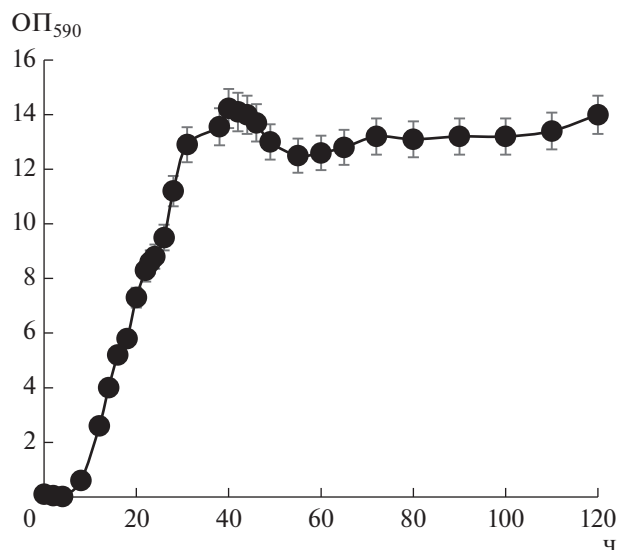


Рис. 1. Кривая роста *Y. lipolytica* (ОП₅₉₀) при культивировании на среде YNB с глицерином в качестве источника углерода.

ля тетраметилэтилендиамин до pH 10.0. Затем к реакционной смеси добавляли 10 мкл гомогената, разведенного 1 : 10 или при высокой активности 1 : 100. Реакцию запускали добавлением кверцетина (0.36 мМ в ДМСО). За единицу ферментативной активности СОД принимали количество белка, вызывающего 50% ингибирование автоокисления кверцетина. В качестве специфического ингибитора СОД применяли диэтилдитиокарбамат (ДДК).

Определение белка. Содержание белка в клеточных экстрактах определяли по методу Бредфорда [22] с использованием Кумасси G-250 ("VWR Amresco", США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика роста культуры клеток дрожжей *Y. lipolytica* при продолжительном культивировании. Культивирование дрожжей *Y. lipolytica* проводили на среде YNB с глицерином в качестве субстрата в оптимальных условиях (28°C, pH 5.5) в течение 120 ч. Как видно из рис. 1, лаг-фаза длилась 6 ч, через 38–40 ч культивирования происходил переход в стационарную стадию роста, которая длилась более 400 ч без заметного снижения ОП культур (не показано).

Для дальнейших исследований физиолого-биохимических показателей адаптации *Y. lipolytica* к длительному культивированию были выбраны следующие точки: 18 ч (логарифмическая фаза), 40 ч (переход в стационарную фазу роста), 70 ч (стационарная фаза роста), 120 ч (поздняя стадия стационарного культивирования). У ото-

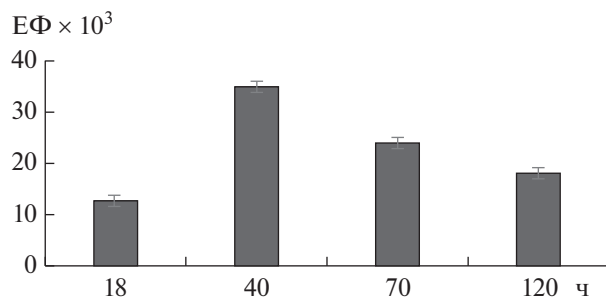


Рис. 2. Уровень АФК (ед. флуоресценции, ЕФ × мг⁻¹ сухой биомассы) в клетках *Y. lipolytica* в ходе продолжительного культивирования.

бранных в эти точки клеток были определены: уровень АФК, скорость дыхания, вклад альтернативной оксидазы митохондрий в общую дыхательную активность, анализ активностей антиоксидантных ферментов (каталазы и СОД) и соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона.

Исследование уровня АФК в клетках *Y. lipolytica*. Показано, что уровень АФК в клетках *Y. lipolytica* был минимальным в логарифмической фазе роста, достигал максимального значения при переходе в стационарную (40 ч), после чего снижался примерно на 45–50% при переходе клеток в позднюю стационарную фазу (рис. 2). Снижение уровня АФК в поздней стационарной фазе свидетельствовало об адаптации культуры и активации антиоксидантных защитных механизмов.

Исследование скорости дыхания и активности альтернативной оксидазы митохондрий *Y. lipolytica*. Скорость дыхания является важнейшим показателем энергетического статуса клеток, а включение в дыхание альтернативной оксидазы рассматривается как один из универсальных механизмов ответа клеток на стрессовые воздействия различной природы. Индукция альтернативной оксидазы позволяет избежать "утечки" электронов из электрон-транспортной цепи и снизить таким образом генерацию АФК, которая делает процесс дыхания менее энергетически выгодным [23].

Анализ интенсивности дыхания и вклада альтернативной оксидазы митохондрий у клеток *Y. lipolytica* (рис. 3) показал, что скорость дыхания клеток достигала максимального значения в логарифмической фазе роста (51 нг-атом О/мг сухой биомассы), после чего клетки, по всей видимости, проходили некий период адаптации, в течение которого скорость уменьшалась в переходной фазе более, чем в 3 раза, стабилизируясь в стационарной фазе роста на одном минимальном уровне (рис. 3). У всех образцов клеток *Y. lipolytica* также был исследован вклад альтернативной оксидазы митохондрий в общую скорость дыхания (рис. 3). Цианид-резистентность клеток *Y. lipolytica* была

минимальной в логарифмической стадии роста (31% от общего дыхания клеток), далее наблюдалось возрастание активности альтернативной оксидазы по мере перехода в стационарную фазу роста — от 61% от общего дыхания клеток в переходной фазе до 68% в стадии устойчивого стационара (рис. 3).

Определение активностей антиоксидантных ферментов клеток *Y. lipolytica*. Во всех образцах клеток была исследована активность ферментов первой линии защиты против АФК — СОД и каталазы. Показано, что активность СОД (рис. 4, 1) постепенно увеличивалась по мере перехода клеток в стационарную стадию роста (от 173 до 236 ед./мг белка) и достигала максимального значения в поздней стационарной стадии роста.

Активность клеточной каталазы (рис. 4, 2) увеличивалась примерно в 2.5 раза в стадии перехода в стационарную фазу по сравнению с логарифмической фазой, а затем постепенно снижалась, достигая уровня 18 ч роста в поздней стационарной фазе.

Исследование соотношения восстановленной и окисленной форм глутатиона *Y. lipolytica*. Соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона в клетке является одним из важнейших параметров, который характеризует уровень окислительного стресса в клетке [24]. Значения соотношения восстановленной и окисленной форм глутатиона в клетках *Y. lipolytica* в логарифмической стадии и фазе перехода были практически одинаковыми (0.9 ± 0.1) и уменьшались примерно в 3 раза по мере перехода клеток в позднюю стационарную фазу ($0.3-0.4 \pm 0.05$) (рис. 5).

Анализ выживаемости клеток *Y. lipolytica*. Оценка выживаемости клеток *Y. lipolytica* на разных стадиях роста проводилась методом Коха. Анализ жизнеспособности клеток дрожжей *Y. lipolytica* показал, что выживаемость клеток в ходе продолжительного культивирования постепенно снижалась с 94% в 18 ч роста до ~80% в 120 ч (рис. 6).

Анализ энергетического статуса клеток *Y. lipolytica* по окрашиванию с потенциометрическим красителем MitoTracker Red. Митохондрии выполняют основную функцию в энергообеспечении клетки. Состояние митохондрий в процессе старения культуры оценивали цитометрически по окраске с MitoTracker Red. Флуоресцентный краситель MitoTracker Red несет на себе два положительно заряженных атома азота (обладает катионными свойствами), что позволяет ему накапливаться в митохондриях живых клеток с отрицательным мембранным потенциалом [25]. При анализе энергетического статуса клеток *Y. lipolytica* [26] на проточном цитометре оценивали распределение клеток в зависимости от их флуоресценции после окрашивания MitoTracker Red. Анализ энергетического статуса клеток *Y. lipolytica* показал, что в

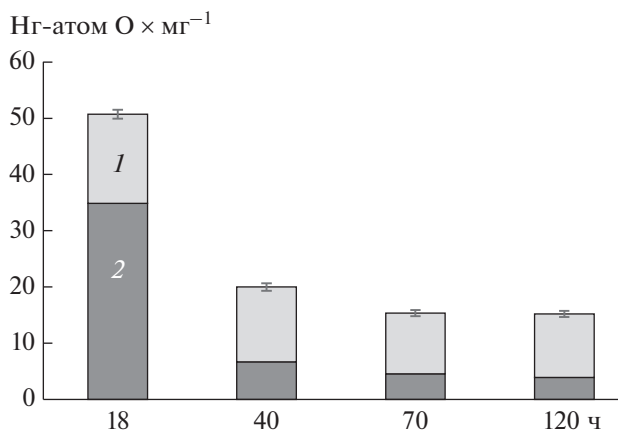


Рис. 3. Вклад альтернативной оксидазы митохондрий (1) и цианид-чувствительного дыхания клеток (2) в общую скорость дыхания *Y. lipolytica* в ходе продолжительного культивирования.

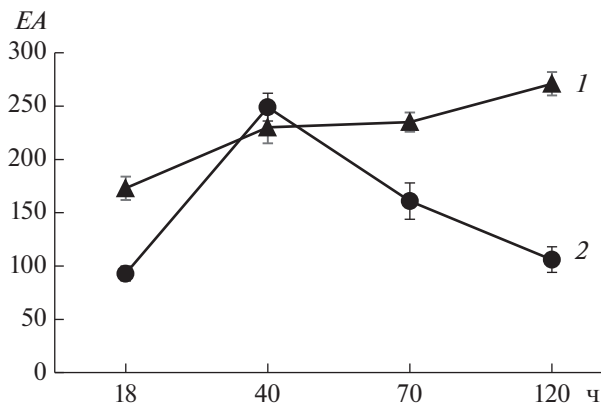


Рис. 4. Суммарная активность СОД (1, ед. акт × мг⁻¹ белка) и каталазы (2, мкмоль Н₂О₂ × мин⁻¹ × мг⁻¹ белка) в клетках *Y. lipolytica*.

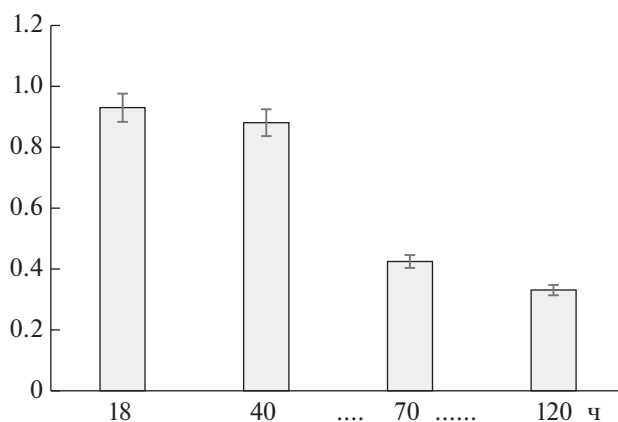


Рис. 5. Соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона в клетках *Y. lipolytica*.

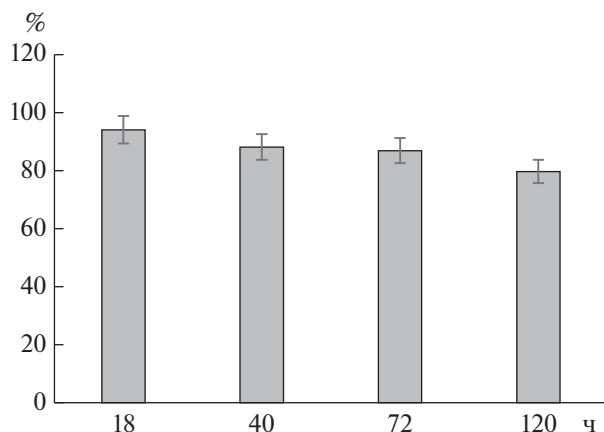


Рис. 6. Выживаемость клеток *Y. lipolytica*.

зависимости от уровня мембранного потенциала митохондрии распределялись на группы с высокими, средними и низкими показателями (рис. 7). В логарифмической фазе роста преобладали клетки с высоким и средним потенциалом митохондрий — до 97% (рис. 7а, б, д). При 40 и 70 ч культивирования сумма клеток с высокой и средней энергизацией снижалась до 60%. В поздней стационарной фазе роста суммарная доля клеток с высоким и средним уровнем энергизации снижалась до 42% (рис. 7в, г, д). Снижение энергетического статуса совпадало со снижением уровня дыхания вследствие снижения уровня метаболизма в стационарной фазе (рис. 3).

Окрашивание клеток *Y. lipolytica* LysoTracker Red DND 99. Лизосомы являются основными органеллами клетки, где происходит гидролиз различных макромолекул. Они характеризуются высокой концентрацией протонов и содержанием более 50 гидролаз с оптимальным рН ниже 6.36 [27]. Для детекции этих органелл в клетках используются специфические зонды на основе слабоосновных аминов, которые избирательно накапливаются в клеточных компартментах с низким рН и могут быть использованы для исследования биосинтеза и патогенеза лизосом [28]. Зонды группы LysoTracker, состоящие из флуорофора, связанного со слабым основанием, лишь частично протонируются при нейтральном рН, свободно проникают через клеточные мембраны и обычно концентрируются в сферических органеллах клетки. Было проведено прижизненное окрашивание клеток *Y. lipolytica* специфическим зондом LysoTracker Red DND 99, в результате чего было показано, что в клетках логарифмической фазы роста наблюдалось слабое окрашивание пристеночной области цитоплазмы без видимого усиления флуоресценции в сферических органеллах (рис. 8а), в то время как в клетках поздней ста-

ционарной фазы были отчетливо видны сферические области, которые можно отнести к лизосомальным структурам (рис. 8г).

В результате проведенных исследований на модели *Y. lipolytica* W29 была выполнена оценка некоторых показателей физиологического старения в ходе продолжительного культивирования дрожжей: параметров роста и основных показателей окислительно-восстановительного статуса клеток. Известно, что *Y. lipolytica* обладает полным набором ферментов дыхательной цепи и точками сопряжения, характерными для клеток млекопитающих. В ходе эксперимента в логарифмической фазе роста (18 ч) наблюдали высокую скорость дыхания, низкий уровень АФК (рис. 2), высокий уровень соотношения GSH/GSSG (рис. 5) и относительно невысокую активность антиоксидантных ферментов СОД и каталазы (рис. 4). Все вместе эти экспериментальные факты свидетельствуют о высоком восстановительном потенциале культуры в этой фазе. Переход в стационарную фазу сопровождался наибольшими изменениями в состоянии клеток — уровень АФК возрастал почти в 3 раза (рис. 2), дыхательная активность снижалась в 2.5 раза на фоне возрастания вклада альтернативной оксидазы (рис. 3), а также возрастала активность СОД и в большей мере активность каталазы (рис. 4), что подтверждало развитие окислительного стресса. Ранее при анализе неспецифических изменений проницаемости внутренней мембраны митохондрий в ходе роста и старения культуры дрожжей *Endomyces magnusii* также наблюдали увеличение активности митохондриальных антиоксидантных ферментов и уровня АФК [29]. По-видимому, высокая продукция АФК, наблюдаемая в этот период, приводит к индукции альтернативного цианид-резистентного пути переноса электронов, который является элементом антиоксидантной защиты, как показано в ряде исследований [30–32]. При этом накопленных ресурсов еще достаточно для поддержания соотношения GSH/GSSG на уровне, соответствующем логарифмической фазе роста: в этой стадии развития деление клеток идет еще достаточно активно.

Показатели окислительно-восстановительного статуса в стадии глубокого стационара указывали, с одной стороны, на снижение окислительного стресса, которое выражалось в некотором снижении уровня АФК (рис. 2) и активности каталазы (рис. 4, 2), однако, падение соотношения GSH/GSSG в 3 раза по сравнению с логарифмической стадией роста (рис. 5) отражало в целом уменьшение восстановительного потенциала клетки, что сопряжено со снижением способности клеток к интенсивному росту и делению. Согласно современным представлениям, снижение уровня GSH ниже определенного порогового значения

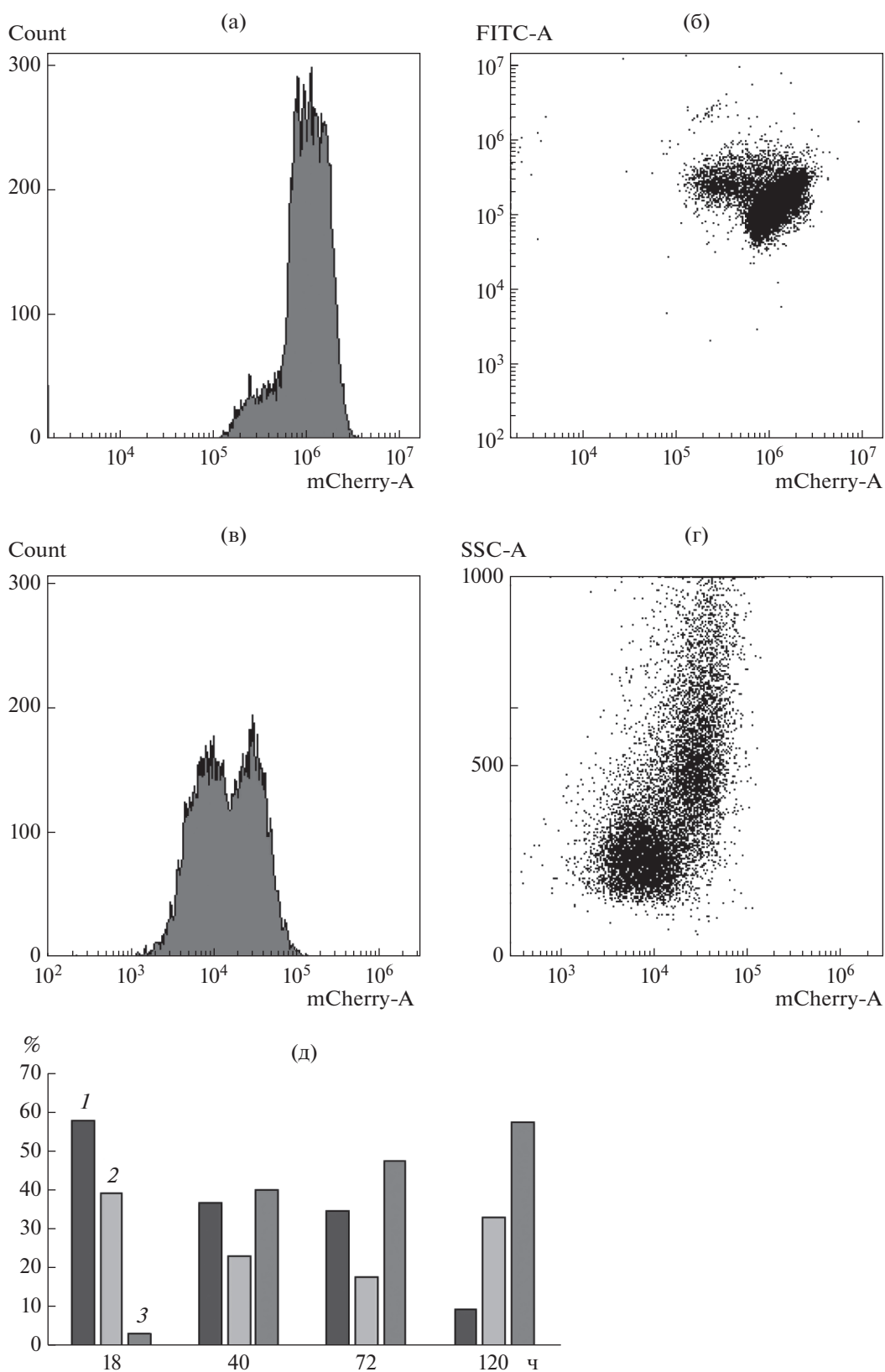


Рис. 7. Распределение клеток (%) в зависимости от интенсивности их флуоресценции (окраска потенциометрическим красителем MitoTracker Red): а, б – 18 ч роста; в, г – 120 ч; а, в – гистограмма; б, г – точечные графики; д – распределение клеток по степени энергизации митохондрий: 1 – высокий потенциал; 2 – средний потенциал; 3 – низкий потенциал.

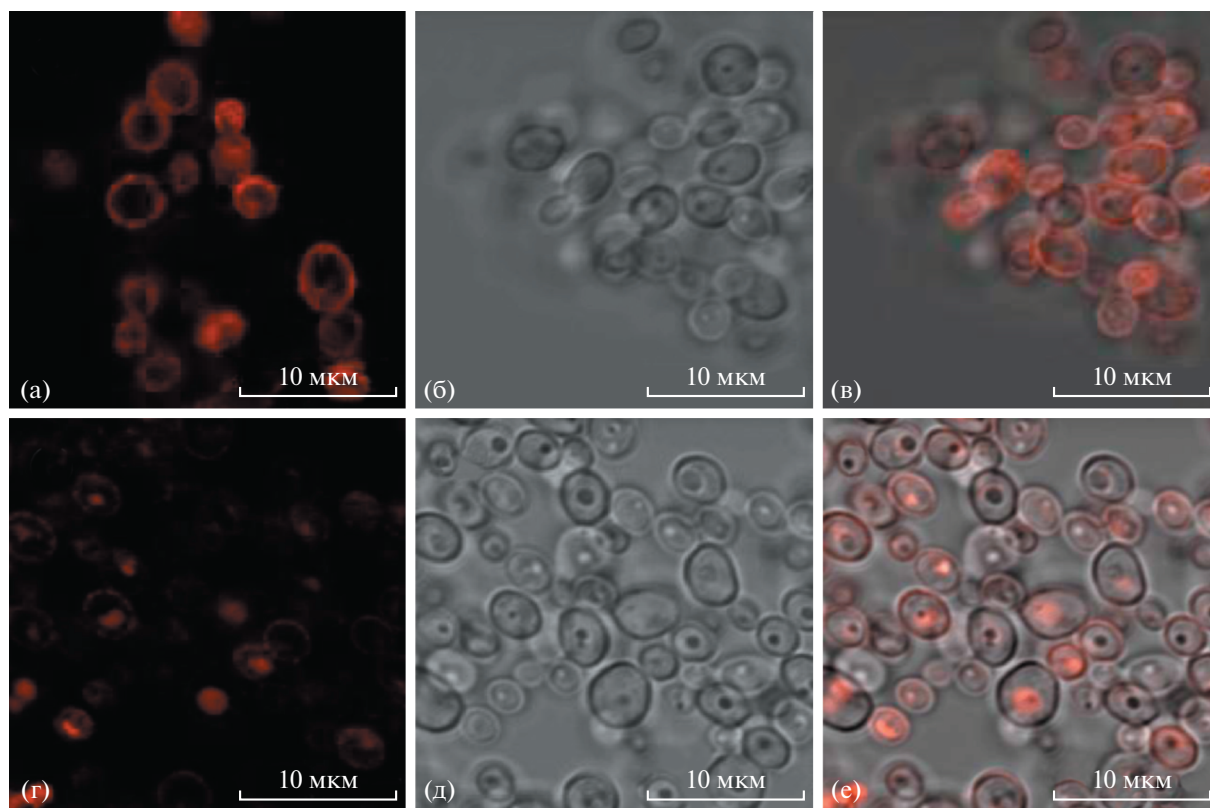


Рис. 8. Визуализация лизосом после окрашивания LysoTracker Red DND-99 при помощи флуоресцентного микроскопа: а, г — флуоресцентная микроскопия; б, д — оптическая микроскопия; в, е — наложение изображений.

ведет к появлению сигнала к развитию апоптоза, который инициируется активацией рецептора смерти или митохондриальным апоптопотическим сигналингом [33]. Это предположение подтверждалось общим снижением энергетического потенциала, которое характеризовалось уменьшением доли клеточной популяции с высоким мембранным потенциалом митохондрий (рис. 7д).

При длительном культивировании клеток митохондрии дрожжей претерпевают изменения, определяющие их последующее существование и их способность к пролиферации или переходу в стадию относительного покоя [34]. Клетки *Y. lipolytica* при снижении восстановительного потенциала после 70–120 ч культивирования сохраняли высокую жизнеспособность на уровне 80%, что может свидетельствовать об их переходе в состояние высокой устойчивости к окислительному стрессу.

Способность клеток *Y. lipolytica* W29 сохранять жизнеспособность в условиях продолжительного роста может быть связана с процессами аутофагии. При недостатке питательных веществ или факторов роста аутофагия считается неселективным и целенаправленным процессом, который приводит к массовой деградации любого цитозольного белка

и других макромолекул для доставки необходимых питательных веществ клеткам [35, 36]. Известно, что аутофагия может также избирательно воздействовать на клеточные структуры, такие как органеллы, ядерные компоненты, протеасомы, белковые агрегаты и т.д. в случае селективного цитопротекторного процесса. Результаты окрашивания показали, что количество активных лизосом увеличивалось, либо их биогенез индуцировался в стадии устойчивого стационара (рис. 8г), что свидетельствовало о протекании процессов аутофагии с участием лизосом. Это, в свою очередь, объясняет, с одной стороны, падение выживаемости, то есть фактическую гибель ~20% клеточной популяции, которая может происходить за счет аутофагии, а с другой — поддержание относительно стабильной выживаемости остальной части популяции.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Song H.T., Yang Y.M., Liu D.K., Xu X.Q., Xiao W.J., Liu Z.L. et al.* // *Bioengineered*. 2017. V. 8. № 5. P. 624–629.
<https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1293219>
2. *Louhasakul Y., Cheirsilp B., Treu L., Kougiass P.G., Angelidaki I.* // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2020. V. 67. № 6. P. 1020–1029.
<https://doi.org/10.1002/bab.1878>
3. *Bae S.J., Park B.G., Kim B.G., Hahn J.S.* // *Biotechnol. J.* 2020. V. 15. № 1. e1900238.
<https://doi.org/10.1002/biot.201900238>
4. *Darvishi F., Ariana M., Marella E.R., Borodina I.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. № 14. P. 5925–5938.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9099-x>
5. *Shi T.Q., Huang H., Kerkhoven E.J., Ji X.J.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. № 22. P. 9541–9548.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9366-x>
6. *Patra P., Das M., Kundu P., Ghosh A.* // *Biotechnology Advances*. 2021. V. 47. P. 107695.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107695>
7. *Секова В.Ю., Гесслер Н.Н., Исакова Е.П., Антипов А.Н., Дергачева Д.И., Дeryabina Ю.И., Трубникова Е.В.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2015. Т. 51. № 6. С. 570–577.
8. *Sekova V.Yu., Dergacheva D.I., Isakova E.P., Gessler N.N., Tereshina V.M., Deryabina Y.I.* // *Metabolites*. V. 2019. № 9. P. 307.
<https://doi.org/10.3390/metabo9120307>
9. *Korpys-Woźniak P., Kubiak P., Biatas W., Celińska E.* // *Applied microbiology and biotechnology*. 2020. V. 104. № 22. P. 9785–9800.
10. *Rzechonek D.A., Dobrowolski A., Rymowicz W., Mirończuk A.M.* // *Bioresour Technol.* 2019. V. 271. P. 340–344.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.118>
11. *Fickers P., Marty A., Nicaud J.-M.* // *Biotechnol. Adv.* 2011. V. 29. № 6. P. 632–644.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.005>
12. *Аринбасарова А.Ю., Бирюкова Е.Н., Меденцев А.Г.* // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2015. Т. 51. № 2. С. 122–131.
13. *Dahiya R., Mohammad T., Alajmi M.F., Rehman M.T., Hasan G.M., Hussain A., Hassan M.I.* // *Biomolecules*. 2020. V. 10. P. 882.
<https://doi.org/10.3390/biom10060882>
14. *Dakik P., Titorenko V.I.* // *Front. Genet.* 2016. V. 7. P. 177.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00177>
15. *Postnikoff S.D.L., Johnson J.E., Tyler J.K.* // *Microb. Cell.* 2017. V. 4. № 11. P. 368–375.
16. *Herker E., Jungwirth H., Lehmann K.A., Maldener C., Fröhlich K.-Uwe., Wissing S. et al.* // *J. Cell Biol.* 2004. V. 164. № 4. P. 501–507.
17. *Vysokikh M.Y., Holtze S., Averina O.A., Lyamzaev K.G., Panteleeva A.A., Marey M.V. et al.* // *PNAS*. 2020. V. 117. № 12. P. 6491–6501.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1916414117>
18. *Lei Y., Huang Y., Wen X., Yin Z., Zhang Z., Klionsky D.J.* // *Antioxidants*. 2022. V. 11. P. 304.
<https://doi.org/10.3390/antiox11020304>
19. *Deere D., Shen J., Vesey G., Bell P., Bissinger P., Veal D.* // *Yeast*. 1998. V. 14. № 2. P. 147–160.
20. *Deryabina Y., Isakova E., Antipov A., Saris N.E.* // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2013. V. 45. № 5. P. 491–504.
21. *Костюк В.А., Потанович А.И., Ковалева Ж.В.* // *Вопросы мед. химии*. 1990. № 2. С. 88–91.
22. *Bradford M.M.* // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
23. *Рогов А.Г., Звягильская Р.А.* // *Биохимия*. V. 2015. V. 80. № 4. С. 472–479.
24. *Белозерская Т.А., Гесслер Н.Н.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2007. Т. 43. № 5. С. 565–575.
25. *Poot M., Zhang Y.Z., Kramer J.A., Wells K.S., Jones L., Hanzel D.K. et al.* // *J. Histochem. Cytochem.* 1996. V. 44. № 12. P. 1363–1372.
<https://doi.org/10.1177/44.12.8985128>
26. *Monteiro L.B., Davanzo G.G., Aguiar C.F., Moraes-Vieira P.M.M.* // *Methods X*. 2020. V. 7.
<https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100938>
27. *Zhu H., Fan J., Du J., Peng X.* // *Acc. Chem. Res.* 2016. PMID, 27661761.
28. *Martins W.K., Santos N.F., Rocha C.S., Bacellar I.O.L., Tsubone T.M.* // *Autophagy*. 2019. V. 15. № 2. P. 259–279.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1515609>
29. *Deryabina Y., Isakova E., Sekova V., Antipov A., Saris N.E.* // *Bioenerg. Biomembr.* 2014. V. 46. № 6. P. 479–492.
30. *Veiga A., Arrabaça J.D., Loureiro-Dias M.C.* // *FEMS Yeast Res.* 2003. V. 3. № 3. P. 239–245.
31. *Vanlerberghe G.C.* // *J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. № 4. P. 6805–6847.
32. *Saha, B., Borovskii. G., Panda. S.K.* // *Plant Signal Behav.* 2016. V. 11. № 12. e1256530.
33. *Shi Y., Buffenstein D.A.* // *Integr. Comp. Biol. Res.* 2010. V. 50. № 5. P. 869–879.
34. *Laporte D., Gouleme L., Jimenez L., Khemiri I., Sagotet I.* // *eLife*. 2018. V. 7. e35685. doi.org/
<https://doi.org/10.7554/eLife.35685>
35. *Dikic I.* // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. 86. № 5. P. 193–224.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044908>
36. *Madeo F., Zimmermann A., Maiuri M.C., Kroemer G.* // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 1. P. 85–93.
<https://doi.org/10.1172/JCI73946>

Physiological Adaptation Features of the Poly-Extremophilic *Yarrowia lipolytica* Yeast W29 During Long-Lasting Cultivation

N. N. Gessler^a, N. O. Ivanova^a, A. S. Kokoreva^a, O. I. Klein^a, E. P. Isakova^a, and Y. I. Deryabina^{a, *}

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

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

The study of the redox and mitochondria state, as well as some other hallmarks of cell aging was performed using the extremophilic yeast of *Yarrowia lipolytica* W29 during long-lasting cultivation for 120 h. An increase in the ROS level upon the transition to the stationary growth phase was accompanied by a decrease in the cell respiratory rates, an increase in the alternative oxidase share. Moreover the activities of superoxide dismutase and catalase rose. In the stationary growth phase, the ratio of glutathione/glutathione disulfide two-three-fold decreased. Cytometric studies of the populations *in vivo* stained with a potentiometric mitotracker showed a decrease in mitochondrial potential as the culture gets old. At the late stationary growth stage, some lysosomal processes in the *Y. lipolytica* cells were induced that apparently increased the resistance to oxidative stress and let the culture keep the survival rate at the level of 80%.

Keywords: stress, long-lasting cultivation, antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, reactive oxygen species, *Yarrowia lipolytica*

УДК 577.151.32

ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗОФЕРМЕНТОВ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ИЗ ЛИСТЬЕВ КУКУРУЗЫ ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ

© 2022 г. А. Т. Епринцев¹, *, Д. Н. Федорин¹, О. Х. Флорес Каро¹¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Воронежский государственный университет”, Воронеж, 394018 Россия

*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 07.04.2022 г.

После доработки 04.06.2022 г.

Принята к публикации 04.07.2022 г.

При использовании многостадийной очистки сукцинатдегидрогеназы (СДГ) получены препараты в высокоочищенном состоянии. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ-Sephacel позволила разделить изоферменты СДГ1 и СДГ2 из листьев кукурузы в норме и при воздействии солевого стресса. Удельная активность полученных препаратов СДГ колебалась от 0.623 до 1.095 Е/мг белка, при этом выход составлял от 15.36 до 20.71%. Сравнительный анализ значений K_m , V_{max} и рН-оптимумов изоферментов СДГ показал незначительные изменения скорости реакции и сродства к субстрату у изоферментов, полученных из проростков, инкубированных в условиях солевого стресса. Увеличение значений K_m указывало на снижение сродства к субстрату у изоферментов (СДГ2), что может вызывать изменение метаболических реакций при адаптации клетки к стрессовому воздействию.

Ключевые слова: *Zea mays*, сукцинатдегидрогеназа, изоферменты, солевой стресс, константа Михаэлиса

DOI: 10.31857/S0555109922060034

Цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) и дыхательная электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) являются важными компонентами клеточного энергетического метаболизма и играют важную роль не только в синтезе АТФ, но и в различных процессах адаптации и развития у растений [1]. Одним из ключевых ферментов, участвующих в обоих процессах, связывающих ЦТК с ЭТЦ, является сукцинатдегидрогеназа (СДГ, КФ 1.3.99.1). СДГ катализирует реакцию окисления сукцината до фумарата в ЦТК за счет гидрофильных субъединиц А и В, в ЭТЦ переносит электроны в пределах дыхательного комплекса, восстанавливая убихинон до убихинола межмембранными субъединицами С и D [2]. Кроме того, СДГ принимает участие в глюконеогенезе, обеспечивая метаболизм сукцината, образованного в глиоксилатном цикле [3]. Поскольку СДГ является ферментом, участвующим в функционировании нескольких метаболических процессов клетки, как катаболических, так и анаболических, большое значение приобретает наличие молекулярных форм фермента, обеспечивающих координацию этих процессов. Показано, что в щитках кукурузы на ранних стадиях развития семян присутствуют четыре изофермента СДГ [4]. По мере развития в семенах происходит изменение состава

молекулярных форм СДГ как в щитке [4], так и в листьях. При нормальных условиях роста обнаруживаются только две формы [5].

Механизмы регуляции функционирования СДГ-системы при различных стрессовых воздействиях на растения остаются малоизученными, а их понимание позволяет определить роль, которую играют изоферменты в адаптационных процессах у растений. Известно, что при солевом стрессе избыточное количество ионов Na^+ вызывает осмотический стресс, нарушающий метаболизм, нормальную физиологическую деятельность, процессы фотосинтеза и дыхания [6]. Особое значение в адаптации к стрессу играют ферментные системы, участвующие в энергетическом и конструктивном метаболизме. В частности, показана роль малатдегидрогеназной системы и фумаратгидратазы в метаболизме митохондрий в листьях кукурузы в условиях хлоридного засоления [7, 8]. Изучение биохимических особенностей, кинетических свойств изоферментов СДГ позволяет оценить адаптивную реакцию клеточного метаболизма на воздействие стрессового фактора на уровне ферментов.

Цель работы – получение высокоочищенных препаратов изоферментов сукцинатдегидрогена-

Таблица 1. Очистка сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы, выращенной в стандартных условиях ($n = 3, p < 0.05$)

Стадия	Белок, мг	Общая активность, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	31.420	0.425	0.014	100	1
Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20–60%	5.689	0.312	0.055	73.41	3.93
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	3.756	0.285	0.076	67.06	5.43
Хроматография на ДЭАЭ-Sephacel	0.085	0.088	1.035	20.71	73.93
	0.074	0.081	1.095	19.06	78.21

зы из листьев кукурузы и изучение их основных кинетических характеристик.

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использовали 14-дневные растения кукурузы (*Zea mays* L.), выращенные гидропонным способом при температуре 20°C и 12-часовом световом дне и интенсивности освещения 25 Дж/м². Солевой стресс моделировали инкубацией проростков в 150 мМ растворе NaCl в тех же условиях выращивания. Контрольные растения инкубировались в воде.

Активность СДГ определяли в гомогенате листьев кукурузы спектрофотометрическим методом по падению оптической плотности реакционной смеси при длине волны 600 нм в течение 5 мин при 25°C в результате обесцвечивания 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) в ходе его восстановления. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, образующего 1 мкМ продукта за 1 мин при 25°C [9].

Содержание белка в пробе определили по методу Лоури [10].

Для получения высокоочищенных препаратов СДГ использовали 3-стадийную схему очистки. Все операции проводили при температуре 4°C. На первой стадии навеску растительного материала (1.0 г) гомогенизировали в соотношении 1 : 5 в среде следующего состава: 50 мМ Трис-HCl буфер, pH 7.5, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 0.4 М сахара. Полученный гомогенат фильтровали через 4 слоя марли, затем центрифугировали в течение 5 мин при 1300 g. К супернатанту добавляли кристаллический сульфат аммония до 20% насыщения. Полученный осадок отделяли центрифугированием 20 мин при 12000 g. В супернатант вносили сульфат аммония до 60% насыщения и вновь центрифугировали 20 мин при 12000 g. Осадок ресуспендировали в 2 мл среды, содержащей: 10 мМ фосфатный буфер, pH 7.8, 0.01%-ный тритон X-100, 20 мМ сукцинат натрия.

Полученный ферментный препарат наносили на колонку (1.5 × 20 см), заполненную сефадексом G-25 ("Pharmacia", Швеция), для освобождения от

солей и низкомолекулярных примесей. Элюцию осуществляли 10 мМ фосфатным буфером, pH 7.8, содержащим 20 мМ сукцинат натрия, со скоростью 30 мл/ч. Собранные активные фракции наносили на колонку (1.5 × 15 см) с ДЭАЭ-Sephacel ("Sigma-Aldrich", США), предварительно уравновешенную 30 мМ фосфатным буфером, pH 7.8, содержащим 30 мМ KCl. Десорбцию фермента осуществляли линейным градиентом концентрации KCl от 0.03 до 0.2 М с 20 мМ фосфатным буфером, pH 6.2, с 20 мМ сукцинатом натрия.

Гомогенность активных фракций СДГ оценивали электрофоретическим методом [1]. Для специфического проявления на активности СДГ использовали тетразолиевый метод со средой следующего состава: калий-фосфатный буфер – 0.1 М, pH 7.5, 0.1 М сукцинат натрия, 0.5 мг/мл нитросинего тетразолия и 1 мг/мл феназинметасульфата [12].

Для выявления молекулярной массы полученных препаратов СДГ использовали гель-хроматографию на колонке (2 × 40 см) с сефадексом G-200 ("Pharmacia", Швеция) [12]. Свободный объем колонки определяли с помощью голубого декстрана ("Serva", ФРГ).

Определение величины константы Михаэлиса (K_m) и максимальной скорости (V_{max}) для изоферментов СДГ из листьев кукурузы проводили по методу Лайнуивера-Берка в системе двойных обратных координат [12].

Определение pH-оптимума проводили по графику зависимости активности фермента от различных значений pH.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из гомогената листьев контрольных растений кукурузы, выращенных в условиях солевого стресса получены гомогенные препараты СДГ в результате проведения 3-стадий очистки. Результаты представлены в табл. 1 и 2.

После десорбции фермента с ДЭАЭ-Sephacel линейным градиентом KCl (30–200 мМ) были получены два препарата в опыте и контроле, обладающих активностью сукцинатдегидрогеназы. Изо-

Таблица 2. Очистка сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы, выращенной в условиях засоления ($n = 3, p < 0.05$)

Стадия	Белок, мг	Активность СДГ, Е	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Гомогенат	41.256	0.625	0.015	100	1
Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20, 60%	22.654	0.396	0.017	63.36	1.13
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	16.856	0.294	0.018	47.04	1.2
Хроматография на ДЭАЭ-Sephacel	0.154	0.096	0.623	15.36	41.33
	0.095	0.104	1.095	16.64	73.00

ферменты, выделенные из гомогената листьев кукурузы, выращенной в обычных условиях, имели удельные активности: 0.623 первый и 1.095 Е/мг белка второй, при этом степень очистки составила 41.33 и 73.00, выход – 15.36 и 16.64% соответственно. Удельная активность СДГ из листьев растений, подвергнутых солевому стрессу, составила 1.035 Е/мг для первого изофермента и 1.095 Е/мг белка для второго, степень очистки 73.93 и 78.21, при выходе – 20.71 и 19.06% соответственно.

Изоферменты СДГ, полученные как из листьев контрольных растений, так и выращенных в присутствии 150 мМ NaCl, отличались по степени сорбции на колонке с ДЭАЭ-Sephacel (рис. 1). ДЭАЭ-Sephacel является слабым анионообменником и имеет положительный заряд. По данным литературы теоретическая изоэлектрическая точка (pI) СДГ равна 6.34, а значения pI зависят от анализируемого изофермента [13]. В среде с pH выше изоэлектрической точки белки проявляют отрицательный суммарный заряд и связываются с анионообменником. СДГ проявляла наибольшую стабильность и каталитическую активность в диапазоне pH от 7.0 до 8.0, что выше pI фермента. Результаты исследования показывают, что СДГ1 контрольных растений и СДГ1 из растений, подвергшихся солевому стрессу, десорбировалась с колонки ДЭАЭ-Sephacel при концентрации KCl 81.0 мМ и 89.5 мМ соответственно. Второй изофермент из контрольных растений элюировался при концентрации 149 мМ KCl, а из растений в условиях солевого стресса элюирование происходило при 166 мМ KCl (рис. 1). Эти различия в величине концентрации для десорбирования изоферментов СДГ из листьев кукурузы предполагают различие их поверхностного заряда. Увеличение концентрации KCl, необходимой для десорбции изоферментов с ионообменника ДЭАЭ-Sephacel, соотносится с изменением их заряда в отрицательную сторону, что является характерным для растений, подвергшихся солевому стрессу, чему способствует также подщелачивание матрикса митохондрий таких растений [14].

Диск-электрофорез в полиакриламидном геле с применением общего проявления белка нитра-

том серебра подтвердил гомогенность полученных препаратов всех четырех изоферментов. При проявлении наблюдали только одну белковую полосу в каждом образце активных фракций, полученных после очистки на ДЭАЭ-Sephacel (рис. 2а). При проведении специфического проявления препаратов изоформ на активность СДГ, выделенных их контрольных растений и выращенных в условиях засоления, были получены по 2 полосы, с электрофоретической подвижностью для первого изофермента – 0.34 и 2 полосы для второго –

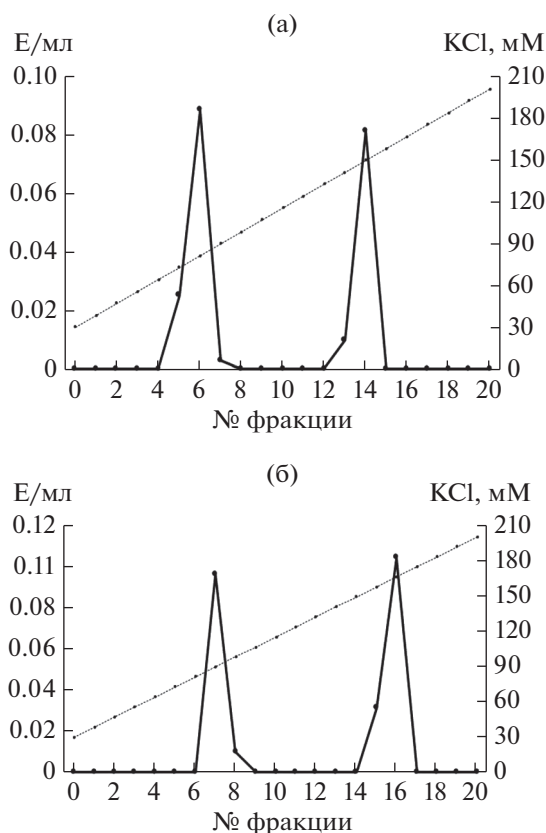


Рис. 1. Профиль элюции с колонки ДЭАЭ-Sephacel изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы: а – контрольные растения, б – растения, подвергшиеся действию 150 мМ хлорида натрия.

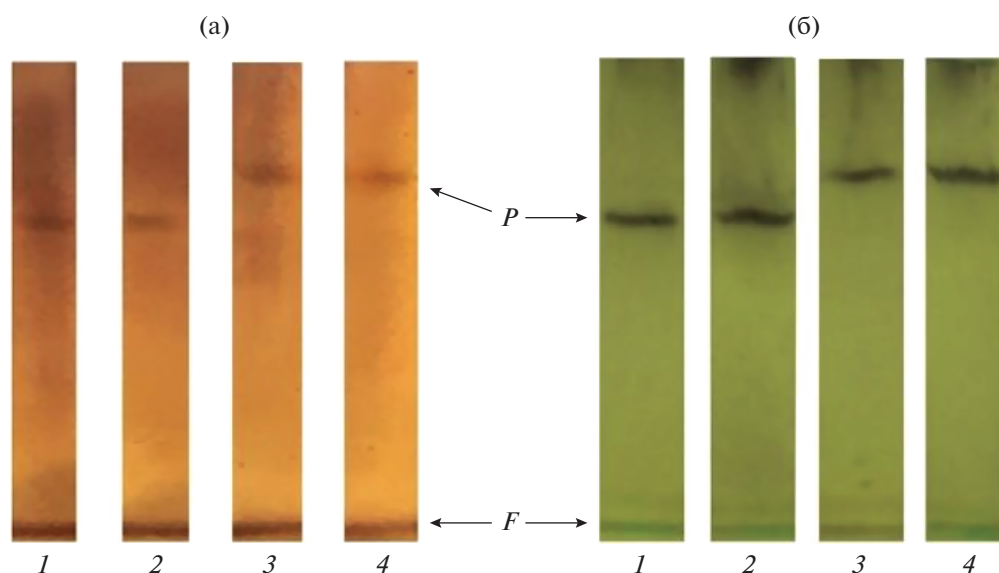


Рис. 2. Электрофорез очищенных фракций СДГ из листьев кукурузы (а) и специфическое проявление на активность (б). 1 – СДГ1 контроль, 2 – СДГ1 NaCl, 3 – СДГ2 контроль, 4 – СДГ2 NaCl.

0.23 (рис. 2б). На этом основании можно сделать вывод о том, что в листьях кукурузы после засоления присутствуют изоферменты с одинаковой электрофоретической подвижностью СДГ1 и СДГ2.

При проведении гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-200 были установлены молекулярные массы выделенных изоформ СДГ из контрольных растений и растений, подвергшихся солевому стрессу. Величина молекулярной массы изоформ из контрольных и опытных растений совпадала и для СДГ1 составила 105 кДа, а для СДГ2 – 134 кДа.

Полученные результаты согласуются с данными предыдущих исследований, согласно которым показано наличие двух изоферментов СДГ в листьях кукурузы [5], в листьях гороха [15], а также в корнях сладкого картофеля [16]. Эти две формы являются конститутивными и различаются по своей структурной организации: первая – гетеродимерный изофермент (СДГ1), а вторая – гетеротетрамерный (СДГ2) [17].

Были изучены кинетические свойства K_m , V_{max} и pH оптимумы каждого изофермента, полученного из контрольных и опытных растений кукурузы.

Два изофермента СДГ из листьев проростков кукурузы проявляли сходные кинетические свойства как в контроле, так и в проростках в условиях кратковременного солевого стресса. Для изофермента СДГ1 значение константы Михаэлиса составило 1.08 мМ, что незначительно отличалось от K_m фермента, полученного из растений, подвергнутых стрессу – 1.13 мМ (табл. 3). Величины K_m для второго изофермента СДГ в опыте и кон-

троле имели достоверные различия и составляли 1.23 и 1.18 мМ соответственно. Полученные значения K_m для изоферментов СДГ контрольных образцов указывают, что СДГ2 проявляла несколько меньшее сродство к субстрату по сравнению с СДГ1. Эта тенденция сохранялась и у изоферментов, полученных из листьев проростков в условиях солевого стресса. Результаты проведенного анализа кинетической характеристики исследуемых изоферментов свидетельствуют о большем сродстве к субстрату изофермента СДГ1, что, вероятно, обуславливает его большую кинетическую активность.

При расчете V_{max} для изоферментов СДГ из листьев кукурузы в норме и в условиях засоления анализируемая величина изменялась для обеих форм фермента. Величина V_{max} как для СДГ1, так и СДГ2 в экспериментальных растениях увеличилась в 1.17 и 1.27 раза соответственно (табл. 3). Таким образом, данные по V_{max} для изоформ СДГ свидетельствовали об увеличении каталитической активности при воздействии 150 мМ хлорида натрия на кукурузу.

Изменения величин K_m и V_{max} обоих исследуемых изоферментов СДГ при воздействии на растения солевого стресса возможно объясняются модификациями их белковых компонентов, обусловленные изменением pH матрикса митохондрий [14], что находит отражение в кинетике реакции [18]. Анализ величины V_{max}/K_m изоформ СДГ свидетельствует, что наибольшее сродство к субстрату проявляли ферменты растений в условиях воздействия на них солевого стресса. Значения V_{max}/K_m для СДГ1 и СДГ2 из контрольных

Таблица 3. Значения k_m и V_{max} по сукцинату для изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы

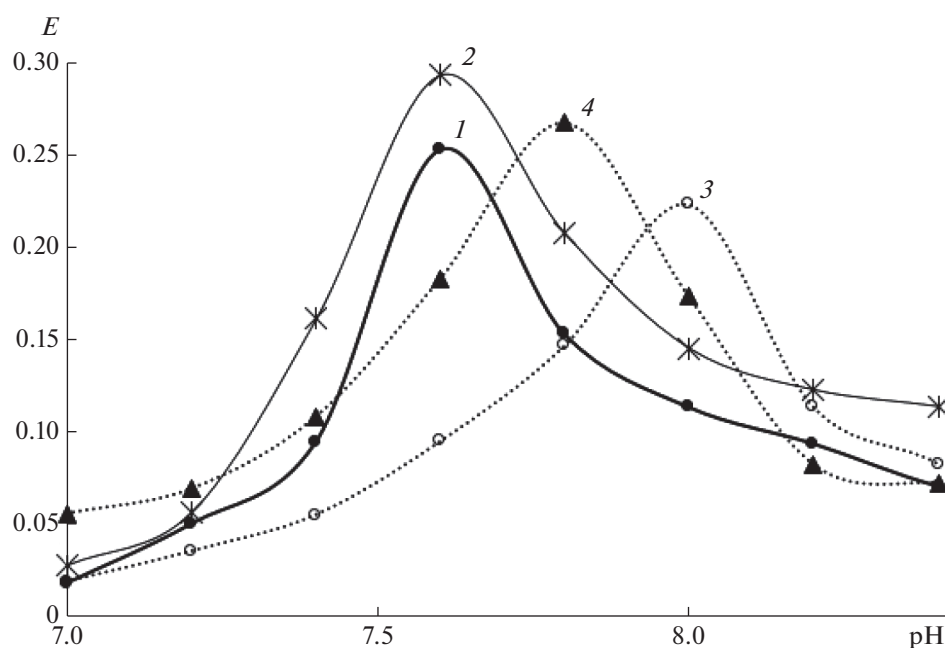
СДГ Изофермент	K_m , мМ	V_{max} , мкмоль/мин	V_{max}/K_m
СДГ1 Контроль	1.08 ± 0.03	0.174 ± 0.005	0.16
СДГ2 Контроль	1.18 ± 0.01	0.233 ± 0.002	0.20
СДГ1 24 ч NaCl [150 мМ]	1.13 ± 0.04	0.204 ± 0.008	0.18
СДГ2 24 ч NaCl [150 мМ]	1.23 ± 0.06	0.296 ± 0.015	0.24

растений были в 1.17 и 1.27 раза соответственно ниже, чем у изоформ из растений при воздействии солевого стресса, что свидетельствует о большем родстве к сукцинату изоформы СДГ2. Кроме того, при повреждении, в том числе и при солевом стрессе, происходит некоторое изменение субстратной специфичности, делая возможными дополнительные метаболические реакции, некоторые из которых имеют потенциальное физиологическое значение [19, 20]. Показано, что в условиях солевого стресса происходит модуляция величины рН цитозоля мембранных органоидов клетки, в том числе за счет перераспределения вакуолярного пула протонов [21]. Изменение значений рН матрикса митохондрий сказывается на конформационных состояниях белковых компонентов изоферментов СДГ, что находит отражение в изменении родства к субстрату.

Изменение рН влияет на структуру белка, а снижение активности фермента за пределами оптимального рН определяется природой аминокислот в активном центре, который подвергается

протонированию и депротонированию, а также конформационными изменениями, вызванными ионизацией аминокислот. Изучение зависимости активности изофермента СДГ от рН среды показало, что достоверных различий между опытными и контрольными образцами по изоферменту СДГ1 нет. Максимальная активность фермента для СДГ1 наблюдалась при рН 7.6 и в контроле и фракциях фермента, полученных из растений, подвергнутых солевому стрессу. Оптимальное значение рН для СДГ2 понизилось с 8.0 рН до 7.8 рН после воздействия солевого стресса в течение 24 ч (рис. 3).

Таким образом, применение разработанной схемы очистки СДГ, включающей ионообменную хроматографию, позволило получить изоформы исследуемого фермента в высокоочищенном состоянии. Два изофермента СДГ1 и СДГ2 десорбировались с ДЭАЭ-Sephacel при различных концентрациях хлорида калия, что предполагает различие в организации их полипептидов, в частности, по-

**Рис. 3.** pH-оптимум для изоферментов сукцинатдегидрогеназы из листьев кукурузы. 1 – СДГ1 контроль, 2 – СДГ1 NaCl, 3 – СДГ2 контроль, 4 – СДГ2 NaCl.

казано, что молекулярная масса изоформы СДГ1 составляет 105 кДа, а для СДГ2 — 134 кДа.

Сравнительный анализ полученных значений K_m и значений рН-оптимума изоферментов СДГ из листьев кукурузы в контрольных растениях и при воздействии 150 мМ хлорида натрия, показал незначительное снижение каталитической активности изоферментов, полученных из проростков, инкубированных в условиях солевого стресса. Наблюдаемое увеличение значений K_m указывало на небольшое снижение сродства к субстрату у этих двух изоферментов, что может быть необходимым для протекания дополнительных метаболических реакций при адаптации клеточного метаболизма к условиям стресса [19].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Che-Othman M., Millar A.H., Taylor N.L.* // Plant Cell Environ. 2017. V. 40. № 12. P. 2875–2905.
2. *Huang S., Millar A.H.* // Curr. Opin. Plant Biol. 2013. V. 16. № 3. P. 344–349.
3. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Selivanova N.V., Wu T.L., Makhmud A.S., Popov V.N.* // Rus. J. Plant Physiol. 2012. V. 59. P. 299–306.
4. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Karabutova L.A., Florez O., Puglla M.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. № 1. P. 34–37.
5. *Федорин Д.Н., Карабутова Л.А., Покусина Т.А., Епринцев А. Т.* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2016. Т. 16. № 4. С. 544–549.
6. *Kaiwen G., Zisong X., Yuze H., Qi S., Yue W., Yanhui C. et al.* // Plant Signaling & Behavior. 2020. V. 15. № 9. e1832373. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1832373>
7. *Епринцев А.Т., Федорин Д.Н., Федорина О.С.* // Известия РАН. Серия биологическая. 2021. № 1. С. 65–72.
8. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Cherkasskikh M.V., Igamberdiev A.U.* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 11. e6012. <https://doi.org/10.3390/ijms22116012>
9. *Popov V.N., Eprintsev A.T., Fedorin D.N., Igamberdiev A.U.* // FEBS Letters. 2010. V. 584. № 1. P. 199–202.
10. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
11. *Davis B.J.* Disc electrophoresis. Method and Application to Human Serum Protein // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1994. V. 121. P. 404–427.
12. *Епринцев А.Т., Ву Т.Л., Селиванова Н.В., Хасан Хамад А.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 6. С. 600–605.
13. *Schilling B., Murray J., Yoo C.B., Row R.H., Cusack M.P., Capaldi R.A., Gibson B.W.* // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1762. № 2. P. 213–222.
14. *Sun Y., Liang W., Cheng H., Wang H., Lv D., Wang W. et al.* // Plant Signal Behav. 2021. V. 16. № 3. e1856546. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1856546>
15. *Федорин Д.Н., Епринцев А.Т.* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2018. Т. 18. № 4. С. 563–567.
16. *Hattori T., Asahi T.* // Plant & Cell Physiol. 1982. V. 23. P. 515–523.
17. *Eprintsev A.T., Fedorin D.N.* // Applied Biochemistry and Microbiology. 2020. V. 56. № 2. P. 179–184.
18. *Collin J., Tseng C.-Y., Zocchi G., Tlustý T.* // PLoS One. 2014. V. 9. e101442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101442>
19. *Piedrafita G., Keller M.A., Ralser M.* // Biomolecules. 2015. V. 5. P. 2101–2122.
20. *Nagy P., Lechte T.P., Das A.B., Winterbourn C.C.* // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 31. P. 26068–26076.
21. *Kader M.A., Lindberg S.* // Plant Signal Behav. 2010. V. 5. № 3. P. 233–238.

Purification and Some Kinetic Characteristics of Succinate Dehydrogenase Isoenzymes from Corn Leaves under Salt Stress

A. T. Eprintsev^{a, *}, D. N. Fedorin^a, and O. Kh. Flores Karo^a

^a Voronezh State University, Voronezh, 394018 Russia

*e-mail: bc366@bio.vsu.ru

When using multistage purification of succinate dehydrogenase (SDH), its preparations were obtained in a highly purified state. Ion-exchange chromatography on DEAE-Sephacel was the key step that made it possible to separate isoenzymes of the studied enzyme from corn leaves in normal conditions and under salt stress. The specific activity of the resulting SDH preparations ranged from 0.623 to 1.095 U/mg protein, with the yield ranging from 41.33 to 78.21%. Comparative analysis of the obtained K_m values and the pH optimum of the obtained succinate dehydrogenase isoenzymes shows a slight decrease in the activity of isoenzymes obtained from seedlings incubated under salt stress. An increase in K_m values indicates a decrease in the affinity for the substrate in these two isoenzymes, which may cause the transformation of metabolic reactions during cell adaptation to stress.

Keywords: *Zea mays*, succinate dehydrogenase, isoenzymes, salt stress, Michaelis constant

УДК 579.61;579.6;6579.67;581.1

МИКРОВОДОРОСЛИ КАК ОБЪЕКТЫ БИМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ: ПРОБИОТИКИ, ПРЕБИОТИКИ, МЕТАБИОТИКИ

© 2022 г. А. В. Олескин¹, *, Цао Боян²¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, Москва, 119234 Россия²Университет МГУ-Пекинский политехнический институт, Шэньчжэнь, Китай

*e-mail: oleskin@yandex.ru

Поступила в редакцию 14.04.2022 г.

После доработки 01.07.2022 г.

Принята к публикации 04.07.2022 г.

Микроводоросли в широком смысле (зеленые, красные, бурые, диатомовые, а также цианобактерии) более полувека находятся в центре внимания ученых и технологов как ценные и экономичные продуценты пищевых добавок, косметических средств, лекарственных препаратов, биологических удобрений, биотоплива, а также при очистке сточных вод (биоремедиации). В последние годы значение микроводорослей все в большей мере рассматривается в терминах их *пробиотической* функции — в качестве нормализаторов микробиоты организма человека (и хозяйственно важных животных), источников биологически активных соединений, включая гормоны, нейромедиаторы и иммуностимуляторы. Отдельный подраздел посвящен потенциальному влиянию микроводорослей и их продуктов на мозг и психику в роли *психобиотиков*. Помимо этого, содержащиеся в микроводорослях олигосахариды и некоторые другие органические соединения позволяют рассматривать их как *пребиотики* (стимуляторы резидентной микробиоты организма человека). Наконец, фрагменты клеток микроводорослей, их капсульные структуры и межклеточные материалы (альгинат, каррагинан и др.) могут оказывать полезное влияние на организм, выступая в роли *метабиотиков* (термин Б.А. Шендерова).

Ключевые слова: микроводоросли, водные экосистемы, биотехнология, фармакология, нейромедиаторы, иммуностимуляторы, пробиотики, психобиотики, пребиотики, метабиотики

DOI: 10.31857/S0555109922060125

Настоящая работа посвящена междисциплинарной теме — своего рода точке пересечения экологии, биотехнологии и медицины [1–6]. В ней обсуждаются потенциальные функции микроводорослей в организме человека, в роли пробиотиков, психобиотиков, пребиотиков, метабиотиков. Все эти роли микроводоросли могут выполнять в рамках консорциума организм человека (или животного) — симбиотическая микробиота. Данный важный с физиологической и медицинской точки зрения консорциум рассматривается как миникопия других природных биоценозов, в состав которых входят микроводоросли как важный компонент трофических и регуляторных взаимодействий в водных, почвенных и иных естественных и искусственных экосистемах.

Микроводоросли как объекты биотехнологии. По несколько условной классификации, водоросли вообще делятся на две основные группы: макро- и микроводоросли. Если макроводоросли — это макроскопические многоклеточные организмы, достигающие до 65 м в длину, то рассматриваемые здесь микроводоросли представляют собой

микроскопические одноклеточные, колониальные или нитевидные организмы с размерами от ~1 до ~900 мкм. Предполагается существование примерно 800000 видов микроводорослей, из которых описано не менее 50000 видов [7]. Большое количество видов микроводорослей может обеспечить широкий спектр возможных применений. Таксономически микроводоросли включают эукариот, в частности представителей царства Viridiplantae зеленые (отдел Chlorophyta), красные (отдел Rhodophyta) водоросли, царства Stramenophila (золотистые водоросли в широком значении, Ochrophyta и Prymnesiophyta), а также прокариот — цианобактерий (отделы Nostocales, Oscillatoriales и др.). Микроводоросли в настоящее время важны как источники фармацевтических препаратов, нутрицевтиков (пищевые добавки и др.), косметических средств, биотоплива, биодобавок, кормов для различных животных, агентов для очистки сточных вод [5]. Все указанные приложения микроводорослей находятся в орбите “промышленного использования биологических процессов и агентов на основе получения высоко-

коэффициентных форм микроорганизмов, культур клеток и тканей растений и животных с заданными свойствами” [8], т.е. биотехнологии – любого технологического приложения, которое использует биологические системы, живые организмы или их производные для создания или модификации продуктов или процессов (<https://www.cbd.int/convention/text>, см. также [9]).

В частности, к “рабочим лошадкам” современной биотехнологии (табл. 1) относятся многие виды зеленых водорослей родов *Chlorella*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, *Haematococcus*, *Chlamydomonas*, *Botryococcus*, *Chlorococcum*, которые имеют потенциальные или уже актуальные применения как лекарственные, диетические, косметические средства. В биотехнологии, в том числе медицинской, применимы и микроскопические красные водоросли (отдел Rhodophyta), например, виды рода *Porphyridium*. Что касается цианобактерий, отметим широко применяемые ныне продуценты ценных соединений (от косметики и пищевых добавок до фармацевтических средств) – виды родов *Arthrospira* (вид *A. platensis* (*Spirulina platensis* по устаревшей номенклатуре), применявшийся в пищу еще ацтеками в Центральной Америке и племенами в районе озера Чад в Африке, *Nostoc* (*N. commune* применяется для био-очистки, или ремедиации, техногенно загрязненных почв, [10]), *Anabaena* и *Aphanizomenon*.

По существующим международным оценкам, глобальный рынок продуктов микроводорослей в 2022 г. будет соответствовать 3.3 млрд. долларов США, причем особенно большой вклад внесут фармацевтическая и пищевая промышленность, учитывая заботу людей о своем здоровье, интерес к экологичным альтернативам продуктам химического синтеза, а также все большее распространение на планете хронических заболеваний [5]. Среди лидирующих компаний в области биотехнологии микроводорослей отметим “Algae Tec” (Австралия), “Pond Biofuels Incorporated” (Канада), “Cyanotech” и “Algae Systems” (США).

Перспективы современной биотехнологии микроводорослей, включая в первую очередь ее биомедицинские аспекты, во многом связаны с внедрением *синтетической биологии* как “инженерного подхода” к геному, который можно менять и собирать по-новому, чтобы модифицировать функции генов [11]. Например, создать микроводоросль, которая будет флокулировать (выпадать в осадок, который легко отфильтровать для сбора биомассы) “по команде” биотехнолога или вырабатывать интересующий биотехнолога продукт в ответ на добавление в среду сигналов бактериальных систем коммуникации (quorum-sensing), гены для которых будут внедрены из бактериальной ДНК в геном этих микроводорослей [11].

Перспективы внедрения могут быть связаны также с широким использованием *феномики*, опирающейся на обширные базы данных по важным признакам (фенотипам) микроводорослей, для прицельного поиска среди природных и генно-модифицированных организмов, оптимальных биотехнологических объектов, которые, например, сочетают высокую скорость роста с высоким удельным выходом целевого продукта (например, полезного для здоровья человека антиоксиданта – астаксантина) [11].

Кроме того возможно внедрение в биотехнологию *Интернета вещей* (IoT), что подразумевает применение автоматки, сенсоров, обучающихся роботов для создания самоприспосабливающихся биотехнологических процессов, реагирующих и адаптирующихся к любым изменениям условий; причем, у реального биотехнологического процесса на базе постоянно поступающей сенсорной информации создается его цифровой “двойник”, т.е. виртуальный процесс, позволяющий прогнозировать развитие реального процесса и вносить необходимые технологические изменения, с целью повышения выхода биомассы и целевых биотехнологических продуктов и уменьшения количества отходов производства [11].

Медицинские приложения. Микроводоросли и их продукты обещают революционизировать фармакологическую индустрию, поскольку представляют экологичную альтернативу химически синтезированным фармакологическим средствам лечения и профилактики разнообразных заболеваний, в том числе диабета различных типов, метаболического синдрома и ожирения, сердечно-сосудистых заболеваний, злокачественных опухолей, воспалительных процессов, болезни Альцгеймера, депрессии и других расстройств психической сферы, разнообразных бактериальных, грибковых и вирусных инфекций. Эти полезные в медицинском аспекте эффекты микроводорослей обусловлены присутствием в них компонентов, обладающих антиоксидантной, фотопротекторной, гелеобразующей, увлажняющей, антимикробной, антивирусной и другими активностями, в том числе наличием полисахаридов (особенно сульфатированных), каротиноидов, фикобилипротеинов (у цианобактерий), липидных компонентов (особенно ненасыщенных жирных кислот, **НЖК**), витаминов и многих других химических соединений [4–6, 12–17].

Подчеркнем важную в медицинском аспекте способность компонентов водорослей нейтрализовать свободные радикалы. В частности, каротиноиды микроводорослей имеют не менее трех способов тушения свободных радикалов, в частности, активных форм кислорода (что во многом обуславливает фотопротекторное, противовоспалительное, омолаживающее, антиканцерогенное действие этих компонентов) [18]:

Таблица 1. Примеры микроводорослей (включая цианобактерии) – важных объектов современных биомедицинских технологий

Род и репрезентативные виды	Важные применения [4, 5, 14–16, 19].
Цианобактерии (Cyanobacteria)	
<i>Arthrospira</i>	ФПД, лечение рака, аллергий, косметика
<i>A. platensis</i>	
<i>A. maxima</i>	
<i>Nostoc</i>	ФПД добавка, косметика
<i>N. commune</i>	
<i>Aphanizomenon</i>	ФПД (в литературе подчеркивается необходимость контроля токсичности)
<i>A. flos-aquae</i>	
Зеленые водоросли (Chlorophyta)	
<i>Chlorella</i>	ФПД, иммуностимулятор, косметика
<i>C. vulgaris</i>	
<i>C. pyrenoidosa</i>	
<i>Scenedesmus</i>	ФПД, косметика
<i>S. quadricauda</i>	
<i>S. obliquus</i>	
<i>Dunaliella</i>	ФПД, источник фармацевтических средств на базе β-каротина и глицерола, косметика, кардиопротектор
<i>D. salina</i>	
<i>D. maritima</i>	
<i>Haematococcus</i>	ФПД, источник астаксантина как антиоксиданта, косметика, средство от ожирения
<i>H. pluvialis</i>	
<i>Chlorococcum</i>	Источник астаксантина
<i>C. infusionum</i>	
Красные водоросли (Rhodophyta)	
<i>Porphyridium</i>	Косметика, кардиопротектор, проттивовоспалительное средство
<i>P. cruentum</i>	
Охровые водоросли (Ochrophyta)	
<i>Phaeodactylum</i>	ФПД, средство от ожирения
<i>P. tricornutum</i>	
<i>Nitzschia</i>	Средство от ожирения
<i>N. frigida</i>	
<i>Chaetoceros</i>	Антимикробный агент
<i>C. affinis</i>	
<i>Nannochloropsis</i>	ФПД (обогащен ω-3-НЖК), косметика, средство от ожирения
<i>N. oculata</i>	
Гаптофитовые водоросли (Haptophyta)	
<i>Isochrysis</i>	Косметика, кардиопротектор, противовоспалительное средство
<i>I. galbana</i>	

Примечание: ФПД – функциональная пищевая добавка, что предполагает нормализующий микробиоту и улучшающий телесное и психическое здоровье эффект наряду с более специфическими аспектами влияния на организм (например, с омолаживающим, транквилизирующим или анти-аллергенным действием).

$\text{Car} + \text{R}^* \rightarrow \text{Car}^+ + \text{R}^-$ (перенос электрона),

$\text{Car} + \text{R}^* \rightarrow [\text{Car}\dots\text{R}]$ (образование радикального аддукта),

$\text{Car} + \text{R}^* \rightarrow \text{Car}(-\text{H})^* + \text{RH}$ (перенос протона),

где Car – каротиноид, R^* – свободный радикал. Приведенные процессы особенно характерны для такого активного тушителя радикалов, как

астаксантин, который содержит реагирующие с радикалами полярные группировки [18].

Фармакологическое и профилактическое применение находят как отдельные компоненты микроводорослей, так и препараты цельной биомассы водорослей. Так, биомасса *Chlorella* sp. способствует заживлению желудочных язв и ран, ускоряет синтез мышечной ткани и повышает

секрецию анаболических гормонов. Добавление в пищу 6 г биомассы хлореллы в течение дня значительно снижает риск осложнений беременности (анемия, протеинурия, водянка) [5, 18].

Микроводоросли родов *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, а также цианобактерии р. *Arthrospira*, *Aphanizomenon*, *Nostoc* в роли продуктов питания или пищевых добавок соответствуют международной категории “в целом признаны безопасными” (Generally Regarded As Safe, **GRAS**), однако при их использовании необходим анализ на возможную токсичность [4, 19]. Микроводоросли являются важным источником белка (глобальная потребность в белке водорослей превысила 700 млн долларов США в 2019 г. и продолжает расти [5]). Прогнозируется, что к середине текущего столетия на долю водорослей будет приходиться до 18% источников белка на мировом рынке [20]. Микроводоросли – ценные источники незаменимых аминокислот, углеводов (например, глюкозы и крахмала), витаминов В₁, В₂, В₅, В₆, В₉, В₁₂, А, С и Е, биотина, каротиноидов и других диетически и фармакологически ценных пигментов, включая фикобилипротеины в случае цианобактерий [12, 13, 20]

Микроводоросли применяются в пищу самостоятельно в виде жидких культур, капсул, таблеток, порошков или в форме добавок к многообразным пищевым продуктам (соусы, десерты, йогурты, сыры, в том числе плавленые, творог и другие молочные продукты, паста и другие макаронные изделия, хлеб, стейки, колбасы и др. [4, 5, 19]). Желатинизирующие и стабилизирующие свойства компонентов биомассы многих водорослей, их способность функционировать как загустители пищевых продуктов обуславливают широкое применение таких выделяемых из биомассы продуктов, как альгинат и каррагинан [19].

Основной компонент биомассы хлореллы – β-1,3-глюкан действует как иммуностимулятор, антиоксидант, он снижает концентрацию липидов в крови [4, 5]. В роли лечебного питания и БАД, *C. vulgaris* и другие виды хлореллы производятся компаниями “Chlorella Manufacturing and Co”. (Тайвань), “Klötze” (Германия), “Ocean Nutrition” (Канада) [5]. В России один из брендов Оргтиум® (хлорелла, прессованная в таблетки; https://fitomarket.ru/catalog/zdorovoe_pitanie/superfudy/khlorella; под тем же брендом выпускается биомасса *Arthrospira* как “Спирулина”). Китайский аналог представляет продукт “Natural Chlorella Tablet”, производимая компанией “Qingdao Vital Nutraceutical Ingredients Bioscience Co.” (<https://www.made-in-china.com/products-search/hot-china-products>) [21].

Существенный интерес вызывает применение полисахаридов, в том числе сульфатированных, из микроводорослей (включая цианобактерии),

которые обладают антиоксидантными, противовоспалительными, иммуномодулирующими и противовирусными свойствами, а также используются для лечения суставов. Наиболее популярны *Tetraselmis* sp., *Isochrysis* sp., *Porphyridium cruentum* и *Porphyridium purpureum*, в дополнение к различным видам хлореллы [22].

К преимуществам хлореллы относятся высокие концентрации в ее биомассе аскорбиновой кислоты, ионов К⁺, Na⁺, Mn²⁺, Ca²⁺. *Chlorella vulgaris* соперничает с *Arthrospira platensis* в роли ценного для вегетарианцев источника витамина В₁₂, который присутствует в биомассе хлореллы в подходящей для человеческого организма биологически активной форме метилкобаламина [23]. Выращивание при низкой интенсивности света способствует накоплению в составе биомассы *Chlorella* sp. ценных ненасыщенных НЖК, а именно α-линоленовой кислоты [5].

На мировом рынке представлены также такие изолированные из микроводорослей фармакологически ценные вещества, как астаксантин из *Haematococcus pluvialis* под брендом Spirulina (“Earth Spirulina Group, ES Co”. Ю. Корея), рекомендованный для снижения содержания липидов в организме [24, 25], эйкозапентаеновая кислота (ЭПК) из *Nannochloropsis* sp. (“Almega®PL”, “Qualitas Health”, США), уменьшающая уровень холестерина в крови [5, 26], и докозагексаеновая кислота (ДГК) из *Schizochytrium limacinum* (“Maris DHA Oil, IOI”, Германия) – средство от ревматоидного артрита [27].

К биотехнологически важным пигментам микроводорослей, кроме астаксантина, принадлежат также другие каротиноиды, особенно β-каротин, ликопин, зеаксантин, кантаксантин и др. Интенсивно окрашенный оранжевый β-каротин служит предшественником важного для зрения и иммунной системы витамина А и обладает антиоксидантными свойствами, а также выступает как ценный пищевой краситель (колорант) [4, 5]. Зеленая микроводоросль *Dunaliella salina* содержит до 12–14% β-каротина от сухой массы. β-Каротин из *D. salina* производится компаниями “Earthrise Nutritionals” (США), “Nature Beta Technologies Cognis” (Австралия). Из-за отсутствия ригидной клеточной стенки, а также высокого содержания белка биомасса водорослей рода *Dunaliella* легко усваивается и, в частности, используется в хлебопекарной промышленности, а также в качестве корма для рыб и скота [5, 13, 28–30].

На базе микроводорослей готовят экстракты (например, для использования в салонах красоты), альгиновые кислоты (применяемые в виде масок), а также эфирные масла. Полезные эффекты препаратов из микроводорослей связаны с их эффективностью в качестве увлажняющих кожу (или напротив, удаляющих лишнюю жид-

кость в роли дренажа), уплотняющих, пигментирующих (окрашивающих), омолаживающих, отбеливающих кожу, солнцезащитных средств [4, 5, 22].

Находят все возрастающее применение продукты генно-модифицированных микроводорослей [12]. Например, генноинженерными методами на базе *Chlamydomonas reinhardtii* были получены антитела [31], вакцины, эритропоэтин, вирусный белок 28 (VP 28) [32], иммуноконъюгированные цитотоксины для прицельного уничтожения раковых клеток [11]; антитела в готовой для введения в организм и борьбы с возбудителями форме выделяются в среду также генномодифицированными клетками *Phaeodactylum tricornutum* [11].

Микроводоросли в качестве пробиотиков. В связи с медицинскими приложениями микроводорослей встает вопрос об их использовании в качестве *пробиотиков* (термин впервые предложен немецким нутрициологом Вернером Коллатом в 1950 г., который противопоставлял их более рискованным антибиотикам, см. [33]). Согласно терминологии Всемирной организации здравоохранения [34] пробиотики рассматривают как “живые микроорганизмы, которые, будучи примененными в адекватных количествах, улучшают здоровье организма-хозяина”.

Термин “пробиотик” происходит от греческих слов “pro” и “bios”, что означает “для жизни”, и обозначает живые микроорганизмы, которые помогают улучшить здоровье организма-хозяина при введении в адекватных количествах и как часть сбалансированной диеты [13]. Пробиотики поступают на рынок в форме лекарственных препаратов, биологически активных добавок (БАД) к пище, продуктов питания на основе живых организмов.

Пробиотикам и их преимуществам посвящены последние работы профессора Б.А. Шендерова [35–39].

Дискуссионный вопрос — в какой мере микроводоросли могут быть рассмотрены как пробиотики? В литературе ссылаются на то, что хотя добавление живых микроводорослей в корм улучшает здоровье и жизнеспособность морских животных (рыб, беспозвоночных), однако для большинства из них отсутствуют научные доказательства пользы пробиотиков — как судьба микроводорослей в корме, так и их влияние на микробиоту кишечника животных, остаются не исследованными [13]. В отличие от классических пробиотиков (лактобацилл, лактококков, бифидобактерий и др.), нет убедительных данных о выживаемости микроводорослей в кишечнике с сохранением достаточно высокой плотности их популяции. Существенные надежды, по мнению автора, следует возложить на гетеротрофный образ жизни, к которому способны достаточно многие микроводоросли. Для

сравнения: от лактобацилл-пробиотиков ожидается сохранение в кишечнике популяции с плотностью по крайней мере 10^6 колониеобразующих единиц в расчете на 1 г кишечного содержимого [40].

В доступной авторам международной литературе не приводится доказательств выполнения микроводорослями такого требования, предъявляемого к пробиотикам, как устойчивость к условиям ЖКТ и к характерным для этой среды обитания физико-химическим стрессам: низкие значения pH, высокий редокс-потенциал, высокое осмотическое давление [30].

Не доказана и требуемая от пробиотиков во многих работах [35, 41–43] способность закрепляться на слизистой оболочке кишечника организма-хозяина. Впрочем, склонность многих микроводорослей к формированию биопленок с адгезией к субстратам допускает такую возможность. В лаборатории авторов настоящего обзора запланированы прицельные исследования для проверки способности микроводорослей — кандидатов в пробиотики — к “заякориванию” на слизистой оболочке толстой кишки.

В последние годы серьезное внимание уделяется смешанному культивированию микроводорослей и бактерий-пробиотиков, как в водоемах в режиме аквакультуры, так и лабораторных условиях. Компоненты такой смешанной культуры микроводоросли-бактерии демонстрируют синергидный эффект, проявляющийся в ускорении роста как бактерий-пробиотиков, так и водорослей, а также стимуляции синтеза важных для здоровья организма-хозяина продуктов. Есть данные, например, об ускорении роста микроводоросли *Isochrysis galbana* в совместной культуре с различными пробиотическими микроорганизмами [44]. В аквакультуре добавление микроводорослей наряду с бактериальными пробиотиками ведет к улучшенному функционированию кишечника и повышению выхода продукции (рыбы, мидий, креветок и др.) [40, 45, 46]. Введение культуры *Chlorella sorokiniana* в выпечку, содержащую пробиотики *Lactobacillus plantarum* и *Bifidobacterium longum* позволяет удлинить период выживания этих пробиотиков в охлажденном (до 4°C) продукте; кроме того, метаболиты, выделяемые *C. sorokiniana*, усиливают антивирусный эффект (в отношении ротавирусов) обоих пробиотиков [47].

В дальнейшем следует иллюстрация применимости некоторых других важных критериев, характеризующих пробиотики, как они изложены в работах [29, 30, 39], к микроводорослям.

1. Пробиотики способствуют оптимизации качественного и количественного состава и стабильности микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), подавляют вредоносную микробиоту (конкуренция, конкурентное исключение), конкурируя за экологические ниши в организме хозяина,

за питательные вещества и факторы роста, а также путем выработки антимикробных соединений (короткоцепочечные жирные кислоты, бактериоцины и их аналоги, перекись водорода, окись азота и др.) [48–50]. Эта, одна из наиболее значимых, функций пробиотиков, недостаточно исследована в применении к микроводорослям. Однако установлено, например, что *Arthrospira platensis* стимулирует развитие таких полезных бактерий-симбионтов ЖКТ, как *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* и *Bifidobacteria*, и ингибирует рост потенциальных патогенов *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* и *B. pumilus* [13, 51–55]. *Chlorella pyrenoidosa* и *C. ellipsoidea* подавляют, благодаря своим полисахаридам, пролиферацию клеток патогенов: бактерии *Listeria monocytogenes* и дрожжей *Candida albicans* [13, 51]. Существенное позитивное воздействие на кишечную микробиоту оказывают продуцируемые микроводорослями омега-3-ненасыщенные жирные кислоты [56].

Есть также данные о пробиотическом действии микроводорослей на микробиоту животных. Включение *Nannochloropsis oculata* в рацион морского конька (*Hippocampus reidi*) или кормление устриц микроводорослями *Chaetoceros* sp., *Pavlova* sp. и *Isochrysis* sp. (по отдельности или в сочетании друг с другом) улучшало выживаемость этих животных, снижая количество жизнеспособных патогенных бактерий в их организмах [13, 57]. Следует подчеркнуть, что подавляя патогенную микробиоту, пробиотики не нарушают функционирование симбиотической микробиоты ЖКТ, в противоположность антибиотикам [43]. Все это указывает на возможность использования микроводорослей в качестве нового терапевтического средства для сохранения здорового микробного сообщества ЖКТ [13].

2. Пробиотики нейтрализуют токсины и вредные для организма-хозяина метаболиты. Эта, отмеченная в работах Б.А. Шендерова [30, 37–39, 48–50] функция характерна для “классических” бактериальных пробиотиков, но следует ожидать, что смешанная культура бактерии-водоросли окажется еще более эффективной в плане нейтрализации вредных для здоровья хозяина веществ, поскольку в такой совместной культуре проявляется отмеченное нами выше синергидное стимулирующее действие ее обоих компонентов [40]. Помимо этого, сами микроводоросли способны активно связывать различные вредные вещества. Микроводоросли эффективно очищают среду от соединений серы и селена и, что особенно важно, тяжелых металлов, включая цинк, медь, свинец, ртуть, хром, кадмий, никель, железо, марганец, ванадий [5, 58, 59]. Все эти элементы накапливаются в воде и почве в результате антропогенного загрязнения и так или иначе поступают в организм людей и сельскохозяйственных животных, обуславливая важную “нишу” для водорослей

как кандидатов в пробиотики. Можно дополнить йогурты, соки и другие напитки биомассой микроводорослей, что позволит снизить поступление металлов и других вредных агентов в организм человека, особенно в условиях большого города. Обладая активными ферментами, многие микроводоросли могут нейтрализовать также и вредные органические соединения, в том числе попадающие в питьевую воду и пищу, фармацевтические и косметические средства. Например, *Scenedesmus obliquus* и *Chlorella pyrenoidosa* способны расщеплять средства гормональной контрацепции прогестерон и норгестрел [11, 60].

3. Пробиотики образуют низкомолекулярные питательные вещества, антиоксиданты, вещества-протекторы и прочие биологически активные соединения, которые влияют на водно-солевой, липидный, аминокислотный и энергетический метаболизм, на окислительно-восстановительный баланс на локальном (кишечном) и системном (весь организм) уровнях, на развитие и функционирование периферической и центральной нервной системы; осуществляют эпигеномный контроль над экспрессией “хозяйских” генов; модулируют системные врожденные и приобретенные иммунные реакции; нейтрализуют токсические и канцерогенные соединения [30, 37, 48–50]. Этот критерий пробиотиков также нуждается в дальнейших исследованиях в приложении к микроводорослям. Тем не менее, с антиоксидантными свойствами компонентов микроводорослей, особенно каротиноидов, связан, в частности, их кардиопротекторный и антиатеросклеротический эффекты. *Dunaliella salina*, содержащая до 10–13% β-каротина, защищает от развития атеросклероза как мышей, так и людей. При этом смесь *транс*- (~40%) и *цис*-изомеров β-каротина, присущая *D. salina*, в большей мере снижает уровни липидов в организме в целом, холестерина и триглицеридов, по сравнению с синтетическим β-каротином, представляющим только *транс*-изомер [61, 62]. *Цис*-изомер β-каротина из *Dunaliella bardawil* подавлял развитие атеросклероза у пожилых мышей, получавшими богатую жирами пищу [63, 64]. Кардиопротекторными свойствами обладают НЖК, особенно образуемые рядом видов микроводорослей (например, *Porphyridium purpureum*, *Isochrysis galbana*) омега-3-кислоты, снижающие уровень холестерина в крови и способствующие нормализации кровяного давления. В коммерческой форме доступны препараты докозагексаеновой кислоты (ДГК) [5]. Штамм *Nannochloropsis* sp. в открытом пруду при ярком солнечном свете производил значительные количества эйкозапентаеновой кислоты (ЭПК), на основе которой разработан коммерческий препарат “A2EPA Pure™” (США) [65].

В рубрике “биологически активных веществ” нельзя не отметить многочисленные сигнальные молекулы, включая гормоны и нейромедиаторы.

Так, нейроактивные биогенные амины в то же время служат “химическим языком” для коммуникации между организмом-хозяином и микробиотой, в том числе претендующими на роль пробиотиков микроводорослями, у которых биогенные амины (норадреналин, дофамин, серотонин, гистамин и др.) обуславливают специфические реакции, в том числе стимуляцию роста и ускорение развития культур микроводорослей, например, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda* и ряда других видов [66–71].

4. Пробиотики обладают антиканцерогенным эффектом. Подобный эффект характерен для многих микроводорослей и их компонентов, например, астаксантина, β -каротина, лютеина, виолаксантина, фукоксантина и других каротиноидов микроводорослей, а также для фикобилипротеинов цианобактерий, включая *Arthronema africanum* и *Arthrospira platensis* [5, 12, 13, 72]. Так, С-фикоцианин оказывает ингибиторное воздействие на линии клетки рака печени (HepG2) [73], лейкемии (K562) [74], рака легких (A549 и NSCLC) [75, 76]. Показано, что фикоцианин из *Limnospira* sp. усиливает воздействие противопухолевого лекарства топотекан на линию клеток рака простаты [77]. Моноацилглицериды в составе липидов *Skeletonema marinoi*, активируя каспазу 3/7, индуцируют апоптоз (программируемую гибель) клеток рака толстой кишки (HCT-116) и гематологического рака (U-937), но не нормальных клеток [56]. Липиды микроводорослей с НЖК проявляют противоопухолевую активность в отношении рака шейки матки и молочной железы. ЭПК и ДГК подавляют рост сосудов в опухолевой ткани и способствуют пероксид-зависимому стрессу в эндоплазматическом ретикулуме, что ведет к разрушению опухолевых клеток [56]. Сульфатированный полисахарид фукоидан из *Fucus vesiculosus*, *Sargassum henslowianum*, *Cladosiphon fucoidan*, *Coccolithus longidorsii* подавляет формирование кровеносных сосудов и образование метастазов, индуцируя апоптоз (путем активации каспазы 3/7) в линиях клеток лимфомы, меланомы, легочной карциномы, промиелоидной лейкемии, рака толстой кишки, молочной железы [78]. Антиканцерогенная активность показана для виолаксантина, синтезируемого, например, *Dunaliella tertiolecta* [22].

5. Пробиотики характеризуются противовоспалительным, антиаллергическим, антидиабетическим действием. Противовоспалительный эффект, реализуемый во многом посредством влияния на иммунную систему (см. особый пункт ниже), типичен для сульфатированных полисахаридов *Chlorella* spp., *Tetraselmis* sp., *Isochrysis* sp., *Porphyridium* spp. [22] и других водорослей, а также для их пигментов, в частности, β -каротина и астаксантина, которые находятся в центре внимания влиятельных международных сетей International Carotenoid Society, Eurocaroten, IBERCAROT,

CaRed [13]. В модельных экспериментах с крысами высушенный порошок биомассы *Dunaliella bardawil* облегчал вызванное уксусной кислотой воспаление тонкого кишечника [79]. В случае больных неалкогольной жировой дистрофией печени (NAFLD) лечение таблетированной биомассой *C. vulgaris* приводило к достоверному снижению уровня провоспалительного (способствующего воспалению) цитокина TNF- α [79]. Фикоцианины *Arthrospira* ингибируют участвующий в воспалительных процессах фермент НАДФН-оксидазу [12, 80]. Астаксантин, красный пигмент (пищевой и косметический колорант) и антиоксидант, особенно характерный, например, для *Haematococcus pluvialis*, ослабляет “цитокиновый шторм” (избыточное выделение активаторов иммунной системы) при заражении COVID-19 [12, 80]. Полиненасыщенные жирные кислоты водорослей способствуют излечению воспалительных заболеваний, включая, например, артрит [13, 81].

Присущее бактериальным пробиотикам антидиабетическое действие отмечено, например, у цианобактерий рода *Arthrospira*, что связывают с высоким содержанием витаминов и γ -линоленовой кислоты [12]. Антидиабетическим действием обладают и уже упомянутые нами астаксантин [13] и фикоцианин [82]. Более сложным является вопрос с антиаллергическим действием микроводорослей, и мнение автора состоит в том, что необходима проверка на возможность их противоположного действия, т.е. аллергических осложнений при систематическом потреблении микроводорослей больными.

6. Пробиотики способствуют нормализации обмена веществ и борьбе с избыточным весом и ожирением (метаболическим синдромом). С другой стороны, пробиотики можно рассматривать и как средство борьбы с патологией противоположного типа – анорексией, исхуданием. В экспериментальных исследованиях установлено, что пробиотики способствуют нормализации состояния организма грызунов после периода голодания [83]. Лечебное воздействие показано в опытах *in vitro* и *in vivo*, включая клинические испытания, для микроводорослей *Euglena gracilis*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Arthrospira maxima*, *A. platensis*, *Nitzschia laevis*. Микроводоросли подавляют дифференцировку преадипоцитов (предшественников клеток жировой ткани), снижают липогенез (синтез липидов) вообще и накопление триглицеридов в особенности [82]. Наблюдаются повышенный липолиз и окисление жирных кислот, а также повышенные затраты энергии за счет активации термогенеза в бурой жировой ткани и потемнения в белой жировой ткани. Наряду с уменьшением накопления жира в организме, лечение микроводорослями улучшает другие симптомы у людей с ожирением, такие как повышенный уровень липидов в плазме, резистентность к инсулину

(с угрозой диабета), хроническое системное воспаление низкой степени тяжести [82]. Добавление порошка из биомассы *Arthrospira platensis* или *Chlorella* sp. к хлебу или печени способствует снижению уровней липидов и холестерина в крови, смене чувства голода на состояние насыщения [13].

7. С пробиотиками связаны и надежды на борьбу с прогрессирующими симптомами старения. Эта формулировка в работах Б.А. Шендерова [48–51], перекликающаяся с идеями “Этюдов оптимизма” И.И. Мечникова [84], соответствует фактам о задержке старения и омолаживающем влиянии микроводорослей, которое связано с их антиоксидантными, протекторными, противовоспалительными, нормализующими метаболизм эффектами.

Старение кожи связано с ослаблением синтеза структурных компонентов матрикса кожи (коллаген, эластин, гиалуроновая кислота) и с одновременной активацией расщепляющих эти компоненты протеиназ. Соответственно, замедляющее старение и омолаживающее действие препаратов из микроводорослей частично объясняется их ограничивающим влиянием на протеолиз компонентов матрикса. Не менее важно то, что микроводоросли содержат вещества с антиоксидантным эффектом, которые обезвреживают свободные радикалы, особенно активные формы кислорода. Образующие микроводорослями каротиноиды, в том числе β -каротин (*Dunaliella salina*), лютеин (*D. salina*, *Scenedesmus* spp., *Chlorella* spp., *Mougeotia* sp.), а также ликопин защищают кожу от действия ультрафиолетового света, нейтрализуют свободнорадикальные формы кислорода и замедляют процесс старения кожи. Омолаживающий эффект микроводорослей связывают также с регуляторным воздействием на организм человека синтезируемых ими фитогормонов (ауксинов, цитокининов, абсцизовой кислоты, гиббереллинов и др.) [5, 22].

8. Пробиотики также способствуют росту кровеносных сосудов в тканях кишки (ангиогенезу), вырабатывая фактор VEGF (vascular endothelial growth factor) [43]. В традиционной китайской медицине спирулина (ныне обозначаемая *Arthrospira platensis*) и ряд других микроводорослей (<https://www.ginseng-london.com/blog/benefits-of-spirulina>, см. [85]). используются для лечения язвенной болезни двенадцатиперстной кишки именно потому, что они способны ускорять васкуляризацию (рост сосудов) в тканях стенки кишки. Прицельные исследования по возможности биосинтеза и секреции в среду фактора VEGF или его функциональных аналогов – точка роста всего исследовательского направления, посвященного пробиотическим функциям микроводорослей. В связи со стимуляцией ангиогенеза в тканях кишки упомянем важное лечебное влияние микроводорослей, в частности, рода *Chlorella* на синдром повышенной кишечной проницаемости (leaky gut syn-

drome), при котором хлорелла способствует регенерации тканей стенки кишки [86].

9. Некоторые пробиотики обладают выраженным болеутоляющим действием. Такой эффект характерен, в частности, для водных экстрактов *Chlorella stigmatophora* и *Phaeodactylum tricorutum*, что связывают с их полисахаридными компонентами [22, 87, 88]; эти экстракты также обладают противовоспалительным действием и способны нейтрализовать свободные радикалы.

10. Пробиотики облегчают стрессы, что характерно не только для “классических” бактериальных пробиотиков – бифидобактерий и лактобацилл, входящих в состав кисломолочных продуктов [89]. Такие препараты могли бы быть обогащены препаратами микроводорослей с антистрессорным эффектом. Получены данные, что, например, *Chlorella vulgaris* обладает не только противoinфекционным и антиканцерогенным, но и антистрессорным действием. В экспериментах с крысами Вистар после стрессов (мокрая клетка, погружение крыс в емкости с холодной или горячей водой, нарушение ритма дня-ночи и др.) культура *C. vulgaris* облегчала: 1) поведенческие последствия стресса – ангедонию (безразличие к удовольствиям – равнодушие к вкусному для крыс в норме раствору сахарозы: после приема культуры хлореллы крысы снова активно предпочитали подслащенный раствор простой воде); 2) биохимические эффекты стресса, а именно повышение уровня холестерина в крови; у крыс на фоне стресса хлорелла достоверно снижала этот уровень [90].

11. Пробиотики, взаимодействуя с клетками эпителия кишки, регулируют активность иммунной системы и непосредственно ее кишечного звена иммунной системы – GALT (gut autonomic lymphoid tissue), модулируют иммунные реакции, нормализуют баланс про- и противовоспалительных цитокинов, снижают антигенную нагрузку на GALT, уменьшают проницаемость кишечной стенки, повышают секрецию иммуноглобулинов IgA, индуцируют активность противовоспалительных Treg-клеток [91] и способствуют выработке противовоспалительного интерлейкина IL-10.

Что касается микроводорослей – “кандидатов на роль пробиотиков”, то активное иммуностимуляторное действие показано для β -1,3-глюкана и других полисахаридов (содержащих остатки маннозы, глюкозы, рамнозы, арабинозы и др.) у представителей рода *Chlorella* [13, 22, 79]. Одним из механизмов регулирования иммунной системы является стимуляция пролиферации моноцитов, макрофагов и нейтрофилов, усиление фагоцитарной активности и секреции иммуномедиаторов, таких как цитокины. Так, содержащие полисахариды экстракты *Chlorella stigmatophora*, *Skeletonema costatum* и *S. dohrni* активировали фагоцитоз макрофагов в брюшной полости мышей [79]. Содерж-

жащиеся в биомассе микроводорослей омега-3 НЖК также стимулируют активность макрофагов [56]. Введение препаратов высушенного порошка биомассы *Chlorella vulgaris* в рацион испытуемых повышало активность натуральных киллеров в составе моноцитов периферической крови и увеличивало содержание интерферона- γ , интерлейкинов IL-1 β и IL-12 в сыворотке крови [79]. Аналогично, кормление мышей высушенной биомассой *Dunaliella salina* приводило к активации их макрофагов и натуральных киллеров (НК-клеток), а также повышало выживаемость мышей, больных лейкемией [79].

В доступной авторам литературе не содержались сведения о непосредственном воздействии микроводорослей и препаратов из них на активность кишечного звена иммунной системы (GALT), которое присуще многим представителям “классических” бактериальных пробиотиков (см. [29, 30]). Эта тема остается немаловажной “точкой роста” для дальнейших исследований, так же как и связанный с активностью иммунной системы вопрос о том, способны ли микроводоросли, их компоненты и препараты из них регулировать активность естественных барьеров организма – барьера между кишечкой и кровотоком, а также гемато-энцефалического барьера (ГЭБ), повышая экспрессию белков, участвующих в тесных контактах между клетками? Способность укреплять ГЭБ и другие важные барьеры в организме показана для бактерий-пробиотиков [92]. В частности, при стрессе “пробиотики восстанавливают функцию кишечного барьера, снижают концентрацию циркулирующих глюкокортикостероидов и провоспалительных цитокинов и одновременно повышают концентрацию противовоспалительных цитокинов. Последние участвуют в восстановлении целостности ГЭБ, кишечного барьера и уменьшают выраженность системного воспаления” [93].

12. Пробиотики оказывают полезное воздействие на нервную систему, деятельность головного мозга, психические функции, включая когнитивные способности, память, социальное поведение и др. Здесь необходимо отметить, что среди пробиотиков в литературе выделяют подгруппу психобиотиков. Речь идет о живых микроорганизмах, которые при введении в адекватных количествах улучшают здоровье пациентов с психиатрическими проблемами [94, 95]. Растущий объем данных свидетельствует о том, что пробиотики могут влиять на мозг и поведение и, что особенно примечательно, на настроение и познавательные способности – как в эксперименте, так и в клинической обстановке [96]. Было показано, например, что психобиотический штамм *Lactobacillus rhamnosus* JB-1, действуя через ГАМК-зависимую систему в мозгу, подавлял тревожное поведение мышей в сложном лабиринте и в опытах на открытом освещенном поле, а также депрессивное состояние в опытах с форсирован-

ным плаванием мышей [97, 98]. Выдвинута гипотеза о том, что без микробиоты человек не смог бы достичь современного уровня познавательных (когнитивных) способностей [99].

Что касается микроводорослей, то в последние десятилетия получены важные данные о способности различных микроводорослей и их компонентов (полисахаридов, липидов, особенно содержащих НЖК, каротиноидов, фикобилинов и др.) к нейропротекторному действию – защите нервной системы от окислительных стрессов, процессов старения, нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера и Паркинсона, деменция и др.). Достаточно отметить, что представители рода *Arthrospira* обладают нейропротекторными свойствами и способствуют поддержанию нормальных функций мозга [40]. Ее экстракты облегчают симптомы утомления мозга, способны предотвратить или смягчить нарушения мозгового кровообращения, а также улучшить когнитивные, двигательные и речевые способности, что было показано в специальных исследованиях с лечением препаратами *Arthrospira* (“спирулина”) детей, страдающих от недостаточного питания [40].

Содержащиеся в микроводорослях НЖК, особенно ДГК и ЭПК кислоты, необходимы для нормального развития нервной системы и служат важным дополнением смесей для искусственного вскармливания грудных детей, витаминизированных продуктов питания и напитков, диетических пищевых добавок. Так, смеси для вскармливания младенцев, производимые компанией “Dutch State Mines” (Голландия), содержат препараты из биомассы динофлагеллят *Cryptocodinium cohnii*, у которой на ДГК приходится до 60% всей фракции жирных кислот [11].

Известно, что бактерии-пробиотики вырабатывают необходимые для работы центральной нервной системы вещества (нейромедиаторы) или их предшественники, способные проникать через ГЭБ в мозг (2,3-дигидроксифенилаланин, ДОФА), предшественник катехоламинов; 5-гидрокситриптофан (5-НТР) – предшественник серотонина, и др.) ([29, 30, 39]. В этом контексте интересно, что многие виды водорослей (представители *Chlorophyta*, *Charophyta*, *Ochrophyta*, *Rhodophyta*) синтезируют значительные количества дофамина, серотонина, гистамина, тирамина, ацетилхолина и других нейромедиаторов [66]; потенциальное применение подобных водорослей как пробиотиков помогло бы улучшению работы головного мозга, оздоровлению психики людей, лечению мозговых расстройств, например, болезни Паркинсона, при которой в черной субстанции мозга отмечается дефицит дофамина.

Следует подчеркнуть в отношении любого полезного эффекта пробиотиков, отвечают не только индивидуальные микробные вещества, но и

сложный комплекс низкомолекулярных соединений, которые продуцируются пробиотическими микроорганизмами или “в готовом виде”, или в форме предшественников [37, 38]. Эти комплексы веществ микробного происхождения воздействуют на организм-хозяин и на его микробиоту на фоне влияния других биологически-активных веществ, которые или поступают в организм с пищевыми продуктами, или продуцируются резидентной (существующей до введения пробиотиков) микробиотой. Поэтому в контексте пробиотической роли микроводорослей необходимо также отметить, что различные фенолы, жирные кислоты, индол, терпены, ацетогенины и некоторые летучие галогенированные углеводороды, полученные из микроводорослей, проявляют антимикробную активность. Сверхкритические (полученные экстракцией CO₂) экстракты микроводорослей *Chaetoceros muelleri* проявляют антимикробную активность благодаря своему липидному составу [100]. Еще одной “точкой роста” современных исследований являются эксперименты по изучению антибактериального, а также антипротозойного, противогрибкового и противовирусного действия многих микроводорослей и их компонентов [12].

Микроводоросли в роли пробиотиков. Помимо приведенных здесь данных в пользу пробиотической функции микроводорослей, в литературе ставится также вопрос о пребиотической роли их полисахаридных компонентов и других органических составляющих. Пребиотики представляют неперевариваемые пищевые компоненты, которые вызывают специфические изменения в составе и/или активности микробиоты ЖКТ, тем самым оказывая положительное влияние на здоровье хозяина. По официальному определению ФАО/ВОЗ, пребиотики представляют “неживые съедобные продукты, которые улучшают здоровье хозяина за счет изменения микробиоты” [101].

Типичными представителями пребиотиков являются “неперевариваемые олигосахариды, разлагаемые в кишечнике полезными микробами, образующими жирные кислоты с короткой ацильной цепью и другие органические кислоты, имеющие пищевую ценность для хозяина” [42]. Оптимизация диеты, например, обогащение ее такими пребиотиками как фруктаны, может способствовать пролиферации в организме полезных бактерий, в частности рода *Bifidobacterium* [49, 102]. “Пребиотики также могут проявлять противовоспалительные эффекты, которые связывают со способностью олигосахаридов непосредственно взаимодействовать с кишечным эпителием независимо от кишечных бактерий и значительно уменьшать продукцию провоспалительных цитокинов” [93].

Важно, что полисахаридные компоненты микроводорослей могут быть расщеплены до коротких фрагментов (олигосахаридов), которые обладают

пребиотическими свойствами. Таковы инулин, галактоолигосахариды, ксилоолигосахариды, олигосахариды, полученные из агарозы, альгината, каррагинана, а также арабиноксиланы, галактаны и β-глюканы [13, 14]. Олигосахариды микроводорослей не ферментируются или, по крайней мере, не полностью расщепляются обычной кишечной микробиотой человека или животных. Однако они избирательно стимулируют рост и активность определенных полезных бактерий, например, лактобацилл и бифидобактерий, если присутствуют в толстой кишке, тем самым способствуя улучшению здоровья хозяина — т.е. действуют как пребиотики [13].

Можно предположить, что пребиотические компоненты микроводорослей вносят вклад в отмеченное выше (пункт 1 в перечне свойств микроводорослей как потенциальных пробиотиков) позитивное воздействие на микробиоту организма человека, например, положительное влияние *Arthrospira platensis* на жизнеспособность таких входящих в состав микробиоты кишечника бактерий, как *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, и отрицательное — на патогенов *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* подавлялось *A. platensis* [13] во время исследований *in vitro*.

Пребиотическая и пробиотическая роли микроводорослей дополняют друг друга: водоросли могут использоваться как живые культуры, обладая всеми перечисленными выше эффектами пробиотиков; в то же время, их углеводные компоненты могут служить “сырьем” для изготовления эффективных пребиотиков для стимуляции полезной микробиоты и, тем самым, улучшения здоровья человека.

Микроводоросли как источники метабитиков. Метабитики определены в литературе как “биологически активные соединения, связанные с метаболической активностью симбиотических (пробиотических) микроорганизмов, потенциально способные участвовать практически в любых физиологических процессах” [35]. К термину “метабитики” по существу близок по значению встречающийся в литературе термин “постбиотики”, обозначающие бактериальные продукты, которые в отсутствие жизнеспособных микробных клеток могут иметь сходное с ними действие на сигнальные пути и различные барьерные функции в организме. В качестве примеров таких микробных продуктов могут быть бактериоцины, органические кислоты, этанол, диацетил [29, 30, 35, 43]. Примерами метабитиков служат убитые нагреванием клетки пробиотических бактерий, микробный полисахарид А, образуемый *Bacteroides fragilis*, модулирующий функцию иммунной системы и защищающий (в эксперименте на мышках) от колита, вызванного *Helicobacter hepaticus*,

препарат скелетон P-CWS (часть клеточной стенки *Propionibacterium acne*), который активирует цитотоксическую активность макрофагов и тем самым оказывает антираковое влияние [30].

По мнению авторов, данному выше определению метабиотиков в целом соответствуют образующие микроводорослями ценные с точки зрения улучшения телесного и психического здоровья людей продукты, в частности, каротиноиды (β -каротин, астаксантин, ликопин, лютеин, зеаксантин, катаксантин, виолаксантин, фукоксантин и др.), хлорофиллы, фикобилипротеины (особенно фикоцианин, аллофикоцианин, фикоэритрин), углеводы (в частности, β -глюкан, фукоидан и другие сульфатированные полисахариды), липиды, особенно триацилглицериды с НЖК, витамины, растительные гормоны (ауксины, цитокинины и др.) и прочие регуляторные молекулы, ионы K^+ , Na^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} и другие ценные компоненты [5, 12, 13, 16–18, 24]. Отметим, например, что НЖК способствуют излечению сердечно-сосудистых заболеваний и гипертонии [13], тромбоза коронарных сосудов сердца, злокачественных опухолей, астмы, воспалительных заболеваний кишечника, а также психических расстройств – шизофрении и тревожных состояний [15].

Таким образом, настоящая работа посвящена актуальной информации о практическом применении микроводорослей, включая цианобактерии, в качестве средства для лечения и профилактики различных заболеваний, укрепления здоровья, борьбы со старением. Несмотря на отсутствие достаточных данных о приживаемости культур полезных микроводорослей в желудочно-кишечном тракте человека и животных, мы вправе констатировать, что многие культуры водорослей вполне соответствуют многим важным критериям пробиотиков, а некоторые их компоненты (например, полисахариды) могут служить “сырьем” для производства коротких фрагментов, используемых в качестве пребиотиков или иметь самостоятельную лекарственную и диетическую ценность в роли метабиотиков, как их оценивал Б.А. Шендеров [35, 36].

Исследование проведено в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kay R.A., Barton L.L., Kay R.A. // Crit. Ver. Food Sci. Nutr. 1991. V. 30. P. 37–41.
2. Norton T.A., Melkonian M., Andersen R.A. Algal biodiversity // Phycologia. 1996. V. 35. P. 308–326.
3. Spalore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. // J. Biosci. Bioeng. 2006. V. 101. P. 87–96.
4. Варфоломеев С.Д., Вассерман Л.А. // Биотехнология. 2011. № 2. С. 9–33.
5. Balasubramaniam V., Gunasegavan R.D., Mustar S., Lee J.C., Mohd Noh M.F. // Molecules. 2021. V. 26. P. 943. <https://doi.org/10.3390/molecules26040943>
6. Sompura Y., Chayadevi H., Vaishnavi G., Karthik M., Ashokkumar K. // J. Curr. Opin. Crop Sci. 2021. V. 2. № 3. P. 384–390.
7. Ronga D., Biazzi E., Parati K., Carminati D., Carminati E., Tava A. // Agronomy. 2019. V. 9. P. 192. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040192>
8. Егоров Н.С., Олескин А.В., Самуилов В.Д. Биотехнология: проблемы и перспективы. М: Высшая школа, 1987. 159 с.
9. Springham D., Springham G., Moses V., Cape R.E. Biotechnology: The Science and the Business. Boca Raton: CRC Press, 1999. P. 1
10. Дидович С.В., Москаленко С.В., Темралева А.Д., Ханчаева С.А. // Вopr. соврем. альгологии. 2017. № 2. № 14. <https://algology.ru/1170>.
11. Fabris M., Abbriano R.M., Pernice M., Sutherland D.L., Caommault A.S., Hall C.C. et al. // Front. Plant. Sci. 2020. V. 11. P. 279. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00279>
12. Khavari F., Saidijam M., Taheri M., Nouri F. // Mol. Biol. Rep. 2021. V. 48. P. 4757–4765. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06422-w>
13. Camacho F., Macedo A., Malcata F. // Mar. Drugs. 2019. V. 17. P. 312. <https://doi.org/10.3390/md17060312>
14. Patel A.K., Singhanian R.R., Awasthi M.K., Varjani S., Bhatia S.K., Tsai M.-L. et al. // Microb. Cell. Fact. 2021. V. 20. P. 112. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01601-7>
15. Naruka M., Khadka M., Upadhayay S., Kumar S. // Octa J. Biosci. 2019. V. 7. № 1. P. 1–5.
16. Sathasivam R., Ki J.-S. // Mar. Drugs. 2018. V. 16. P. 26. <https://doi.org/10.3390/md16010026>
17. Fu W., Nelson D., Yi Z., Xu M., Khraiweh B., Jijakli K. et al. // Stud. Natural Prod. Chem. 2017. V. 54. P. 199–225. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63929-5.00006-1>
18. Choo W.-T., Teoh M.-L., Phang S.-M., Convey P., Yap W.-H., Goh B.-H., Beardall J. // Front. Pharmacol. 2020. V. 11. P. 1086. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01086>
19. Scieszka S., Klewicka E. // Crit. Rev. Food Sci. Nut. 2019. V. 59. № 21. P. 3538–3543. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1496319>
20. Caporgno M.P., Mathys A. // Front. Nutr. 2018. V. 5. P. 58. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00058>
21. Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P.-Y., Vaca-Garcia C. Morphology, Composition, Production, Processing and Applications of *Chlorella vulgaris*: A review // Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2014.

- V. 35. P. 265–278.
doi.org//10.1016/j.rser.2014.04.007
22. *Mourelle M.L., Gómez C.P., Logido J.L.* // *Cosmetics*. 2017. V. 4. P. 46.
https://doi.org/10.3390/cosmetics4040046
 23. *Kumudha A., Selvakumar S., Dilshad P., Vaidyanathan G., Thakur M.S., Sarada R.* // *Food Chem*. 2015. V. 170. P. 316–320.
 24. *Sathasivam R., Radhakrishnan R., Hashem A., Abd Allah E.* // *Saudi J. Biol. Sci*. 2019. V. 26. № 4. P. 709–722.
https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003
 25. *Pack H.J., Lee Y.J., Ryu H.K., Kim M.Y., Chung H.W., Kim W.Y.* // *Ann. Nutr. Metab*. 2008. V. 52. P. 322–328.
 26. *Rao A., Briskey D., Nalley J.O., Ganuza E.* // *Nutrients*. 2020. V. 12. P. 1869.
https://doi.org/10.3390/nu12061869
 27. *Dawczynski C., Dittrich M., Neumann T., Goetze K., Welzel A., Oelzner P. et al.* // *Clin. Nutr*. 2018. V. 37. P. 494–504. doi.org/
https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.02.021
 28. *Самуилов В.Д., Олескин А.В.* Технологическая биоэнергетика. М.: Издательство МГУ, 1994. 192 с.
 29. *Oleskin A.V., Shenderov B.A.* Microbial Communication and Microbiota-Host interactions: Biomedical, Biotechnological, and Biopolitical implications. Наупауге (N.Y.): Nova Science Publishers, 2020. 371 p.
 30. *Олескин А.В., Шендеров Б.А., Роговский В.С.* Социальность микроорганизмов и взаимоотношения в системе микробиота-хозяин: роль нейромедиаторов. М.: Издательство МГУ, 2020. 286 с.
 31. *Ramana K.V., Xavier J.R., Sharma R.K.* // *Pharm. Biotechnol. Curr. Res*. 2017. V. 1. № 1. P. 5.
https://www.imedpub.com/pharmaceutical-biotechnology-current-research
 32. *Yan N., Fan C., Chen Y., Hu Z.* // *Int. J. Mol. Sci*. 2016. V. 17. № 6. P. 962.
https://doi.org/10.3390/ijms17060962
 33. *Park Y.W.* Bioactive Compounds in Milk and Dairy Products. Hoboken (N.J): John Wiley & Sons, 2009. 397 p.
 34. Probiotics in food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. World Health Organization, Rome: FAO and WHO, 2006. 56 p. ISBN: 92-5-105513-0.
 35. *Шендеров Б.А., Синуца А.В., Захарченко М.М.* Метабиотики: вчера, сегодня, завтра. Спб.: Крафт, 2017. 80 с.
 36. *Shenderov B.A., Sinitsa A.V., Zakharchenko M.M., Lang C.* Metabiotics. Present State, Challenges and Perspectives. Switzerland: Springer Nature, 2020. 123 p.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-34167-1
 37. *Shenderov B.A.* // *Anaerobe*. 2011. V. 17. P. 490–495.
https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.05.009
 38. *Shenderov B.A.* The microbiota as an Epigenetic Control Mechanism. Chapter 11 // *The Human Microbiota and Chronic Disease: Dysbiosis as a Cause of Human Pathology*. 1st Ed. / Ed. L. Nibali, B. Henderson. J. Wiley & Sons, 2016. P. 179–197.
 39. *Oleskin A.V., Shenderov B.A.* // *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2019. V. 11. № 4. P. 1071–1085.
https://doi.org/10.1007/s12602-019-09583-0
 40. *Perković L., Djedović E., Vujović T., Baković M., Paradžik T., Což-Rakovac R.* // *Marine Drugs*. 2022. V. 20. P. 142.
https://doi.org/10.3390/md200220142
 41. *Ahn N.L.* Health-promoting Microbes in Traditional Vietnamese Fermented Foods: a review // *Food Science and Human Wellness*. 2015.
https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.08.009
 42. *Boddu R.S., Divakar K.* // *Microbial Biotechnology*. V. 2 Application in Food and Pharmacology / Ed. J. K. Patra, G. Das, H.-S. Shin. Singapore: Springer Nature Singapore Pte, 2018. P. 23–38.
 43. *Kerry R.G., Pradhan P., Samal D., Gouda S., Das G., Shin H.-S., Patra J.K.* // *Microbial Biotechnology*. V. 2. Application in Food and Pharmacology. / Ed. J. K. Patra, G. Das, H.-S. Shin. Singapore: Springer Nature Singapore Pte., 2018. P. 141–152.
 44. *Planas M., Vázquez J.A., Novoa B. J.* *Coast. Life Med*. 2015. V. 3. P. 925–930.
https://doi.org/10.12980/JCLM.3.2015J5-174
 45. *Pacheco-Vega J.M., Cadena-Roa M.A., Leyva-Flores J.A., Zavala-Leal O.I., Pérez-Bravo E., Ruiz-Velazco J.M.J.* // *Aquac. Rep*. 2018. V. 11. P. 24–30.
https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2018.05.003
 46. *Souza F.P., de Lima E.C.S., Urrea-Rojas A.M., Suphonski S.A., Facimoto C.T., Bezerra Júnior J.d.S. et al.* // *PLoS ONE* 2020. V. 15. P. e0226977. doi.org/
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226977
 47. *Cantú-Bernal S., Domínguez-Gómez M., Medina-Pérez I., Aros-Uzarraga E., Ontiveros N., Flores-Mendoza L. et al.* // *Front. Microbiol*. 2020. V. 11. P. 875.
https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.008
 48. *Шендеров Б.А.* Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 3 Пробиотики и функциональное питание. М.: Грантъ, 2001. 288 с.
 49. *Шендеров Б.А.* // *Метаморфозы*. 2014. № 5. С. 72–80.
 50. *Шендеров Б.А., Голубев В.Л., Данилов А.Б., Прищепа А.В.* // *Неврология*. 2016. № 1. С. 7–13.
 51. *Hamed I., Özogul F., Özogul Y., Regenstein J.M.* // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*. 2015. V. 14. P. 446–465.
https://doi.org/10.1111/1541-4337.12136
 52. *Beheshtipour H., Mortazavian A.M., Haratian P., Khosravi-Darani K.* // *Eur. Food Res. Technol*. 2012. V. 235. P. 719–728.
https://doi.org/10.1007/s00217-012-1798-4
 53. *Beheshtipour H., Mortazavian A.M., Mohammadi R., Sohravandi S., Khosravi-Darani K.* // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*. 2013. V. 12. P. 144–154.
 54. *Patel S., Goyal A.* // *Biotech*. 2012. V. 2. P. 115–125.
https://doi.org/10.1007/s13205-012-0044-x
 55. *Gupta C.* // *J. Microbiol. Exp*. 2017. V. 4. P. 1–4.
https://doi.org/10.15406/jmen.2017.04.00120
 56. *Remize M., Brunel Y., Silva J.L., Berthon J.-Y., Filaire E.* // *Mar. Drugs*. 2021. V. 19. P. 113.
https://doi.org/10.3390/md19020113
 57. *Mélo R.C.S., de Souza Santos L.P., Brito A.P.M., de Andrade Gouveia A., Marçal C., Cavalli R.O.* // *Aquac.*

- Res. 2016. V. 47. P. 3934–3941.
<https://doi.org/10.1111/are.12843>
58. *Ahmad S., Pandey A., Pathak V.V., Tyagi V.V., Kothari R.* // Bioremediation of Industrial Waster for Environmental Safety / Eds. R.N. Bharagava, G. Saxena. Singapore: Springer Nature, 2020. P. 53–76.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-3426-9_3
59. *Das P.K.* // Def. Life Sci. J. 2018. V. 3. № 2. P. 190–196.
<https://doi.org/10.14429/dlsj.3.11346>
60. *Peng F.Q., Ying G.G., Yang D., Liu S., Lai H.J., Liu Y.S. et al.* // Chemosphere. 2014. V. 95. P. 581–588.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.013>
61. *Raposo M.F.D.J., de Morais A.M.M.B., de Morais R.M.S.C.* // Mar. Drugs. 2015. V. 13. P. 5128–5155.
<https://doi.org/10.3390/md13085128>
62. *Raposo M.F.D.J., de Morais A.M.M.B.* // Life Sci. 2015. V. 125. P. 32–41.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.09.018>
63. *Harari A., Abecassis R., Relevi N., Levi Z., Ben-Amotz A., Kamari Y., Harats D., Shaish A.* // BioMed. Res. Int. 2013. V. 2013. P. 169517.
<https://doi.org/10.1155/2013/169517>
64. *Harari A., Melnikov N., Kandel Kfir M., Kamari Y., Mahler L., Ben-Amotz A., Harats D., Cohen H., Shaish A.* // Nutrients. 2020. V. 12. P. 1625.
<https://doi.org/10.3390/nu12061625>
65. *Winwood R.J.* // OCL. 2013. V. 20. P. D604.
<https://doi.org/10.1051/ocl/2013030>
66. *Олескин А.В., Постнов А.Л.* // Вестник Московского ун-та. Сер. 16: Биология. 2022. Т. 77. № 1. С. 9–15.
67. *Oleskin A.V., Postnov A.L., Boyang C.* // J. Pharm. Nutr. Sci. 2021. V. 11. P. 49–53.
<https://doi.org/10.29169/1927-5951.2021.11.07>
68. *Oleskin A.V., Postnov A.L., Boyang C.* // J. Pharm. Nutr. Sci. 2021. V. 11. P. 144–150.
<https://doi.org/10.29169/1927-5951.2021.11.17>
69. *Boyang C., Oleskin A.V., Vlasova T.* // J. Pharm. Nutr. Sci. 2020. V. 10. P. 88–91.
<https://doi.org/10.29169/1927-5951.2020.10.03.2>
70. *Roshchina V.V.* // Microbial Endocrinology: interkingdom signaling in infectious disease and health / Eds. M. Lyte, P.P.E. Freestone. N.Y.: Springer. 2010. P. 17–52.
71. *Roshchina V.V.* // Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health. / Ed. M. Lyte. N.Y.: Springer. 2016. P. 25–72.
72. *Martínez Andrade K.A., Lauritano C., Romano G., Iancora A.* // Mar. Drugs. 2018. V. 16. P. 165.
<https://doi.org/10.3390/md16050165>
73. *Prabakaran G., Sampathkumar P., Kavisri M., Moovendhan M.* // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 153. P. 256–263.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.009>
74. *Liu Y., Xu L., Cheng N., Lin L., Zhang C.* // J. Appl. Phycol. 2000. V. 12. P. 125–130.
75. *Hao S., Yan Y., Li S., Zhao L., Zhang C., Liu L., Wang C.* // Mar. Drugs. 2018. V. 16. № 6. P. 178.
<https://doi.org/10.3390/md16060178>
76. *Hao S., Li S., Wang J., Yan Y., Ai X., Zhang J., Ren Y., Wu T., Liu L., Wang C.* // Cells. 2019. V. 8. P. 588.
<https://doi.org/10.3390/cells8060588>
77. *Gantar M., Dhandayuthapani S., Rathinavelu A.* // J. Med. Food. 2012. V. 15. P. 1091–1095.
<https://doi.org/10.1089/jmf.2012.0123>
78. *Deniz I., García-Vaquero M., Imamoglu E.* // Microalgae-based Biofuels and Bioproducts. Amsterdam; Elsevier, 2017. P. 429–460.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00018-2>
79. *Riccio G., Lauritano C.* // Mar. Drugs. 2020. V. 18. P. 2.
<https://doi.org/10.3390/md18010002>
80. *Singh S.D., Dwivedi V., Sanyal D., Dasgupta S.* // IJCRT. 2020. V. 8. № 9.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.16527.41127>
81. *Jacob-Lopes E., Maroneze M.M., Deprá M.C., Sartori R.B., Dias R.R., Zepka L.Q.* // Curr. Opin. Food Sci. 2018. V. 25. P. 1–7.
<https://doi.org/10.3390/md17060312>
82. *Gomez-Zorita S., Trepiana J., Gonzalez-Aruo M., Aguiru L., Milton-Laskibar J., Gonzalez M. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 41.
<https://doi.org/10.3390/ijms2101004110.1016/j.cofs.2018.12.003>
83. *van de Wouw M., Schellekens H., Dinan T.G., Cryan J.F.* // J. Nutrition. 2017. V. 147. P. 727–745.
<https://doi.org/10.3945/jn.116.240481>
84. *Metchnikoff É.* Etudes sur la nature humaine; essai de philosophie optimiste. Paris: Masson & Cis, 1904.
85. *Bo-tang W., Xiang W.-Z., Cheng-kui Z.* // Chinese J. Oceanol. Limnol. 1998. V. 16. P. 152–157.
<https://doi.org/10.1007/BF02849094>
86. *Kranz S.* // Kurier. 2018. kurier.at/chronik/oberoesterreich/die-chlorella-algen-heilen-den-darm/400095401.
87. *Guzmán S., Gato A., Calleja J.M.* // Phytother. Res. 2001. V. 15. P. 224–230.
<https://doi.org/10.1002/ptr.715>
88. *Guzmán S., Gato A., Lamela M., Freire-Garabal M., Calleja J.M.* // Phytother. Res. 2003. V. 17. P. 665–670.
<https://doi.org/10.1002/ptr.1227>
89. *O'Mahony S.M., Clarke G., Borre Y.E., Dinan T.G., Cryan J.F.* // Behav. Brain Res. 2015. V. 277. P. 32–48.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.027>
90. *Karima F.N., Sarto M.* // Biogenesis. 2019. V. 7. № 1. P. 44–53.
<https://doi.org/10.242253/BIO.V711.7292>
91. *Belkaid Y., Hand T.* // Cell. 2014. V. 157. № 1. P. 121–141.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.011>
92. *Liang S., Wu X., Jin F.* // Frontiers in Integrative Neurosciences. 2018. V. 12. Art. 33. P. 1–24.
<https://doi.org/10.3389/fnint.2018.00033>
93. *Ивашкин В.Т., Ивашкин К.В.* // Российский журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2017. Т. 27. № 5. С. 11–19.
<https://doi.org/10.22416/1382-4376-2017-27-5-11-19>
94. *Cryan J.F., Dinan T.G.* // Nature Rev. Neurosci. 2012. V. 13. P. 701–712.
<https://doi.org/10.1038/nrn3346>

95. Cryan J.F., O'Ryordan K.J., Cowan C.S.M., Sandhu K.V., Bastiaanssen T.F.S., Boehme V. et al. // *Physiol. Rev.* 2019. V. 99. № 4. P. 1877–2013.
https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018
96. Parashar A., Udayabanu M. // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2016. V. 26. P. 78–91.
https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.11.002
97. Bravo J.A., Forsythe P., Chew V., Escaravage E., Savignac H.M., Dinan T.G., Bienenstock J., Cryan J.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 16050–16055.
https://doi.org/10.1073/pnas.1102999108
98. Lyte M. // *Plos Pathogen.* 2013. V. 9. № 11. P.e1003726.
https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003726
99. Montiel-Castro A.J., Gonzalez-Cervantes R.M., Bravo-Ruiseco G., Pacheco-Lopez G. // *Frontiers in Integrative Neuroscience.* 2013. V. 7.
https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00070
100. Jena J., Subudhi E. // *The Role of Microalgae in Wastewater Treatment.* /Eds. L. Suckla, E. Subudhi, D. Pradham. Singapore: Springer, 2019. P. 99–114.
https://doi.org/10.1007/978-981-13-1586-2_8
101. Pineiro M., Asp N.G., Reid G., Macfarlane S., Morelli L., Brunser O., Tuohy K. // *J. Clin. Gastroenterol.* 2008. V. 42. P. S 156–159.
https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31817f184e
102. Norris V., Molina F., Gewirtz A.T. // *J. Bacteriol.* 2013. V. 195. P. 411–416.
https://doi.org/10.1128/JB.01384-12

Microalgae in Terms of Biomedical Technology: Probiotics, Prebiotics, and Metabiotics

A. V. Oleskin^{a,*} and Cao Boyang^b

^a *Moscow State University, General Ecology and Hydrobiology Department, Biology Faculty, Moscow, Russia*

^b *MSU-BIT Joint University, Shenzhen, China*

*e-mail: oleskiny@yandex.ru

Green, red, brown, and diatomic algae, as well as cyanobacteria, have been in the focus of attention of scientists and technologists for over five decades. This is due to their importance in the capacity of efficient and economical producers of food additives, cosmetics, pharmaceuticals, biofertilizers, biofuels, and wastewater bioremediation agents. Recently, the role of microalgae has increasingly been considered in terms of their probiotic function, i.e. of their ability to normalize the functioning of the microbiota of humans and agricultural animals and to produce biologically active substances, including hormones, neurotransmitters, and immunostimulators. A separate brief subsection of the review deals with the potential functions of microalgae with respect to the brain and psyche, i.e. in the capacity of psychobiotics. Moreover, algal polysaccharides and some other compounds can be broken down to short fragments that will stimulate the development of useful intestinal microorganisms, i.e. function as efficient prebiotics. Finally, many components of microalgal cells and chemical agents produced by them can exert important health-promoting effects per se, which enables considering them as potentially valuable metabiotics (the term preferred by late Prof. B.A. Shenderov) that are alternatively denoted as postbiotics in the literature.

Keywords: microalgae, aquatic ecosystems, biotechnology, biofuel, functional nutrition, biological fertilizers, wastewater treatment, bioremediation, cosmetics, pharmacology, neurotransmitters, immunostimulators, probiotics, psychobiotics, prebiotics, metabiotics