

СОДЕРЖАНИЕ

Том 56, номер 6, 2020

Пероксинитрит: токсический агент и сигнальная молекула (обзор) <i>Ю. В. Абаленихина, О. В. Космачевская, А. Ф. Топунов</i>	523
Биологические методы защиты растений от вирусов: проблемы и перспективы (обзор) <i>И. В. Максимов, А. В. Сорокань, М. Ю. Шеин, Р. М. Хайруллин</i>	536
Возможности экспрессионной системы гриба <i>Penicillium verruculosum</i> для получения продуцентов ферментов, обеспечивающих эффективную деструкцию возобновляемой растительной биомассы (обзор) <i>А. П. Сеницын, О. А. Сеницына, И. Н. Зоров, А. М. Рожкова</i>	551
Получение рекомбинантного химозина марала (<i>Cervus elaphus sibiricus</i> Severtzov) в прокариотической системе экспрессии и изучение комплекса его биохимических свойств, важных для сыроделия <i>С. В. Беленькая, Д. Н. Шербаков, Д. В. Балабова, А. Н. Белов, А. Д. Коваль, В. В. Ельчанинов</i>	561
Оптимизация метода получения рекомбинантного химозина в метилотрофных дрожжах <i>Komagataella phaffii</i> <i>С. Ю. Филькин, Н. В. Чертова, Е. А. Вавилова, С. С. Зацепин, М. А. Эльдаров, Э. Г. Садыхов, А. Н. Фёдоров, А. В. Липкин</i>	571
Исследование природы термостабильности нуклеозидфосфорилаз из прокариот <i>Н. Н. Мордкович, А. Н. Антипов, Н. А. Окорокова, Т. Н. Сафонова, К. М. Поляков, В. П. Вейко</i>	577
Одностадийная очистка CRISPR-нуклеазы Cas13a методом металл-хелатной хроматографии после гетерологичной экспрессии с сохранением коллатеральной рибонуклеазной активности <i>Л. К. Курбатов, С. П. Радько, С. В. Кравченко, О. И. Киселёва, Н. Д. Дурманов, А. В. Лисица</i>	587
Препаративная очистка бактериофагов <i>Pseudomonas aeruginosa</i> комбинацией гель-проникающей и анионообменной хроматографии <i>Н. Н. Ландышев, Я. Г. Воронько, Е. Е. Куликов, Н. Н. Сыкилинда, К. А. Мирошников</i>	595
Биосинтез такролимуса штаммом <i>Streptomyces tsukubensis</i> ВКМ Ас-2618Д в присутствии полимерных сорбентов и разработка метода его выделения и очистки <i>Д. С. Салионов, В. Ю. Пошехонцева, В. В. Фокина, А. А. Шутов, В. М. Николаева, Г. Г. Васяров, Е. В. Титова, В. С. Карасев, С. М. Староверов, М. В. Донова</i>	602
Влияние электропорации на чувствительность к антибиотикам и адгезию к <i>n</i> -гексадекану клеток <i>Rhodococcus ruber</i> ИЭГМ 231 <i>М. С. Куюкина, А. М. Варушкина, И. Б. Ившина</i>	612
Эффективность двухфазного анаэробного сбраживания и физико-химические свойства органической фракции твердых коммунальных отходов, преобразованных в аппарате вихревого слоя <i>Э. Р. Михеева, И. В. Катраева, Д. Л. Ворожцов, Ю. В. Литти, А. Н. Ножевникова</i>	619

CONTENTS

Vol. 56, No. 6, 2020

Peroxydinitrite: Toxic Agent and Signal Molecule <i>Yu. V. Abalenikhina, O. V. Kosmachevskaya, and A. F. Topunov</i>	523
Biological Methods of Plant Protection Against Viruses: Problems and Prospects <i>I. V. Maksimov, A. V. Sorokan, M. Yu. Shein, and R. M. Khairullin</i>	536
Capabilities of the Fungus <i>Penicillium verruculosum</i> Expression System for Producing of Enzymes Providing Effective Destruction of Renewable Plant Biomass (Review) <i>A. P. Sinitsyn, O. A. Sinitsyna, I. N. Zorov, and A. M. Rozhkova</i>	551
Preparation of Recombinant Chymosin of Maral (<i>Cervus elaphus sibiricus</i> Severtzov) in Prokaryotic Expression System and Investigation of the Complex of Its Biochemical Properties, Important for Cheesemaking <i>S. V. Belenkaya, D. N. Shcherbakov, D. V. Balabova, A. N. Belov, A. D. Koval, and V. V. Elchaninov</i>	561
Optimization of Production Method for Recombinant Chymosin in Methylophilic Yeast <i>Komagataella phaffii</i> <i>S. Y. Filkin, N. V. Chertova, E. A. Vavilova, S. S. Zatsepin, M. A. Eldarov, E. G. Sadykhov, A. N. Fedorov, and A. V. Lipkin</i>	571
Study of the Nature of Thermal Stability of Nucleoside Phosphorylases from Prokaryotes <i>N. N. Mordkovich, A. N. Antipov, N. A. Okorokova, T. N. Safonova, K. M. Polyakov, and V. P. Veiko</i>	577
Single Stage Purification of CRISPR/Cas13a Nuclease by Metal-Chelating Chromatography Following Heterologous Expression with Preservation of Collateral Ribonuclease Activity <i>L. K. Kurbatov, S. P. Radko, S. V. Kravchenko, O. I. Kiseleva, N. D. Durmanov, and A. V. Lisitsa</i>	587
Preparative Purification of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bacteriophages Using a Combination of Gel-Permeation and Anion-Exchange Chromatography <i>N. N. Landyshev, Y. G. Voronko, E. E. Kulikov, N. N. Sykilinda, and K. A. Miroshnikov</i>	595
Biosynthesis of Tacrolimus by the <i>Streptomyces tsukubensis</i> VKM Ac-2618D Strain in the Presence of Polymeric Sorbents and Development of a Method for Its Isolation and Purification <i>D. S. Salionov, V. Yu. Poshekhontseva, V. V. Fokina, A. A. Shutov, V. M. Nikolaeva, G. G. Vasiarov, E. V. Titova, V. S. Karasev, S. M. Staroverov, and M. V. Donova</i>	602
Electroporation Effects on <i>Rhodococcus ruber</i> IEGM 231 Antibiotic Susceptibility and Adhesive Activity Towards <i>n</i> -Hexadecane <i>M. S. Kuyukina, A. M. Varushkina, and I. B. Ivshina</i>	612
Efficiency of Two-Phase Anaerobic Fermentation and Physicochemical Properties of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes Processed in the Vortex Layer Apparatus <i>E. R. Mikheeva, I. V. Katraeva, D. L. Vorozhtsov, Yu. V. Litt, and A. N. Nozhevnikova</i>	619

УДК 546.172.6:577.12

ПЕРОКСИНИТРИТ: ТОКСИЧЕСКИЙ АГЕНТ И СИГНАЛЬНАЯ МОЛЕКУЛА (ОБЗОР)

© 2020 г. Ю. В. Абаленихина¹, О. В. Космачевская², А. Ф. Топунов², *

¹Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Рязань, 390026 Россия

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

*e-mail: aftopunov@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.05.2020 г.

После доработки 10.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

Активная форма азота – пероксинитрит, является одним из самых сильных окислителей в организме. В зависимости от условий он либо подвергается биотрансформации и детоксикации, либо взаимодействует с различными соединениями (белки, в том числе ферменты, липиды, нуклеиновые кислоты, углеводы), модифицируя их. Наиболее активно подвергаются воздействию тиолы, включая остатки цистеина в белках. Ингибирующее действие пероксинитрита на ферменты в наибольшей степени было описано для оксидоредуктаз, в которых он также чаще всего действовал на цистеин. Модифицированные биомолекулы могут быть токсичны, однако в физиологических концентрациях они способны функционировать как участники сигнальных путей. Описанные данные показывают, что пероксинитрит является не только токсическим агентом, но и компонентом системы мессенджеров и сигнальной молекулой, ответственной за окислительно-восстановительную регуляцию клеточного метаболизма. Важными аспектами его изучения являются пути детоксикации, что может способствовать поиску лекарственных препаратов против заболеваний, сопровождаемых нитрозативным стрессом.

Ключевые слова: пероксинитрит, пероксинитрозная кислота, оксид азота, цистеин, токсическое действие, сигнальная функция

DOI: 10.31857/S0555109920060021

В живых организмах функционирует большое количество химических соединений, которые в процессе обмена могут выполнять многообразную, а иногда и прямо противоположную роль. Так, при повышении концентрации многие антиоксиданты переходят в статус прооксидантов, что необходимо учитывать при описании их свойств. Известно также, что многие соединения в организме при определенных условиях могут выполнять и сигнальную функцию. К таким соединениям можно отнести и пероксинитрит, у которого обычно описывают лишь его свойства как сильного окислителя.

Пероксинитритный анион (ONOO^-) образуется *in vivo* в результате реакции между оксидом азота (NO) и супероксидным анион-радикалом ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Несмотря на короткий период полураспада (10 мс при физиологическом значении pH), ONOO^- способен проникать через биологические мембраны, как путем пассивной диффузии, так и через анионные каналы. Пероксинитрит является анионом пероксинитрозной кислоты (ONOOH), поэтому обмен этих двух соединений обычно рассматривают в комплексе.

После синтеза ONOO^- может удаляться веществами-ловушками или подвергаться биотрансформации с образованием нетоксичных продуктов, а также выступать в качестве сигнальной молекулы и токсического агента.

Дальнейшие превращения пероксинитрита: биотрансформация, детоксикация или взаимодействие с мишенями зависят от доступности субстратов и условий окружающей среды клетки. С одной стороны, его обмен приводит к образованию токсичных продуктов, а с другой – эти же продукты могут быть звеньями сигнальных цепей. Так, например, повреждение аминокислотных остатков в молекулах белка способствует изменению их функциональной активности, а повреждение ферментов – снижению каталитической активности и, в результате, отключает или ослабляет отдельные реакции, что приводит к нарушению метаболических путей и каскадов регуляции. Продукты модификации липидов – окисленные липиды и нитролипиды, также могут быть не только маркерами окислительного стресса, но и сигнальными молекулами.

Для понимания роли ONOO^- в организме необходимо знать, при каких условиях он выступает в роли токсического агента, а когда – в роли сиг-

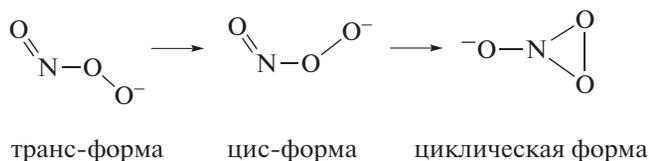


Рис. 1. Конформационные изомеры пероксинитрита.

нальной молекулы, изменяющей метаболические пути с целью повышения адаптации к патофизиологическому состоянию. В данном обзоре обобщается имеющаяся на сегодняшний день информация о путях обмена пероксинитрита в организме и процессах, в которых он может принимать участие как реакционно-активная и как сигнальная молекула.

СИНТЕЗ И ДЕТОКСИКАЦИЯ ПЕРОКСИНИТРИТА

Роль оксида азота в синтезе пероксинитрита. Пероксинитрит является одним из метаболитов оксида азота (NO), и его образование и распад напрямую связаны с обменом самого NO. Более трех десятилетий назад стало известно, что NO участвует во многих процессах в организме [1, 2] и было доказано, что он является важнейшим внутри- и межклеточным вторичным мессенджером [3]. NO влияет на многие функции клеток через циклические GMP-зависимые и независимые механизмы, являясь универсальным регулятором клеточного метаболизма. Он участвует во многих жизненно важных процессах: ингибирует агрегацию тромбоцитов и их адгезию на стенках кровеносных сосудов [4]; регулирует тонус кровеносных сосудов [5], деятельность органов дыхания [6], желудочно-кишечного тракта [7], мочеполовой [8] и нервной систем [9], иммунный ответ [10, 11] и многое другое. Выявление регуляторной роли NO способствовало открытию его двойственной роли в живых системах, как про-, так и антиоксидантной.

Пути синтеза NO могут быть NOS-зависимыми (катализируемыми NO-синтазами) и NOS-независимыми. В первом случае NO синтезируется при ферментативной трансформации гуанидинового фрагмента L-аргинина с участием ферментов семейства цитохром-P-450-подобных гемопротенидов — NO-синтаз [12]. Во втором — можно выделить генерацию NO при взаимодействии аргинина и H_2O_2 , а также восстановление нитрит-ионов до NO в ферментативных и неферментативных реакциях.

Оксид азота отличается высокой реакционной способностью благодаря наличию неспаренного электрона на внешней π -орбитали. Основными продуктами его окисления являются химически инертные нитратные ионы, способные вновь превращаться в NO при восстановлении. NO относительно медленно реагирует с большинством биологических молекул, но активно взаимодействует со свободными радикалами: гидроксильным (OH^\bullet),

супероксид-анионом ($\text{O}_2^{\bullet-}$), пероксильным (ROO^\bullet), тиильным (RS^\bullet) и радикалом тирозина (Тир $^\bullet$).

Синтез пероксинитрита обычно происходит в результате взаимодействия $\text{O}_2^{\bullet-}$ и $^\bullet\text{NO}$: $\text{N}=\text{O} + ^\bullet\text{O}-\text{O}^- \rightarrow \text{O}=\text{N}-\text{O}-\text{O}^-$.

Избыточный синтез NO и токсические эффекты, связанные с образованием пероксинитрита, могут вызвать различные патологические последствия [13].

В образовании пероксинитрита участвует не только свободный супероксид-анион-радикал, но и связанный с железом гемовой группы. В результате такой реакции образуется связанный с гемом пероксинитрит — пероксинитритный комплекс [14, 15].

Пероксинитрит не является свободным радикалом, так как неспаренные электроны супероксидного анион-радикала и оксида азота участвуют в образовании новой связи ($\text{ON}-\text{OO}^-$). Содержание ONOO^- в клетке незначительно, поскольку при физиологическом значении pH он существует в равновесии с протонированной формой — пероксинитрозной кислотой (ONOOH , pK_a 6.6–6.8) [16, 17].

Пероксинитрит и пероксинитрозная кислота могут существовать в виде конформационных цис- и транс-изомеров, которые также являются ротамерами [18]. При нейтральных и щелочных значениях pH преобладает цис-изомер. Из-за локализации отрицательного заряда по всей цис-молекуле пероксинитрита между концевыми атомами кислорода существует слабое взаимодействие, что способствует образованию его циклической формы [16]. Взаимопревращения изомеров ONOO^- показаны на рис. 1.

Детоксикация пероксинитрита: ловушки и биотрансформация. Важным аспектом в изучении метаболизма пероксинитрита являются пути его детоксикации, которые можно разделить на удаление ловушками (“уборщиками”) и трансформацию до нитритов/нитратов (рис. 2).

Пероксинитрозная кислота неустойчива и разлагается по гомолитическому пути, что приводит к продукции $^\bullet\text{OH}$ и $^\bullet\text{NO}_2$ (с выходом ~30%), причем оба эти соединения могут инициировать радикальные цепные реакции, усиливая окислительное повреждение. Протон-катализируемое разложение ONOO^- может протекать более активно в гидрофобных фазах (например, в клеточных мембранах), что приводит к перекисному окислению липидов. Большая часть ONOO^- (~70%) изомеризуется в нитрат в присутствии гемоглобина (Hb), который выступает в качестве катализатора [19].

Биотрансформация пероксинитрита. Пероксинитрит является нестабильной химической молекулой, его судьба определяется кинетикой доступных реакций, и в биохимических системах их можно обобщить в виде трех возможных путей [20]. Детоксикация пероксинитрита происходит в результате изомеризации в нитрат и восстановления до нит-

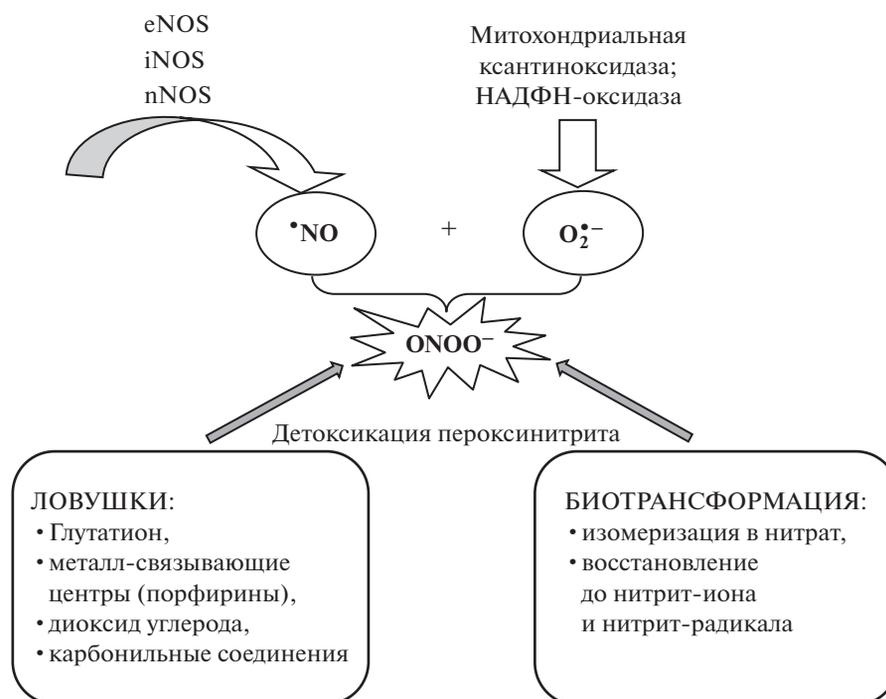
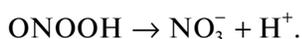


Рис. 2. Синтез и детоксикация пероксинитрита. eNOS, iNOS, nNOS – эндотелиальная, индуцируемая и нейрональная NO-синтазы соответственно.

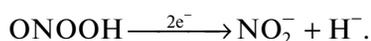
рит-иона и нитрит-радикала в реакциях двух- или одноэлектронного восстановления соответственно.

1. Протон-зависимая изомеризация в нитрат:



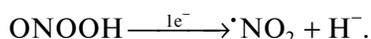
Нетоксичный путь распада до нитрата, поскольку нитрат имеет очень ограниченную биологическую активность. Эту реакцию катализируют гемопротейды, в частности, – оксигемоглобин и метмиоглобин, а также синтетические Fe^{III}-порфирины.

2. Двухэлектронное восстановление до нитрит-иона:



Этот путь является в количественном отношении наиболее значимым путем деградации в биологических системах. Реакция катализируется гемпероксидазами, Mn^{II}-порфиринами и пероксиредоксинами [21].

3. Одноэлектронное восстановление до нитрит-радикала *NO₂:



Реакция катализируется гем-пероксидазами, Mn^{III}-порфиринами и Fe^{III}-порфиринами.

Ловушки пероксинитрита. *Глутатион.* Пероксинитрит реагирует с глутатионом с образованием S-нитрозотиола, который может быть источником NO [22]. Этот механизм также может представлять собой один из путей детоксикации пероксинитрита/пероксинитрозной кислоты (рис. 3).

Ферментом, катализирующим эту реакцию, является тетрамерная селенсодержащая глутатионпероксидаза (**GPx**, КФ 1.11.1.9), которая в восстановленной форме реагирует с пероксинитритом при pH 7.4 и 25°C [22]. Реакция представляет собой каталитическое двухэлектронное восстановление ONOO⁻ до нитрита, а окисленная форма фермента утилизируется за счет глутатиона, который, в свою очередь, восстанавливается под действием глутатионредуктазы (КФ 1.8.1.7) в присутствии NADPH₂.

Fe-; Mn-порфирины. Среди синтетических ловушек пероксинитрита известны порфирины марганца (**MnP**) [23]. При взаимодействии ONOO⁻ с Mn(III)P и Mn(II)P образуются *NO₂ и NO₂⁻ соответственно и Mn(IV)P, который является сильным окислителем. Затем в результате реакции Mn(IV)P с восстановителями (**Rd**) образуются Mn(III)P и производные радикалов Rd^{*} [20]. Таким образом, взаимодействие пероксинитрита с Mn(III)-порфиринами представляет собой каталитический цикл (рис. 4). Следует отметить, что окисленный комплекс марганца способен взаимодействовать практически с любым доступным восстановителем. Чаще всего в качестве восстановителей выступают ураты, аскорбат, глутатион или тирозин.

Представленный механизм утилизации пероксинитрита может быть использован для регуляции биологически нежелательных реакций *in vitro*, например, окисления ДНК или нитрозилирования тирозина. Тем не менее, *in vivo* этот процесс маловероятен из-за доступности других потенциальных восстановителей.

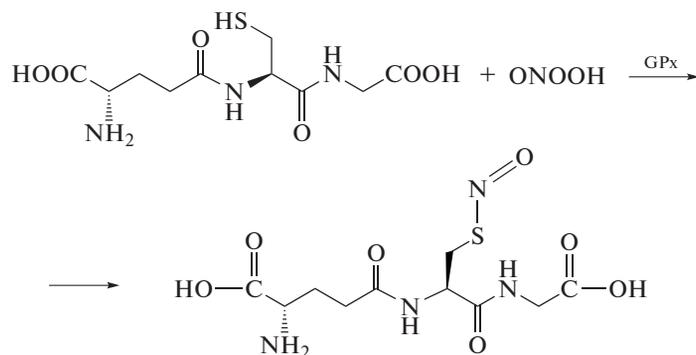


Рис. 3. Взаимодействие пероксинитрозной кислоты с глутатионом в присутствии селенсодержащей глутатионпероксидазы (GPx, КФ 1.11.1.9).

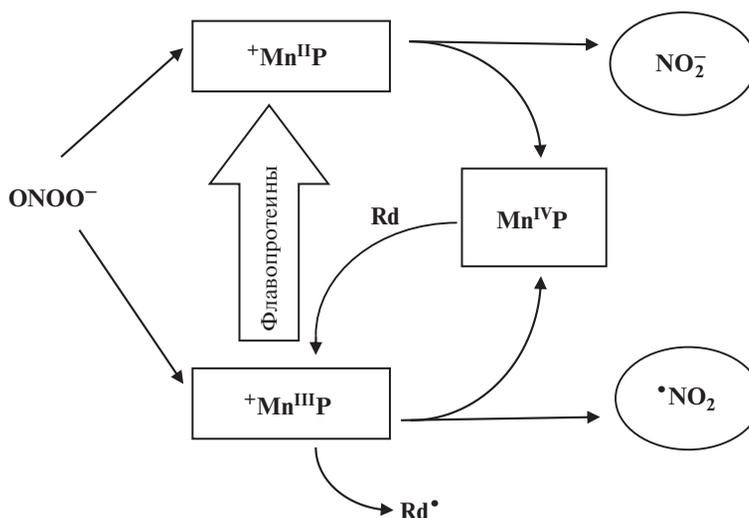
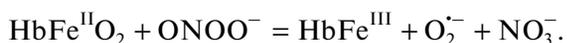


Рис. 4. Взаимодействие пероксинитрита с Mn-порфиринами. Mn(II)P, Mn(III)P, Mn(IV)P – Mn-порфирины с разной степенью окисления марганца; Rd – восстановитель; Rd• – радикал восстановителя.

Железопорфирины катализируют изомеризацию пероксинитрита в нитрат:



Использование в качестве ловушек синтетических железопорфиринов имеет большое практическое значение при пероксинитрит-опосредованных патологиях [24].

Диоксид углерода. Одним из путей распада пероксинитрита является взаимодействие с CO_2 (рис. 5). Углекислый газ связывает пероксинитрит с образованием пероксикарбоната (ONOOCO_2^-), который распадается с образованием радикальных продуктов: нитрит-радикала ($\cdot\text{NO}_2$) и нитрит-анион-радикала ($\cdot\text{NO}_3^-$) [25, 26]. Скорость реакции зависит от наличия в среде пероксидаз, а также от pH среды.

Карбонильные соединения. Механизм взаимодействия пероксинитрита с карбонильными соединениями подобен механизму взаимодействия с CO_2 , однако оно протекает медленнее. На пер-

вом этапе происходит взаимодействие ONOO^- с углеродом карбонила, образующийся промежуточный продукт затем трансформируется в нитрат и исходное карбонильное соединение, которое способно диффундировать из клетки и давать вторичные радикальные продукты или в случае альдегидов распадаться до карбоксилат-иона и азотной кислоты через перенос атомов водорода [20].

Таким образом, чтобы соединение могло выступать в качестве ловушки пероксинитрита, оно должно обладать следующими свойствами:

- высокой реакционной способностью, поскольку соединение должно реагировать с пероксинитритом быстрее, чем он вступит в реакцию с другими естественными мишенями;

- высокой концентрацией и доступностью, поскольку соединение должно присутствовать в клетке в достаточно высоких концентрациях, так как взаимодействие ONOO^- с основными мишенями определяется константой скорости;

- каталитической активностью, поскольку окисленная форма соединения должна быстро

восстанавливаться естественным путем, чтобы не вступать в побочные реакции и не оказывать токсического и повреждающего действия;

– отсутствием токсичности конечных продуктов реакции.

ТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ПЕРОКСИНИТРИТА: МИШЕНИ И МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ

Токсический потенциал пероксинитрита и его радикальных продуктов объясняется его способностью окислять или нитрозировать основные классы биомолекул: белки, липиды, нуклеиновые кислоты и углеводы. Однако в биологических системах, в которых эти мишени сосуществуют, первоочередность процессов будет определяться концентрациями взаимодействующих соединений и константами скоростей реакций.

Мишени токсического действия пероксинитрита.

Белки. Белки являются основными мишенями пероксинитрита из-за высокой концентрации и реакционной способности входящих в их состав аминокислотных остатков. Реактивность пероксинитрита по отношению к аминокислотным остаткам в белке проявляется в таком порядке: цистеин, метионин, триптофан, тирозин. Для протекания некоторых из этих процессов необходим CO_2 (табл. 1).

Напомним, что среди белков важными мишенями для пероксинитрита являются гемопротейды [14, 15]. Прямое и быстрое взаимодействие ONOO^- с оксиHb и оксимиоглобином приводит к образованию окисленных форм гемопротейдов, повреждению порфиринового кольца с последующей деградацией гема.

Нуклеиновые кислоты и нуклеотиды. Пероксинитрит может вызывать повреждение ДНК, включая окисление углеводов и азотистых оснований [35, 36]. Например, под действием окислителей происходит модификация гуанина в 8-оксогуанин [37], который далее взаимодействует с пероксинитритом с образованием 8-нитрогуанина [38].

Большинство исследований пероксинитрит-зависимого повреждения ДНК были проведены *in vitro* с использованием нуклеотидов или изолированной ДНК. Под действием пероксинитрита могут происходить разрывы нитей ДНК, которые были обнаружены, как в изолированной ДНК [39], так и в клетках, подвергнутых воздействию экзогенного ONOO^- . Механические разрывы нитей, по-видимому, возникают как вследствие повреждения углевода, так и модификации азотистого основания. Показано, что углекислый газ увеличивает образование нитрогуанина, но уменьшает разрывы нитей ДНК, и может быть важным модулятором модификаций нуклеиновых кислот пероксинитритом *in vivo*.

Подобные процессы могут происходить и с циклическими нуклеотидами. Так, 8-нитрогуанозин-3',5'-цикломонофосфат (**8-нитро-cGMP**) –

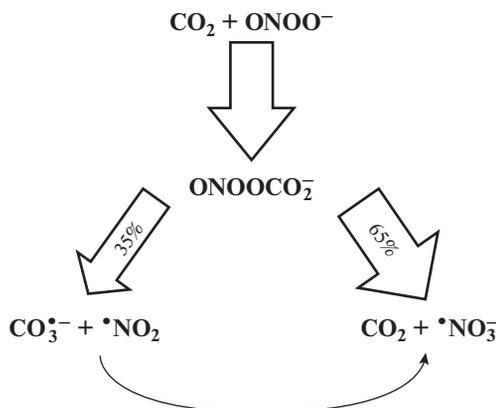


Рис. 5. Взаимодействие пероксинитрита с CO_2 . Доля путей распада пероксикарбоната (ONOOCO_2^-) до нитрит-радикала ($\bullet\text{NO}_2$) и нитрит-анион-радикала ($\bullet\text{NO}_3^-$) показана цифрами на стрелках.

электрофильное соединение, выполняющее сигнальные функции [40], эндогенно образуется при нитровании гуанозин-3',5'-цикломонофосфата (**cGMP**) пероксинитритом или диоксидом азота [28]. 8-нитро-cGMP реагирует с сульфгидрильными группами белков, образуя S-гуанилирование [41]. В частности, так регулируется активность белка Keap1, участвующего в сигнализации редокс-условий и экспрессии белков второй фазы инактивации ксенобиотиков.

Липиды. При воздействии пероксинитрита на клетку первыми мишенями для повреждения являются мембранные биомолекулы, и, естественно, важную роль здесь играют липиды.

Ненасыщенные жирные кислоты мембран могут быть повреждены различными активными формами кислорода (**АФК**) и азота (**АФА**), включая радикалы – производные ONOO^- ($\bullet\text{OH}$ и $\bullet\text{NO}_2$). При одноэлектронном окислении мембранных жирных кислот, вызванном АФК или АФА, образуются высокореактивные алкильные радикалы, которые могут принимать электроны от других жирных кислот, запуская реакции цепного радикального окисления. При этом алкильные производные быстро реагируют с молекулярным кислородом, образуя органический пероксильный радикал ($\text{ROO}\bullet$), который также может инициировать реакции перекисного окисления липидов в биологических мембранах [42].

Липидные радикалы могут реагировать с АФА (ONOO^- , $\bullet\text{NO}$ и $\bullet\text{NO}_2$), что приводит к образованию нитрозилированных и нитрованных липидов. Пероксильные радикалы при взаимодействии с $\bullet\text{NO}$ образуют органический пероксинитрит (ROONO^-) – липидное производное, которое может превращаться в органический нитрат (RONO_2) или разлагаться на алкоксильный радикал ($\text{RO}\bullet$) и нитрит-радикал ($\bullet\text{NO}_2$). Для утилиза-

Таблица 1. Модификации аминокислотных остатков белков пероксинитритом: продукты и особенности химических реакций

Аминокислотный остаток	Продукты реакции	Условия и особенности протекания реакции
Цистеин	Нитрозотиины, тиоловые радикалы, конъюгаты с глутатионом	– Необходима постоянная концентрация реагентов и наличие CO ₂ ; – на протекание реакции влияет природа и доступность вовлеченного тиола (свободный цистеин или внутримолекулярный цистеин) [27, 28].
Триптофан	6-нитротриптофан	– Соотношение триптофан / пероксинитрит в сторону триптофана способствует образованию преобладающего продукта 6-нитротриптофана; – побочные продукты реакции: N-формилкинуренин, дигидрокситриптофан; – для протекания реакции необходимы электроны и протоны; – присутствие гемсодержащих пероксидаз и перекиси водорода способствуют окислению триптофана до нитротриптофана [29, 30].
Метионин	Метионин-сульфоксид, метионинсульфон	– Скорость реакции с пероксинитрозной кислотой выше, чем с пероксинитритом; – возможность окисления метионина пероксинитритом и его производными зависит от доступности метионина (свободная аминокислота или часть пептидной цепи); – выход сульфоксида метионина снижается в присутствии CO ₂ [31, 32].
Тирозин	Дитирозин, 3-нитротирозин	– Скорость реакции нитрования тирозина возрастает в присутствии CO ₂ и АФК за счет формирования радикалов тирозина; – тирозильные радикалы могут взаимодействовать между собой, что приводит к формированию 3,3-дитирозина [33, 34].

ции образовавшегося алкоксильного радикала расходуется еще одна молекула $\cdot\text{NO}$ [43]. Пероксинитрит реагирует с ненасыщенными жирными кислотами с образованием алкильного производного пероксинитрита LOONO, который затем превращается в более стабильный LONO₂ или распадается до LO \cdot и $\cdot\text{NO}_2$ [44].

Нитролипиды, образующиеся в результате нитрования ненасыщенных жирных кислот и липидных радикалов пероксинитритом или диоксидом азота, как и описанный выше 8-нитро-cGMP можно отнести к эндогенным электрофильным соединениям, выполняющим сигнальные функции [27, 40]. Как и 8-нитро-cGMP, нитролипиды образуют обратимые аддукты с SH-группами белков по реакции присоединения Михаэля и регулируют ключевые адаптивные сигнальные пути, участвующие в клеточном гомеостазе и воспалительном ответе [45]. Эти соединения особенно важны для регуляции работы сердечно-сосудистой системы [45]. Образование нитро-жирных кислот было обнаружено и количественно определено в плазме крови человека и мембранах эритроцитов [46], а также доказана роль нитролипидов при патологии почек [47].

При нитровании арахидоновой кислоты образуется сложная смесь продуктов, включающая цис- и

транс-изомеры ее производных и нитрогидроксиарахидонат [48]. Нитроарахидоновая кислота является потенциальным ингибитором циклооксигеназы [49], а нитроалкен, также продукт нитрования арахидоновой кислоты, обладает противовоспалительной активностью в макрофагах, осуществленной по двум механизмам: ингибирование экспрессии iNOS и снижение продукции провоспалительных цитокинов [50]. Нитроолеиновая кислота проявляет сигнальную активность, связанную с противовоспалительными эффектами [51].

Потенциальное фармакологическое действие нитролипидов проявляется в ингибировании гипертензии и воспаления сосудов [52, 53], при защите кардиомиоцитов в изолированной модели ишемии/реперфузии сердца [54], а также уменьшении атеросклеротического поражения, показанном в модельных экспериментах на животных [55, 56].

ПЕРОКСИНИТРИТ КАК СИГНАЛЬНАЯ И РЕГУЛЯТОРНАЯ МОЛЕКУЛА

Пероксинитрит обладает не только токсическим действием. В некоторых случаях он способен выступать и как сигнальная молекула. Обсуждается его участие в качестве компонента системы месенджеров и сигнальных молекул, ответственных

за окислительно-восстановительную регуляцию метаболизма, активность ферментов, процессов транскрипции, клеточной дифференцировки и апоптоза [57–59]. Рассмотрим некоторые из сигнальных функций пероксинитрита подробнее.

Регуляция внутриклеточных сигнальных путей. Показано, что пероксинитрит влияет на такие важные для сигнальных путей ферменты, как киназы, и на регулируемые ими пути метаболизма.

Имеются противоречивые данные относительно регуляции пероксинитритом *протеинкиназы В* (семейство РКВ/Акт; серин/треонин-специфическая протеинкиназа), участвующей в регуляции метаболизма глюкозы, апоптоза, пролиферации клеток и интегрирующей клеточные ответы к факторам роста и инсулину. Пероксинитрит и его доноры инициируют фосфорилирование и активацию РКВ/Акт, что сопровождается фосфорилированием киназы гликогенсинтазы-3 в фибробластах кожи человека [60]. Пероксинитрит-зависимое фосфорилирование РКВ/Акт приводит к активации транскрипционного фактора Nrf2, что влияет на экспрессию глутатион-S-трансферазы [61]. Результатом может быть также увеличение активности цитопротекторного фермента гем-оксигеназы-1 в нервных клетках [62]. Были предложены различные механизмы активации пероксинитритом пути РКВ/Акт [63, 64]. При этом получены данные, что он ингибирует сигнальный путь РКВ/Акт в эндотелиальных клетках и макрофагах [65–67]. Ингибирование пути РКВ/Акт пероксинитритом, образующимся при диабете, приводит к эндотелиальной дисфункции и сосудистой патологии [68], а усиленное образование ONOO⁻ при диабете может быть вызвано усиленным образованием O₂⁻ и активацией экспрессии индуцируемой NO-синтазы (iNOS) [69]. Таким образом, пероксинитрит способен как активировать, так и ингибировать путь РКВ/Акт, индуцируя окисление и нитрование тирозина, а знак эффекта зависит от концентрации ONOO⁻, типа клетки и химического окружения.

С протеинкиназами В связано и действие пероксинитрита на *сигнальные пути инсулина*. В дополнение к своему метаболическому гормональному действию инсулин играет важную роль в поддержании физиологической эндотелиальной функции стимуляции синтеза NO через каскад активации фосфоинозитид-3-киназы (PI₃K-Akt) [62, 68]. В свою очередь PI₃K-Akt активирует серин/треонин-протеинкиназу РКВ/Акт, что усиливает дальнейшее фосфорилирование серина эндотелиальной NO-синтазы и приводит к увеличению продукции NO [68]. Воздействие пероксинитрита на эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVECs) значительно ингибирует инсулин-зависимое фосфорилирование РКВ/Акт по остаткам серина [66].

Пероксинитрит, как и другие прооксиданты, может активировать *митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК)*, представляющие наиболее

важное семейство серин-треониновых киназ, вовлеченных в регуляцию многих сигнальных путей. Этот процесс может идти через активацию эпидермального рецептора фактора роста Raf-1 и небольших G-белков, от которой зависят восходящие сигнальные пути, запускающие активацию киназы киназы митоген-активируемой киназы (МККК) [70].

Внеклеточная сигнал-регулируемая киназа (ERK – extracellular signal-regulated kinase). Этот фермент играет центральную роль в сигнальном пути, который активируется факторами роста EGF через активацию EGFR, киназы Raf-1, и MEK1 (компонента киназы MAPK/ERK). ERK может быть активирована окислителями и свободными радикалами, в том числе пероксинитритом [71]. В сердце ERK представляет собой кардиопротекторную сигнальную молекулу, которая включена в основной регуляторный путь гипертрофии миокарда при различных формах стресса [72].

Механизмы активации ERK при окислительном стрессе неясны. Данные, полученные на изолированных фибробластах [73], нейтрофилах [74], эндотелиальных [75] и нервных клетках [76], кардиомиоцитах [77] и целой легочной ткани [78], показывают, что пероксинитрит является мощным активатором ERK. Однако в каждом типе клеток этот эффект объясняется различными механизмами. Интересно, что активация ERK в миофибробластах легкого крысы полностью зависит от нитрования тирозина MEK.

c-Jun N-терминальная (концевая) киназа (JNK – c-Jun N-terminal kinases). JNK существует в виде трех изоформ (JNK-1, 2 и 3), активирующихся в ответ на стрессовые факторы внешней среды: УФ-излучение, тепловой удар, механический стресс и окислители, к которым относится и пероксинитрит. JNK активируется небольшими G-белками (ras/rac) через сигнальный путь, который включает несколько киназ MAPKKK, MKK1 и MKK4, связанные друг с другом в конкретных сигнальных модулях [79, 80]. Сигнальный путь JNK играет важную роль в развитии воспалительных реакций и апоптоза. По аналогии с ERK и p38 MAPK активация JNK регулирует гибель или выживание клеток разного типа в условиях стресса.

p38 MAP киназа (p38 MAPK или CSBP – цитокинин-специфический связывающий белок). p38 MAPK представлена 5 изоформами (α, β1, β2, γ и δ), которые активируются в стрессовых условиях через MAPKKK, MKK3 и MKK6. В сердце p38 защищает сердечные миоциты от гипертрофии и ремоделирования миокарда, а также является регулятором пролиферации в терминально дифференцированных кардиомиоцитах.

Активно изучается роль α- и β-изоформ p38 в регуляции выживаемости клеток при окислительном стрессе. Для многих типов клеток показано, что активация p38 различными видами оксидантов приводит к апоптозу. Доказано, что пероксинитрит

запускает фосфорилирование и активацию p38 в клетках сердца [81, 82], сосудов [83] и нервной системы [84, 85].

Протеинкиназа C (PKC). Фермент относится к семейству фосфолипид-зависимых киназ серина/треонина, которые участвуют во многих сигнальных путях, регулируя рост и дифференцировку клеток, апоптоз, иммунные реакции и реакции стресса, особенно окислительного [86].

Пероксинитрит играет важную роль в процессе активации PKC во время ишемического preconditionирования [87]. Стимуляция первичных кардиомиоцитов крыс происходит за счет активации PKC через нитрование тирозина. Это способствует усилению взаимодействия PKC с ее субстратным белком RACK2. Данный механизм также может быть опосредован ONOO⁻.

В кровеносных сосудах классические изоформы протеинкиназы (α , β и γ) регулируют разнообразные физиологические функции. Повышенная активность PKC (особенно β -изоформы) связана с такими острыми и хроническими сосудистыми стрессами, как гипоксия, ишемия-реперфузия, механический стресс (рестеноз после ангиопластики) и атеросклероз [87]. Все эти формы сосудистых стрессов связаны с усиленным образованием пероксинитрита в стенке сосуда.

Src-киназа. Фермент является нерецепторной тирозинкиназой и гомологом онкогена v-src, входящего в геном вируса саркомы Рауса, что обусловило происхождение ее названия. Доказано активирующее действие пероксинитрита на две src-киназы: lyp и hck. Активация им hck может быть объяснена обратимыми окислительно-восстановительными изменениями SH-групп, в то время как активация lyp происходит по цистеин независимому механизму окисления [88].

Ядерный фактор карра В (NF-kB). Фактор относится к семейству димерных транскрипционных факторов. NF-kB регулирует экспрессию многих генов, участвующих в иммунном ответе, воспалении и защите клеток от стресса окружающей среды. Активация NF-kB зависит от фосфорилирования I-kB (ингибирующих белков) и опознавания убиквитином. Протеасомная деградация белков I-kB индуцирует высвобождение транскрипционных факторов NF-kB, которые запускают экспрессию генов [89, 90].

АФК, в том числе пероксинитрит, способствуют активации NF-kB, но специфическая роль ONOO⁻ в этом процессе до конца не понятна. Известно, что его микромолярные концентрации вызывают активацию NF-kB, наряду с продукцией интерлейкина-6 в моноядерных лейкоцитах. Данный эффект объясняют нитрованием I-kB по Tug42, что может вызывать его протеасомную деградацию [91].

Транспортер дофамина (hDAT). Пероксинитрит вызывает повреждение нейронов, что может вносить существенный вклад в этиологию болезни Паркинсона. ONOO⁻ вызывает дозозави-

симое и необратимое ингибирование активности hDAT [92], окисляя в нем остаток цистеина 342. Таким образом, препараты, понижающие функцию hDAT *in vivo*, могут оказывать свое действие через окислительный стресс, опосредованный ONOO⁻.

α , β -адренорецепторы (GPCR). Показано, что пероксинитрит подавляет β -адренергические реакции путем нитрования остатков тирозина, находящегося в β_1 - и β_2 -адренорецепторах [93].

Основные сигнальные пути, регулируемые пероксинитритом, показаны в табл. 2.

Регуляция активности ферментов. Особый интерес представляет действие пероксинитрита на ферменты, которое, как правило, *in vitro* приводит к их инактивации. При работе с клеточными культурами *in vivo* этого может и не происходить из-за одновременного протекания других реакций с участием пероксинитрита. В табл. 3 приведены результаты таких исследований.

Видно, что большинство ферментов, для которых показано ингибирующее действие пероксинитрита, представляют собой оксидоредуктазы (1 класс ферментов) – 13 из 22, а простациклинсинтаза (КФ 5.3.99.4) относится к внутримолекулярным оксидоредуктазам – 3 подкласс трансфераз. Таким образом, ONOO⁻, являющийся сильным окислителем, в первую очередь действует на ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции.

Пероксинитрит чаще всего вызывает необратимое окисление или нитрование аминокислотного остатка, которое изменяет структуру и, как следствие, функциональную активность белка. Иногда это может приводить и к активации фермента. Так, пероксинитрит способствует активации проколлагеназы, поскольку в условиях окислительного/нитрозативного стресса изменяется конформация остатка цистеина в аутоингибиторном домене профермента, что приводит к активации коллагеназы и распаду коллагена [125].

Изменение активности ферментов не всегда связано с прямым воздействием на них пероксинитрита, а может быть результатом развития окислительного или нитрозативного стресса, обусловленного токсичностью ONOO⁻, вследствие чего начинается каскад событий, например, как в случае с каспазой-3. Пероксинитрит инактивирует Mn-супероксиддисмутазу [109], что влечет за собой образование АФК, повреждение наружной мембраны митохондрий и выход в цитоплазму цитохрома c. Цитохром c формирует комплекс с цитозольными белками, Araf-1 и прокаспазой-9, что приводит к образованию активной каспазы-9, которая, в свою очередь, положительно воздействует на прокаспазу-3 [126]. Итогом всех происходящих событий становится апоптоз клеток.

Следует отметить, на какие сайты в молекулах ферментов действует пероксинитрит. В первую очередь, это остатки цистеина (включая селено-

Таблица 2. Сигнальные пути, регулируемые пероксинитритом

Сигнальный белок	Активация (+)/ ингибирование (–)	Биологическая роль
PKB (протеинкиназа В); PKC (протеинкиназа С)	+/-	Регуляция метаболизма глюкозы, апоптоза, пролиферации клеток, транскрипции [60–69, 86, 87]
PI ₃ K фосфоинозитид-3-киназа (сигнальный путь инсулина)	+/-	Регуляция роста, пролиферации, и метаболизма клеток, защита от апоптоза [62, 68]
МАРК (митоген-активируемые протеинкиназы)	+	Регуляция транскрипции генов метаболизма, пролиферации и подвижности клеток, апоптоза [70, 94]
ERK (внеклеточная сигнал-регулируемая киназа)	+	Активация Т-клеток, пролиферации эндотелиальных клеток; регуляция синаптической пластичности и фосфорилирования транскрипционного фактора p53 [71–78]
JNK (с-Jun N-терминальная киназа)	+	Регуляция апоптоза, воспаления, продукции цитокинов и метаболизма [79, 80]
p38 MAPK или CSBP (цитокинин-специфический связывающий белок)	+	Регуляция клеточной реакции на цитокины и стресс (УФ-облучение, температура); регуляция апоптоза и аутофагии [81–85]
Src – семейство киназ	+	Активация NMDA-рецепторов [88, 95]
NFκB (ядерный фактор карра β)	+/-	Регуляция экспрессии генов, участвующих в иммунном ответе, воспалении и защите клеток от экологических стрессов [89–91]
hDAT (транспортер дофамина)	–	Перенос дофамина из синаптической щели в цитозоль [92]
α,β-адренорецепторы (GPCR)	–	Регуляция артериального давления, гликолиза, липолиза, теплопродукции [93]

цистеин) – в 12 случаях, и тирозина – в 9 случаях. Пероксинитрит может действовать и на небелковые участки активного центра фермента, в том числе металлсодержащие: молибдокофактор у ксантиноксидазы [98, 99, 101, 102], марганец у Mn-супероксиддисмутазы [110] и железосерные кластеры у сукцинатдегидрогеназы и аконитазы [101, 102, 121]. Но наиболее часто встречающейся мишенью действия ONOO⁻ на ферменты, как и на белки в целом, является остаток цистеина – тиол-содержащей аминокислоты.

Таким образом, пероксинитрит объединяет в себе свойства АФК и АФА и является очень сильным окислителем. Пероксинитрит и пероксинитрозная кислота участвуют во многих реакциях, включая одно- и двухэлектронное окисление, нитрование и в меньшей степени нитрозилирование различных соединений, при этом скорость взаимодействия пероксинитрита с биомолекулами как правило превышает скорость его биотрансформации. Главными мишенями ONOO⁻ *in vivo* являются CO₂ и тиолы, а также глутатион, который играет ключевую роль в детоксикации этой молекулы.

Действует пероксинитрит и на многие белки, в том числе ферменты, прежде всего оксидоредуктазы, причем наиболее часто встречающейся мишенью его действия являются остатки цистеина. Этот тиол-содержащий аминокислотный остаток

является одним из наиболее реакционноспособных и взаимодействует с различными АФК и АФА, как в свободном состоянии, так и в составе глутатиона и многих белков. Именно противодействие окислению остатков цистеина способствует защите и всей белковой молекулы от окислительного и нитрозативного стресса. Ранее нами было показано антиоксидантное действие на молекулу гемоглобина динитрозильных комплексов железа, которые связываются с остатком цистеина β-субъединицы [127, 128].

Помимо описанного выше токсического действия пероксинитрит может модулировать различные сигнальные пути в клетке, а также сообщать об их гибели. Взаимодействие пероксинитрита со многими биомолекулами приводит к образованию модифицированных продуктов, которые могут выполнять сигнальную функцию. Если количество модифицированных продуктов не превышает допустимой величины, они дают сигнал о включении программы адаптации, а при их избытке – они вызывают повреждение, а иногда и гибель клеток.

Разработка фармакологической стратегии борьбы с токсическим действием пероксинитрита поможет скорректировать метаболические процессы при многих патологиях. Поэтому очень важным является изучение механизмов детоксикации ONOO⁻, так как это будет способ-

Таблица 3. Ферменты, инактивируемые пероксинитритом*

Фермент	Модифицированный аминокислотный остаток или участок активного центра	Инактивация фермента <i>in vitro</i>	Инактивация фермента <i>in vivo</i>	Источник
Алкогольдегидрогеназа дрожжей (КФ 1.1.1.1)	Cys	+	+	[96, 97]
Ксантиноксидаза (КФ 1.1.3.22)	MoCo (молибденовый кофактор)	+	+	[98, 99]
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.59)	Cys	+	?	[100]
Сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.5.1)	[4Fe-4S] (железо-серный кластер)	+	+	[101, 102]
Фумаратредуктаза (КФ 1.3.5.4)	Cys	?	+	[102]
Глутаминсинтетаза (КФ 1.4.1.13)	Tyr	+	?	[103]
НАД(Ф)-трансгидрогеназа (КФ 1.6.1.1)	Tyr	+	?	[104]
Тиоредоксинредуктаза (КФ 1.8.1.9)	Se-Cys	?	+	[105]
Глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.12)	Se-Cys	+	+	[105, 106]
Триптофангидроксилаза (КФ 1.13.99.3)	Cys	+	?	[107]
Циклооксигеназа (КФ 1.14.99.1)	Tyr	+	+	[108]
Mn-супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1)	Tyr/Mn	+	+	[109, 110]
Рибонуклеотидредуктаза (КФ 1.17.4.2)	Tyr	+	?	[111]
Креатинкиназа (КФ 2.7.3.2)	Cys	+	+	[112]
НАДФ ⁺ -зависимая изоцитратдегидрогеназа (КФ 2.7.11.5)	Cys/Tyr	+	?	[113]
Тирозингидроксилаза (КФ 2.7.11.6)	Tyr/Cys	+	+	[114, 115]
Тирозинфосфатаза (КФ 3.1.3.86)	Cys	+	+	[116, 117]
Zn ²⁺ -глицерофосфохолин-фосфоэстераза (КФ 3.1.4.2)	Tyr	+	?	[118]
Каспаза 3 (КФ 3.4.22.56)	Cys	+	+	[119, 120]
Аконитаза (КФ 4.2.1.3)	[4Fe-4S] (железо-серный кластер)	+	+	[121]
Простациклинсинтаза (КФ 5.3.99.4)	Tyr	+	+	[122, 123]
Ca ²⁺ -АТФаза (КФ 7.2.2.10)	Cys	?	+	[124]

* (+) – ингибирующее действие пероксинитрита на фермент; (?) – нет данных.

ствовать созданию лекарственных препаратов для лечения заболеваний, сопровождаемых нитрозативным стрессом. При этом необходимо учитывать тот факт, что малые дозы пероксинитрита и продуктов его обмена могут играть и позитивную

роль для клетки и организма, активируя сигнальные пути адаптации к условиям стресса.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских

ученых — кандидатов наук (МК № 1856.2020.7) (Ю.В.А.) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (О.В.К., А.Ф.Т.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 24. P. 9265–9269.
2. Radi R. // Nitric Oxide. 2019. V. 87. P. 83–89.
3. Zhang N., Diao Y., Hua R., Wang J., Han S., Li J., Yin Y. // Front. Biosci. (Landmark Ed.) 2017. V. 22. P. 824–834.
4. Borgognone A., Shantsila E., Worrall S.M., Prompnt E., Loka T., Loudon B.L., Chimen M., Ed. Rainger G., Lord J.M., Turner A., Nightingale P., Feelisch M., Kirchhof P., Lip G.Y.H., Watson S.P., Frenneaux M.P., Madhani M. // Cardiovasc. Res. 2018. V. 114. № 10. P. 1313–1323.
5. Gaynullina D.K., Schubert R., Tarasova O.S. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 6. e1421. <https://doi.org/10.3390/ijms20061421>
6. Garrido F., Gonzalez-Caballero J.L., Lomax R., Dady I. // Acta Paediatr. 2019. V. 109. № 2. P. 309–313.
7. Yaguchi J., Yaguchi S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. № 12. P. 5607–5612.
8. Ahmad A., Dempsey S. K., Daneva Z., Azam M., Li N., Li P.-L., Ritter J. K. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 9. № 19. e2605. <https://doi.org/10.3390/ijms19092605>
9. Xie C.W., Wang Z.Z., Zhang Y.N., Chen Y.L., Li R.P., Zhang J.D. // Neurotox. Res. 2019. V. 36. № 1. P. 193–203.
10. Peñarando J., Aranda E., Rodríguez-Ariza A. // Transl. Res. 2019. V. 210. P. 99–108.
11. Абаленихина Ю.В., Фомина М.А., Исаков С.А. // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. 2013. № 1. С. 44–48.
12. Nagarkoti S., Sadaf S., Awasthi D., Chandra T., Jagavelu K., Kumar S., Dikshit M. // Free Radic. Res. 2019. V. 53. № 3. P. 281–292.
13. Radi R. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2018. V. 115. № 23. P. 5839–5848.
14. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. V. 45. № 6. P. 563–587.
15. Agarwal P., Ahsan H., Ahmad R. // Int. J. Health. Sci. (Qassim). 2018. V. 12. № 6. P. 30–35.
16. Hrabrova E., Gemeiner P., Šolt L. // Chem. Pap. 2007. V. 61. № 6. P. 417–437.
17. Tarabová B., Lukeš P., Hammer M.U., Jablonowski H., von Woedtke T., Reuter S., Machala Z. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2019. V. 21. № 17. P. 8883–8896.
18. Berski S., Latajka Z., Gordon A.J. // J. Comput. Chem. 2011. V. 32. № 8. P. 1528–1540.
19. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. // Biochemistry (Moscow). 2018. V. 83. № 12-13. P. 1575–1593.
20. Ferrer-Sueta G., Campolo N., Trujillo M., Bartsaghi S., Carballal S., Romero N., Alvarez B., Radi R. // Chem. Rev. 2018. V. 118. № 3. P. 1338–1408.
21. De Armas M.I., Esteves R., Viera N., Reyes A.M., Mastrogiovanni M., Alegria T.G.P., Netto L.E.S., Tórtora V., Radi R., Trujillo M. // Free Radic. Biol. Med. 2019. V. 130. P. 369–378.
22. Sun C., Du W., Wang P., Wu Y., Wang B., Wang J., Xie W.A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017. V. 494. № 3–4. P. 518–525.
23. Carballal S., Valez V., Alvarez-Paggi D., Tovmasyan A., Batinic-Haberle I., Ferrer-Sueta G., Murgida D.H., Radi R. // Free Radic. Biol. Med. 2018. V. 126. P. 379–392.
24. Sharma S.K., Schaefer A.W., Lim H., Matsumura H., Moënné-Loccoz P., Hedman B., Hodgson K.O., Solomon E.I., Karlin K.D. // J. Am. Chem. Soc. 2017. V. 139. № 48. P. 17421–17430.
25. Augusto O., Goldstein S., Hurst J.K., Lind J., Lymar S.V., Merenyi G., Radi R. // Free Radic. Biol. Med. 2019. V. 135. P. 210–215.
26. Aicardo A. Biochemistry of Oxidative Stress – Physiopathology and Clinical Aspects. Luxembourg: Springer, 2016. P. 49–77.
27. Natarajan K., Abraham P. // Chem. Biol. Interact. 2016. № 251. P. 45–59.
28. Peixoto Á.S., Geyer R.R., Iqbal A., Truzzi D.R., Soares Moretti A.I., Laurindo F.R.M., Augusto O. // J. Biol. Chem. 2018. V. 293. № 4. P. 1450–1465.
29. Iizumi K., Kawasaki H., Shigenaga A., Tominaga M., Otsu A., Kamo A., Kamata Y., Takamori K., Yamakura F. // J. Clin. Biochem. Nutr. 2018. V. 63. № 3. P. 197–204.
30. Абаленихина Ю.В., Фомина М.А. // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2016. № 1. С. 7–11.
31. Chen H.J., Yang Y.F., Lai P.Y., Chen P.F. // Anal. Chem. 2016. V. 88. № 18. P. 9276–9284.
32. Nakao L.S., Iwai L.K., Kalil J., Augusto O. // FEBS Lett. 2003. V. 547. № 1–3. P. 87–91.
33. De Boer T.R., Palomino R.I., Mascharak P.K. // Med Onc. 2019. № 4. e190003. <https://doi.org/10.20900/mo.20190003>
34. Daiber A., Daub S., Bachschmid M., Schildknecht S., Oelze M., Steven S., Schmidt P., Megner A., Wada M., Tanabe T., Münzel T., Bottari S., Ullrich V. // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. № 4. P. 7542–7570.
35. Islam B.U., Habib S., Ahmad P., Allarakha S., Moinuddin, Ali A. // Ind. J. Clin. Biochem. 2015. V. 30. № 4. P. 368–385.
36. Yamashiro R., Misawa T., Sakudo A. // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. e17947. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36779-1>
37. Niles J.C., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. // Nitric Oxide. 2006. V. 14. № 2. P. 109–121.
38. Hu C.W., Chang Y.J., Chen J.L., Hsu Y.W., Chao M.R. // Molecules. 2018. V. 23. №3. e605. <https://doi.org/10.3390/molecules23030605>
39. Tavares C.P., Vernal J., Delena R.A., Lamattina L., Cassia R., Terenzi H. // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1844. № 4. P. 810–817.
40. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F. // Biochemistry (Moscow). 2019. V. 84. Suppl. 1. P. 206–224.
41. Kishimoto Y., Kunieda K., Kitamura A., Kakihana Y., Akaike T., Ihara H. // ACS Chem. Neurosci. 2018. V. 9. № 2. P. 217–223.
42. Jaeschke H., Ramachandran A. // React. Oxyg. Species (Apex). 2018. V. 5. № 15. P. 145–158.
43. Rubbo H., Trostchansky A., O'Donnell V.B. // Arch. Biochem. Biophys. 2009. V. 484. № 2. P. 167–172.
44. Mustafa A.G., Alfaqih M.A., Al-Shboul O., Al-Dwairi A. // Biomed. Rep. 2018. V. 9. № 5. P. 421–426.

45. Villacorta L., Gao Z., Schopfer F.J., Freeman B.A., Chen Y.E. // *Front. Biosci.* 2016. V. 21. № 4. P. 873–889.
46. Trostchansky A., Möller M.N., Bartesaghi S., Botti H., Denicola A., Radi R., Rubbo H. // *Nitric Oxide (2nd Edition): Biology and Pathobiology.* N.Y.: Acad. Press, 2010. P. 27–60.
47. Jobbagy S., Tan R.J. // *Nitric Oxide.* 2018. V. 78. P. 121–126.
48. Volker R., Khoo N.K.H., Schopfer F.J., Rudolph T.K. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 284. № 3. P. 1461–1473.
49. Trostchansky A., Bonilla L., Thomas C.P., O'Donnell V.B., Marnett L.J., Radi R., Rubbo H. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 15. P. 12891–12900.
50. Trostchansky A., Souza J.M., Ferreira A., Ferrari M., Blanco F., Trujillo M., Castro D., Cerecetto H., Baker P.R., O'Donnell V.B., Rubbo H. // *Biochemistry.* 2007. V. 46. № 15. P. 4645–4653.
51. Baker P.R., Schopfer F.J., O'Donnell V.B., Freeman B.A. // *Free Radic. Biol. Med.* 2009. V. 46. № 8. P. 989–1003.
52. Zhang J., Villacorta L., Chang L., Fan Z., Hamblin M., Zhu T., Chen C.S., Cole M.P., Schopfer F.J., Deng C.X., Garcia-Barrio M.T., Feng Y.H., Freeman B.A., Chen Y.E. // *Circ. Res.* 2010. V. 107. № 4. P. 540–548.
53. Villacorta L., Chang L., Salvatore S.R., Ichikawa T., Zhang J., Petrovic-Djergovic D., Jia L., Carlsen H., Schopfer F.J., Freeman B.A., Chen Y.E. // *Cardiovasc. Res.* 2013. V. 98. № 1. P. 116–124.
54. Koenitzer J.R., Bonacci G., Woodcock S.R., Chen C.S., Cantu-Medellin N., Kelley E.E., Schopfer F.J. // *Redox Biol.* 2016. V. 8. P. 1–10.
55. Rudolph T.K., Rudolph V., Edreira M.M., Cole M.P., Bonacci G., Schopfer F.J., Woodcock S.R., Franek A., Pekarova M., Khoo N.K., Hasty A.H., Baldus S., Freeman B.A. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010. V. 30. № 5. P. 938–945.
56. Baker P.R., Schopfer F.J., Sweeney S., Freeman B.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 32. P. 11577–11582.
57. Speckmann B., Steinbrenner H., Grune T., Klotz L.O. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2016. V. 595. P. 153–160.
58. Grace P.M., Gaudet A.D., Staikopoulos V., Maier S.F., Hutchinson M.R., Salvemini D., Watkins L.R. // *Trends Neurosci.* 2016. V. 39. № 12. P. 862–879.
59. Chen X., Zhou B., Yan T., Wu H., Feng J., Chen H., Gao C., Peng T., Yang D., Shen J. // *Free Radic. Biol. Med.* 2018. V. 117. P. 158–167.
60. Klotz L.O., Schieke S.M., Sies H., Holbrook N.J. // *J. Biochem.* 2000. V. 352. № 1. P. 219–225.
61. Kang K.W., Choi S.H., Kim S.G. // *Nitric Oxide.* 2002. V. 7. № 4. P. 244–253.
62. Li M.H., Cha Y.N., Surh Y.J. // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. V. 41. № 7. P. 1079–1091.
63. Delgado-Esteban M., Martin-Zanca D., Andres-Martin L., Almeida A., Bolaños J.P. // *J. Neurochem.* 2007. V. 102. № 1. P. 194–205.
64. Schroeder P., Klotz L.O., Buchczyk D.P., Sadik C.D., Schewe T., Sies H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 285. № 3. P. 782–787.
65. Shacka J.J., Sahawneh M.A., Gonzalez J.D., Ye Y.Z., D'Alessandro T.L., Estévez A.G. // *Cell Death Differ.* 2006. V. 13. № 9. P. 1506–1514.
66. Song P., Wu Y., Xu J., Xie Z., Dong Y., Zhang M., Zou M.H. // *Circulation.* 2007. V. 116. № 14. P. 1585–1595.
67. Song P., Xie Z., Wu Y., Xu J., Dong Y., Zou M.H. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 18. P. 12446–12455.
68. Kobayashi T., Taguchi K., Yasuhiro T., Matsumoto T., Kamata K. // *Hypertension.* 2004. V. 44. № 6. P. 956–962.
69. Kosmachevskaya O.V., Shumayev K.B., Topunov A.F. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2017. V. 53. № 3. P. 273–289.
70. Zhang P., Wang Y.-Z., Kagan E., Bonner J.C. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 29. P. 22479–22486.
71. Martindale J.L., Holbrook N.J. // *J. Cell. Physiol.* 2002. V. 192. № 1. P. 1–15.
72. Xia P., Liu Y., Cheng Z. // *BioMed Research International.* 2016. V. 2016. № 19. e9583268. <https://doi.org/10.1155/2016/9583268>
73. Bapat S., Verkleij A., Post J.A. // *FEBS Lett.* 2001. V. 499. № 1–2. P. 21–26.
74. Zouki C., Zhang S.L., Chan J.S., Filep J.G. // *FASEB J.* 2001. V. 15. № 1. P. 25–27.
75. Upmaces R.K., Deeb R.S., Resnick M.J., Lindenbaum R., Gamss C., Mittar D., Hajjar D.P. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004. V. 286. № 6. P. 1271–1280.
76. Zhang Y., Wang H., Li J., Dong L., Xu P., Chen W., Neve R.L., Volpe J.J., Rosenberg P.A. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 14. P. 9460–9470.
77. Pesse B., Levrant S., Feihl F., Waeber B., Gavillet B., Pacher P., Liaudet L. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2005. V. 38. № 5. P. 765–775.
78. Iwagaki A., Choe N., Li Y., Hemenway D.R., Kagan E. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2003. V. 28. № 1. P. 51–60.
79. Chang L., Mammalian K. M. // *Nature.* 2001. V. 410. № 6824. P. 37–40.
80. Davis R.J. // *Cell.* 2000. V. 103. № 2. P. 239–252.
81. Wang W., Dow K.E., Riopelle R.J., Ross G.M. // *Neurotoxicity research.* 2001. V. 3. № 5. P. 485–499.
82. Wang Y. // *Circulation.* 2007. V. 116. № 12. P. 1413–1423.
83. Eligini S., Arenaz I., Barbieri S.S., Faleri M.L., Crisci M., Tremoli E., Colli S. // *Br. J. Pharmacol.* 2001. V. 133. № 7. P. 1163–1171.
84. Sarker K.P., Nakata M., Kitajima I., Nakajima T., Maruyama I. // *J. Mol. Neurosci.* 2000. V. 15. № 3. P. 243–250.
85. Ali T.K., Matragoon S., Pillai B.A., Liou G.I., El-Remessy A.B. // *Diabetes.* 2008. V. 57. № 4. P. 889–898.
86. Yan S.F., Harja E., Andrassy M., Fujita T., Schmidt A.M. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006. V. 48. № 9. Suppl 1. P. A47–A55.
87. Das Evcimen N., King G.L. // *Pharmacol. Res.* 2007. V. 55. № 6. P. 498–510.
88. Mallozzi C., Di Stasi M.A., Minetti M. // *Free Radic. Biol. Med.* 2001. V. 30. № 10. P. 1108–1117.
89. Bonizzi G., Karin M. // *Trends Immunol.* 2004. V. 25. № 6. P. 280–288.
90. Hayden M.S., Ghosh S. // *Cell.* 2008. V. 132. № 2. P. 344–362.
91. Matata B.M., Galinanes M. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 3. P. 2330–2335.
92. Park S.U., Ferrer J.V., Javitch J.A., Kuhn D.M. // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. № 11. P. 4399–4405.
93. Lewis S.J. // *Eur. J. Pharmacol.* 2005. V. 518. № 2–3. P. 187–194.
94. Yang S.H., Sharrocks A.D., Whitmarsh A.J. // *Gene.* 2013. V. 513. № 1. P. 1–13.
95. Ali D.W., Salter M.W. // *Curr. Opin. Neurobiol. J.* 2001. V. 11. № 3. P. 336–342.

96. Men L., Wang Y. // J. Proteome Res. 2007. V. 6. № 1. P. 216–225.
97. Crow J.E., Beckman J.S., McCord J.M. // Biochemistry. 1995. V. 34. № 11. P. 3544–3552.
98. Millar T.M., Kanczler J.M., Bodamyali T., Blake D.R., Stevens C.R. // Redox Rep. 2002. V. 7. № 2. P. 65–70.
99. Lee C.I., Liu X., Zweier J.L. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 13. P. 9369–9376.
100. Souza J.M., Radi R. // Arch. Biochem. Biophys. 1998. V. 360. № 2. P. 187–194.
101. Pearce L.L., Martinez-Bosch S., Manzano E.L., Winnica D.E., Epperly M.W., Peterson J. // Nitric Oxide. 2009. V. 20. № 3. P. 135–142.
102. Rubbo H., Denicola A., Radi R. // Arch. Biochem. Biophys. 1994. V. 308. № 1. P. 96–102.
103. Melo P.M., Silva L.S., Ribeiro I., Seabra A.R., Carvalho H.G. // Plant. Physiol. 2011. V. 157. № 3. P. 1505–1517.
104. Forsmark-Andree R., Persson B., Radi R., Dallner G., Ernster L. // Arch. Biochem. Biophys. 1996. V. 336. № 1. P. 113–120.
105. Benhar M. // Free Radic. Biol. Med. 2018. V. 127. P. 160–164.
106. Padmaja S., Squadrito G.L., Pryor W.A. // Arch. Biochem. Biophys. 1998. V. 349. № 1. P. 1–6.
107. Kuhn D.M., Geddes T.J. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 42. P. 29726–29732.
108. Sorokin A. // Curr. Med. Chem. 2016. V. 23. № 24. P. 2559–2578.
109. Yamakura F., Taka H., Fujimura T., Murayama K. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 23. P. 14085–14089.
110. Quijano C., Hernandez-Saavedra D., Castro L., McCord J.M., Freeman B.A., Radi R. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 15. P. 11631–11638.
111. Guittet O., Decottignies P., Serani L., Henry Y., Le Maréchal P., Laprévote O., Lepoivre M. // Biochemistry. 2000. V. 39. № 16. P. 4640–4648.
112. Mihm M.J., Coyle C.M., Schanbacher B.L., Weinstein D.M., Bauer J.A. // Cardiovasc. Res. 2001. V. 49. № 4. P. 798–807.
113. Lee J.H., Yang E.S., Park J.-W. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 51. P. 51360–51371.
114. Kuhn D.M., Aretha C.W., Geddes T.J. // J. Neurosci. 1999. V. 19. № 23. P. 10289–10294.
115. Blanchard-Fillion B., Souza J.M., Friel T., Jiang G.C., Vrana K., Sharov V., Barrón L., Schöneich C., Quijano C., Alvarez B., Radi R., Przedborski S., Fernando G.S., Horwitz J., Ischiropoulos H. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 49. P. 46017–46023.
116. Takakura K., Beckman J.S., Mac Millan-Crow L.A., Crow J.P. // Arch. Biochem. Biophys. 1999. V. 369. № 2. P. 2197–2207.
117. Bartesaghi S., Radi R. // Redox Biol. 2018. V. 14. P. 618–625.
118. Sok D.E. // Neurochem. Res. 1998. V. 23. № 8. P. 1061–1067.
119. Larson K.M., Zhang L., Badger G.J., Jay G.D. // Osteoarthritis Cartilage. 2017. V. 25. № 9. P. 1488–1495.
120. Lau A., Arundine M., Sun H.S., Jones M., Tymianski M. // J. Neurosci. 2006. V. 26. № 45. P. 11540–11553.
121. Tórtora V., Quijano C., Freeman B., Radi R., Castro L. // Free Radic. Biol. Med. 2007. V. 42. № 7. P. 1075–1088.
122. Zou M.H. // Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2007. V. 82. № 1–4. P. 119–127.
123. Zou M.H., Ullrich V. // FEBS Lett. 1996. V. 382. № 1–2. P. 101–104.
124. Gutiérrez-Martín Y., Martín-Romero F.J., Iñesta-Vaquera F.A., Gutiérrez-Merino C., Henao F. // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271. № 13. P. 2647–2657.
125. Okamoto T., Akaie T., Nagano T., Miyajima S., Suga M., Ando M., Ichimori K., Maeda H. // Arch. Biochem. Biophys. 1997. V. 342. № 2. P. 261–274.
126. Dubey M., Nagarkoti S., Awasthi D., Singh A.K., Chandra T., Kumaravelu J., Barthwal M.K., Dikshit M. // Cell Death Dis. 2016. V. 7. № 9. P. 23–48.
127. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F. // Methods Enzymol. 2008. V. 436. P. 445–461.
128. Shumaev K.B., Gubkin A.A., Serezhenkov V.A., Lobyshva I.I., Kosmachevskaya O.V., Ruuge E.K., Lankin V.Z., Topunov A.F., Vanin A.F. // Nitric Oxide. 2008. V. 18. № 1. P. 37–46.

Peroxynitrite: Toxic Agent and Signal Molecule

Yu. V. Abalenikhina^a, O. V. Kosmachevskaya^b, and A. F. Topunov^{b, *}

^aRyazan State Medical University named after Academician I.P. Pavlov, Ryazan, 390026 Russia

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

*e-mail: aftopunov@yandex.ru

Reactive nitrogen specie – peroxynitrite is one of the most powerful oxidizers in the body. Depending on the conditions it either undergoes biotransformation and detoxification, or interacts with various substances (proteins and among them enzymes, lipids, nucleic acids, carbohydrates) with their modification. Thiol compounds are most actively exposed to peroxynitrite, including cysteine residues in proteins. Among enzymes the inhibiting effect of peroxynitrite has been shown to the greatest extent on oxidoreductases, and here it also more often acted on cysteine. Modified biomolecules may be toxic, but in physiological concentrations they can function as participants of signaling pathways. Data show that peroxynitrite is not only a toxic agent, but also a component of the messenger system, and a signal molecule responsible for redox regulation of cellular metabolism. Detoxification pathways are important aspects of studying peroxynitrite. They can contribute to the search for drugs against diseases accompanied by nitrosative stress.

Keywords: peroxynitrite, peroxynitrose acid, nitric oxide, cysteine, toxic action, signal function

УДК 578.85.86:579.64

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ ВИРУСОВ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ (ОБЗОР)

© 2020 г. И. В. Максимов¹, *, А. В. Сорокань¹, М. Ю. Шеин¹, Р. М. Хайруллин¹

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа, 450054 Россия

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

Поступила в редакцию 31.03.2020 г.

После доработки 24.05.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

Вирусные заболевания вызывают значительные потери урожая и заметное ухудшение качества сельскохозяйственной продукции. В настоящее время не существует методов защиты растений от циркулирующих в агроэкосистемах вирусов непосредственно какими-либо противовирусными препаратами, а меры борьбы сводятся к селекции устойчивых сортов, оздоровлению культивированием верхушечных меристем, а также к контролю численности насекомых-переносчиков. В обзоре описываются современные подходы в защите растений от вирусных заболеваний редактированием генома, регуляцией экспрессии генов растения-хозяина и/или вируса методами РНК-интерференции и формирования искусственного консорциума растений с ризосферными и/или эндофитными микроорганизмами, обладающими комплексной защитной активностью и иммуномодулирующим потенциалом.

Ключевые слова: вирусы, стимулирующие рост растений микроорганизмы, противовирусная активность, РНКазы, системная устойчивость растений, биопрепараты

DOI: 10.31857/S0555109920060100

Вирусы – уникальные болезнетворные агенты, способные использовать генетический аппарат хозяина для воспроизводства и рециркуляции в природе. В силу их патогенных свойств защита человека, домашних животных, культурных растений и промышленных микроорганизмов от вирусных инфекций относится к одному из важнейших вызовов современности [1]. Культурные растения поражаются не менее чем 450 видами вирусов [2], многократно уменьшая и ухудшая их биологическую продуктивность, а также товарные качества [3, 4]. Вирусная инфекция является одной из причин “вырождения сорта”, неизбежно происходящего при возделывании культур без специального семеноводства и сортообновления [5]. Аббревиатуры вирусных болезней, которые обсуждаются в обзоре, приведены в табл. 1.

Восстановлением генетически запрограммированного биологического потенциала культуры и освобождением ее от вирусов в растениеводстве занимается комплекс семеноводческой индустрии, проводящий мероприятия по химической и биологической защите растений от вирусов и их переносчиков, соблюдению агротехники (выбор сроков посадки и уборки, соблюдение севооборота, борьба с сорняками и др.), а также клонному отбору растений, биотехнологическому оздоровлению и размножению безвирусного материала в культуре *in vitro* [6]. Вместе с тем, современная тех-

нология оригинального семеноводства, например, безвирусного картофеля, основанная исключительно на выделении и регенерации безвирусных апикальных меристем, недостаточно эффективна в исключении вирусной инфекции. По мере репродукции изначально безвирусный стерильный посадочный материал в полевых условиях (3–5 лет) заражается механическим путем или посредством повреждения различными переносчиками (патогенными микроорганизмами, нематодами и насекомыми). Титр вирусных частиц в тканях растений по мере репродукции культуры неуклонно повышается. В итоге стародавние сорта в коллекциях, а также образцы, отобранные в частных хозяйствах, оказываются формирующими определенный резерват инфекции, в том числе вирусной [7].

В отличие от пестицидов, уничтожающих грибные патогены и вредных насекомых, в настоящее время отсутствуют эффективные химические средства защиты растений против вирусов в полевых условиях [8]. Вместе с тем, еще в начале 70 гг. 20 в. существенным этапом в развитии химиотерапии как метода, дополняющего биотехнологические методы оздоровления растений от вирусов, явилось открытие противовирусной активности рибавирина (1,β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) [9]. В работе [10] показано, что обработка растений томатов этим соединением полностью подавляет размножение вируса

Таблица 1. Аббревиатура вирусных болезней, упоминаемых в обзоре

Вирус бронзовости томата	ВБТ	Tomato spotted wilt virus	TSWV
Вирус мозаики томатов	ВТоМ	Tomato mosaic virus	ToMV
Вирус черной кольцевой пятнистости томатов	ВЧКПТ	Tomato black ringspot nepovirus	TBRV
Вирус желтой курчавости листьев томата	ВЖКЛТ	Tomato yellow leaf curl virus	TYLCV
Вирус крапчатой мозаики томатов	ВКМТ	Tomato mottle virus	ToMoV
Вирус хлоротичной пятнистости томатов	ВХПТ	Tomato chlorotic spot virus	TCSV
Вирус табачной мозаики	ВТМ	Tobacco mosaic virus	TMV
Вирус погремковости табака	ВПоТ	Tobacco rattle virus	TRV
Вирус некроза табака	ВНТ	Tobacco necrosis virus	TNV
Табачный вирус стрика	ТВС	Tobacco streak virus	TSV
X вирус картофеля	ХВК	Potato virus X	PVX
Y вирус картофеля	YВК	Potato virus Y	PVY
M вирус картофеля	МВК	Potato virus M	PVM
Вирус черной кольцевой пятнистости картофеля	ВЧКПК	Potato black ringspot nepovirus	PBRV
Вирус метельчатости верхушек картофеля	ВМВК	Potato mop-top virus	PMTV
Вирус скручивания листьев картофеля	ВСЛК	Potato leafroll virus	PLRV
Вироид веретеновидности клубней картофеля	ВВКК	Potato spindle tuber viroid	PSTV
Вирус пятнистости жилок острого перца	ВПЖОП	Chilli veinal mottle virus	ChiVMV
Вирус крапчатости перца	ВКП	Pepper mottle virus	PMV
Вирус мягкой крапчатости перца	ВМКП	Pepper mild mottle virus	PMMoV
Вирус некротического пожелтения жилок свеклы	ВНПЖС	Beet necrotic yellow vein virus	BNYVV
Вирус разрастания жилок салата-латука	ВРЖСЛ	Lettuce big-vein associated virus	LBVaV
Вирус некроза почек арахиса	ВНПА	Groundnut bud necrosis virus	GBNV
Вирус желтой мозаики фасоли	ВЖМФ	bean yellow mosaic potyvirus	BYMV
Вирус скручивания листьев маша	ВСЛМ	Urdbean leaf crinkle virus	ULCV
Вирус крапчатости клевера	ВКК	Red clover mottle virus	RCMV
Вирус вилта кормовых бобов = Вирус вилта фасоли	ВВФ	Broad bean wilt virus	BBWV
Вирус пятнистости кормовых бобов	ВПКБ	Broad Bean Strain Virus	BBSV
Вирус мозаики вигны	ВМВ	Cowpea mosaic virus	CPMV
Вирус мозаики люцерны	ВМЛ	Alfalfa mosaic virus	AMV
Вирус карликовости кукурузы	ВКК	Maize rough dwarf virus	MRDV
Вирус карликовой мозаики кукурузы	ВКМК	Maize dwarf mosaic virus	MDMV
Вирус желтой пятнистости ириса	ВЖПИ	Iris yellow Spot Virus	IYSV
Вирус огуречной мозаики	ВОМ	Cucumber mosaic virus	CMV
Вирус зеленой крапчатой мозаики огурца	ВЗКМО	Cucumber green mottle mosaic virus	CGMMV
Вирус мозаики тыквы	ВМТ	Squash mosaic virus	SMV
Вирус некротической пятнистости дыни	ВНПД	Melon necrotic spot virus	MNSV
Вирус зеленой крапчатой мозаики киури	ВЗКМК	Kyuri green mottle mosaic virus	KGMMV
Вирус некроза подсолнечника	ВНП	Sunflower necrosis virus	SNV
Вирус кольцевой пятнистости папайи	ВКПП	Papaya ringspot virus,	PRV
Вирус разрастания верхушек банана	ВРВБ	Banana bunchy top virus	BBTV

бронзовости томатов (**ВБТ**). Мишенью рибавирина является фермент, эффективно блокирующий и предотвращающий только синтез новых вирусных частиц, поэтому препарат неэффективен против уже сформировавшихся вирусных частиц. Кроме того, обнаружен тератогенный эффект рибавирина по отношению к человеку [11].

На международном рынке пестицидов существует ряд органических препаратов, которые по-

зиционируются производителями как антивирусные. Например, предложены препараты, такие как Virimox (“Gurudutt Agro Chemicals”, Индия), который содержит антиоксиданты, подобные аскорбиновой кислоте, витамины и минералы, поддерживающие иммунные реакции растений и активизирующие синтез лигнина, Virol-H (“Ambience Fertchem”, Индия), содержащий водный экстракт трав, и Viriweak (“Jaiveek Agro Biotech.”, Индия),

активными компонентами которого являются сапонины [12], а также Kobe (“Onzelivre BV”, Нидерланды), активными веществами которого являются хризофановая кислота и пигмент лишайника *Xanthoria parietina*, паритинин [13]. Механизм действия этих препаратов основан либо на индукции защитных реакций растений, либо на инсектицидной или фунгицидной активностях, но не на прямом вируцидном эффекте. Интересна работа египетских исследователей, в которой отмечается прямой, а также опосредованный активацией иммунной системы растений, антивирусный защитный эффект наночастиц оксида никеля против вируса огуречной мозаики (ВОМ) [14] и диоксида титана против вируса пятнистости кормовых бобов (ВПКБ) [15].

При разработке мероприятий по защите растений от вирусов нельзя упускать из виду традиционные химические пестициды (бактерициды, фунгициды, нематоциды и инсектициды), действующие как регуляторы численности потенциальных векторов переноса вирусных частиц. Давно известно, что эффективными векторами многих фитовирусов являются тли (надсемейство *Aphidoidea*), белокрылки (семейство *Aleyrodidae*), трипсы (отряд *Thysanoptera*), нематоды (семейство *Trichodoridae*) и др. [16–19]. Из-за повреждения почвенными нематодами *Trichodorus* sp. и *Paratrichodorus* sp. происходит заражение растений картофеля вирусом погрешности табака (ВПоТ) [20], а нематодами *Longidorus* sp. – вирусами черной кольцевой пятнистости картофеля (ВЧКПК) и томатов (ВЧКПТ) [19]. Переносчиком вируса ВОМ может быть фитопатогенный гриб *Rhizoctonia solani* [21], вируса некротического пожелтения жилок свеклы (ВНПЖС) – плазмодиюфорный псевдогриб *Phoma betae* A.V. Frank. (син. *Pleospora betae* Bjorl.). Гриб *Olpidium brassicae*, (Woronin) P.A. Dang, вызывающий ризоманию [22], может быть переносчиком вируса разрастания жилок салата-латука (ВРЖСЛ) и вируса некроза табака (ВНТ) [17, 19]. Вирус метельчатости верхушек картофеля (ВМВК) распространяется зооспорами гриба *Spongospora subterranean* (Wallr.) Lagerh. [3]. Обнаружена способность зооспор возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestance* переносить X-вирус картофеля (ХВК) [23], а вирус табачной мозаики (ВТМ) сохранял свою вирулентность по отношению к табаку после пассирования на мицелии этого оомицета [24].

В качестве основы для антивирусных препаратов исследователями особое внимание уделяется низкомолекулярным биологически активным молекулам и пептидам, способным активировать иммунитет растений и уменьшить степень развития симптомов вирусной инфекции [25, 26]. Эти соединения по сравнению с пестицидами менее токсичны, легко утилизируются растениями и разлагаются в окружающей среде без накопления

вредных веществ [3]. Они могут долговременно усиливать в растениях иммунитет, защищающий их от заражения вирусами и другими патогенами, в том числе могут быть использованы для размножения безвирусных микрорастений. Например, имеются сведения об эффективном использовании интерферона человека для борьбы с вирусами [27, 28], в том числе ХВК, М-вируса картофеля (МВК) и Y-вируса картофеля (YВК) на растениях картофеля [29].

Хитозан и салициловая кислота (СК) нашли практическое применение в качестве средств защиты растений от вирусов [25, 30–32]. Показана эффективность хитозана в защите картофеля от ХВК, YВК, ВТМ, вируса некроза табака (ВНТ), огуречной мозаики (ВОМ), мозаики люцерны (ВМЛ), желтой мозаики фасоли (ВЖМФ), вириода веретенновидности клубней (ВВКК) и др. [30, 31]. Использование хитозана способствовало уменьшению степени развития вирусной инфекции у растений банана [33], томатов [34] и огурца [35]. Его защитный эффект зависел от концентрации, степени полимеризации, N-дезацетилирования, заряда молекулы и природы ее химической модификации [36]. Механизм защитного эффекта хитозана оказался связан с предотвращением распространения вирусов по сосудам флоэмы и плазмодесмам растений [31], в том числе благодаря отложению каллозы в порах клеток ситовидных трубок [37] и активации растительных рибонуклеаз [31, 38]. Олигомеры хитозана индуцировали устойчивость к ВТМ у растений *Arabidopsis* дикого типа и нечувствительного к жасмоновой кислоте мутанта (*jar1*), но не у растений *Arabidopsis* (*NahG*) с лимитированным синтезом СК [39].

На растениях дурмана *Datura stramonium* L. выявлено снижение степени пораженности ХВК после обработки κ/β -каррагинаном (сульфированный полисахарид) из красной водоросли *Tichocarpus crinitus* [40]. Активацией гидролитических ферментов, в том числе рибонуклеаз, объясняют защитный эффект применения динатриевой соли 2-ацетил-4-гидроксикарбонил-метилтио-5-хлороциклопент-4-ен-1,3-диона (β , β' -трикетона) для обработки листьев табака против ВТМ [41].

Под влиянием экзогенной СК обнаружена экспрессия растительных рибонуклеаз, РНК-зависимой РНК-полимеразы, участвующей в механизме антивирусной РНК-интерференции (РНКи) [38], и, соответственно, накоплении коротких интерферирующих РНК [42]. Предполагается, что это может приводить к полному исчезновению вируса в растении [43]. Например, под влиянием СК активность транскрипции РНК-зависимой РНК-полимеразы может увеличиваться более чем в 1300 раз [44], ингибируя репликацию, транспорт вирусных частиц от клетки к клетке по плазмодесмам и проводящим сосудам [45]. Обработка синтетическим аналогом СК – бензотиади-

азолом (S-метилловый эфир бензо-(1,2,3)-тиадиазол-7-карботионовой кислоты), который является основой препаратов “BION®” и “Astigard®” (Syngenta, Швейцария), эффективно уменьшала степень распространения YBK в растениях томата в течение 7 сут после обработки [46]. Обработка растений перца *Capsicum annuum* препаратом 0.5 мМ бензотиадиазола индуцировала устойчивость к ВОМ [47]. Точно также обработка аналогом СК, 2,6-дихлорникотиновой кислотой, восстанавливала у растений линии картофеля NahG-Desire устойчивость к YBK [48].

Однако несмотря на успешность использования таких препаратов, следует принимать во внимание, что описанные выше и другие подобные вещества в относительно краткий срок утилизируются и/или разбавляются в растениях, что способствует реинфекции, так как вирусные частицы постоянно присутствуют в клетках и репродуцируются, как только прекращается действие ингибирующего фактора [6, 11]. Так, например, уже к 14 сут после обработки бензотиадиазолом различия в проявлении болезни между контрольными и обработанными препаратами растениями нивелировались [46].

Одним из главных путей борьбы с вирусной инфекцией можно считать селекцию вирусостойчивых растений. Но, к сожалению, у культурных растений не так много источников генов иммунитета к вирусам с доминантным типом наследования [49, 50]. Например, анализ 178 сортов картофеля отечественной селекции, проведенный Клименко с соавт. [7], показал, что из них 78.2% не имели ни одного маркера устойчивости к YBK и только сорта, содержащие в геноме маркер STM0003, сцепленный с геном *Ry_{sto}*, были в определенной степени ценны для селекции. Гены *Ty-1* и *Ty-3*, отвечающие за устойчивость томатов к вирусу желтой курчавости листьев томата (ВЖКЛТ) оказались генами, кодирующими РНК-зависимую РНК-полимеразу [51] важный фермент РНКи.

Более эффективными по сравнению с классическими методами селекции для формирования устойчивости оказались технологии генной инженерии, когда в геном хозяйственно ценной культуры (сорта) вводятся гены [52], кодирующие синтез потенциально антивирусных белков (интерферона и/или рибонуклеаз), белков токсичных для насекомых (белков *Cry* и *Vip* бактерии *B. thuringiensis* и/или ингибиторов протеиназ) или капсидных белков (КБ) самого вируса [53, 54], а также гены, ответственные за функционирование механизмов редактирования геномов с использованием систем CRISPR/CasN и РНКи [55]. Вместе с тем, следует отметить, что эффективность таких трансформаций может быть различна и со временем неизбежно преодолевается вирусами. Так, показано, что если трансгенные линии картофеля, синтезирующие КБ YBK, проявили по-

чти полную устойчивость к соответствующему вирусу, то синтез растениями КБ вируса скручивания листьев (ВСКЛ) приводил к формированию устойчивости только у 72–96% растений [53].

Другим негативным эффектом массового выращивания в поле генно-модифицированных растений является перераспределение видовой структуры вирусов, которое может приводить к распространению других, нецелевых, но также вредоносных инфекций. Так, испанские ученые [56] показали, что на посевах традиционного сорта кукурузы преобладал вирус карликовости (ВКК), в то время как на посевах генно-модифицированной Vt-кукурузы – вирус карликовой мозаики (ВКМК).

Интересен подход к формированию защиты растений от вирусной инфекции с использованием эффекта РНКи, действующей как на транскрипционном – метилирование ДНК, так и на пост-транскрипционном уровнях посредством прямой РНКи информационной или вирусной РНК, опосредованной Dicer-подобными рибонуклеазами III класса (Dicer-like protein, DCL) и малыми (короткими) интерферирующими РНК (миРНК) [57]. Цхан с соавт. [55], показали, что в растениях линий картофеля, экспрессирующих генно-инженерную кассету CRISPR/Cas13a, содержащую миРНК, комплементарную фрагменту генома YBK, накапливалось меньше вирусной РНК, и, соответственно, уменьшалась интенсивность проявления симптомов заболевания. Вместе с тем, в некоторых случаях подобные манипуляции приводили не только к устойчивости, например, томатов к ВЖКЛТ, но и к значительному изменению транскриптома растений, у которых некоторые интегрируемые компоненты негативно влияли на продуктивность культуры [58]. В то же время бурно развивающаяся технология редактирования геномов, включающая и компоненты РНКи, позволяет считать, что использование комплексных систем редактирования на основе, например, кассеты CRISPR/Cas13 может помочь в решении задачи подавления репликации вирусного генома в растениях [59].

Перспективность борьбы с патогенами и вредителями, переносчиками вирусов, на основе РНКи обсуждается также при создании РНКи-инсектицидов [60, 61], РНКи-фунгицидов [62], РНКи-нематицидов [63], а также РНКи-вирицидов [64, 65]. Пять лет назад (2015) компания Monsanto (США) анонсировала выход на рынок первого инсектицида на основе интерферирующих РНК [66]. Авторы работы [67] считают, что необходимо создавать несколько видов таких препаратов или вводить в геном растения целую кассету, содержащую гены защитных соединений, действующих против насекомых, вирусов, и, может быть, грибных фитопатогенов. Однако такая громоздкая кассета, по нашему мнению, является

проблемной с точки зрения конструирования, ее интеграции в растительный геном и сохранности в нем, а также биобезопасности и вероятности формирования впоследствии суперрезистентности у целевых объектов. Такая схема принципиально отличается от защиты растений с помощью генетической модификации, но требует разработки методов доставки “РНКи-пестицида” в растение, защиты РНКи-молекул от ультрафиолетового излучения и смыва дождем [68]. Тем не менее, имеются удачные работы по созданию устойчивых против вирусной РНК растений, содержащих РНКи векторы. Так, был сконструирован химерный вектор экспрессии, содержащий три фрагмента генов ORF2 вируса картофеля ХВК, гена протеазы желперного компонента вируса УВК и гена КБ вируса скручивания листьев картофеля (ВСЛК) [69]. Его внедрение в картофель позволило выделить 20% растений, иммунных ко всем трем вирусам, вследствие одновременного подавления экспрессии вирусных генов.

Интересны новые идеи по доставке таких “РНКи-пестицидов”, например, с помощью микросимбионтов целевого вида насекомого [67] или ризосферных и эндофитных бактерий [70]. В работе [71] отмечается, что использование эндофитов в качестве векторов для введения в растения сигнальных молекул является более перспективным, чем возделывание генетически модифицированных растений.

Биологический контроль распространения вирусов. Создание на современном этапе противовирусных препаратов для защиты растений, которые элиминировали бы вирусные частицы, представляется сомнительным. Заявлено, что биофунгицид Serifel® (“BASF SE”, Германия) эффективно защищает растения томата от вируса бронзовости томата (ВБТ), а картофеля – от УВК [46]. На Украине созданы два биопрепарата (“Биогран” и “Бактопаслен”) с заявленной противовирусной активностью против МВК. Первый содержит бактерии *Azospirillum*, фитогормоны, аминокислоты, гуминовые кислоты, микро- и макроэлементы, а второй – бактерии *Azotobacter vinelandii*, *A. chroococcum* и лектин картофеля [72]. Известен препарат Bei Laisi, содержащий ауксин-продуцирующий штамм *B. velezensis* SNB55, депонированный в коллекции микроорганизмов Китая под номером CGMCC NO.17315 [73]. Штамм ингибировал размножение ВТМ, ВЖЛТ, а также был эффективен для защиты растений огурца от фузариоза, перца – от фитофтороза, риса – от ризиктониоза, а также подавлял рост фитопатогенов *Rhizoctonia solani* Kuhn и *Botrytis cinerea*. Анализ российского рынка показывает, что антивирусные препараты в классификации биопестицидов Российской Федерации вообще не встречаются [8].

Одним из перспективных подходов к созданию новых противовирусных препаратов заклю-

чается в применении штаммов микроорганизмов с явными инсектицидным или другими биоцидными эффектами для контроля векторов переноса вирусов. Например, только в Китайской Народной Республике к 2013 г. 85 компаний зарегистрировали 132 биопрепарата на основе бактерий *B. thuringiensis* [74]. В Индии биопестициды для борьбы с вредителями занимают около 5% рынка подобных средств защиты растений. В состав этих препаратов входят до 15 видов и штаммов микроорганизмов. Центральный Совет по инсектицидам и регистрационный комитет Индии (Central Insecticides Board and Registration Committee) зарегистрировал в 2017 г. 970 микробиологических препаратов, из которых более 200 содержали энтомопатогенные (*Lecanicillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii*, *Hirsutella thompsonii*, *Metarhizium anisopliae* s.l.) и нематоцидные (*Purpureocillium lilacinum*, *Pochonia chlamydosporia*) грибы. Основу более тридцати препаратов составляли бактерии *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, двенадцати – *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, трех – *B. thuringiensis* subsp. *sphaericus* (для борьбы с москитами) [75]. В США зарегистрировано 356 активных ингредиентов биопестицидов, включающих 57 видов и/или штаммов микроорганизмов или их продуктов, направленных против размножения насекомых, клещей и нематод [76]. В России зарегистрировано не менее 10 биоинсектицидов, содержащих в том числе штаммы *B. thuringiensis*, наибольшую известность из которых имеет биопрепарат “Битоксибациллин” (*B. thuringiensis* var. *thuringiensis*, “СибБиоФарм”, Россия).

Биоцидная активность ризосферных и эндофитных бактерий позволяет предположить, что эти микроорганизмы, благодаря продукции ими антибиотических веществ, проявляют антивирусную активность опосредовано, так как фитопатогенные бактерии, грибы, нематоды и насекомые-вредители, как уже отмечено выше [3, 16–23], могут быть векторами-переносчиками большого числа вирусных инфекций растений. Многократное уменьшение степени поражения растений свеклы ВМПЖС после их обработки препаратом бактерий *B. amylolequifaciens* в работе [22] объясняется снижением пораженности грибом *Phoma betae*, возбудителем зональной пятнистости или фомоза. Обнаружено, что изолят *B. subtilis* BS3A25 и его культуральный фильтрат сдерживали развитие ВОМ в растениях томата, угнетая развитие бахчевой тли *Aphis gossypi*, являющегося переносчиком этого заболевания [77], что может быть связано как с афицидностью сурфактинов, вырабатываемых бактериями [78, 79], так и с запуском под влиянием бактерий защитных механизмов растений против насекомого и/или вируса [79, 80]. Колонизация внутренних тканей лука эндофитным грибом *Hypocrea lixii* (F3ST1) достоверно уменьшала титр частиц вируса желтой пятнисто-

сти ириса (**ВЖПИ**) в растениях, снижая их поврежденность основным его переносчиком – трипсом *Thrips tabaci* Lind. [81].

Достаточно активно проводится оценка влияния стимулирующих рост растений микроорганизмов (**СРРМ**) на проявление в растительной ткани вирусной инфекции, а также распространение и накопление вирусов. В 1966 г. [82] было описано, что инъекция в ткани табака сорта Самсун NN убитых клеток *P. syringae* способствовала уменьшению симптомов мозаики, вызванной ВТМ. Обработка семян коровьего гороха (вигны) *Vigna unguiculata* суспензией клеток штаммов бактерий *B. pumilus* T4 и *B. subtilis* GBO3 увеличивала их всхожесть, уменьшала симптомы поражения растений вирусом мозаики (**ВМВ**) на 42% и 41%, соответственно, в особенности при совместном применении, а также восстанавливала их рост [83]. Совместное применение штаммов *P. putida* 89B-61 и *Serratia marcescens* 90-166 [84], а также штаммов *S. marcescens* 90-166 и *B. pumilus* SE34 [85] для обработки семян огурца и томатов развивало устойчивость у проростков к ВОМ и заметно уменьшала степень проявления болезни. Впервые системность развития защитных механизмов растений против вирусной инфекции была показана после сложной последовательной инокуляции первого и второго листьев огурца бактерией *P. lachrymans*, а третьего листа – вирусом ВОМ [86]. Обработка хлопчатника суспензионной культурой изолятов *Bacillus* spp. из ризосферы и тканей растений эффективно защищала растения от табачного вируса стрика (**ТВС**), уменьшая титр частиц вируса в тканях [87]. Ризосферные штаммы бактерий *B. amyloliquefaciens* FZB24 и FZB42 [88], а также штаммы *B. pumilus* EN16 и *B. subtilis* SW1 [89], внесенные в почву, способствовали меньшему проявлению симптомов ВТМ на листьях табака и уменьшению содержания вирусных частиц в тканях. Сотрудниками Всероссийского НИИ картофельного хозяйства РАСХН [90] предложено обрабатывать безвирусные миниклубни пред посадкой в грунт 1%-ной суспензией бактериального препарата “Экстрасол” на основе ризосферных бактерий штамма *B. subtilis* Ч13 для защиты растений, в том числе и от вирусов. В обзоре [91] подробно описан терапевтический эффект СРРМ на растения, размножающиеся клонированием, который проявлялся в лучшей их приживаемости, защите от стрессовых факторов окружающей среды абиотической и биотической природы, в том числе и от вирусной инфекции.

Обработка растений *P. fluorescens* СНАО индуцировала системную защиту табака от ВНТ [92], а черного маша (*Vigna mungo*) – от вируса скручивания листьев маша (**ВСЛМ**) [93]. Обработка почвы и семян перца горького (*Capsicum annuum*) клетками *B. cereus* (I-35) и *Stenotrophomonas* sp. (II-10) подавляла развитие вируса ВТМ и вируса пятни-

стости жилок острого перца (**ВПЖОП**) [94]. Обработка растений перца клетками почвенных дрожжей *Pseudozyma churashimaensis* индуцировала устойчивость к ВОМ, вирусу крапчатости перца (**ВКП**), вирусу мягкой крапчатости перца (**ВМКП**) и вирусу вилта кормовых бобов (фасоли) (**ВВФ**) [95]. В условиях закрытого грунта растения томата, обработанные СРРМ, поражались ВОМ на 32–58%, тогда как контрольные – на 88–98% [96].

Предобработка почвы перед посевом табака ризосферной бактерией *P. putida* A3 уменьшала степень поражения растений ВТМ по сравнению с контрольными, также как и после посева [96]. Выявлено, что клетки *P. putida* A3 [97] и *B. pumilus* [98] разрушают частицы вируса в соке из листьев табака, инфицированных ВТМ. Таким образом, в этих работах показана не только способность стимулирующих рост растений бактерий из родов *Pseudomonas* spp. и *Bacillus* spp. подавлять непосредственно вирусную инфекцию, но и опосредовано стимулировать их защитные механизмы.

В работе [99] штамм бактерий *Bacillus* sp. SJ использовали для подавления ВТМ, внося в почву 10^8 кл./г или кл./л сухого или жидкого препарата.

Выявлено, что некоторые штаммы эндофитных бактерий имеют широкий круг растений-хозяев. Так, штамм *B. amyloliquefaciens* 5B6, выделенный из листьев вишни, защищал растения табака *Nicotiana benthamiana* и перца от ВОМ, ВВФ и ВКП [100]. Показана возможность применения препарата на основе штамма бактерий *Bacillus* DAIJU-SIID2550 или его мутанта ($4 \times 10^9-10^{10}$ КОЕ/г) [101] для борьбы с различными вирусными инфекциями: ВТМ, ВМКП, ВТом, вирусом некротической пятнистости дыни (**ВНПД**), вирусом зеленой крапчатой мозаики огурца (**ВЗКМО**) и вирусом зеленой крапчатой мозаики киури (**ВЗКМК**). Обработка почвы при выращивании томатов клетками штамма *Streptomyces pactum* Act12 уменьшала содержание вирусных частиц ВЖКЛТ в растениях и увеличивала урожайность культуры [102]. При обработке растений дурмана *Datura metel* препаратом, содержащим штаммы *Streptomyces*, обнаружили высокую эффективность защиты против ВТМ [103]. В работе [85] сообщается, что обработка семян томатов спорами штаммов бактерий *B. amyloliquefaciens* 937a, *B. subtilis* 937b и *B. pumilus* SE34 индуцировала устойчивость растений к ВКМТ.

Бактерии рода *Bacillus* используются для защиты растений от вирусных инфекций также в составе с другими видами микроорганизмов, или/и в смеси с биологически активными природными или химическими веществами, растительным материалом и минеральными компонентами. Например, была продемонстрирована возможность придания устойчивости растениям томатов, перца, дыни, арбуза, сахарной свеклы, табака, арабидопсиса, огурца, ладанной сосны, кайенского

перца и чой сумы (*Brassica rapa* subsp. *Chinensis*) не только к грибным и бактериальным фитопатогенам, но и к вирусам при использовании препаратов, содержащих несколько видов бактерий рода *Bacillus*: *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycooides* и *B. sphaericus* [104]. В работе [85] было обнаружено, что комплекс *B. amyloliquefaciens* IN937a и *B. pumilus* IN937b защищал растения огурца от ВОМ. Обработка этими бактериями семян томатов перед посевом уменьшала поражение вирусом крапчатой мозаики (ВКМТ), а препаратами двойных комбинаций бактерий, включающих штаммы *B. subtilis* GB03 и *B. pumilus* SE34, или *B. amyloliquefaciens* IN937a, или *B. subtilis* IN937b, или *B. pumilus* INR7, или *B. pumilus* T4 эффективно защищала от ВОМ [85]. В работе авторы [105] показали высокую эффективность применения культуральных фильтратов консорциума бактерий *B. circulans*, *P. fluorescens* и гриба *Trichoderma harzianum* для защиты растений томатов от ВТОМ. Сообщается также, что применение препарата, содержащего консорциум штаммов *B. licheniformis* MML2501 + *Bacillus* sp. MML2551 + *P. aeruginosa* MML2212 + *S. fradiae* MML1042, существенно уменьшало поражение растений подсолнечника вирусом некроза (ВНП) [106], а дополнительное введение штаммов *Streptomyces* sp. PM5 и *Trichothecium roseum* MML005 усиливало этот защитный эффект [106]. Обработка семян папайи и томатов консорциумом штаммов *B. amyloliquefaciens* IN937a, *B. pumilus* SE34 и *B. pumilus* T4 способствовала в последующем защите растений от вирусов кольцевой пятнистости (ВКПП) и хлоротичной пятнистости (ВХПТ), соответственно. Сложный микробиологический состав с общей конечной концентрацией 10^9 кл./мл, содержащий культуральную жидкость стрептомицетов (*Streptomyces*) и гриба *Paecilomyces lilacinus*, споры цианобактерий, гриб *Aspergillus niger*, смесь в определенных пропорциях клеток и спор штаммов *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mucilaginosus*, *B. polymyxa*, *B. cereus*, *B. laterosporus* и *B. brevis*) и энтомопатогенный гриб *Metarhizium anisoplia*, защищал растения табака от ВТМ [107].

Для защиты семян, почвы и вегетирующих растений от ВТМ предложена их обработка составом на основе штаммов бактерии *Pseudomonas* sp. C-0176A V, *Bacillus* sp. BS-0017AV и дрожжи *Schizosaccharomyces* sp. 2. [108]. Дополнительно в состав препарата могут вводиться протеаза, какой-либо органический субстрат и альгинаты. Так, препарат, содержащий клетки бактерии *P. fluorescens* (изолят о. Ява, Индонезия) и хитозан, подавлял развитие вируса мозаики тыквы (ВМТ) на растениях огурца [35], а обработка смесью хитозана с консорциумом бактерий *Pseudomonas* sp. (206(4) + В-15 + ЖК-16) усиливала защиту растений томатов от ВЖКЛТ [34].

Обработка в условиях закрытого грунта растений фасоли *Vicia faba* L. консорциумом из штаммов *P. fluorescens* FB11 и *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* FBG05 индуцировала у растений устойчивость к ВЖМФ [109]. В другой работе [110] применение *R. leguminosarum* bv. *viciae* уменьшала пораженность растений фасоли ВЖМФ на 36.6% по сравнению с необработанными. Использование в полевых условиях консорциума *P. fluorescens* и *Rhodotorula* sp. защищало растения картофеля от ЮВК и увеличивало их продуктивность [111], точно так же, как и обработка посадок картофеля суспензией клеток штамма *B. vallismortis* EXTN-1 защищала от вирусов ЮВК и ХВК [112]. На обработанных штаммом *P. fluorescens* СНА0 почвах растения *N. glutinosa*, *N. tabacum* 'Xanthi nc' и *N. tabacum* 'Burley 63' в течение 6-и недель были защищены от инфицирования ВТМ [113]. Выделенные из ризосферы томатов штаммы *P. fluorescens* (CoP-1, CoT-1, СНАО) в отдельности и в смеси эффективно уменьшали симптомы ВБТ на растениях томата [114], изоляты *Pseudomonas* spp. (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa* и *P. taiwanensis*) и *Bacillus* spp. способствовали защите растений папайи от вируса кольцевой пятнистости (ВКПП) [115]. Комбинирование в одном препарате хитина и штамма *P. fluorescens* СНАО позволила индуцировать у растений банана системную устойчивость к вирусу разрастания верхушек (ВРВБ) [33]. Предложен жидкий препарат, содержащий сложную смесь лизата бактерий *B. cereus*, водные экстракты различных видов шлемника (*Radix astragali*, *R. scutellariae*, *R. paeoniae rubra*, *R. glycyrrhizae*, *R. pulsatillae*, *R. rehmanniae*, *R. bupleuri*, *R. isatidis* и *R. salviae miltiorrhizae*), мушмулы (*Folium eriobotryae* и *F. isatidiss*) и жимолости (*Flos lonicerae* и *F. carthami*), а также культуральную жидкость стрептомицетов (yellow-bird streptomycete seed liquor и yellow purple streptomycete seed liquor) и *Trichoderma* spp. [116]. Указывается, что его противовирусный эффект достигается благодаря наличию протеазы и амилазы в лизате бактерий, а также различных антибиотиков, синтезируемых используемыми микроорганизмами. В другой работе [117] для защиты растений от ВТМ, а также от насекомых, грибных и бактериальных болезней предлагается использовать микробиологическое удобрение, состоящее из смеси бактерий *B. licheniformis*, *B. mucilaginosus*, *B. subtilis* и *B. thuringiensis*, включающее, в том числе, порошок из стеблей растений, спиртовую дробину, сульфат кальция, хлорид магния и дигидрофосфат калия. Для борьбы с ВОМ, ВТМ и ЮВК предложен многокомпонентный состав [118], содержащий наносеребро, метил- α -нафтил ацетат, фосфат калия, глицериды, цитрат железа, этефон, поверхностно активные вещества, дихлорметан, гуминовые кислоты, α -нафтилуксусную кислоту, экстракт герани и агрономически ценные штаммы бактерий, в том числе, клетки бактерий *B. licheniformis*.

Внеклеточные нуклеазы (РНказы) бактерий как эффективный компонент антивирусных биопрепаратов. Геномы большинства вирусов, поражающих растения, представлены одноцепочечной РНК [119], и можно предположить, что некоторые вырабатываемые бактериями ферменты, разрушающие РНК, будут оказывать негативное влияние на распространение вирусов в растительных тканях. В связи с этим для защиты растений от вирусной инфекции представляет интерес разработка биопрепаратов на основе ризосферных и эндофитных бактерий с высокой РНКазной активностью или же препарата самой РНКазы [98], а также создание генно-модифицированных форм микроорганизмов с внедренным геном нуклеаз [120]. В настоящее время известно более 20 внеклеточных РНКаз, продуцируемых бактериями *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. intermedius*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. circulatis* и *B. thuringiensis*, которые названы в зависимости от вида бактерий барназами, биназами, балифазами или бальназами [121–123]. Оказалось, что бактериальные РНКазы имеют практическое значение для медицины, поскольку они способны оказывать противовирусное, мутагенное и антимутагенное, мембранотропное, цитоксическое и даже противоопухолевое действия [124].

Уже более 45 лет назад было обнаружено, что обработка растений панкреатической РНКазой способствует снижению развития вирусной инфекции [125]. Затем сообщалось о возможности использования бактериальной эндонуклеазы для оздоровления картофеля от вирусов [126]. Показана положительная корреляция между активностью РНКазы в растениях разных сортов картофеля и их вирусостойчивостью [120].

Эндофитные штаммы бактерий также способны синтезировать РНКазы. Так, например, 73% эндофитных изолятов рода *Bacillus*, 27% изолятов *Paenibacillus*, 30% *Enterobacteriaceae*, а также представители *Cronobacter*, *Pantoea*, *Microbacterium* и *Staphylococcus*, выделенные из тканей растений семейства *Cucurbitaceae*, обладали РНКазной активностью [127]. На основании этого применение препаратов бактерий *Bacillus* может быть перспективным для защиты растений от вирусной инфекции.

Относительно недавние исследования также демонстрируют потенциальную эффективность применения бактериальных РНКаз для инактивации РНК-содержащих вирусов в растениях [128]. Так, РНКазы *B. pumilus*, нанесенная на поверхность листьев растений картофеля, подавляла развитие симптомов, вызванных инфицированием УВК и МВК, а также уменьшала пораженность растений гороха вирусом крапчатости клевера (ВКК) [129]. При обработке растений табака раствором 100 мкг/мл РНКазы бактерии *B. pumilus* до 94% растений проявляли невосприимчивость к ХВК [98]. Фермент с молекулярной массой

75.6 кДа, выделенный из культурального фильтрата *B. cereus* ZH14 и идентифицированный как РНКазы, ингибировал репликацию ВТМ в соке растений табака [130]. В работе [131] было обнаружено, что обработка посадок картофеля сорта “Удача” суспензией клеток штаммов бактерий *B. subtilis* 26Д и *B. thuringiensis* ВКПМ-5689, продуцирующих РНКазы, уменьшала степень инфицирования растений МВК с 60% в контроле до 18% на участках, обработанных микроорганизмами. При этом наиболее эффективным было использование комбинированного биопрепарата на основе штаммов *B. subtilis* 26Д, *B. thuringiensis* ВКПМ-5689 и *B. thuringiensis* ВКПМ-6066, уменьшающего титр УВК в растениях картофеля более чем в 2 раза по сравнению с контролем [132]. Обнаружено, что сами бактериальные барназы могут защищать растения не только от вирусной инфекции, но и подавлять развитие других болезней, например, фитофтороза на растениях табака [133].

В Российской патентной базе имеется несколько патентов, в которых описано использование бактерий рода *Bacillus* или продуцируемых ими соединений для ингибирования размножения фитовирусов. Так, согласно патенту РФ № 2542480, бактерии *B. pumilus* и *B. amyloliquefaciens* предлагаются в качестве источников для выделения РНКаз, подавляющих развитие ХВК у табака [98]. Обработка вегетирующих растений или семян ферментным препаратом РНКазы, выделенной из метаболитов *B. pumilus*, увеличивала количество здоровых растений табака, картофеля и томатов при искусственном заражении их ХВК, а растений клевера, гороха, вики, люцерны и фасоли – ВКК.

Известны данные о том, что введение гена бактериальной РНКазы в геном растений подавляет развитие вирусной инфекции [134]. У растений картофеля, экспрессирующих бактериальную нуклеазу *S. marcescens*, наблюдалась высокая устойчивость к вирусам [135]. Растения сои, экспрессирующие ген рибонуклеазы *PAC1* из дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, проявляли устойчивость к широкому спектру вирусных заболеваний [136]. Введение в геном табака генно-инженерной конструкции CRISPR/Cas13a, содержащей ген VI-A рибонуклеазы II типа, способной распознавать и расщеплять одноцепочечные РНК, эффективно уменьшало степень поражения GFP-вирусом турнепса [58]. Недавние исследования демонстрируют способность искусственных РНКаз инактивировать РНК-содержащие вирусы расщеплением их РНК и нарушением формирования КБ [128]. С использованием гена барназы из бактерии *B. amyloliquefaciens* в растения табака была внедрена генная конструкция, позволившая сформировать невосприимчивость к австралийскому штамму ВЖКЛТ у более чем трети регенерантов [137].

Индукция эндофитами компонентов фитоиммунитета к вирусам. В научной литературе встреча-

ется небольшое число публикаций, посвященных индукции СРРМ системной устойчивости растений против фитовирусов. Выделяют три основных типа устойчивости растений к вирусам: полевую устойчивость, локализованную сверхчувствительность и крайнюю устойчивость [17]. Показано, что гены *Nctbr* и *Nytbr* картофеля детерминируют в растениях сверхчувствительные реакции, характеризующиеся некрозом и нарушением системного передвижения вирусных частиц УВК. Интересно, что мутация в вирусном гене *Hc-pro*, ответственном за вирулентность УВК, приводила к восстановлению устойчивости сортов картофеля, содержащих ген *Nu* [138]. Сверхчувствительность у растений с геном *Nx* и устойчивость у растений с геном *Rx* вызываются различными частями одного и того же КБ ХВК. КБ, точно также и РНК вирусов, представляют собой, так называемые, патоген (микроб)—ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП, МАМП, pathogen (microbe)—associated molecular patterns, PAMPs, MAMPs), связывающиеся с рецепторами клеток растений и индуцирующие иммунные реакции [139]. Впоследствии эти реакции проявляются в изменении содержания фитогормонов, активных форм кислорода и других метаболитов, а также в локальной и системной активации транскрипции генов защитных белков [140]. Этот механизм, по-видимому, связан с индукцией хозяйских генов по салицилатному сигнальному пути, что доказывалось негативной ее регуляцией под влиянием вирусного белка Hc-Pro [141]. Вместе с тем, нельзя отрицать отсутствие связи салицилатной защитной системы и механизмов РНК, так как защитный эффект антимицина-А, антибиотика, выделенного из культурального фильтрата *Streptomyces* spp., проявлялся исключительно в накоплении СК и активации с ее участием РНК-зависимой РНК-полимеразы [38].

Ответные реакции на вирусную инфекцию в растениях запускаются вследствие взаимодействия различных ПАМП, в том числе флагелина и липопептидов бактерий или КБ вирусов с белками, содержащими лейцин-богатые повторы (LRR), и обладающими, преимущественно, киназной активностью [140]. В растениях арабидопсиса эти киназоподобные белки участвуют в системной индуцированной устойчивости (СИУ), например, праймированной клетками *B. cereus* AR156, против гнили, вызываемой *P. syringae* pv. *tomato* (Pst) DC3000 [142]. При такой реакции в растениях экспрессируются гены, кодирующие защитные белки, в том числе и классов PR-4 и PR-10 с противовирусной и РНКазной активностями [100].

В работе [143] показано, что флагеллин (Flg) и фактор элонгации (EF-Tu) бактерии штамма *B. amyloliquefaciens* VB7 могут выступать в качестве МАМП. Вторичные метаболиты *B. amyloliquefaciens* VB7 на 84% по сравнению с контрольными

растениями подавляли развитие симптомов ВНТ и вируса некроза почек арахиса (ВНПА). Введение генов, кодирующих синтез этих белков, в бактерию *Agrobacterium tumefaciens* ENA105 и обработка почвы или листьев растений томата суспензией рекомбинантных бактерий сократили число пораженных вирусами растений до 15% по сравнению с контрольными (88.25%).

Сурфактин бактерий *B. subtilis* BMG02 участвует в защите растений томатов от ВТОМ, запуская активную генерацию H₂O₂ и экспрессию генов, кодирующих фенилаланинаммоний-лиазу и PR-2 [144]. В работе [92] показано, что способность *P. fluorescens* CHA0 защищать растения табака от ВТМ связана с системным накоплением в них СК, а также экспрессией защитных белков класса PR-1. Обнаружено также, что и сами бактерии *P. fluorescens* могут, наряду с такими низкомолекулярными липопептидами, как псевдобактин и пиовердин, вовлеченными в систему защиты растений [33], синтезировать СК [145]. Можно предположить, что участие псевдомонад в защите растений от вирусной инфекции происходит благодаря запускаемой СК индукции системной устойчивости, связанной с генерацией АФК. Вместе с тем использование клеток бактерий, мутантных по синтезу СК и псевдобактина, не выявило участия этих соединений в данном процессе [145].

Основываясь на полученных знаниях, предложен комплексный препарат на основе бактерий штаммов *B. mojavensis* 203-7 и *B. mycooides* VmJ для защиты растений банана, тыквы, ореха пекан, герани и пшеницы от ХВК, а также ряда бактериальных и грибных патогенов. Он запускает системную устойчивость, при этом первый индуцирует NPR1-независимый сигнальный путь, а второй — NPR1-зависимый. Этот препарат может быть использован совместно с такими фунгицидами, бактерицидами и стимуляторами роста растений, как Headline®, Manex®, Manzate®, Sonata® и Endura® [146].

Из бактерий *B. thuringiensis* выделен фактор MF2, который в низких концентрациях индуцирует устойчивость растений к ВТМ и ХВК. Этот фактор, представляющий собой низкомолекулярный термостабильный белок с молекулярной массой 7.2 кДа, гомологичный бациллярному белку холодового шока, предполагается использовать в качестве противовирусного агента в культуре тканей растений, а также для защиты растений картофеля от фитофторы и риса от пирикуляриоза [147]. В другой работе [148] летучее соединение 3-пентанол, продуцируемое *B. amyloliquefaciens* IN937a, предлагается использовать для контроля ВОМ, а также бактериальной пятнистости перцев (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*). Препарат индуцировал устойчивость растений к вирусам, активируя гены защитных белков PR-1 и PR-4 при низких концентрациях, равных 10 мкМ и 100 нМ.

В работе [149] показано, что бактерии штамма *B. subtilis* ВЕВ-DN, изолированные из ризосферы томатов, стимулировали рост растений и запускали СИУ против вирусов, переносимых белокрылкой *Bemisia tabaci*. Индукция устойчивости проявлялась по путям, как зависимым, так и независимым от сигнальных путей, контролируемых жасмоновой кислотой (ЖК). При этом жасмонат-зависимый сигнальный путь включал механизмы защиты растений от белокрылки, контролируемые синтез ингибиторов протеаз, а независимый путь – регуляцию усиления экспрессии нескольких генов, участвующих в фотосинтезе, синтезе фенолпропаноидных и терпеноидных соединений, а также белка шаперонина Hsp90.

Бактерии рода *Bacillus*, ассоциированные с растениями, индуцировали развитие системной устойчивости макроорганизма к ВТМ, ингибируя синтез КБ в растительных клетках и усиливая экспрессию генов, кодирующих белки сигнальных (жасмонатного и салицилатного) путей (Coil и NPR1, соответственно), защитных белков (PR-1a и PR-1b) и клеточно-стеночных экспансинов (NtEXP2 и NtEXP6) [88]. Продуцирующий ауксины и 5-аминолевуленовую кислоту штамм бактерии *Rhodopseudomonas palustris* GJ-22 уменьшал степень поражения табака ВТМ в полевых условиях, увеличивая в растениях активность транскрипции защитных генов PR-1, PR-5, PR-3 и ингибитора протеиназы до того же уровня, что и бензотиадиазол [150]. Это в некоторой степени противоречит информации о том, что обработка томата штаммом *B. amyloliquefaciens* МВ1600 индуцировала устойчивость растений к ВБТ и УВК, сопровождающуюся экспрессией зависимых от салициловой кислоты генов [46]. Показано, что в многократном уменьшении степени поражения свеклы ризоманией, вызываемой ВВПЖС, после обработки растений бактерией *B. amyloliquefaciens*, важную роль играет экспрессия генов защитных белков PR-8 и NPR-1 [22]. Обработка растений банана смесью хитина и клеток штамма *P. fluorescens* СНАО способствовала накоплению транскриптов генов белков PR-2 (b-1,3-глюканаза) и PR-3 (хитиназа) и индуцировала устойчивость к ВРВБ [33].

Применение препарата бактерий штамма *B. amyloliquefaciens* 5В6 на растениях перца уменьшал степень их поражения ВОМ в полевых условиях [100]. Этот процесс был связан с индукцией транскрипции генов, кодирующих PR-4, PR-5 и PR-10 белки. Точно также, праймирование под влиянием бактерий *B. pumilus* EN16 и *B. subtilis* SW1 устойчивости растений перца к ВОМ и ВВФ сопровождалось системным накоплением в тканях патоген-индуцируемых белков PR-4 и PR-5 [95].

Обнаружено развитие СИУ в растениях огурца, предварительно обработанных штаммами *Streptomyces* spp., что позволяет использовать эти

микроорганизмы как основу для антивирусных препаратов [151]. Из культурального фильтрата ряда штаммов *Streptomyces* spp. были выделены антивирусные компоненты, уменьшающие на растениях мари гигантской *Chenopodium amaranticolor* развитие инфекции ВОМ на 82.6% по сравнению с контрольными [152].

Об участии проантиоксидантных ферментов и ферментов фенолпропаноидного метаболизма в защите растений от вирусов с участием регулирующих рост растений бактерий и их метаболитов свидетельствовали активация пероксидазы, полифенолоксидазы и фенилаланин-аммиаклиазы и накопление фенольных соединений в растениях банана при обработке их черенков консорциумом ризосферной бактерии *P. fluorescens* Pfl1 и эндофитного штамма *Bacillus* spp. EPB22, способствующих многократному снижению уровня пораженности растений вирусом ВРВБ с эффективностью защиты до 80% [153]. Близкие к этому изменения наблюдали при обработке отдельно или смесью хитина и клеток штамма *P. fluorescens* СНАО растений банана, инфицированных ВРВБ [33], черного маша – ВСЛМ [93] и томата – ВБТ [114]. Растения линии *A. thaliana* Col-0 и мутанта NahG (с уменьшенным содержанием СК), обработанные бактериями *S. marcescens* 90-166 и *B. pumilus* SE34, проявляли менее выраженные симптомы мозаики, чем необработанные растения. Это позволило предположить, что в данном случае системная устойчивость развивается по независимому от СК пути. Важно, что обработка данными штаммами арабидопсиса, несущего генно-инженерную конструкцию, экспрессирующую химерный белок PDF1.2:GUS, активировала транскрипцию ЖК-зависимого гена *PDF1.2* [153]. Следует отметить, что бензотиадиазол, который используется в качестве стандартного защитного препарата во многих исследованиях устойчивости растений к вирусам, в некоторых случаях подавлял рост растений при вирусной инфекции по сравнению с бактериальными культурами, несмотря на ослабление симптомов болезни [150, 154]. Как показано в работе [155], внесение в почву штамма бактерии *Paenibacillus lentimorbus* В-30488 усиливало у растений табака устойчивость к ВОМ при сохранении активности их фотосинтеза и роста. При этом падала активность антиоксидантных ферментов, увеличивалась транскрипционная активность генов, кодирующих патоген-индуцируемые белки и накопление полифенолов, что, впоследствии, препятствовало распространению вируса по тканям растений. Об отсутствии антагонистического эффекта между бактериями *Bacillus* spp. и СК в развитии защитных реакций растений против вирусов свидетельствует уменьшение симптомов ВОМ на растениях перца при совместном использовании штамма *B. pumilus* INR7 и бензотиадиазола [47].

Таким образом, в научной литературе накопилось достаточно сведений об эффективности использования ризосферных и эндофитных бактерий и их метаболитов в защите растений от вирусной инфекции. В совокупности эти сведения позволяют разрабатывать на основе различных видов микроорганизмов целевые препараты для защиты растений от вирусов.

Известные нам источники научно-технической информации свидетельствуют о том, что микроорганизмы, в особенности представители рода *Bacillus*, содержащие как живые клетки и споры, так и лизаты, культуральные жидкости или очищенные ферменты можно использовать в качестве относительно эффективной основы для создания бактериальных противовирусных препаратов. Их применение в зависимости от объекта (растение, животное, культуры клеток животных или человек) позволяет подавлять размножение (распространение) вирусов, содержащих как ДНК, так и РНК, и защищать хозяина от этой инфекции. В качестве основы препаратов для подавления вирусной инфекции у растений могут быть использованы различные штаммы непатогенных бактерий рода *Bacillus*, в том числе следующих видов: *B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mojavensis*, *B. mucilaginosus*, *B. mycoides*, *B. pasteurii*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. vallismortis* и *B. velezensis*. Препараты могут содержать жизнеспособные клетки и/или споры бацилл в виде суспензий или сухой массы, либо убитые клетки. Наряду с живыми или мертвыми клетками бактерий средства защиты растений от вирусов могут включать культуральную жидкость, при этом она может быть отделена от клеток бактерий центрифугированием и/или ультрафильтрацией или иным способом. Культуральная жидкость может быть высушена и применяться отдельно или содержать также живые или мертвые клетки бактерий. Микробиологические препараты, содержащие клетки и/или метаболиты бацилл могут включать клетки или продукты других видов микроорганизмов: *P. fluorescens*, *T. harzianum*, *A. niger*, *Paecilomyces lilacinus*, *Streptomyces* sp. и цианобактерии. Действующие концентрации жизнеспособных клеток и/или спор бактерий для проявления противовирусного эффекта находятся в широких пределах — от 10^3 до 10^{13} /мл(г). Часто в качестве эффективной концентрации указывается предел от 10^6 до 10^9 /мл(г).

Экзометаболиты бактерий способны проявлять и усиливать противовирусный эффект в смеси с другими органическими и неорганическими веществами, в том числе антибиотиками и фунгицидами, а также инсектицидами, нематодицидами и гербицидами. При этом для защиты клеток или метаболитов бактерий в составе сложных смесей используют различные носители: активированный

уголь, тальк, вермикулит, перлит, доломитовую муку, мел, измельченную солому, стебли растений, спиртовую дробину и другие. При комплексном применении таких препаратов одновременно в качестве удобрений могут добавляться сульфат кальция, хлорид магния, дигидрофосфат или фосфат калия.

Действующими агентами противовирусных препаратов являются метаболиты бактерий. В качестве основных веществ, способных подавлять вирусные инфекции, как растений, так и животных, указываются ферменты и белки. К таким ферментам относят РНКазы — барназы, биназы и др. Поиск эндофитов, продуцирующих РНКазы непосредственно в растительных тканях, является перспективным направлением в разработке средств защиты растений от вирусов.

Вызывает также практический интерес возможность индукции устойчивости растений к вирусам низкомолекулярными соединениями, синтезируемыми микроорганизмами, в особенности — эндофитными. С одной стороны считается, что арахидоновая, пентадекановая, гептадекановая, октадекановая и тетрадекановая кислоты, а также 2,5-дикетопиперазин и пиролл способствуют проявлению непосредственной противовирусной активности у бактерий. С другой — вырабатываемые бактериями липопептиды также могут опосредованно через ингибирование развития вирусных переносчиков, вредителей и патогенов, а также совместно с МАМП через индукцию системной устойчивости, формировать защитные барьеры против вирусов.

Таким образом, развитие исследований в этих направлениях будет способствовать разработке экологически безопасных средств защиты растений, сочетающих комплекс свойств, повышающих устойчивость сельскохозяйственных культур к вредным биогенным и абиогенным факторам и их продуктивности. Кроме прямого противовирусного действия, подобного активности РНКаз, в качестве механизма, приводящего к повышению устойчивости растений к вирусным болезням, многие авторы относят индуцированную устойчивость, которая может регулироваться различными сигнальными молекулами, например, СК и ЖК, а также развиваться по различным NRP1-зависимым и/или NRP1-независимым сигнальным путям [156]. Для создания комплексных многофункциональных биопрепаратов тройного действия (инсектицид + фунгицид + вирицид) необходимо знать сигнальные пути растений, которые будут активироваться под влиянием такого препарата при обработке растений, чтобы исключить их интерференцию друг с другом. Основой для устойчивого развития агроэкоценозов может стать моделирование искусственного растительно-бактериального метабиома с использованием штаммов СРРМ, продуцирующих противовирус-

ные соединения и стимулирующих иммунный потенциал растений.

Работа выполнена в рамках совместного международного гранта Российского научного фонда и Департамента науки и техники (DST) правительства Индии (проект № 19-46-02004).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kunh J.H.* // Nature. 2019. V. 566. № 7744. P. 318–320.
2. *Soosaar J.L., Burch-Smith T.M., Dinesh-Kumar S.P.* // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. № 10. P. 789–798.
3. *Макарова С.С., Макаров В.В., Тальянский М.Э., Калинина Н.О.* // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2017. Т. 21. № 1. С. 62–73. <https://doi.org/10.18699/VJ17.224>
4. *Kreuze J.F., Souza-Dias J.A.C., Jeevalatha A., Figueira A.R., Valkonen J.P.T., Jones R.A.C.* // The Potato Crop. Chapter 11 / Eds. H. Campos, O. Cham. Ortiz: Springer, 2020. P. 389–430.
5. *Анисимов Б.В.* // Защита и карантин растений. 2010. № 5. С. 12–18.
6. *Трускинов Э.В.* // Электронное периодическое издание ЮФУ “Живые и биокосные системы”. 2014. № 9. <http://www.jbks.ru/archive/issue-9/article-4>
7. *Клименко Н.С., Антонова О.Ю., Желтова В.В., Фомина Н.А., Костина Л.И., Мамадбокирова Ф.Т., Гавриленко Т.А.* // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. № 5. С. 958–969. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.5.958rus>
8. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов”, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Часть 1. Пестициды. М.: Изд. 2017. 938 с.
9. *Sidwell R.W., Huffman I.H., Khare G.P., Witkowski I.T., Robins R.K.* // Science. 1972. V. 177. № 4050. P. 705–706.
10. *De Fazio G., Caner J., Vicente M.* // Arch. Virol. 1980. V. 63. № 3–4. P. 305–309.
11. *Бобырь А.Д.* Химиопрофилактика и терапия вирусных болезней растений. Киев: “Наукова думка”, 1976. 255 с.
12. <http://www.redoxagro.com/viricide-3639616.html>
13. <https://onzelivre.nl/disease-management.php>
14. *Derbalah A.S.H., Elsharkawy M.M.* // J. Biotechnol. 2019. V. 306. № 12. P. 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.10.003>
15. *Elsharkaway M., Derbalah A.* // Pest Management Sci. V. 75. № 3. P. 835–843. <https://doi.org/10.1002/ps.5185>
16. https://studme.org/77445/agropromyshlennost/rasprostranenie_virusov_rasteniy
17. *Мэтьюс Р.* Вирусы растений / Ред. И.Г. Атабеков. М.: Мир. 1973. 600 с.
18. *Roossinck M.J.* // Virology. 2015. V. 479–480. P. 271–277.
19. *Рогозина Е.В., Мироненко Н.В., Афанасенко О.С., Мацухито Ю.* // Вестник защиты растений. 2016. Т. 4. № 90. С. 24–33.
20. *Holeva R., Phillips M.S., Neilson R., Brown D.J.F., Young V., Boutsika K., Blok V.C.* // Mol. Cel. Probes. 2006. V. 20. № 3–4. P. 203–211.
21. *Andika I.B., Wei S., Cao C., Salaipeth L., Kondo H., Sun L.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. № 46. P. 12267–12272.
22. *Desoignies N., Schramme F., Ongena M., Legrève A.* // Mol. Plant Pathol. 2013. V. 14. № 4. P. 416–421.
23. *Али Х.Х., Келдыш М.А., Помазков Ю.И.* // Агрономия и животноводство. 2010. Т. 3. С. 18–23.
24. *Mascia T., Labarile R., Doohan F., Gallitelli D.* // Sci. Rep. 2019. V. 9. Art. 2657. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39162-w>
25. *Тютеев С.Л.* Научные основы индуцированной болезнестойчивости растений. СПб.: Издательство ВИЗР, 2002. 328 с.
26. *Palukaitis P., Yoon J.-Y., Choi S.-K., Carr J.P.* // Curr. Opin. Virol. 2017. V. 26. P. 141–148.
27. *Rosenberg N., Reichman M., Gera A., Weisback A., Sela I.* // Virology. 1985. V. 140. № 1. P. 173–178.
28. *Vicente M., De Fasio G., Menezec M.E., Golgher R.R.* // Phytopathology Z. 1987. V. 119. № 1. P. 25–31.
29. *Огарков В.И., Каплан И.Б., Тальянский М.Э., Атабеков И.Г.* // Докл. АН СССР. 1984. Т. 276. № 3. С. 743–745.
30. *Pospieszny H., Struszczyk H., Cajza M.* Chitin Enzymology. / Ed. R.A.A. Muzzarelli. Ancona, Italy: Atec Edizioni, 1996. V. 2. P. 385–389.
31. *Чирков С.Н.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38. № 1. С. 5–13.
32. *El Hadrami A., Adam L.R., Daayf F.* // Marine Drugs. 2010. V. 8. № 4. P. 968–987. <https://doi.org/10.3390/md8040968>
33. *Kavino M., Harish S., Kumar N., Saravanakumar D., Samiyappan R.* // Eur. J. Plant Pathology. 2008. V. 120. P. 353–362.
34. *Mishra S., Jagadeesh K. S., Krishnaraj P. U., Prem S.* // Australian J. Crop Science. 2014. V. 8. № 3. P. 347–355.
35. *Firmansyah D., Hidayat S.H.* // Asian J. Plant Pathol. 2017. V. 11. № 3. P. 148–155.
36. *Куликов С.Н., Чирков С.Н., Ильина А.В., Лопатин С.А., Варламов В.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 2. С. 224–228.
37. *Knoblauch M., Van Bel A., J.E.* // Plant Cell. 1998. V. 10. P. 35–50. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.1.35>
38. *Gilliland A., Singh D.P., Hayward J.M., Moore C.A., Murphy A.M., York C.J., Slatore J., Carr J.P.* // Plant Physiol. 2003. V. 132. № 3. P. 1518–1528. <https://doi.org/10.1104/pp.102.017640>
39. *Jia X., Meng Q., Zeng H., Wang W., Yin H.* // Sci. Rep. 2016. V. 6. Art. 26144. <https://doi.org/10.1038/srep26144>
40. *Нагорская В.П., Реунов А.В., Лапушина Л.А., Ермак И.М., Барабанова А.О.* // Известия РАН. Сер. Биол. 2010. № 6. С. 756–761.
41. *Лапушина Л.А., Реунов А.В., Нагорская В.П., Шестаков О.П., Новиков В.Л.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 1. С. 67–71.
42. *Hunter L.J.R., Westwood J.H., Heath G., Macaulay K., Smith A.G., Macfarlane S.A., Palukaitis P., Carr J.P.* // PLoS ONE. 2013. V. 8. Art. e66530. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066530>
43. *Singh K.P., Mohon D., Sinha S., Dalwani R.* // Chemosphere. 2004. V. 55. № 2. P. 227–255. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.10.050>

44. Leibman D., Kravchik M., Wolf D., Haviv S., Weissberg M., Ophir R., Paris H.S., Palukaitis P., Ding Sh.-W., Gaba V., Galon A. // *Mol. Plant Pathol.* 2018. V. 19. № 2. P. 300–312.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12518>
45. Kachroo P., Yoshioka K., Shah J., Dooner H.K., Kleszig D.F. // *Plant Cell.* 2000. V. 12. № 5. P. 677–690.
<https://doi.org/10.1105/tpc.12.5.677>
46. Beris D., Theologidis I., Skandalis N., Vassilakos N. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. Art. 10320.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-28677-3>
47. Whitham S.A. Hajimorad M.R. Current Research Topics in Plant Virology. / Eds. A. Wang, X. Zhou. Springer AG Switzerland. 2016. P. 87–111.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-32919-2>
48. Baebler S., Stare K., Kovac M., Blejcek A., Prezelj N., Stare T., Kogovsek P., Pompe-Novak M., Rosahl S., Ravnikar M., Gruden K. // *PLoS ONE.* 2011. V. 6. № 12. Art. e29009.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029009>
49. Yi H.-S., Yang J.W., Ryu C.-M. // *Frontier of Plant Science.* 2013. V. 4. Art. 122.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00122>
50. Nicaise V. // *Curr. Opin. Virol.* 2017. V. 26. P. 112–119.
51. Verlaan M.G., Hutton S.F., Ibrahim R.M., Kormelink R., Visser R.G.F., Scott J.W., Edwards J.D., Bai Y. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. Art. e1003399.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003399>
52. Prins M., Laimer M., Noris E., Schubert J., Wassenegger M., Tepfer M. // *Mol. Plant Pathology.* 2008. V. 9. № 1. P. 73–83.
53. Chung B.N., Yoon J.Y., Palukaitis P. // *Virus Genes.* 2013. V. 47. № 1. P. 86–92.
54. Cillo F., Palukaitis P. // *Advances in Virus Research.* 2014. V. 90. P. 35–146.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801246-8.00002-0>
55. Zhan X., Zhang F., Zhong Z., Chen R., Wang Y., Chang L., Bock R., Nie B., Zhang J. // *Plant Biotechnol. J.* 2019. V. 17. № 9. P. 1814–1822.
56. Achon M.A., Alonso-Dueñas N. // *Transgenic Research.* 2009. V. 18. № 3. P. 387–397.
<https://doi.org/10.1007/s11248-008-9231-2>
57. Pooggin M.M. // *Curr. Opin. Virol.* 2017. V. 26. P. 28–35.
58. Fuentes A., Carlos N., Ruiz Y., Callard D., Sánchez Y., Ochagavía M.E., Seguin J., Malpica-López N., Hohn T., Lecca M.R. // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2016. V. 29. № 3. P. 197–209.
59. Aman R., Ali Z., Butt H., Mahas A., Aljedaani F., Khan M.Z., Ding S., Mahfouz M. // *Genome Biology.* 2018. V. 19. № 1. Art. 1.
<https://doi.org/10.1186/s13059-017-1381-1>
60. Mamta B., Rajam M.V. // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2017. V. 23. № 3. P. 487–501.
<https://doi.org/10.1007/s12298-017-0443-x>
61. Vogel E., Santos D., Mingels L., Verdonck T.-W., Broeck J.V. // *Frontiers of Physiology.* 2019. V. 9. Art. 1912.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01912>
62. Johnson E.T., Proctor R.H., Dunlap C.A., Busman M. // *Mycotoxin Res.* 2018. V. 34. № 1. P. 29–31.
63. Jaubert-Possamai S., Noureddine Y., Favery B. // *Frontiers of Plant Science.* 2019. V. 10. Art. 1180.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01180>
64. Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Li P., Jain R.G., Taochy Ch., Fletcher S.J., Carroll B.J., Lu G.Q. (Max), Xu Z.P. // *Nature Plants.* 2017. V. 3. Art. 16207.
<https://doi.org/10.1038/nplants.2016.207>
65. Kaldis A., Berbati M., Melita O., Reppa Ch., Holeva M., Otten P., Voloudakis A. // *Mol. Plant Pathol.* 2018. V. 19. № 4. P. 883–895.
66. <http://www.motherjones.com/tom-phillpott/2015/08/coming-farm-field-near-you-gene-silencing-pesticides-RNAi>
67. Whitten M.M.A., Facey P.D., Sol R.D., Fernández-Martínez L.T., Evans M.C., Mitchell J.J., Bodger O.G., Dyson P.J. // *Proc. R. Soc. B.* 2016. V. 283. № 1825. Art. 20160042.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0042>
68. <http://gogreenpestcontrol.ca/rna-insecticide-could-target-specific-pests>
69. Arif M., Azhar U., Arshad M., Zafar Y., Mansoor S., Asad S. // *Transgenic Res.* 2012. V. 21. № 2. P. 303–311.
70. Goodfellow S., Zhang D., Wang M.-B., Zhang R. // *Plants.* 2019. V. 8. Art. 572.
<https://doi.org/10.3390/plants8120572>
71. Bouizgarne B. Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management. /Ed. D.K. Maheshwari, Chapter 2. Heidelberg, New York, Dordrecht, London: Springer, 2013. P. 15–46.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-33639-3_2
72. Кучерявенко О.А., Будзанивская И.Г., Пирог А.В., Дмитрук О.А. // *Вестник Алтайского государственного университета.* 2018. № 4. С. 22–28.
73. Патент КНР. 2019. CN109868250.
74. Han S. // *AGROW World Protection News.* P. 16–18.
https://agrow.agribusinessintelligence.informa.com/-/media/agri/agrow/ag-market-reviews-pdfs/supplements/agrow-biopesticides_2013.pdf
75. Kumar K.K., Sridhar J., Murali-Baskaran R.K., Senthil-Nathan S., Kaushal P., Dara S.K., Arthurs S. // *J. Invertebr. Pathol.* 2019. V. 65. P. 74–81.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.008>
76. Arthurs S., Dara S.K. // *J. Invertebr. Pathology.* 2019. V. 165. P. 13–21.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.008>
77. Sudhakar N., Thajuddin N., Murugesana K. // *Bio-control Science and Technology.* 2011. V. 21. № 3. P. 367–386.
78. Rodríguez M., Marín A., Torres M., Béjar V., Campos M., Sampedro I. // *Frontiers Microbiol.* 2018. V. 9. Art. 3114.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03114>
79. Maksimov I.V., Blagova D.K., Veselova S.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A., Sarvarova E.R., Rumyantsev S.D., Alekseev V. Yu., Khayrullin R.M. // *Biological Control.* 2020. V. 144. Art. 104242.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104242>
80. Zarate S., Kempema L., Walling L.L. // *Plant Physiol.* 2007. V. 143. № 2. P. 866–875.
81. Muvea A.M., Subramanian S., Maniania N.K., Poehling H.-M., Ekesi S., Meyhöfer R. // *Frontiers Plant Sci.* 2018. V. 9. Art. 1785.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01785>
82. Loebenstein G., Lovrekovich L. // *Virology.* 1966. V. 30. № 4. P. 587–591.
[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90162-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90162-0)
83. Shankar A.C. Udaya, Nayaka S. Chandra, Niranjan-Raj S., Kumar H. Bhuvanendra, Reddy M.S., Niranjan-

- na S.R., Prakash H.S.* // Pest Manag. Sci. 2009. V. 65. № 10. P. 1059–1064.
84. *Raupach G.S., Liu L., Murphy J.F., Tuzun S., Kloeper J.W.* // Plant Disease. 1996. V. 80. № 8. P. 891–894.
85. *Murphy J.F.* Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses, Chapter 1. / Eds. G. Loebenstein, J. P. Carr. Netherland: Springer, 2006. P. 1–11.
86. *Bergstrom G.C., Johnson M.C., Kuc J.* // Phytopathology. 1982. V. 72. № 7. P. 922–926.
87. *Vinodkumar S., Nakkeeran S., Renukadevi P., Mohankumar S.* // Agric. Ecosyst. Environ. 2018. V. 267. P. 42–51.
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.08.008>
88. *Wang S., Wu H., Qiao J., Ma L., Liu J., Xia Y., Gao X.* // J. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 19. № 10. P. 1250–1258.
<https://doi.org/10.4014/jmb.0901.008>
89. *Lian L., Xie L., Zheng L., Lin Q.* // Biocontrol Sci. Technol. 2011. V. 21. № 3. P. 281–292.
90. Патент РФ. 2003. № 2206976. БИ 2003. № 18.
91. *Самарина Л.С., Маляровская В.И., Розожина Е.В., Малокова Л.С.* // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 5. С. 917–927.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.5.917rus>
92. *Maurhofer M., Reimann C., Sacherer S.P., Heeb S., Haas D., Defago G.* // Phytopathology. 1998. V. 88. № 7. P. 678–684.
93. *Karthikeyan G., Doraisamy S., Rabindran R.* // Archives Phytopathol. Plant Protect. 2009. V. 42. № 3. P. 201–212.
94. *Damayanti T.A., Katerina T.* // J. ISSAAS. 2008. V. 14. № 1. P. 92–100.
95. *Lee G., Lee S.H., Kim K.M., Ryu C.M.* // Scientific Reports. 2017. V. 10. № 7. Art. 39432.
<https://doi.org/10.1038/srep39432>
96. *Zehnder G.W., Yao C., Murphy J.F., Sikora E.J., Kloeper J.W.* // Biological Control. 2000. V. 45. P. 127–137.
97. *Yang J., Guo C., Zhai X., Shen L., Qian Y., Wang F.* // African J. Microbiol. Res. 2012. V. 6. P. 6300–6307.
98. *Шарипова М.Р., Балабан Н.П., Марданова А.М., Тойменцева А.А.* Патент РФ. 2015. № 2542480 // БИ. 2015. № 5.
99. *Zhai X., Shan J., Song H., Qiao L., Zhang J.* Патент КНР. 2013. CN103289931B.
100. *Lee G.H., Ryu C.M.* // Plant Disease. 2016. V. 100. № 10. P. 2099–2105.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0314-RE>
101. *Itsuki D., Itsuki A.* Патент ЕС 2006. EP1719410A1.
102. *Li Y., Guo Q., Li Y., Sun Y., Xue Q., Lai H.* // Biol. Fertil. Soils. 2019. V. 55. P. 149–169.
<https://doi.org/10.5897/AJMR12.1123>
103. *Ara I., Bukhari N.A., Aref N.M., Shinwari M.M.A., Bakir M.A.* // African J. Biotechnol. 2012. V. 11. № 8. P. 2130–2138.
104. *Choudhary D.K., Johri B.N.* // Microbiol. Res. 2009. V. 68. № 5. P. 1754–1759.
105. *Megahed A.A., El-Dougoud Kh.A., Othman B.A., Lashin S.M., Ibrahim M.A., Sofy A.R.* // Pak. J. Biol. Sci. 2013. V. 16. № 8. P. 385–390.
<https://doi.org/10.3923/pjbs.2013.385.390>
106. *Srinivasan K., Mathivanan N.* // Biological Control. 2009. V. 51. № 3. P. 395–402.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.07.013>
107. *Yang C., Fu Y., Wang L., Cheng Y., Li P.* Патент КНР. 2016. CN105875652A.
108. *Ikegashira Y., Kinooka Y., Noguchi K.* Патент Японии. 2005. JP2005000145.
109. *Elbadry M., Taha R.M., Eldougoud K.A., Gamal-El-din H.* // J. Plant Disease Protect. 2006. V. 113. № 6. P. 247–251.
110. *Sofy A.R., Attia M.S., Sharaf A.M.A., El-Dougoud Kh.A.* // Nature and Science. 2014. V. 12. № 10. P. 67–82.
111. *Al-Ani A.R., Adhab A.M., Matny N.O.* // Int. J. Microbiol. Mycol. 2013. V. 1. № 1. P. 1–6.
112. *Park K.S., Paul D., Ryu K.R., Kim E.Y., Kim Y.K.* // Plant Pathol. J. 2006. V. 22. P. 360–363.
113. *Maurhofer M., Hase C., Meuwly Ph., Mettraux J.-P., Defago G.* // Phytopathology. 1994. V. 84. № 2. P. 139–146.
114. *Kandan A., Ramaiah M., Vasanthi V.J., Radjacomtare R., Nandakumar R., Ramanathan A., Samiyappan R.* // Biocontrol. Sci. Tech. 2005. V. 15. № 2. P. 553–569.
<https://doi.org/10.1007/BF02817669>
115. *Ranasinghe C., De Costa D.M., Basnayake B.M.V.S., Gunasekera D.M., Priyadharshani S., Navagamuwa N.V.R.* // Trop. Agric. Res. 2018. V. 29. № 4. P. 271–283.
116. *Jiang Ch., Hu Y.* Патент КНР. 2017. CN106359473.
117. *Lu Sh.M.* Патент КНР. 2015. CN105036986.
118. *Wang M., Zhang Q.* Патент КНР. 2017. CN106818901A.
119. *Жирнов И.В., Трифонова Е.А., Кочетов А.В.* // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 3. С. 558–567.
120. *Трифорова Е.А., Ибрагимова С.М., Волкова О.А., Шумный В.К., Кочетов А.В.* // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2018. Т. 22. № 8. С. 987–991.
<https://doi.org/10.18699/VJ18.441>
121. *Ulyanova V., Mahmud R.Sh., Dudkina E., Vershinina V., Domann E., Ilinskaya O.* // J. Gen. Applied Microbiology. 2016. V. 62. № 4. P. 181–188.
122. *Ilinskaya O., Ulyanova V., Lisevich I., Dudkina E., Zakharchenko N., Kusova A., Faizullin D., Zuev Y.* // BioMed Research International. V. 2018. Art. 4837623.
<https://doi.org/10.1155/2018/4837623>
123. *Bechhofer D.H., Deutscher M.P.* // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2019. V. 54. № 3. P. 242–300.
<https://doi.org/10.1080/10409238.2019.1651816>
124. *Rakesh K., Singh K.S.* Biotechnological Production of Bioactive Compounds. / Eds. L. Verna, Anuj K. Chandel. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2020. P. 963–989.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64323-0.00012-6>
125. *Мартынова П.В.* Биологические исследования на Дальнем Востоке. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1975. С. 149–152.
126. *Леонова Н.С., Салганик П.И.* // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 1991. № 5. С. 25–28.
127. *Khalaf E.M., Raizada M.N.* // Frontiers Microbiol. 2018. V. 9. Art. 42.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00042>
128. *Fedorova A.A., Azzami K., Ryabchikova E.I., Spitsyna Y.E., Silnikov V.N., Ritter W., Gross H.J., Tautz J., Vlassov V.V., Beier H., Zenkova M.A.* // Antiviral Research. 2011. V. 91. № 3. P. 267–277.
129. *Sharipova M., Rockstroh A., Balaban N., Mardanova A., Toymentseva A., Tikhonova A., Vologin S., Sta-*

- shevsky Z. // *Agricultural Sci.* 2015. V. 6. P. 1357–1366. <https://doi.org/10.4236/as.2015.611130>
130. Zhou W.W., Niu T.G. // *Biotechnol. Letters.* 2009. V. 31. № 1. P. 101–105.
131. Бурханова Г.Ф., Сорокань А.В., Черепанова Е.А., Сарварова Е.Р., Хайруллин Р.М., Максимов И.В. // *Вавиловский журн. генетики и селекции.* 2019. Т. 23. № 7. С. 873–878. <https://doi.org/10.18699/VJ19.561>
132. Хайруллин Р.М., Бурханова Г.Ф., Сорокань А.В., Сарварова Е.Р., Веселова С.В., Черепанова Е.А., Вологин С.Г., Замалиева Ф.Ф., Максимов И.В. // *Теоретическая и прикладная экология.* 2019. № 4. С. 115–120. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2019-4-130-135>
133. Natsoulis G., Boeke J.D. // *Nature.* 1991. V. 352. № 6336. P. 632–635. <https://doi.org/10.1038/352632a0>
134. Cao X., Lu Y., Di D., Zhang Z., Liu H., Tian L., Zhang A., Zhang Y., Shi L., Guo B., Xu J., Duan X., Wang X., Han C., Miao H., Yu J., Li D. // *PLOS ONE.* 2013. V. 8. № 4. Art. e60829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060829>
135. Жирнов И.В., Трифонова Е.А., Романова А.В., Шумный В.К. // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 11. С. 1256–1261.
136. Yang X., Niu L., Zhang W., He H., Yang J., Xing G., Guo D., Zhao Q., Zhong X., Li H., Li Q., Dong Y. // *Transgenic Research.* 2019. V. 28. № 1. P. 129–140. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0108-8>
137. Pakniat-Jahromy A., Behjatnia S.A., Dry I.B., Izadpanah K., Rezaian M.A. // *J. Virol. Methods.* 2010. V. 170. № 1–2. P. 57–66.
138. Tian Y.P., Valkonen J.P. // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2013. V. 26. № 3. P. 297–305.
139. Zvereva A.S., Golyaev V., Turco S., Gubaeva E.G., Rajeswaran R., Schepetilnikov M.V., Srour O., Ryabova L.A., Boller T., Poogin M.M. // *New Phytology.* 2016. V. 211. № 3. P. 1020–1034.
140. Macho A.P., Lozano-Duran R. // *Mol. Plant Pathol.* 2019. V. 20. № 9. P. 1191–1195.
141. Poque S., Wu H.W., Huang C.H., Cheng H.W., Hu W.C., Yang J.Y., Wang D., Yeh S.D. // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2018. V. 31. № 1. P. 86–100.
142. Wang N., Wang L., Zhu K., Hou S., Chen L., Mi D., Gui Y., Qi Y., Jiang C., Guo J.H. // *Frontiers Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 98. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00098>
143. Vanthana M., Nakkeeran S., Malathi V.G., Renukadevi P., Vinodkumar S. // *Microbial Pathogenesis.* 2019. V. 137. Art. 103757. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103757>
144. Hussein W., Awad H., Fahim S. // *American J. Microbiological Research.* 2016. V. 4. № 5. P. 153–158. <https://doi.org/10.12691/ajmr-4-5-5>
145. Djavaheri M., Mercado-Blanco J., Versluis C., Meyer J.M., Loon L.C., Bakker P.A. // *Microbiology Open.* 2012. V. 1. № 3. P. 311–325. <https://doi.org/10.1002/mbo3.32>
146. Jacobsen B., Zidack N.K., Larson R. Патент США. 2011. US2010092442A1.
147. Djavakhia V., Batchikova N., Korpela T., Khomutov R., Nikolaev O. Патент США. 2003. US6528480B1.
148. Ryu Ch.-M., Chun-Soo, Choi H.-K. Патент Респ. Корея. 2012. WO2012086881A.
149. Valenzuela-Soto J.H., Estrada-Hernández M.G., Ibarra-Laclette E., Délano-Frier J.P. // *Planta.* 2010. V. 231. № 2. P. 397–410.
150. Su P., Tan X., Li Ch., Zhang D., Cheng J., Zhang S., Zhou X., Yan Q., Peng J., Zhang Z., Liu Y., Lu X. // *Microbial Biotechnol.* 2017. V. 10. № 3. P. 612–624.
151. Galal A.M. // *Plant Pathol. J.* 2006. V. 5. № 3. P. 343–349.
152. El-DougDoug Kh.A., Ghaly M.F., Taha M.A. // *Int. J. Virol.* 2012. V. 8. № 2. P. 151–164.
153. Harish S., Kavino M., Kumar N., Saravanakumar D., Soorianathasundaram K., Samiyappan R. // *Appl. Soil Ecology.* 2008. V. 39. № 2. P. 187–200.
154. Ryu C.M., Murphy J.F., Mysore K.S., Kloepper J.W. // *Plant J.* 2004. V. 39. № 3. P. 381–392.
155. Kumar S., Chauhan P.S., Agrawal L., Raj R., Srivastava A., Gupta S., Mishra S.K., Yadav S., Singh P.C., Raj S.K., Nautiyal C.S. // *PLoS ONE.* 2016. V. 11. № 3. Art. e0149980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149980>
156. Jacobsen B., Bradley C., Zidack N.K., Larson R. Патент США. 2012. US 2012/0003197A1.

Biological Methods of Plant Protection Against Viruses: Problems and Prospects

I. V. Maksimov^{a,*}, A. V. Sorokan^a, M. Yu. Shein^a, and R. M. Khairullin^a

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

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

Viral diseases cause significant crop losses and a decline in the quality of agricultural products. Currently, there are no direct methods to protect plants from viruses circulating in agroecosystems by any antiviral agents. Control measures focus on the selection of resistant to viral diseases varieties, improvement of varieties by cultivation of apical meristems, and controlling the number of insect vectors. The review paper describes modern approaches to plant protection against viruses by editing the genome, regulating the expression of the host plant and/or virus genes by RNA interference, forming an artificial consortium of plants with rhizospheric and/or endophytic microorganisms that combine protective activity and immunomodulating potential.

Keywords: plant viruses, plant-growth promoting microorganisms, antiviral activity, RNase, systemic acquired resistance, biocontrol

УДК 573.6/577.151/579.66/663.15

ВОЗМОЖНОСТИ ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЫ ГРИБА *Penicillium verruculosum* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЭФФЕКТИВНУЮ ДЕСТРУКЦИЮ ВОЗОБНОВЛЯЕМОЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ БИОМАССЫ (ОБЗОР)

© 2020 г. А. П. Сеницын^{1,2}, О. А. Сеницына², И. Н. Зоров^{1,2}, А. М. Рожкова^{1,2}, *

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

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

*e-mail: amrojko@yahoо.com

Поступила в редакцию 24.04.2020 г.

После доработки 11.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

В обзоре систематизированы данные по использованию реципиентного штамма *Penicillium verruculosum* В1-537 (ΔniaD) для получения продуцентов, ферментов, вспомогательных по отношению к базовому целлюлазному комплексу, увеличивающих его эффективность – β-глюкозидазы, полисахаридмонооксигеназы, а также ксиланаз. Особенностью штамма *P. verruculosum* является секреция базового комплекса целлюлаз, состоящего из целлобиогидролаз и эндоглюканаз, которые по своей гидролитической способности превосходят наиболее широко используемые в лабораторной и промышленной практике штаммы *Hypocrea* (*Trichoderma*). Использование возможностей экспрессионной системы *P. verruculosum* В1-537 (ΔniaD) позволяет вводить в состав базового комплекса целлюлаз новые ферменты, необходимые для увеличения его общей гидролитической активности, и создавать ферментные препараты адаптированные для конверсии различных видов возобновляемой растительной биомассы (ВРБ). Использование экспрессионной системы на основе гриба *P. verruculosum* позволило увеличить способность базового целлюлазного комплекса к конверсии различных видов ВРБ.

Ключевые слова: экспрессионная система, целлюлазы, гемицеллюлазы, возобновляемая растительная биомасса, *Penicillium verruculosum*

DOI: 10.31857/S0555109920060161

Возобновляемая растительная биомасса (ВРБ), основными компонентами которой являются целлюлоза, гемицеллюлозы и лигнин, составляет основную часть органического материала на Земле и является практически неисчерпаемым источником сырья и энергии [1]. Разработка эффективных способов ее использования является одной из наиболее приоритетных задач современной промышленной биотехнологии. Применяемые в настоящее время подходы для переработки ВРБ включают стадии ее предварительной обработки, ферментативного гидролиза полисахаридов до простых сахаров и их трансформацию в коммерчески востребованные продукты – органические спирты и кислоты, алканы, алкены, фураны, диолы и многие другие органические соединения, которые далее используются в химической промышленности, производстве биотоплива и биопроизводителей [2–5].

Сдерживающей промышленное освоение процессов конверсии ВРБ является стадия фермен-

тативного получения сахаров, для реализации которой необходимо иметь в наличии соответствующие дешевые и активные ферменты [6].

Различные ВРБ, например, разные виды многолетних и однолетних растений, значительно отличаются друг от друга по компонентному составу и структуре [7]. Для достижения максимальной эффективности ферментативной конверсии конкретного вида ВРБ требуются ферментные препараты (ФП), обладающие оптимальным составом ферментов, необходимых для гидролиза именно для этого вида ВРБ. Тем не менее, производители промышленных ферментов часто предлагают ФП общего назначения, не адаптированные к максимально эффективному гидролизу различных видов ВРБ [8].

Микроскопические мицелиальные грибы являются основным источником коммерческих ФП целлюлаз и гемицеллюлаз, производимых в промышленном масштабе во многих странах мира, в

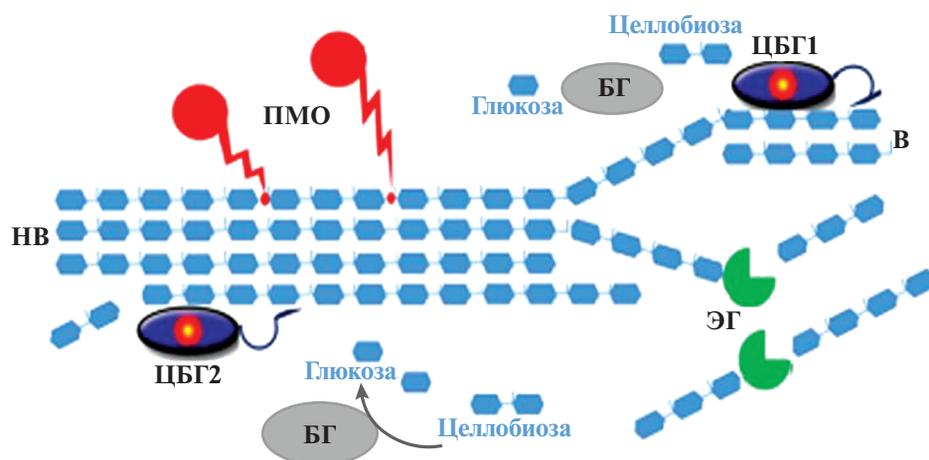


Рис. 1. Механизм ферментативной деструкции целлюлозы. БГ – β -глюкозидаза, ПМО – полисахаридмонооксигеназа, ЦБГ1 и ЦБГ2 – целлобиогидролазы 1 и 2 соответственно, ЭГ – эндоглюканаза, В – восстанавливающий и НВ – невосстанавливающий концы целлюлозных молекул.

том числе и в России, которые могут быть использованы для биоконверсии ВРБ. Долгое время считалось, что низшие грибы, относящиеся к роду *Hypocrea* (синоним *Trichoderma*), являются лидерами по секреции наиболее активных целлюлаз и гемицеллюлаз [9–11], поэтому коммерческие ФП целлюлаз на основе мутантных штаммов *T. reesei* (*H. jecorina*) наиболее распространены на рынке ферментов, а большинство исследований и разработок по биоконверсии ВРБ основаны на использовании целлюлаз *H. jecorina*. Однако такие ФП имеют ряд недостатков, наиболее существенным из которых является относительно низкая активность по отношению к ВРБ [8, 12, 13].

В последнее время стало очевидно, что существует альтернатива ФП *H. jecorina*. Целлюлазы, продуцируемые грибами рода *Penicillium* (синоним *Talaromyces*), как правило, превосходят ферменты *H. jecorina* по скорости гидролиза и выходу глюкозы из различных ВРБ при одинаковой концентрации белка или активности целлюлазы, что неоднократно было показано различными исследователями начиная с середины 1990 г. [14, 15]. Секвенирование и аннотация геномов *P. decumbens*, *P. funiculosum* и *P. verruculosum* показало, что эти виды грибов отличаются более богатым набором ферментов, катализирующих расщепление компонентов ВРБ, по сравнению с *H. jecorina*. Еще одной причиной высокой эффективности целлюлазных комплексов грибов *Penicillium* является высокая удельная активность их ключевых компонентов, в первую очередь целлобиогидролаз 1 и 2 (ЦБГ1 и ЦБГ2), по сравнению с соответствующими ферментами *H. jecorina* [15].

Из дикого целлюлозолитического штамма *P. verruculosum* WA30 методом ступенчатого мутагенеза и последующей селекции был получен вы-

сокопродуктивный штамм *P. verruculosum* B221-151 [16], из которого в дальнейшем также путем мутагенеза был получен реципиентный штамм *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$), сохранивший высокую секреторную способность до 50–60 г/л внеклеточного белка. Этот штамм является ауксотрофом с дефектом в гене *niaD*, кодирующем нитратредуктазу, которая принимает участие в ассимиляции нитратного азота. Штамм *P. verruculosum* 537 ($\Delta niaD$) отличался редуцированным катаболизмом глюкозы за счет случайной мутации в репрессоре *SteA*, что позволяло культивировать его на среде с глюкозой, а также в режиме с подпиткой глюкозой. Биосинтез ферментов штамма индуцировался целлюлозой и целлоолигосахаридами.

Реципиентный штамм *P. verruculosum* B1-537 ($\Delta niaD$) сохранял способность продуцировать комплекс внеклеточных целлюлаз, активность которых превосходила активность комплекса штаммов *Hypocrea* [17]. Целлюлазный комплекс *P. verruculosum* может быть с успехом использован для биоконверсии ВРБ и превращение ее в глюкозу [15, 18], а использование возможностей экспрессионной системы *P. verruculosum* позволяло изменять содержание и состав тех или иных ферментов комплекса (вводить в его состав новые ферменты), чтобы регулировать состав ферментного комплекса для максимально эффективной конверсии различных видов ВРБ.

Реципиентный штамм *P. verruculosum*, таким образом, был использован для создания новых штаммов и получения ФП для эффективной конверсии различных видов ВРБ. Схема действия целлюлазного комплекса приведена на рис. 1.

Строение целлюлозы обуславливает ее высокую химическую стабильность и устойчивость к ферментативному гидролизу. Для эффективного

гидролиза целлюлозы требуется совместное действие ферментов эндодеполимераз, эндоглюканаз (ЭГ), которые расщепляют целлюлозные цепи преимущественно на аморфных участках фибрилл целлюлозы. При этом образуются восстанавливающие (В) и невосстанавливающие (НВ) свободные концы, представляющие собой субстрат для действия экзо-деполимераз, целлобиогидролаз (ЦБГ1, ЦБГ2), которые последовательно отщепляют остатки целлобиозы от концов полимерной цепи (гидролиз осуществляется по процессивному механизму). ЦБГ могут атаковать как кристаллические, так и аморфные зоны субстрата.

К вспомогательным (синергетическим) ферментам, увеличивающим эффективность действия ферментов базового комплекса на ВРБ, относятся β -глюкозидазы (целлобиазы), литические полисахаридмонооксигеназы (ПМО), а также гемицеллюлазы (преимущественно ксиланазы) [15]. Содержание вспомогательных ферментов в составе базового комплекса *P. verruculosum* ограничено, то есть лимитировано физиологией гриба [19], поэтому для увеличения гидролитической способности целлюлозного комплекса представлялось целесообразным увеличить уровень секреции вспомогательных ферментов.

β -Глюкозидаза (БГ) осуществляет конверсию целлобиозы и целлоолигосахаридов в глюкозу, что является важным шагом не только для получения глюкозы как конечного продукта ферментативной деструкции целлюлозы, но и для увеличения эффективности процесса ферментативной конверсии целлюлозы ЦБГ и ЭГ, поскольку целлобиоза и целлоолигосахариды ингибируют эти ферменты, в особенности ЦБГ. Глюкоза ингибирует эти ферменты в значительно меньшей степени [15].

ПМО не обладают гидролитической активностью, но играют важную роль в деструкции целлюлозы, окисляя целлюлозную цепь в произвольном месте на поверхности кристалла, что приводит к образованию свободных концевых групп для действия ЦБГ. Кроме того, заряженные группы на образующихся концах способствуют аморфизации целлюлозы и повышают ее доступность для ферментов [15].

Гемицеллюлазы (ксиланазы, КСИЛ) осуществляют деструкцию, входящих в состав ВРБ гемицеллюлаз (ксиланов), что приводит к увеличению степени конверсии сырья и увеличению доступа целлюлолитических ферментов к поверхности субстрата.

β -Глюкозидаза (КФ 3.2.1.21, БГ). Для получения высокоактивного штамма *P. verruculosum* F10 — продуцента β -глюкозидазы А (БГА) *A. niger* (GH3, 116 кДа, рI 4.55) использовали рецепиентный штамм *P. verruculosum* B1-537 (Δ niaD). Генетиче-

ская конструкция для обеспечения экспрессии гена *bgI1* содержала целевую кодирующую последовательность, связанную с промотором и терминатором “сильного” индуцибельного промотора гена ЦБГ1 (*cbh1*) — мажорного фермента, продуцируемого *P. verruculosum* (в качестве сигнальной последовательности использовали сигнальный пептид БГА) [20].

Создание штамма *P. verruculosum* F10 позволило при культивировании в лабораторных ферментерах достигнуть более 1300 ед./мл β -глюкозидазной активности в культуральной жидкости (КЖ), определенной по скорости гидролиза *n*-нитрофенил- β -D-глюкозида (пНФГ) в качестве субстрата, и 1700 ед./мл активности целлобиазы (определенной по скорости гидролиза целлобиозы). Это примерно в 25–30 раз выше, чем соответствующие активности в КЖ рецепиентного штамма. Сухой ФП F10, полученный лиофильным высушиванием КЖ штамма *P. verruculosum* F10, содержал ~80% гетерологичной БГА (табл. 1) и 35 300 и 46 700 ед./г БГА и целлобиазной активности соответственно [8]. Препарат содержал также около 3% гомологичной БГ от общего количества секретируемого белка и около 1100 ед./г активности БГ (~600 ед./г активности целлобиазы). В отличие от БГ, продуцируемых штаммами родов *Penicillium*, *Hypocrea* и *Chrysosporium*, БГА являлась “истинной” целлобиазой, то есть ее активность по целлобиозе превышала активность по пНФГ, и уменьшалась в ряду целлобиоза > целлоолигосахариды с увеличивающейся степенью полимеризации последних [21].

Было проведено исследование влияния ФП F10 на результаты конверсии целлюлозосодержащего сырья — отходов резки пергамента под действием ФП B1-537, полученным из рецепиентного штамма *P. verruculosum* B1-537 (Δ niaD) [22]. Для сравнения использовали коммерческий ФП BioACE, полученный на основе штамма-продуцента *H. jecorina*, основными компонентами которого, как и ФП B1-537 были ЦБГ и ЭГ. ФП BioACE, также как и ФП B1-537, имел низкую активность БГ. В табл. 2 приведены значения удельных активностей использованных ФП по отношению к различным субстратам. Активность по фильтровальной бумаге (АФБ) и микрокристаллической целлюлозе (МКЦ) отражают уровень целлобиогидролазной активности, активность по КМЦ — уровень эндоглюканазной активности, по пНФГ и целлобиозе — БГ и целлобиазную активности, соответственно. ФП B1-537 и BioACE имели сопоставимые по величине значения удельных активностей по АФБ, МКЦ, КМЦ, пНФГ и целлобиозе. ФП F10 характеризовался более низким уровнем активности по отношению к полисахаридным субстратам, однако существенно превосходил по значениям удельной активности по пНФГ и целлобиозе.

Таблица 1. Состав лабораторных ферментных препаратов, содержащих основные и вспомогательные гидролитические ферменты (состав ферментных препаратов определяли с помощью высокоэффективной анионообменной и гидрофобной хроматографии)

Ферментный препарат, штамм	Ферменты, % от общего содержания белка					
	КСИЛА	КСИЛЗ	БГ	ЦБГ	ЭГ	Др.
<i>P. verruculosum</i> F10	—	—	80	18	1	—
<i>P. verruculosum</i> CV12	—	—	24*	43	8	24
<i>P. verruculosum</i> Hist-БГА	—	—	14**	61	9	14
<i>P. verruculosum</i> КСИЛА	—	18***	3	47	10	22
<i>P. verruculosum</i> КСИЛЗ	17***	—	2	39	15	27
<i>P. verruculosum</i> В1-537	—	—	3****	60	12	25

* Содержание гомологичной БГ – 3%; ** содержание гомологичной БГ – 1%; *** содержание гомологичной ксиланазы – 3%; **** содержание гомологичной БГ.

Таблица 2. Удельная активность ФП (ед./мг белка), использованным для гидролиза ВРБ, по отношению к различным субстратам

Ферментный препарат	АФБ	МКЦ	КМЦ	пНФГ	Целлобиоза
F10	0.19	0.1	5.9	45.5	60.2
В1-537	0.92	0.7	18.3	1.7	0.73
БиоАСЕ (“Dyadic International Co.”, США)	0.83	0.6	17.4	0.1	0.1
Accelerase 1000 (“DuPont/Danisco”, США)	1.7	1.2	12.3	3.6	2.7
Accelerase 1000 (“DuPont/Danisco”, США)	1.2	0.8	10.5	3.8	2.3
Accelerase DUET (“DuPont/Danisco”, США)	1.1	0.8	7.9	3.1	2.2
Cellic CTec-1 (“Novozymes”, Дания)	0.7	0.3	10.9	2.8	2.4
Cellic CTec-2 (“Novozymes”, Дания)	1.7	1.2	12.3	3.6	2.7

В экспериментах по ферментативному гидролизу отходов пергаменты использовали смесь ФП В1-537 + ФП F10 и БиоАСЕ + ФП F10. Кроме того, для гидролиза использовали также отдельные ФП целлюлазы без добавления ФП F10. На 1 г сухого субстрата вносили 10 или 15 ед. целлюлазной активности (в расчете по АФБ), и 40 ед. ФП F10 (при расчете по пНФГ) при концентрации субстрата в реакционной смеси – 50 г/л.

Результаты ферментативного гидролиза отходов пергаменты представлены на рис. 2. Оба препарата целлюлаз (без добавления ФП F10) обеспечивали значительную глубину гидролиза субстрата. Наибольший выход глюкозы наблюдали при действии ФП В1-537 при двух концентрациях препарата. Добавление в реакционную смесь ФП F10 приводило к заметному увеличению выхода глюкозы как при гидролизе ФП В1-537, так и БиоАСЕ: за 24 ч – на 20–56%, за 48 ч – на 31–43%, за 72 ч – на 6–15%. Максимальный выход глюкозы в результате ферментативного гидролиза отходов пергаменты под действием ФП В1-537 в течение 72 ч составил 38 г/л (15 ед. по ФБ) в присутствии БГ,

что соответствовало практически 70%-ной глубине конверсии субстрата.

Присутствие в реакционной смеси избытка БГА позволило снизить дозировку целлюлазных ФП В1-537 и БиоАСЕ на 33%: выход глюкозы при гидролизе пергаменты ФП в дозе 10 ед. АФБ на 1 г субстрата в присутствии избытка БГА превышал выход глюкозы при внесении ФП 15 ед. АФБ на 1 г субстрата в отсутствие БГА.

Было проведено сравнение эффективности использования смеси ФП В1-537 + ФП F10 при гидролизе различных видов ВРБ с эффективностью целлюлазных ФП, специально созданных для биоконверсии ВРБ (обогащенных БГ), таких как Accelerase 1000, Accelerase 1500, Accelerase DUET (http://genencor.com/fileadmin/user_upload/genencor/documents/GEN-00110_DuetBrochure10-low.pdf), и Cellic CTec-1, Cellic CTec-2 (<https://www.novozymes.com/en/advance-your-business/bioenergy/cellic>) [8]. Коммерческие ФП имели, в целом, сопоставимые с ФП В1-537 удельные активности по ФБ, МКЦ и КМЦ, но превосходили ФП В1-537 по активности в отношении пНФГ и целлобиозы,

при этом ФП F10 значительно превосходил коммерческие ФП по активности по пНФГ и целлюлозе (табл. 2).

Ферментативный гидролиз ВРБ проводили как коммерческим ФП, так и ФП В1-537 в реакционной смеси при концентрации 10 мг белка/г сухого вещества субстрата; ФП F10 добавляли из расчета 40 ед./г сухого вещества субстрата (концентрация субстрата в реакционной смеси – 100 г/л).

В качестве ВРБ использовали предобработанные с помощью парового взрыва стебли кукурузы, багассу (стебли сахарного тростника), а также измельченную на планетарной шаровой мельнице древесину сосны и осины. Первые два вида ВРБ традиционно получают в промышленных масштабах в Бразилии, США, а также в Юго-Восточной Азии для производства биотоплива 2 поколения (биоэтанола из целлюлозы). Древесина хвойных и лиственных пород является основным крупнотоннажным отходом лесосечного производства, а также деревообрабатывающих производств различного профиля, характерных для России, Европы и Канады.

Выход восстанавливающих сахаров (ВС) после 48 ч гидролиза приведен в табл. 3. Смесь препаратов В1-537 + F10 наиболее эффективно гидролизовала измельченную древесину сосны и осины, по сравнению с использованными коммерческими ФП. При гидролизе предобработанных кукурузных стеблей и багассы смесью препаратов В1-537 + F10 эффективность процесса уступала эффективности Cellic СТес-2, но была выше эффективности действия остальных коммерческих ФП.

В табл. 3 приведены также результаты гидролиза микрокристаллической целлюлозы (МКЦ), которая в отличие от других использованных субстратов практически не содержит лигнина и гемицеллюлоз. Глубина гидролиза МКЦ всеми исследуемыми ФП оказалась выше степени гидролиза природных ВРБ. При этом максимальный выход ВС был получен при использовании ФП

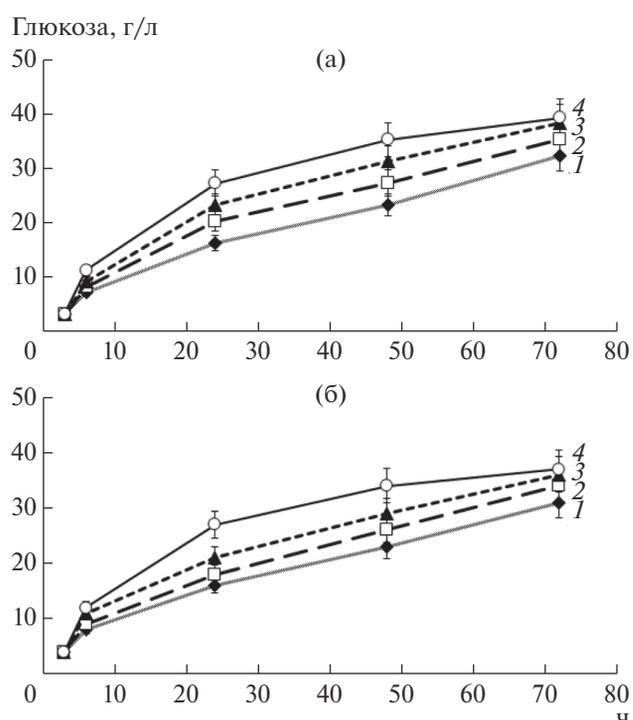


Рис. 2. Выход глюкозы при гидролизе отходов пергамента ФП *P. verrucosum* В1-537 (а) и *T. reesei* BioACE (б) в отсутствие (1, 2) и в присутствии (3, 4) избытка БГ *P. verrucosum* F10. (Дозировка целлюлазных препаратов: 1 и 3 – 10, 2 и 4 – 15 ед. АФБ/г сухого субстрата, ФП F10 – 40 ед. (по пНФГ)/г сухого субстрата. Условия гидролиза: [S] = 50 г/л (сухой вес), 50°C, pH 5, перемешивание – 250 об./мин. Глюкозу определяли глюкозооксидазным методом.)

Cellic СТес-2 и смеси препаратов В1-537 + F10, показавших также и наибольшую эффективность при гидролизе различных видов ВРБ.

Таким образом, создание высокопродуктивного рекомбинантного штамма *P. verrucosum* F10 – продуцента БГА было важным шагом на пути получения высокоэффективного ФП, предна-

Таблица 3. Выход ВС при гидролизе различных видов растительного сырья*

Ферментный препарат	Выход ВС**, мг/мл за 48 ч				МКЦ
	сырье, предобработанное паровым взрывом		сырье, предобработанное измельчением на планетарной шаровой мельнице		
	кукурузные стебли	багасса	сосна	осина	
Accelerase 1000	39	40	31	41	77
Accelerase 1500	39	35	29	41	77
Accelerase DUET	37	43	30	50	76
Cellic СТес-1	26	32	23	23	61
Cellic СТес-2	54	51	32	48	84
В1-537 + F10	52	49	32	52	75

* Дозировка ферментных препаратов 10 мг белка на 1 г сухого вещества субстрата, для смеси препаратов В1-537 + F10 дозировка F10 – 40 ед. (по пНФГ)/г сухого субстрата. (Условия гидролиза: [S] = 100 г/л, 50°C, pH 5, перемешивание – 250 об./мин). ** Концентрацию ВС определяли методом Нельсона–Шомоди.

значенного для биоконверсии различных видов ВРБ и получения из них сахаров.

Возможности экспрессионной системы *P. verruculosum* можно продемонстрировать на примере получения других продуцентов БГА *A. niger*. При использовании *cbh1* промотора помимо штамма F10, препарат из которого содержал 80% БГ от общего пула секретируемых белков, был получен также рекомбинантный штамм *P. verruculosum* CV12, который характеризовался меньшим уровнем экспрессии БГА. ФП, полученный из КЖ этого штамма, содержал 24% БГА. При этом в отличие от штамма F10, был полностью сохранен целлюлазный комплекс *P. verruculosum* (табл. 1).

С использованием конститутивного гистонового промотора *hist4*, существенно более “слабого”, чем промотор *cbh1*, был создан еще один рекомбинантный штамм *P. verruculosum* Hist4-БГА – продуцент БГА *A. niger*. Полученный из его КЖ препарат содержал 13% гетерологичной БГ и тоже характеризовался сохранением базового целлюлазного комплекса (табл. 1) [23].

Было проведено сравнение эффективности гидролиза измельченной на планетарной шаровой мельнице осинового древесины различными препаратами – смесью ФП В1-537 + F10, а также ФП CV12 и Hist4-БГ. Полученные результаты по образованию ВС и степени гидролиза субстрата различными ФП были близки и существенно превосходили полученные при воздействии одного ФП В1-537 [24].

Приведенные выше результаты показали существенную роль БГ для увеличения эффективности гидролиза целлюлазного комплекса *P. verruculosum*. Увеличение синтеза БГ может быть достигнуто с помощью различных подходов, в том числе, основанных на использовании разных промоторов для экспрессионной системы *P. verruculosum*.

Полисахаридмонооксигеназы (ПМО). Еще одним вспомогательным ферментом для целлюлазного комплекса является ПМО. Ферменты осуществляющие окислительную деструкцию целлюлозы и других природных полисахаридов были открыты в 2010–2011 гг. [15]. Следует отметить, что, как белки, ПМО были известны и ранее, но их ошибочно относили к 61 семейству гликозил-гидролаз. После установления принадлежности данных ферментов к классу оксидоредуктаз их классифицировали как семейство AA9 вспомогательных активностей (Family 9 of Auxiliary Activities; <http://www.cazy.org/AA9.html>).

Характерным свойством всех ПМО является их зависимость от ионов двухвалентных металлов. Как правило, это ион Cu^{2+} , который прочно связан в активном центре фермента за счет координации с двумя остатками гистидина. Реакции, катализируемые ПМО, также требуют наличия

молекулы кислорода и донора электронов в реакционной смеси. В качестве последнего часто используют галлиевую или аскорбиновую кислоты, а также другие химические соединения, которые являются восстановителями [15]. В природных условиях донором электрона может являться фермент целлобиозодегидрогеназа, которая катализирует сопряженную реакцию окисления целлобиозы (одного из главных продуктов гидролиза целлюлозы), а также фенольные соединения – продукты биodeградации лигнина, являющегося одним из основных компонентов ВРБ.

ПМО осуществляют взаимодействие с гидролитическими ферментами базового целлюлазного комплекса, приводя в итоге к увеличению выхода глюкозы [15]. С использованием гомогенных ферментов было показано, что оптимальное содержание ПМО в составе целлюлазного комплекса должно составлять ~10% [25], причем введение ПМО в целлюлазный комплекс не должно нарушать его целостность и сбалансированность. Для соответствия этим требованиям была создана система экспрессии на основе индуцибельного промотора гена глюкоамилазы *glc1* гриба *P. verruculosum* [26]. Поскольку промотор гена *glc1* является более “слабым”, чем промотор гена *cbh1*, использование такой системы экспрессии позволяет вводить в состав секретируемых рекомбинантным штаммом-продуцентом ферментов ограниченное количество ПМО, не нарушая секрецию базового комплекса целлюлаз. В качестве целевой была выбрана ПМО *T. reesei* (ПМО-Tr, КФ 1.14.99.54 и 1.14.99.56, AA9, 39 кДа, pI 2,8), кодируемая геном *eglIV*, поскольку фермент обладал большей активностью по сравнению с другими исследованными ПМО [25].

Генетическую трансформацию реципиентного штамма осуществляли с помощью плазмидного вектора, несущего ген *eglIV*, содержащий промотор гена *glc1* и терминатор гена *cbh1*. В результате был получен рекомбинантный штамм *P. verruculosum* gla-ПМО-Tr, после культивирования которого в лабораторных ферментерах были получены ФП Gla-ПМО-Tr, содержащие 9–10% гетерологичной ПМО-Tr с сохранением базового целлюлазного комплекса *P. verruculosum* (табл. 4).

Необходимо отметить, что с помощью экспрессионной системы на основе промотора гена *glc1* был получен рекомбинантный штамм *P. verruculosum* gla-БГА, продуцент гетерологичной БГА *A. niger*, уровень экспрессии которой также составил около 10% от общего секретируемого белка, при сохранении базового целлюлазного комплекса (состав ФП gla-БГА, полученного в лабораторном ферментере, приведен в табл. 4).

Была исследована способность к биоконверсии осинового древесины, измельченной на планетарной шаровой мельнице (концентрация в реакци-

Таблица 4. Компонентный состав лабораторных ФП, содержащих ПМО и БГ (состав ферментных препаратов определяли с помощью высокоэффективной анионообменной и гидрофобной хроматографии)

Ферментный препарат, штамм	Ферменты, % от общего белка				
	ПМО	БГ	ЦБГ	ЭГ	другие
<i>P. verruculosum</i> gla-ПМО-Тг	9–10	3*	54	10	23–24
<i>P. verruculosum</i> gla-БГА	–	13**	55	10	22
<i>P. verruculosum</i> ПМО-Тг	24	3*	40	11	22
<i>P. verruculosum</i> В1-537	–	3*	60	12	25

* Содержание гомологичной БГ; ** содержание гомологичной БГ – 3%.

онной смеси – 100 г/л), препаратами Gla-ПМО-Тг и Gla-БГА, а также их смесью [26]. В качестве контроля использовали ФП В1-537. Концентрация глюкозы при использовании ФП Gla-ПМО-Тг через 48 ч составила 42 г/л, что было на 10% выше концентрации продукта для контрольных ФП В1-537 (38 г/л), однако несколько ниже, чем для препарата Gla-БГА (52 г/л). При использовании же смеси препаратов Gla-ПМО-Тг и Gla-БГА (1 : 1) и сохранении общей дозировки ферментов по белку концентрация глюкозы достигла 59 г/л, что на 13% выше, чем для препарата Gla-БГА и на 56% выше по сравнению с контрольным препаратом В1-537.

Таким образом, синергетический эффект от введения двух гетерологично экспрессируемых ферментов (ПМО и БГ) в состав целлюлазного комплекса *P. verruculosum* при конверсии измельченной осиновой древесины оказался выше, чем от введения какого-либо одного из этих ферментов. Важно подчеркнуть, что использование относительно слабого промотора гена *gla1* для экспрессии целевых ферментов позволило сохранить базовый уровень продукции ключевых целлюлаз, что в итоге и привело к заметному росту эффективности препаратов при конверсии растительного сырья.

Помимо описанного выше продуцента ПМО на базе реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 (Δ niaD) был получен высокоактивный штамм – продуцент ПМО-Тг, в котором экспрессия целевого гена находилась под контролем *cbh1* промотора [27, 28]. Этот штамм *P. verruculosum*-ПМО-Тг позволил при культивировании в лабораторных ферментерах получить ФП, содержащий 24% ПМО-Тг (содержание базовых целлюлаз в таком ФП несколько уменьшилось, табл. 4).

Было проведено сравнение эффективности конверсии измельченной на планетарной шаровой мельнице осиновой древесины, а также МКЦ с помощью ФП ПМО-Тг и контрольного ФП В1-537, полученного из КЖ реципиентного штамма. За критерий эффективности конверсии принимали выход глюкозы и ВС после 24 ч действия ферментов. Несмотря на пониженное содержание целлюлаз базового комплекса (табл. 4) ФП ПМО-Тг осуществлял конверсию субстратов эффектив-

нее, чем ФП В1-537, не содержащий ПМО. Выход ВС при гидролизе МКЦ препаратом ПМО-Тг был на 11%, а выход глюкозы – на 17% выше, чем в случае контрольного ФП. При конверсии измельченной осиновой древесины выходы ВС для ФП на основе рекомбинантного и исходного штаммов были близки, при этом выход глюкозы под действием ФП ПМО-Тг был на 35% выше по сравнению с ФП В1-537. Таким образом, ФП ПМО-Тг обеспечивал увеличение эффективности конверсии целлюлозосодержащего сырья по сравнению с ФП из *P. verruculosum* В1-537.

Ксиланазы. Содержание гемицеллюлоз (ксиланов) в различных видах ВРБ значительно варьирует [7], что требует индивидуального подбора состава ФП для наиболее эффективного гидролиза конкретных видов ВРБ. На основе реципиентного штамма *P. verruculosum* 537 (Δ niaD) были получены несколько рекомбинантных штаммов, продуцирующих мультиферментные комплексы с различным соотношением целлюлазных и ксиланазной активностей.

Ксилан – один из основных компонентов гемицеллюлоз клеточной стенки растений и второй по распространенности природный полисахарид после целлюлозы. Поэтому ФП, предназначенные для гидролиза ВРБ со значительным содержанием ксиланов (например, кукурузные стебли, багасса, осиновая древесина), должны иметь повышенное содержание ксиланаз. Для увеличения ксиланазной активности базового штамма *P. verruculosum* были выбраны эндо- β -1,4-ксиланаза А *P. canescens* (КСИЛА, КФ 3.2.1.8, GH10, 31 кДа, pI 8.5) и эндо- β -1,4-ксиланаза 3 *T. reesei* (КСИЛЗ, GH10, 38 кДа, pI 9.1). С использованием *cbh1* промотора были созданы штаммы *P. verruculosum*-КСИЛА и *P. verruculosum*-КСИЛЗ [23, 28], при культивировании которых в лабораторных ферментерах получали КЖ с активностью ксиланазы около 2000 ед./мл. Содержание гетерологичных КСИЛ в ФП, составило 17–18% (с сохранением ферментов базового целлюлазного комплекса *P. verruculosum* (табл. 1).

Активность ксиланазы ФП КСИЛА и КСИЛЗ в 1.6–5.3 раза превосходила таковую контрольного ФП, полученного из КЖ реципиентного штам-

Таблица 5. Удельные активности ФП (ед./мг белка), содержащих ксиланазы, по отношению к различным субстратам

Ферментный препарат, штамм	МКЦ	КМЦ	пНФГ	Ксилан
<i>P. verruculosum</i> КСИЛА	0.2	2.9	3.3	69
<i>P. verruculosum</i> КСИЛЗ	0.1	18.0	1.1	21
Accelerase XY	0.1	0.8	0.6	92
<i>P. verruculosum</i> В1-537	0.7	18.3	1.7	13

ма *P. verruculosum* В1-537 (Δ niaD) [18] (табл. 5). Активность по отношению к МКЦ (целлобиогидролазная активность) и КМЦ (эндоглюканазная активность) ФП, полученных из рекомбинантных штаммов, по сравнению с ФП из штамма-реципи-

ента уменьшалась. В табл. 5 приведены удельные активности коммерческого ФП Accelerase XY, предназначенного для конверсии ксиланов ВРБ, который имел более высокую удельную активность ксиланазы, по сравнению с ФП КСИЛА или КСИЛЗ, однако существенно уступал им по величине удельных активностей по отношению к МКЦ, КМЦ и пНФГ.

Эффективность рекомбинантных ФП ксиланаз была оценена по степени конверсии различных видов ВРБ (выход ВС и глюкозы после 48 ч действия ФП), в качестве которых использовали измельченные на планетарной шаровой мельнице осиную древесину, сосновую (обесмоленную) древесину и багассу [18]. Концентрация субстрата в реакционной смеси составляла 100 г/л, ФП добавляли из расчета 5 мг белка/г субстрата. Для наиболее полного проявления потенциала исследуемых ФП и повышения степени конверсии ВРБ в реакционную смесь также дополнительно добавляли рекомбинантный ФП β -глюкозидазы *P. verruculosum* F10 (40 ед./г субстрата). В качестве контрольного использовали ФП В1-537, полученный из реципиентного штамма рис. 3.

Осиновая древесина характеризуется высоким содержанием целлюлозы (40–55%) и гемицеллюлоз (ксиланов, до 40%), и относительно невысоким – лигнина (18–25%) [6] и, как уже отмечалось, для ее разрушения требуется высокая активность ФП ксиланазы. Действительно, наибольшим гидролитическим эффектом по отношению к измельченной осиновой древесине обладали ФП КСИЛА и КСИЛЗ (рис. 3а). За 2 сут наилучший из этих ФП (КСИЛЗ) приводил к образованию примерно 42 г/л ВС и 40 г/л глюкозы, контрольный ФП В1-537 в тех же условиях – 35 г/л ВС и 33 г/л глюкозы.

Состав багассы характеризуется меньшим содержанием целлюлозы, чем у древесных растений (~40%), в багассе много ксиланов (>30%) и относительно мало лигнина (не более 25%) [6]. Наибольшим гидролитическим эффектом в случае измельченной багассы обладал ФП КСИЛЗ, при использовании которого получали 42 г/л ВС и 32 г/л глюкозы, в то время как в контроле с ФП В1-537 – 32 г/л ВС и 27 г/л глюкозы (рис. 3б).

Древесина сосны содержит значительное количество целлюлозы (45–50%), до 30% гемицеллюлоз (в основном ксиланов), содержание лигнина составляет 25–35% [6]. Как и в случае ба-

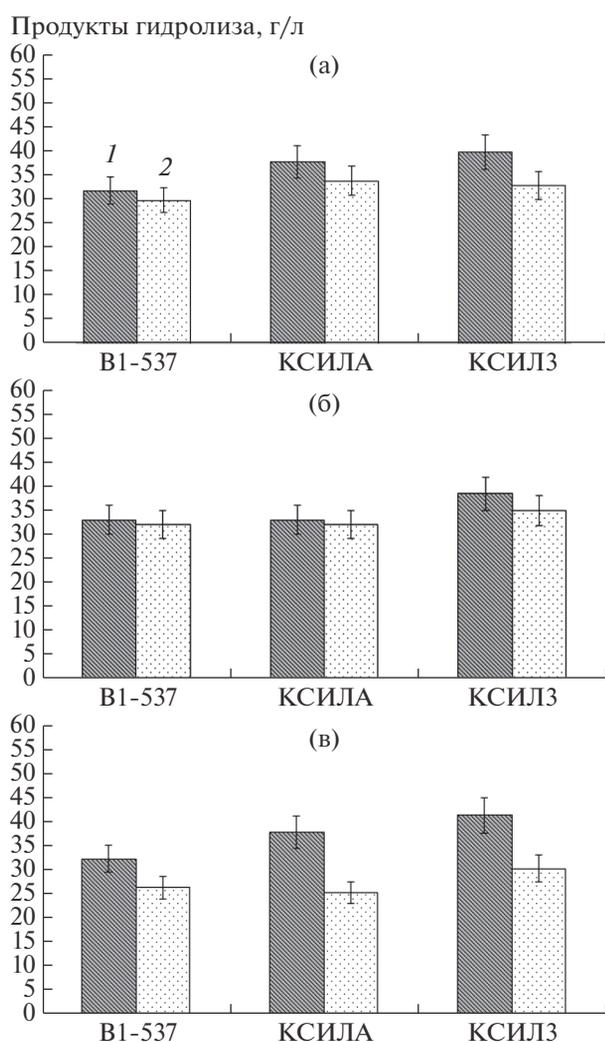


Рис. 3. Выход ВС (1) и глюкозы (2) при конверсии различных видов растительного сырья (а – осина; б – сосна; в – багасса) под действием ферментных препаратов, обогащенных ксиланазой, через 48 ч после начала реакции. (Условия: ФП 5 мг белка/г субстрата в присутствии препарата β -глюкозидазы F10 (40 ед./г субстрата), [S] = 100 г/л, 50°C, pH 5.0, перемешивание – 250 об./мин).

гассы наилучшим для гидролиза измельченной обессмоленной сосновой древесины оказался ФП КСИЛ3, при использовании которого образовывалось 38 г/л ВС и 35 г/л глюкозы, при показателях в контроле с ФП В1-537 – 32 г/л ВС и 30 г/л глюкозы (рис. 3в).

* * *

Таким образом, штамм *P. verruculosum* В1-537 (AniaD) был с успехом использован для получения продуцентов, синтезирующих вспомогательных по отношению к базовому целлюлазному комплексу ферментов, увеличивающих эффективность ФП: БГ, ПМО, а также КСИЛ.

С использованием “сильного” *cbh1* промотора были получены высокоактивные рекомбинантные продуценты вспомогательных ферментов, которые обеспечивали весьма высокое их содержание в ФП – до 80% БГ от общего белка и 24% ПМО. Однако в таких ФП уменьшалось содержание ферментов базового целлюлазного комплекса, в первую очередь ЦБГ1, что, вероятно, связано с титрованием положительных факторов транскрипции в рекомбинантных штаммах [30], поэтому общая литическая активность ФП с высоким содержанием вспомогательных ферментов по отношению к различным видам ВРБ уменьшалась. Эти ФП целесообразно использовать в составе смесей препаратов, основным компонентом которых являются ферменты базового целлюлазного комплекса, а ФП, содержащие вспомогательные ферменты, добавлены в относительно небольшом количестве.

Создание штаммов-продуцентов, позволяющих получить в результате однократно проведенного процесса культивирования сбалансированный комплекс, содержащий как базовые, так и вспомогательные ферменты для конверсии растительного сырья, было осуществлено при использовании “слабых” промоторов *gla1* и *hist4*. В результате были получены ФП, содержащие 13–14% БГ (*gla1* или *hist4*) и 9–10% ПМО (*gla1*). Кроме того, с помощью промотора *cbh1* были получены ФП, содержащие 17–18% КСИЛ. Во всех этих случаях в ФП не была нарушена целостность и сбалансированность базового целлюлазного комплекса.

Важным моментом в конструировании рекомбинантных промышленных штаммов была их стабильность при пересевах. Особенность рекомбинантных штаммов гриба *P. verruculosum* состоит в стабильной интеграции экзогенной ДНК в хромосому реципиентного штамма *P. verruculosum* В1-537 (AniaD), что не приводит к потере активности при пассировании штаммов. Это позволяет использовать полученные штаммы на производстве с воспроизводимыми результатами.

Использование экспрессионной системы на основе гриба *P. verruculosum* позволило увеличить

способность базового целлюлазного комплекса к конверсии различных видов ВРБ. Полученные с использованием этого штамма рекомбинантные ФП (или их смеси) не уступают или превосходят по эффективности действия большинство коммерческих ФП, специально созданных для промышленных процессов биоконверсии ВРБ.

Работа была выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 18-54-80027, а также Государственного задания АААА-А16-116052010081-5.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sánchez Ó.J., Cardona C.A. // *Bioresour. Technol.* 2008. V. 99. № 13 P. 5270–5295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.013>
2. Ragauskas A.J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G., Cairney J., Charles A. et al. // *Science*. 2006. V. 311. № 5760. P. 484–489. <https://doi.org/10.1126/science.1114736>
3. Carmen S. // *Biotechnol. Adv.* 2009. V. 27. № 2. P. 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
4. Menon V., Rao M. // *Prog. Energy Combust. Sci.* 2012. V. 38. № 4. P. 522–550. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>
5. Peralta-Yahya P.P., Keasling J.D. // *Biotechnol. J.* 2010. V. 5. № 2. P. 147–162. <https://doi.org/10.1002/biot.200900220>
6. Gan Q., Allen S.J., Taylor G. // *Process Biochem.* 2003. V. 38. № 7. P. 1003–1017. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00220-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00220-0)
7. Vassilev S.V., Baxter D., Andersen L.K., Vassileva C.G., Morgan T.J. // *Fuel*. 2012. V. 94. P. 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.09.030>
8. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Сеницын А.П. // *Каталог в промышленности*. 2012. Т. 6. С. 68–76. (Chekushina A.V., Dotsenko G.S., Sinitsyn A.P. // *Catal. Ind.* 2012. V. 6. P. 68–76.)
9. Margeot A., Hahn-Hagerdal B., Edlund M., Slade R., Monot F. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2009. V. 20. № 3. P. 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.009>
10. Nieves R.A., Ehrman C.I., Adney W.S., Elander R.T., Himmel M.E. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1998. V. 14. P. 301–304. <https://doi.org/10.1023/A:1008871205580>
11. Gusakov A.V. // *Trends Biotechnol.* 2011. V. 29. № 9. P. 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.004>
12. Kubicek C.P., Mikus M., Schuster A., Schmoll M., Seibot B. // *Biotechnol. Biofuels*. 2009. V. 2. P. 19–33. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-19>
13. Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H. // *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 2002. V. 66. № 3. P. 506–577. <https://doi.org/10.1128/mmbr.66.3.506-577.2002>
14. Berlin A., Gilkes N., Kilburn D., Maximenko V., Bura R., Markov A. et al. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2006. V. 129–132. P. 528–545. <https://doi.org/10.1385/abab:130:1:528>
15. Гусаков А.В., Сеницын А.П. *Химия биомассы: биотоплива и биопластики.* / Ред. С.Д. Варфаломеев. М.: Научный мир, 2017. С. 65–99.

16. Синецын А.П., Окунев О.Н., Черноглазов В.М., Синецына О.А., Черноглазов В.М. Патент РФ. 2361918. 2009.
17. Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravitnikov A., Osipov D., Sinityn A. // *Biotechnol. J.* 2010. V. 5. № 8. P. 871–880. <https://doi.org/10.1002/biot.201000050>
18. Синецын А.П., Осипов Д.О., Рожкова А.М., Бушина Е.В., Доценко Г.С., Синецына О.А. и др. // *Биотехнология.* 2013. Т. 29. № 5. С. 40–53. doi (Sinityn A.P., Osipov D.O., Rozhkova A.M., Bushina E.V., Dotsenko G.S., Sinityna O.A. et al. // *Biotechnology (Russia).* 2013. V. 29. № 5. P. 40–53.) <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2013-5-40-53>
19. Skomarovsky A.A., Gusakov A.V., Okunev O.N., Solov'eva I.V., Bubnova T.V., Kondrat'eva E.G. et al. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005. V. 41. P. 182–184. <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0032-6>
20. Синецын А.П., Рожкова А.М., Синецына О.А., Федорова Е.А., Окунев О.Н., Беккаревич А.О. и др. Патент РФ 2378372. 2009.
21. Короткова О.Г., Семенова М.В., Морозова В.В., Зоров И.Н., Соколова Л.М., Бубнова Т.М. и др. // *Биохимия.* 2009. Т. 74. № 5. С. 699–709. (Korotkova O.G., Semenova M.V., Morozova V.V., Zorov I.N., Sokolova L.M., Bubnova T.M. et al. // *Biochemistry (Moscow).* 2009. V. 74. № 5. P. 569–577.)
22. Синецын А.П., Скомаровский А.А., Чекушина А.В., Синецына О.А., Немашкалов В.А., Кондратьева Е.Г. и др. // *Катализ в промышленности.* 2015. Т. 15. № 5. С. 74–77. doi (Sinityn A.P., Skomarovskiy A.A., Chekushina A.V., Sinityna O.A., Nemashkalov V.A., Kondratieva E.G. et al. // *Catal. Ind.* 2015. V. 15. № 5. P. 74–77.) <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2015-5-74-77>
23. Короткова О.Г., Рожкова А.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Немашкалов В.А. и др. // *Катализ в промышленности.* 2011. № 5. С. 61–68. (Korotkova O.G., Rozhkova A.M., Matys V.Yu., Koshelev A.V., Okunev O.N., Nemashkalov V.A. et al. // *Catal. Ind.* 2011. № 5. P. 61–68.)
- shelev A.V., Okunev O.N., Nemashkalov V.A. et al. // *Catal. Ind.* 2011. № 5. P. 61–68.)
24. Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Korotkova O.G., Sinityn A.P. // *Process Biochem.* 2015. V. 50. № 8. P. 1258–1263. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.008>
25. Булахов А.Г., Гусаков А.В., Чекушина А.В., Сампудинов А.Д., Кошелев А.В., Матыс В.Ю. и др. // *Биохимия.* 2016. Т. 81. № 5. С. 701–709. doi (Bulakhov A.G., Gusakov A.V., Chekushina A.V., Satrudinov A.D., Koshelev A.V., Matys V.Yu. et al. // *Biochemistry (Moscow).* 2016. V. 81. № 5. P. 530–537.) <https://doi.org/10.1134/S0006297916050102>
26. Bulakhov A.G., Volkov P.V., Rozhkova A.M., Gusakov I.A.V., Nemashkalov V.A., Satrudinov I.A.D. et al. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170404>
27. Проскура О.В., Короткова О.Г., Рожкова А.М., Кондратьева Е.Г., Матыс В.Ю., Зоров И.Н. и др. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2015. Т. 51. № 6. С. 592–599. doi (Proskurina O.V., Korotkova O.G., Rozhkova A.M., Kondratieva E.G., Matys V.Yu., Zorov I.N. et al. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015. V. 51. № 6. С. 667–673.) <https://doi.org/10.7868/S0555109915060124>
28. Proskurina O.V., Korotkova O.G., Rozhkova A.M., Matys V.Yu., Koshelev A.V., Okunev O.N. et al. // *Catal. Ind.* 2014. V. 6. № 1. P. 72–78. <https://doi.org/10.1134/S2070050414010085>
29. Осипов Д.О., Рожкова А.М., Матыс В.Ю., Кошелев А.В., Окунев О.Н., Рубцова Е.А. и др. // *Катализ в промышленности.* 2010. № 5. С. 63–70. (Osipov D.O., Rozhkov A.M., Matys V.Yu., Koshelev A.V., Okunev O.N., Rubtsova E.A. et al. // *Catal. Ind.* 2010. № 5. P. 63–70.)
30. Чулкин А.М., Кислицин В.Ю., Зоров И.Н., Синецын А.П., Рожкова А.М. // *Биотехнология.* 2019. Т. 35. № 5. С. 51–57. doi (Chulkin A.M., Kislytsyn V.Yu., Zorov I.N., Sinityn A.P., Rozhkova A.M. // *Biotechnology (Russia).* 2019. V. 35. № 5. P. 51–57.) <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-51-57>

Capabilities of the Fungus *Penicillium verruculosum* Expression System for Producing of Enzymes Providing Effective Destruction of Renewable Plant Biomass (Review)

A. P. Sinityn^{a, b}, O. A. Sinityna^b, I. N. Zorov^{a, b}, and A. M. Rozhkova^{a, b, *}

^aFederal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^bLomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: amrojkova@yahoo.com

The review systematizes the data on the use of the *Penicillium verruculosum* B1-537 (Δ niaD) recipient strain to produce supporting enzymes to the endogenous cellulase complex, increasing its effectiveness – β -glucosidase, polysaccharide monoxygenase, as well as xylanases. A feature of the *P. verruculosum* strain is the secretion of the basic complex of cellulases, consisting of cellobiohydrolases and endoglucanases, which in their hydrolytic ability exceed the most widely used strains of *Hypocrea (Trichoderma)* in laboratory and industrial practice. Using the capabilities of the *P. verruculosum* B1-537 expression system (Δ niaD), it is possible to introduce new enzymes into the endogenous cellulase complex necessary to increase its total hydrolytic activity, and to create enzyme preparations adapted for the conversion of various types of renewable plant biomass (RPB). The use of the expression system based on the *P. verruculosum* fungus made it possible to increase the ability of the base cellulase complex to convert various types of RPB.

Keywords: expression system, cellulases, hemicellulases, renewable plant biomass, *Penicillium verruculosum*

УДК 577.21:577.15:637.334.2

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА МАРАЛА (*Cervus elaphus sibiricus* Severtzov) В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ И ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА ЕГО БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ, ВАЖНЫХ ДЛЯ СЫРОДЕЛИЯ

© 2020 г. С. В. Беленькая^{1,2}, Д. Н. Щербаков^{1,3}, Д. В. Балабова³,
А. Н. Белов⁴, А. Д. Коваль⁴, В. В. Ельчанинов⁴. *

¹ГНЦ вирусологии и биотехнологии “Вектор”, Кольцово, 630559 Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

³Алтайский государственный университет, Барнаул, 656049 Россия

⁴Федеральный Алтайский научный центр агrobiотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул, 656016 Россия

*e-mail: ve3636@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.05.2020 г.

После доработки 11.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

В системе экспрессии *Escherichia coli* (штамм SHaffle express) получен рекомбинантный химозин марала и изучены его биохимические свойства, важные для сыроделия. Наибольшее содержание в тельцах включения рекомбинантного прохимозина марала наблюдалось при культивировании продуцента в течение 6 ч при 25°C с момента внесения индуктора – 10 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид. Биохимические свойства полученного фермента сравнивали со свойствами рекомбинантных химозинов коровы и одногорбого верблюда. Показано, что общая протеолитическая активность рекомбинантного химозина марала была сопоставима с активностью фермента коровы, но примерно в 3.8 раза превышала активность фермента одногорбого верблюда. Термостабильность рекомбинантного химозина марала оказалась на 5–10°C выше, чем у химозинов коровы и одногорбого верблюда. Зависимость коагуляционной активности фермента марала от pH и концентрации хлорида кальция в коровьем молоке соответствовала требованиям сыроделия. Высокая протеолитическая активность и термостабильность ограничивают сферу применения рекомбинантного химозина марала выработкой сыров с короткими сроками созревания и хранения.

Ключевые слова: рекомбинантный химозин марала, молокосвертывающая активность, протеолитическая активность, термостабильность, pH, концентрация хлорида кальция, сыроделие

DOI: 10.31857/S0555109920060033

Аспаратная пепсиноподобная эндопептидаза химозин (КФ 3.4.23.4) широко применяется в сыроделии для свертывания молока. Химозин (Хн) избирательно и с высокой скоростью гидролизует “ключевую” пептидную связь – F105-M106 – в молекуле каппа-казеина, что приводит к дестабилизации казеиновых мицелл и образованию сычужного сгустка. Долгое время по совокупности биохимических свойств, включающих высокую молокосвертывающую активность (МА) в сочетании с низкой общей протеолитической активностью (ПА), умеренной термостабильностью (ТС) и оптимальной зависимостью МА от концентрации Ca²⁺ и pH Хн коровы (*Bos taurus*) считался эталонным молокосвертывающим ферментом (МФ) [1].

В 2006 г. был получен рекомбинантный химозин (рХн) одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) [2]. Было установлено, что по специфич-

ности (соотношению МА и общей ПА) этот рХн в 7 раз превосходит Хн коровы, но уступает ему по термостабильности [2]. Таким образом, в настоящее время существует два эталонных МФ для сыроделия – рХн коровы (рХн **Bos**) и рХн одногорбого верблюда (рХн **Cam**).

Открытие и внедрение в сыродельную практику рХн **Cam** позволяет предположить, что в природе существуют и другие МФ, которые превосходят по биохимическим свойствам эталонные коагулянты молока. Это является предпосылкой для поиска новых химозинов не коровьего происхождения. В настоящее время уже получены и исследованы рХн овцы (*Ovis aries*) [3], козы (*Capra hircus*) [4–6], яка (*Bos grunniens*) [7], буйвола (*Bubalus bubalis*) [4, 8] и альпака (*Vicugna pacos*) [9]. Однако по комплексу биохимических характеристик ни один из этих ферментов не может срав-

ниться с рХн Vos или рХн Sam. Нахождение и внедрение в практику химозина, абсолютно превосходящего существующие эталонные МФ является актуальной биотехнологической задачей, поскольку позволит повысить эффективность стратегической технологии переработки молока – сыроделия.

Объектом данного исследования является химозин алтайского марала (*Cervus elaphus sibiricus* Severtzov, 1873), обитающего на территории России, который относится к подвиду благородного оленя (*C. elaphus* Linnaeus, 1758).

Цель работы – получение рХн марала (рХн Cer) в прокариотической системе экспрессии, сравнение его биохимических свойств с характеристиками эталонных коагулянтов молока и оценка перспектив использования нового МФ в сыроделии.

МЕТОДИКА

Получение рекомбинантного химозина марала. Конструирование экспрессионного вектора. В работе использовали нуклеотидную последовательность, кодирующую прохимозин (ПроХн) марала, представленную в базе GenBank (MT225406). Для экспрессии в системе *Escherichia coli* (штамм SHaffle express) оптимизировали кодонный состав последовательности при помощи онлайн сервиса “Codon Optimisation Tool” (“Integrated DNA Technologies”, США). Оптимизированная нуклеотидная последовательность ПроХн марала (СУМ-Cer) была синтезирована ООО “ДНК-синтез” (Россия) и получена в составе клонирующего вектора рGH. Синтезированный ген был клонирован в состав экспрессионного вектора рЕТ21a (“Novagen”, “Merck”, ФРГ) по уникальным сайтам рестрикции (*Hind*III и *Vam*HI). В результате, был получен плазмидный вектор рЕТ21-СУМ-Cer.

Получение препарата рХн марала. Сконструированной экспрессионной плазмидой (рЕТ21-СУМ-Cer) проводили химическую трансформацию клеток *E. coli*, штамм SHaffle express. Индивидуальные колонии, содержавшие рекомбинантные плазмиды, культивировали на орбитальном шейкере (180 об./мин) в среде LB в течение ночи при 37°C. Инокулят в соотношении 1 : 100 переносили в колбы Эрленмейера, содержавшие свежую среду LB, и растили до оптической плотности (при 600 нм), равной 0.8. Для оптимизации продукции целевого белка варьировали концентрацию вносимого индуктора, а также время и температуру дополнительной стадии культивирования. В инокулят вносили изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0.1, 1.0, 10.0 мМ, и дополнительно культивировали штамм-продуцент на шейкере (180 об./мин) в течение 2, 6 и 12 ч при 25 и 37°C.

После завершения культивирования из биомассы клеток продуцента выделяли тельца вклю-

чения, содержавшие рекомбинантный ПроХн марала (рПроХн Cer). Для этого биомассу осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин при 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в буфере STET, pH 8.0, (содержавшем 8% сахарозы, 50 мМ трис, 20 мМ ЭДТА, 5% тритона X-100), из расчета 20 мл на 1 грамм биомассы и инкубировали в течение ночи при 4°C. После окончания инкубации клетки разрушали при 4°C с использованием ультразвукового (УЗ) гомогенизатора Soniprep 150 Plus (“MSE”, КНР). Суспензию клеток подвергали УЗ воздействию (2000 Вт/литр и 283 Вт/см²) в течение 1 мин, затем 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 и последующий рефолдинг целевого белка проводили по методу [10] с небольшими модификациями. Осажденные тельца включения солюбилизировали в буфере А, pH 10.7 (50 мМ КН₂РO₄, 150 мМ NaCl) в который добавляли мочевины, до конечной концентрации 8 М, инкубировали 24 ч при 15°C и центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин. В полученном супернатанте определяли концентрацию белка. Для ренатурации полученного рПроХн супернатант разбавляли буфером А до конечной концентрации белка 0.7 мг/мл и оставляли на 12 ч при 15°C. Затем в раствор вносили 1.0 М HCl до pH 8.0, выдерживали смесь 60 мин при 15°C и диализировали против буфера В, pH 8.0, содержавшего 50 мМ трис и 150 мМ NaCl, в течение ночи при 4°C. По завершении диализа получали препарат ренатурированного рПроХн Cer.

Зимоген активировали методом ступенчатого изменения pH. В образец рПроХн Cer, при постоянном перемешивании, вносили 2.0 М HCl до pH 3.0 и инкубировали его в течение 24 ч при комнатной температуре. После окончания инкубации pH образца доводили до 5.8, используя 0.5 М NaOH. В результате активации получали препарат рХн Cer.

Исследование биохимических свойств. Молокосвертывающую активность, общую ПА, ТС и зависимость продолжительности коагуляции от pH и концентрации хлорида кальция в коровьем молоке определяли по ранее опубликованным методикам [11, 12] с незначительными модификациями. Биохимические свойства рХн Cer сравнивали с коммерческими препаратами рХн Vos (сухая форма) и рХн Sam (жидкая форма) производства компании “Chr. Hansen” (Дания). Для проведения исследований готовили 0.5–1.0%-ный водный раствор рХн Vos, а рХн Sam разбавляли дистиллированной водой в 80–100 раз. При определении биохимических свойств рХн Cer, рХн Vos и рХн Sam нормировали по МА. Исследование каждого биохимического параметра проводили

дважды с интервалом 1–3 сут между сериями. Все измерения повторяли трижды.

Общая молокосвертывающая активность. В качестве стандарта использовали 0.5%-ный водный раствор сухого коммерческого препарата рХн Vos с заявленной активностью, равной 2235 IMCU/г. Для перевода значений IMCU (International Milk Clotting Units) в УЕ, использовали повышающий коэффициент 125. Субстратом служило сборное непастеризованное коровье молоко, в которое вносили NaN_3 до конечной концентрации 0.02% и доводили рН до 6.5. Субстрат (2.5 мл), прогретый на водяной бане при 35°C не менее 5 мин, быстро смешивали с 0.2 мл исследуемого рХн и регистрировали время образования первых хлопьев коагулята. Общую МА жидких препаратов рХн рассчитывали по формуле (1) и выражали в условных единицах на миллилитр (УЕ/мл).

$$MA = MA_{St}/200T_1/T_2, \quad (1)$$

где:

MA_{St} – заявленная МА стандарта в условных единицах (УЕ/г);

200 – фактор разведения (мл/г);

T_1 – время (с) свертывания субстрата стандартом;

T_2 – время (с) свертывания субстрата раствором исследуемого фермента.

Удельная молокосвертывающая активность. Удельную МА (УЕ/мг белка) препарата рХн Seg рассчитывали после определения общей МА и концентрации белка. Для оценки удельной МА эталонных коммерческих препаратов готовили 1.0%-ный водный раствор рХн Vos, а жидкий препарат рХн Sam разбавляли в 100 раз дистиллированной водой. В полученных растворах определяли МА, концентрацию белка и рассчитывали удельную МА.

Общая протеолитическая активность и специфичность. В качестве субстрата использовали 1%-ный раствор казеина по Гаммерстону в 20 мМ Na-фосфатном буфере, рН 5.6. Аликвоты субстрата (2.0 мл) выдерживали на водяной бане в течение 15 мин при 35°C, затем вносили в них раствор исследуемого МФ (0.5 мл), тщательно перемешивали и отмечали время начала инкубации. Через 30, 90 и 180 мин инкубации реакцию останавливали, добавляя к 2.5 мл фермент-субстратной смеси 2.5 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ), тщательно перемешивали, оставляли на 30 мин при комнатной температуре и фильтровали через бумажный фильтр. В фильтрате определяли оптическую плотность при 280 нм (D_{280}). В качестве спектрофотометрического контроля использовали компоненты фермент-субстратной смеси которые вносили непосредственно в 5%-ную ТХУ. Общую ПА выражали в единицах D_{280} . Для оценки специфичности препаратов рХн использовали ПА, за которую принимали значе-

ния D_{280} образцов, после инкубации в течение 180 мин. Строили график зависимости D_{280} от продолжительности инкубации. Специфичность определяли, как соотношение удельной МА и общей ПА (МА/ПА).

Термостабильность. Растворы исследуемых МФ прогревали в диапазоне 30–60°C в течение 30 мин, быстро охлаждали до комнатной температуры и определяли их остаточную МА. За 100% принимали значения МА, полученные для образцов, прогретых при 30°C. Строили график зависимости остаточной МА от T (°C) прогревания.

Зависимость продолжительности коагуляции от рН молока. Субстратом служило сборное непастеризованное коровье молоко, в которое вносили NaN_3 до конечной концентрации 0.02%. Готовили субстрат с рН 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8 и 7.0 и определяли в них продолжительность образования сгустка, после внесения раствора исследуемого МФ. За 100% принимали продолжительность свертывания субстрата при рН 6.0. Строили график зависимости продолжительности коагуляции (%) от рН молока.

Зависимость продолжительности коагуляции от концентрации хлорида кальция. Субстратом служило сборное пастеризованное коровье молоко, в которое вносили NaN_3 до конечной концентрации 0.02% и доводили рН до 6.5. В субстрат добавляли CaCl_2 до конечной концентрации 1–5 мМ и определяли продолжительность образования сгустка после внесения раствора исследуемого МФ. За 100% принимали значения, полученные на субстрате, в который не вносили CaCl_2 . Строили график зависимости продолжительности коагуляции (%) от концентрации CaCl_2 .

Другие методы. Продукцию рекомбинантного белка в клетках *E. coli* анализировали методом электрофореза по Лэммли [13]. В качестве маркеров молекулярных масс (ММ) использовали смеси белков “PageRuler™ Unstained Protein Ladder” (“Thermo Fisher Scientific”, США) и М31 (“Сиб-энзим”, Россия). Для определения на электрофореграммах площадей полос белковых компонентов и концентрации в них белка использовали программу GelAnalyzer 19.1. Для калибровки применяли препараты бычьего сывороточного альбумина (БСА) различной концентрации. Концентрацию белка в растворах, содержащих рПроХн и рХн, определяли по методу Брэдфорда [14].

Статистическую обработку полученных данных проводили в вычислительной среде табличного процессора Excel 2008 (“Microsoft Corporation”, США). Для количественных переменных результаты представляли в виде среднего арифметического (\bar{M}) с указанием среднеквадратического отклонения ($\pm SD$). На графиках не указан

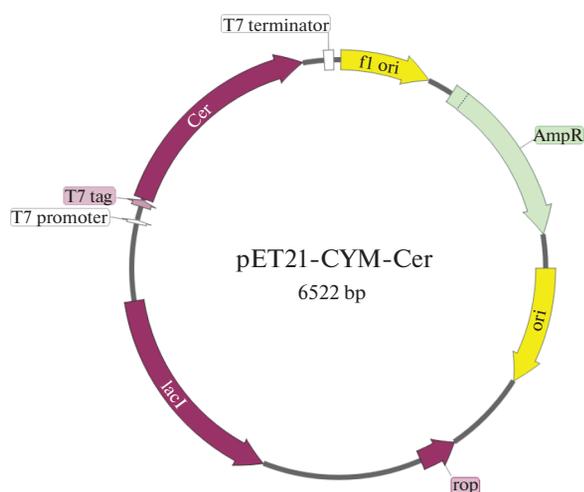


Рис. 1. Генетическая карта плазмидного вектора рЕТ21-СУМ-Сег: T7 promoter – промотор гена белка 10 фага Т7; T7 tag – лидерная последовательность гена 10 бактериофага Т7; Сег – последовательность ПроХн марала; T7 terminator – терминатор бактериофага Т7.

95%-ный доверительный интервал, поскольку его абсолютные значения были <10% от М.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рХн марала. Для получения рХн могут использоваться системы экспрессии бактерий (*E. coli*), дрожжей (*Pichia (Komagataella) pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Kluyveromyces lactis*), плесневых грибов (*Aspergillus niger*), а также высших млекопитающих и растений [1]. В настоящее время в производстве сыров официально применяются рХн Vos и рХн Sam, синтезируемые в эукариотических системах экспрессии высшего плесневого гриба *A. niger* var. *awamori* и молочных дрожжей *K. lactis* [1]. В то же время, для большого сегмента научно-исследовательских и скрининговых работ, использование хорошо изученных и простых прокариотических систем экспрессии предпочтительнее и намного выгоднее, чем получение стабильных эукариотических продуцентов.

Система продукции рекомбинантных белков на основе *E. coli* позволяет получать за относительно короткий промежуток времени целевой продукт в количествах, достаточных для первичной биохимической характеристики. Ранее при помощи векторной системы рЕТ21 в сочетании с *E. coli* штамм BL21(DE3) был получен эффективный продуцент рПроХн альпака [9]. Для продукции рПроХн Сег мы использовали другой штамм *E. coli* – SHaffle express, разработанный для обеспечения корректного формирования дисульфидных связей в рекомбинантных белках, синтезируемых *de novo* [15].

Нуклеотидная последовательность, соответствующая последовательности ПроХн марала (ПроХн Сег), с оптимизированным для экспрессии в системе *E. coli* кодонным составом, была клонирована в составе вектора рЕТ21 в единой рамке трансляции с экспрессионным тагом Т7, представляющим лидерную последовательность (11 аминокислотных остатков) гена 10 бактериофага Т7 (рис. 1). Присутствие этой последовательности на N- или С-концевой части целевого рекомбинантного белка способно значительно повысить его выход [16].

Зависимость эффективности продукции целевого белка от концентрации индуктора, температуры и продолжительности культивирования анализировали методом электрофореза (рис. 2). Наибольший выход рПроХн Сег наблюдался при концентрации ИПТГ, равной 10 мМ и культивировании продуцента при 25°C в течение 6 ч с момента внесения индуктора (рис. 2а, б).

После подбора оптимальных условий продукции целевого фермента был исследован белковый состав биомассы, лизата и телец включения клеток продуцента (рис. 3). На долю протеина, концентрация которого составляла около 3 мг/мл, а ММ была близка к расчетной для рПроХн Сег (41 кДа), приходилось не менее 30% от общего количества белков биомассы (рис. 3, 1). Растворимая часть биомассы клеток *E. coli*, несущих плазмиду рЕТ21а-Сег, почти не содержала целевой белок (рис. 3, 2), в то время как фракция телец включения более чем на 95% состояла из рПроХн Сег (рис. 3, 3). Это свидетельствовало о том, что подобранные условия экспрессии гена ПроХн Сег в системе *E. coli* обеспечивали эффективный синтез целевого белка и его накопление в тельцах включения.

Препарат рХн Сег, полученный после рефолдинга и активации рПроХн, содержал лишь незначительное количество балластных белковых примесей (рис. 3, 7).

Молокосвертывающая активность. По общей МА рХн Сег незначительно уступал коммерческому рХн Vos (табл. 1). Для того, чтобы сравнить коагуляционную способность рХн Сег и коммерческих химозинов, была рассчитана удельная МА этих препаратов. По удельной МА рХн Сег уступал рХн Vos и рХн Sam на 36 и 104% соответственно. Можно предположить, что низкая удельная МА рХн Сег, по сравнению с эталонными коагулянтами молока обусловлена недостаточной эффективностью рефолдинга, поскольку восстановление корректной трехмерной структуры затруднено при получении рХн в системах экспрессии *E. coli* [10, 17–19],

Удельная МА рХн Sam в 1.68 раза превосходит удельную коагуляционную активность рХн Vos (табл. 1). Это хорошо согласовывалось с результатами работы [2], в которой было показано, что со-

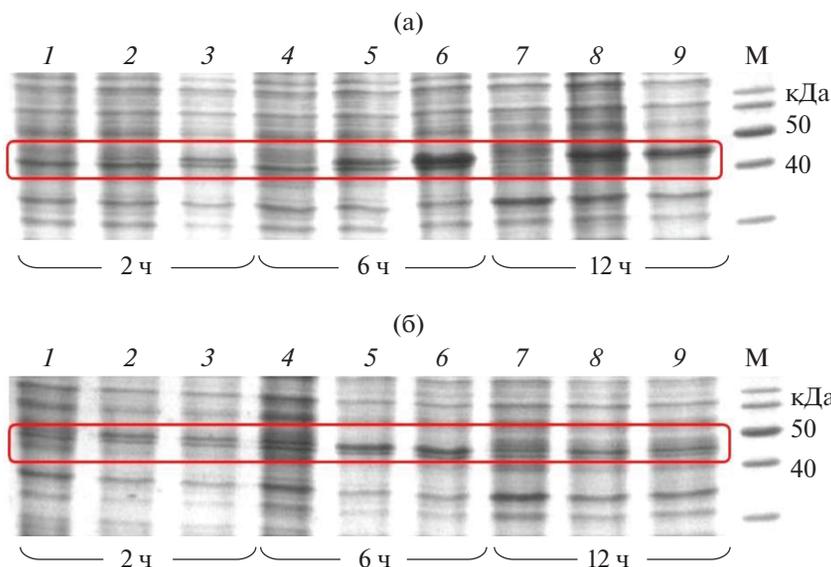


Рис. 2. Электрофорез препаратов биомассы клеток, полученных при культивирования штамма-продуцента при 25 (а) или 37°С (б) и концентрации ИПТГ 0.1 (1, 4, 7), 1.0 (2, 5, 8), 10.0 (3, 6, 9) мМ; М – маркеры молекулярных масс. Рамкой обведены фракции с ММ, близкой к расчетной для рПроХн марала.

отношение удельной МА рХн Vos и рХн Sam составляет 1 : 1.7.

Таким образом, полученный препарат рХн Ser оказался способным свертывать коровье молоко, но по удельной коагуляционной активности заметно уступал эталонным коммерческим МФ. Это означает, что при использовании в сыроделии его расход будет выше, чем у эталонных коагулянтов. При увеличении удельной МА рХн Ser в 1.6–2.6 раза, его дозировка для получения молочного сгустка может быть сопоставима с дозировками рХн Vos и рХн Sam.

Общая протеолитическая активность и специфичность. Для биохимической характеристики нового МФ крайне важна оценка его общей ПА. В сыроделии высокая ПА коагулянта молока считается негативным фактором, поскольку приводит к снижению выхода готовой продукции, способствует формированию пороков вкуса и консистенции сыра и ухудшает технологические характеристики подсырной сыворотки, используемой в качестве сырья при производстве ряда молочных продуктов [20].

Протеолитическую активность коагулянтов молока можно условно разделить на специфическую и неспецифическую. В результате специфической или молокосвертывающей активности происходит только гидролиз связи F105-M106 в молекуле κ-казеина. Протеолиз κ-казеинов по этому сайту дестабилизирует казеиновые мицеллы и приводит к образованию молочного сгустка. Неспецифическая или общая ПА, характеризует способность МФ гидролизовать любые пептидные связи за исключением связи F105-M106 κ-казеина. Соотношение МА и общей ПА (МА/ПА) называется спе-

цифичностью. Идеальный коагулянт молока для сыроделия должен обладать высокой специфичностью, то есть проявлять максимальную МА при минимальной общей ПА [21]. Чем выше специфичность, тем универсальнее МФ и шире ассортимент сыров, для выработки которых он может использоваться.

После инкубации с субстратом в течение 180 мин рХн Ser демонстрировал более высокую общую ПА, чем рХн Sam и рХн Vos (табл. 2).

Динамика накопления продуктов протеолиза рХн Ser оказалась похожей на динамику рХн Vos и заметно отличалась от рХн Sam (рис. 4а). Эти различия наблюдались уже через 30 мин инкуба-

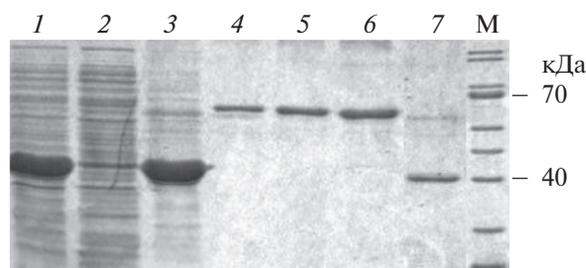


Рис. 3. Результаты электрофореза белковых препаратов, полученных из клеток штамма-продуцента: 1 – биомасса клеток продуцента; 2 – растворимая фракция биомассы после обработки буфером STET; 3 – нерастворимая фракция (тельца включения) после обработки лизирующим буфером; 4, 5, 6 – калибровочные препараты БСА, с нагрузкой 1, 2 и 3 мкг на трек соответственно; 7 – рХн марала, полученный после активации зимогена; М – маркеры молекулярных масс.

Таблица 1. Общая и удельная молокосвертывающая активность рекомбинантных химозинов

Препарат	Общая МА, УЕ/мл	Концентрация белка мг/мл	Удельная МА УЕ/мг	Удельная МА, %
рХн Сег	2330 ± 10	0.044 ± 0.002	52955 ± 2184	64
рХн Vos (1.0% раствор)	2752 ± 88	0.033 ± 0.005	83394 ± 10203	100
рХн Сам (концентрат)	129660 ± 1620	0.928 ± 0.029	139720 ± 2623	168

Таблица 2. Зависимость изменения оптической плотности (D_{280}) ТХУ-растворимых продуктов протеолиза от продолжительности инкубации (мин) фермент-субстратных смесей

Препарат	Оптическая плотность, D_{280}			
	0 мин	30 мин	90 мин	180 мин
рХн Сег	0.0	0.184 ± 0.002	0.513 ± 0.004	0.789 ± 0.013
рХн Vos	0.0	0.187 ± 0.002	0.424 ± 0.003	0.694 ± 0.006
рХн Сам	0.0	0.124 ± 0.005	0.138 ± 0.002	0.208 ± 0.010

Таблица 3. Удельная МА, общая ПА и специфичность (МА/ПА) препаратов рекомбинантных химозинов

Препарат	Удельная МА, %	Общая ПА, %	Специфичность, МА/ПА
рХн Сег	64	114	0.56
рХн Vos	100	100	1.00
рХн Сам	168	30	5.60

ции. Если принять за 100% ПА рХн Vos, проявляемую в течение 180 мин инкубации, то ПА рХн Сег и рХн Сам составят ≈ 114 и $\approx 30\%$ соответственно.

Полученные низкие значения общей ПА характерны для рХн Сам и согласуются с данными работы [2], в которой показано, что рХн Сам обладает вчетверо меньшей ПА, чем рХн Vos. Ранее установлено, что общая ПА рХн близкого родственника одногорбого верблюда, альпака (*Vicugna pacos*), при одинаковой МА была примерно в 2.9 раза ниже, чем у рХн Vos [9]. По-видимому, низкая общая ПА и высокая специфичность характерны для химозинов представителей семейства Верблюдовые (*Camelidae*).

Для сравнения специфичности рХн Сег и эталонных рХн были использованы величины их удельной МА и общей ПА. При этом показатели рХн Vos принимали за 100%. Рассчитанная специфичность рХн Сег оказалась в 1.8 и 10.0 раза ниже, чем у рХн Vos и рХн Сам (табл. 3). Таким образом, по специфичности, а следовательно и по степени универсальности, исследованные ферменты располагались в следующей последовательности: рХн Сам > рХн Vos > рХн Сег.

Очевидно, что низкая специфичность рХн Сег являлась следствием его малой удельной МА, которая, в свою очередь, может быть обусловлена неполным рефолдингом. Следует отметить, что эффективность рефолдинга генно-инженерных химозинов, полученных после солиubilизации телец включения, в среднем редко превышает

30% [10, 17–19]. Можно предположить, что использование эукариотической системы экспрессии вместо *E.coli* (штамм SHaffle express) позволит повысить выход активного рХн Сег, а также его удельную МА и специфичность.

Литературные сведения о специфичности рХн Vos и рХн Сам носят противоречивый характер. Согласно работе [4], специфичность рХн Сам примерно на 11% ниже, чем у рХн Vos. А по данным работы [2], соотношение МА/ПА рХн Сам в 7 раз превосходит рХн Vos. Представления о более высокой специфичности рХн Сам по сравнению с рХн Vos, подтверждаются результатами изучения ПА этих ферментов непосредственно в сырах [22].

Таким образом, общая ПА полученного в данной работе рХн Сег оказалась выше, чем ПА рХн Vos и рХн Сам в 1.14 и 3.79 раза соответственно. Совокупность высокой ПА и малой удельной МА, обуславливает низкую специфичность рХн Сег. Это ограничивает его применение производством сыров с короткими сроками созревания и хранения. Для повышения специфичности и универсальности рХн Сег, требуется существенное увеличение его удельной МА. В случае ее повышения в 3–5 раз, рХн Сег сможет конкурировать по специфичности с одним из эталонных МФ – рХн Vos.

Термостабильность является важной характеристикой любого нового МФ, поскольку коагулянт с высоким порогом термоинактивации может проявлять нежелательную ПА на стадиях выработки сыров, связанных с повышением температуры на-

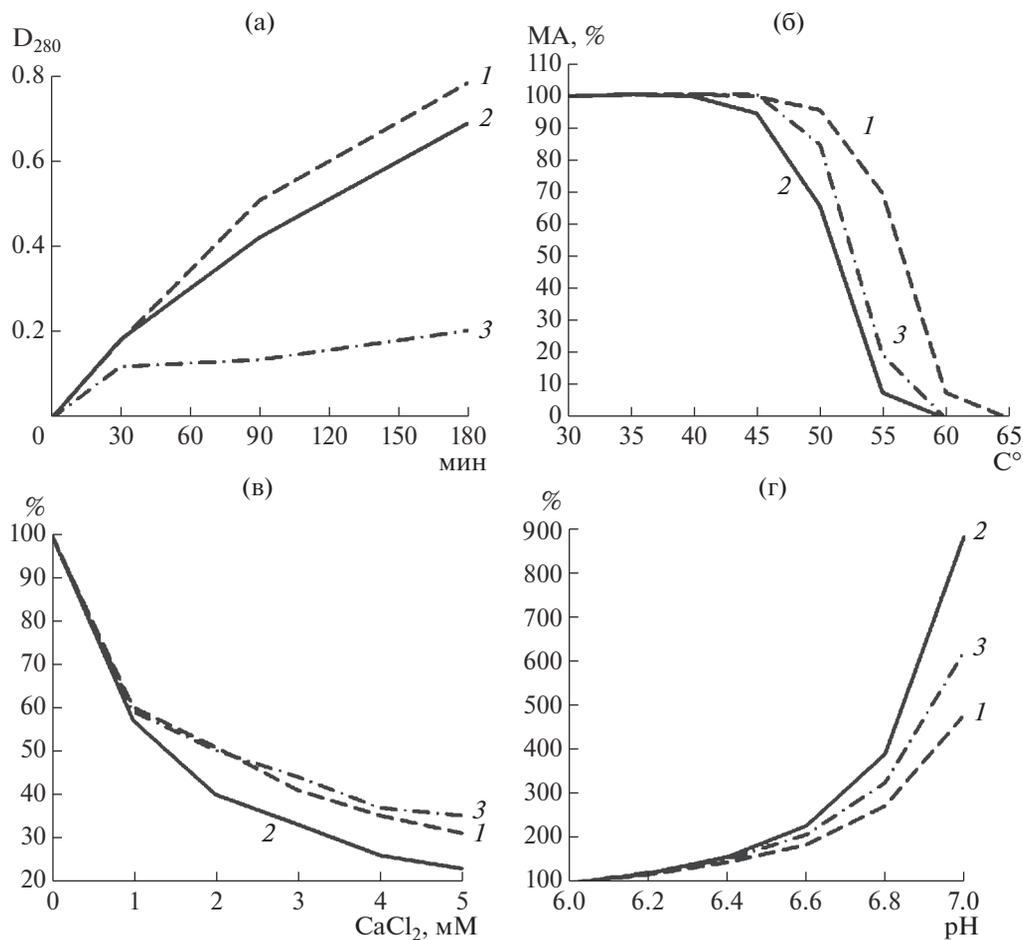


Рис. 4. Результаты сравнительного изучения зависимостей общей протеолитической активности (D_{280}) от продолжительности инкубации (а), остаточной молокосвертывающей активности (МА, %) от температуры прогревания (б), продолжительности коагуляции молочного субстрата (%) от концентрации хлорида кальция (в) и рН (г); 1 – рХн марала, 2 – рХн коровы, 3 – рХн одногорбого верблюда.

гревания, а также при длительном созревании и хранении готовой продукции. Активность химозинов, остающихся в сырном зерне после удаления сыворотки, вносит весомый вклад в “протеолитическое созревание” различных видов сыров, от мягких до сверхтвердых. Например, таких, как Camembert [23], Beyaz Peynir [24], Maasdam [25], Grana Padano [26], Parmigiano Reggiano [27, 28]. Используя информацию о диапазоне температурной устойчивости коагулянта молока можно регулировать степень протеолиза и сроки созревания сыров как путем варьирования температуры обработки сырного зерна, так и за счет применения МФ с различной ТС [25].

Согласно данным работы [2] общая ПА рХн Bos и рХн Sam увеличивалась при повышении температуры. Максимальную ПА рХн Sam проявлял при 55.0°C, а рХн Bos – при 52.5°C. При выработке сыров типа Reggiano с их применением увеличение температуры нагревания сгустка с 50 до 56°C приводило к значительному снижению концентрации продуктов протеолиза α 1-казеи-

на. Но даже после повышения температуры второго нагревания до 56°C в созревающих и хранящихся сырах, выработанных с применением более термостабильного рХн Sam, интенсивность протеолиза была выше, чем при использовании рХн Bos. И это несмотря на то, что общая ПА рХн Sam в 3.5–4.0 раза ниже, чем у рХн Bos [2, 22].

Термостабильность рХн одного и того же вида, полученного в разных системах экспрессии, может различаться. Так, пороги полной температурной инактивации рХн Sam, экспрессированного в клетках высших плесневых грибах (*A. niger*) [2] и дрожжей (*P. pastoris*) [22], отличались на 10°C, что указывало на возможную роль посттрансляционных модификаций в формировании температурной устойчивости фермента.

Порогом термоинактивации считали T (°C), при которой МФ сохранял не менее 80% от исходной коагуляционной активности. Согласно этому критерию порог ТС для рХн Bos составил 50°C, а для рХн Ser и рХн Sam – 55°C. Несмотря

Таблица 4. Остаточная молокосвертывающая активность (%) рекомбинантных химозинов марала, коровы и одиногорбого верблюда при различных температурах прогревания

Препарат	Молокосвертывающая активность, %							
	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C
рХн Сег	100	101 ± 3	101 ± 3	100 ± 3	96 ± 1	70 ± 2	8 ± 1	0
рХн Vos	100	101 ± 3	100 ± 2	95 ± 5	66 ± 8	8 ± 5	0	н.д.*
рХн Сам	100	101 ± 5	101 ± 6	101 ± 5	85 ± 5	20 ± 1	0	н.д.*

* Не определяли.

на одинаковый порог термоинактивации, ферменты марала и верблюда различались по динамике снижения МА в диапазоне температур 50–60°C (рис. 4б). После прогревания при 55°C коагуляционная активность рХн Сег оказалась в 3.5 раза выше, чем у рХн Сам. Это свидетельствовало о более высокой температурной стабильности рХн Сег по сравнению с рХн Сам. Следует также отметить, что эталонные химозины полностью инактивировались после прогревания при 60°C в то время, как рХн Сег при этой температуре еще сохранял примерно 8% от исходной МА (табл. 4).

В системе экспрессии *E. coli* (штамм BL21(DE3)), ранее были получены рХн альпака и рХн Vos, которые на 10–15°C превосходили по ТС контрольный коммерческий рХн Vos, продуцируемый в эукариотической системе *A. niger* var. *awamori* [9]. Можно предположить, что повышенная ТС рХн Сег также обусловлена особенностями посттрансляционного процессинга эукариотического фермента, синтезируемого в прокариотической системе экспрессии.

Таким образом, порог термоинактивации рХн Сег составил 55°C, что на 5°C превосходит данный показатель для рХн Vos. Несмотря на то, что порог термоинактивации рХн Сам и рХн Сег был одинаковым, скорость снижения МА верблюжьего фермента после прогревания при 55°C оказалась в 3.5 раза выше, чем у рХн Сег. Это позволяет считать рХн Сег более термостабильным. Повышенная, по сравнению с эталонными ферментами ТС ограничивает сферу применения рХн Сег и предполагает его использование, прежде всего, в производстве сыров с короткими сроками созревания и хранения.

Зависимость МА от концентрации хлорида кальция. Большинство видов сыров вырабатывается из пастеризованного молока. При высокотемпературной обработке необратимо осаждаются часть присутствующих в молоке солей кальция. В результате этого концентрация ионизированного кальция снижается, что приводит к увеличению продолжительности образования молочного сгустка под действием МФ. Для того, чтобы избежать повышения дозы вносимого МФ и улучшить коагуляционную способность пастеризованного молока в него вносят ≈1–4 мМ CaCl₂ [29].

Важно отметить, что увеличение концентрации CaCl₂ в молочном субстрате особенно на стадии свертывания молока вызывает повышение не только коагуляционной активности, но и общей ПА фермента [30]. Поэтому использование МФ с высокой чувствительностью к концентрации Ca²⁺ связано с опасностью негативных последствий увеличения его общей ПА. В связи с этим необходимо, чтобы любой новый коагулянт молока по чувствительности к концентрации Ca²⁺ был эквивалентен современным эталонным ферментам – рХн Vos и рХн Сам.

Все исследованные рХн увеличивали МА в ответ на повышение концентрации CaCl₂ в диапазоне 0–1 мМ, при этом время образования сгустка сокращалось на 40.5–44.8% (табл. 5). Однако на дальнейшее повышение концентрации CaCl₂ ферменты реагировали по-разному. Наиболее чувствительным к увеличению содержания Ca²⁺ в молоке оказался рХн Vos. При повышении концентрации хлорида кальция с 2 до 5 мМ его МА увеличивалась в 2.5–4.5 раза. Коагуляционная активность рХн Сег и рХн Сам в меньшей степени зависела от нарастания концентрации CaCl₂. По чувствительности к изменениям концентрации ионов кальция в молоке оба фермента оказались похожими (рис. 4в). В диапазоне 2–5 мМ CaCl₂ продолжительность образования молочных сгустков при действии рХн Сег и рХн Сам сокращалась в 2.0–3.1 раза.

Полученные данные, позволили сделать вывод о том, что по чувствительности коагуляционной активности к концентрации CaCl₂ в молоке рХн Сег не уступает эталонным генно-инженерным коагулянтам и полностью соответствует требованиям сыроделия.

Зависимость МА от pH субстрата. Продолжительность коагуляции молока под действием МФ зависит от электростатических и гидрофобных свойств мицелл казеина, которые связаны с концентрацией ионов водорода. При подкислении молока суммарный отрицательный заряд казеинов снижается, вследствие приближения pH к значениям их pI. Это уменьшает силы электростатического отталкивания между мицеллами и одновременно усиливает казеин-казеиновые гидрофобные взаимодействия, что способствует

Таблица 5. Продолжительность коагуляции (%) при различных концентрациях CaCl₂ (мМ) в молоке

Препарат	Продолжительность коагуляции, %					
	0 мМ	1 мМ	2 мМ	3 мМ	4 мМ	5 мМ
pXн Cег	100	59.5 ± 0.9	50.6 ± 0.7	41.0 ± 0.6	35.6 ± 1.3	31.9 ± 1.5
pXн Vos	100	55.2 ± 1.3	39.7 ± 0.9	31.6 ± 1.0	25.6 ± 0.9	22.3 ± 0.6
pXн Сам	100	58.0 ± 0.6	49.7 ± 0.9	42.6 ± 1.0	37.2 ± 1.4	35.1 ± 1.0

Таблица 6. Продолжительность коагуляции (%) при различных значениях pH молока

Препарат	Продолжительность коагуляции, %					
	pH 6.0	pH 6.2	pH 6.4	pH 6.6	pH 6.8	pH 7.0
pXн Cег	100	120.0 ± 4.0	146.9 ± 4.5	187.7 ± 9.5	276.2 ± 12.9	480.0 ± 5.8
pXн Сам	100	124.8 ± 3.8	155.4 ± 2.4	208.9 ± 2.4	326.7 ± 6.5	624.8 ± 35.3
pXн Vos	100	121.3 ± 8.2	158.7 ± 7.8	230.2 ± 12.7	392.1 ± 12.7	885.7 ± 42.6

ускорению образования молочного сгустка [21]. В случае нарастания pH казеин-казеиновые гидрофобные взаимодействия ослабевают, поскольку суммарные отрицательные заряды казеинов увеличиваются. Растущие силы электростатического отталкивания препятствуют сближению одноименно заряженных казеиновых мицелл и замедляют образование сычужного сгустка.

Оптимумы действия химозинов различных видов животных находятся в диапазоне pH 4.5–5.5 [<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.23.4>]. Однако при выработке большинства видов сычужных сыров МФ вносится в молочную смесь при pH 6.5–6.6. В связи с этим, одним из требований к любому новому МФ для сыроделия является способность эффективно коагулировать молоко в слабокислом диапазоне pH, удаленном от pH-оптимума.

Наименьшую чувствительность к увеличению pH молока в диапазоне 6.0–7.0 продемонстрировал pXн Cег, а наибольшую – pXн Vos (рис. 4г). В диапазоне pH 6.0–6.4 все ферменты проявляли близкую МА. При pH 6.6 продолжительность свертывания молока для pXн Cег, pXн Сам и pXн Vos увеличивалась в 1.9, 2.1 и 2.3 раза соответственно (табл. 6). Полученные результаты согласуются с данными других публикаций, в которых были показаны аналогичные зависимости продолжительности свертывания от pH молочного субстрата для pXн Vos, pXн Сам и pXн альпака [2, 4, 9, 30].

Результаты исследования свидетельствуют о том, что pXн марала способен эффективно свертывать коровье молоко при pH 6.5–6.6 и не уступает по этому показателю коммерческим генно-инженерным химозинам.

Таким образом, в прокариотической системе экспрессии *E.coli* (штамм SHaffle express) получен pXн Cег. Оптимальными условиями для достижения максимального выхода pПроXн Cег в тельцах включения были: концентрация изопропил-β-D-

1-тиогалактопиранозид, равная 10 мМ, температура культивирования продуцента – 25°C и продолжительность культивирования – 6 ч с момента внесения индуктора.

Исследован комплекс биохимических свойств pXн Cег, важных для использования при производстве сычужных сыров. По чувствительности МА к изменениям pH и концентрации хлорида кальция в молоке, pXн Cег оказался сопоставимым с эталонными МФ и по данным показателям полностью соответствует требованиям сыроделия. По удельной МА, общей ПА, специфичности и ТС pXн Cег уступает коммерческим эталонным ферментам, что ограничивает его применение производством сыров с короткими сроками созревания и хранения. Можно предположить, что продукция pXн Cег в эукариотической системе, не требующей проведения рефолдинга целевого белка и обеспечивающей качественно иной уровень посттрансляционной модификации, позволит в дальнейшем улучшить его биохимические показатели, важные с точки зрения современного сыроделия и расширить область его применения.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Uniacke-Lowe T., Fox P.F.* Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Oxford, UK: Elsevier, Acad. Press, 2017. P. 69–113.
2. *Kappeler S.R., van den Brink H.(J.)M., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhan Z., Hansen E.B., Johansen E.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. V.2. № 342. P. 647–654.
3. *Rogelj I., Perko B., Francky A., Penca V., Purgenčar J.* // J. Dairy Sci. 2001. V. 84. № 5. P. 1020–1026.
4. *Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G.* // J. Dairy Sci. 2012. V. 95. № 2. P. 609–613.

5. Vega-Hernandes M.C., Gomes-Coello A., Villar J., Claverie-Martin F. // J. Biotechnol. 2004. V. 114. № 1–2. P. 69–79.
6. Liu W.-G., Wang Y.-P., Zhang Z.-J., Wang M., Lv Q.-X., Liu H.-W., Lu M. // Protein Expr. Purif. 2017. V. 135. P. 78–82.
7. Ersöz F., İnan M. // Protein Expr. Purif. 2019. V. 154. P. 126–133.
8. Tyagi A., Kumar A., Mohanty A.K., Kaushik J.K., Grover S., Batish V.K. // LWT-Food Sci. Technol. 2017. V. 84. P. 733–739.
9. Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Kriger A.V., Belov A.N., Koval A.D., Elchaninov V.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. № 6. P. 569–576.
10. Wei C., Tang B., Zhang Y., Yang K. // Biochem. J. 1999. V. 340. № 1. P. 345–351.
11. Ельчанинов В.В. // Сыроделие и маслоделие. 2006. № 4. С. 42–44.
12. Ельчанинов В.В., Уманский М.С., Белов А.Н., Коваль А.Д., Шелепов В.Г. // Сыроделие и маслоделие. 2005. № 4. С. 13–16.
13. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
14. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72 № 1–2. P. 248–254.
15. Lobstein J., Emrich C.A., Jeans C., Faulkner M., Riggs P., Berkmen M. // Microb. Cell Fact. 2012. V. 11. № 1. P. 56.
16. Studier F.W., Moffatt B.A. // J. Mol. Biol. 1986. V. 189. № 1. P. 113–130.
17. Chen H., Zhang G., Zhang Y., Dong Y., Yang K. // Biochem. 2000. V. 39. № 40. P. 12140–12148.
18. Wei C., Zhang Y., Yang K. // J. Protein Chem. 2000. V. 19. № 6. P. 449–456.
19. Eskandari M.H., Hosseini A., Zarasvand S.A., Aminlari M. // Food Biotechnol. 2012. V. 26. № 2. P. 143–153.
20. Singh T.K., Drake M.A., Cadwallader K.R. // Compr. Rev. Food Sci. Food Safety. 2003. V. 2. № 4. P. 166–189.
21. Harboe M., Broe M.L., Qvist K.B. Technology of Cheesemaking. N.Y.: J. Wiley & Sons, 2010. P. 98–129.
22. Costabel L.M., Bergamini C.V., Pozza L., Cuffia F., Candiotti M.C., Hynes E. // J. Dairy Res. 2015. V. 82. № 3. P. 375–384.
23. Mane A., McSweeney P.L.H. // J. Food Biochem. 2020. V. 44. № 1. P. e13101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfbc.13101>
24. Gumus P., Hayaloglu A.A. // J. Dairy Sci. 2019. V. 102. № 7. P. 5945–5956.
25. Lamichhane P., Sharma P., Kennedy D., Kelly A.L., Sheehan J.J. // Food Res. Int. 2019. V. 125. P. 108525 (doi). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108525>
26. Masotti F., Hogenboom J.A., Rosi V., De Noni I., Pellegrino L. // Int. Dairy J. 2010. V. 20. № 5. P. 352–359.
27. D’Incecco P., Limbo S., Hogenboom J., Rosi V., Gobbi S., Pellegrino L. // Foods. 2020. V. 9. P. 268 <https://doi.org/10.3390/foods9030268>
28. Sforza S., Cavatorta V., Lambertini F., Galaverna G., Dossena A., Marchelli R. // J. Dairy Sci. 2012. V. 95. № 7. P. 3514–3526.
29. Майоров А.А., Мироненко И.М., Байбикова А.А. // Сыроделие и маслоделие. 2011. № 2. С. 19–23.
30. Wang N., Wang K.Y., Li G., Guo W., Liu D. // Protein Expr. Purif. 2015. V. 111. P. 75–81.

Preparation of Recombinant Chymosin of Maral (*Cervus elaphus sibiricus* Severtzov) in Prokaryotic Expression System and Investigation of the Complex of Its Biochemical Properties, Important for Cheesemaking

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

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

^bNovosibirsk state University, Novosibirsk, 630090 Russia

^cAltai State University, Barnaul, 656049 Russia

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

*e-mail: ve3636@yandex.ru

In the expression system of *Escherichia coli* (SHaffle express strain), recombinant chymosin (rCn) of maral (rCn Cer) was obtained and its biochemical properties, important from the point of view of cheese-making, were studied. The highest content of recombinant maral prochymosin in the inclusion bodies was observed at 10 mM of isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside and cultivation of the producer at 25°C for 6 hours after the introduction of the inductor. The biochemical properties of rCn Cer were compared with the rCn of a cow (rCn Bos) and a single-humped camel (rCn Cam). The total proteolytic activity (PA) of the rCn Cer was comparable to that of the rCn Bos, but approximately 3.8 times higher than the rCn Cam PA. The temperature stability (TS) of the rCn Cer was 5–10°C higher than the TS rCn Bos and rCn Cam. The threshold for temperature inactivation of rCn Cer was 55°C. The dependence of the coagulation activity of rCn Cer on the pH and the concentration of calcium chloride in cow’s milk met the criteria for using milk-clotting enzymes in the production of rennet cheeses. High PA and TS limit the scope of application of the rCn Cer to the only production of cheeses with short maturation and storage periods.

Keywords: recombinant chymosin of maral, milk-clotting activity, proteolytic activity, thermal stability, pH, concentration of calcium chloride, cheesemaking

УДК 577.112.083

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМОЗИНА В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *Komagataella phaffii*

© 2020 г. С. Ю. Филькин¹, Н. В. Чертова¹, Е. А. Вавилова¹, С. С. Зацепин¹,
М. А. Эльдаров², Э. Г. Садыхов¹, А. Н. Фёдоров¹, А. В. Липкин¹, *

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

²Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

*e-mail: lipus57@yahoo.com

Поступила в редакцию 15.05.2020 г.

После доработки 30.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

Получен эффективный рекомбинантный штамм *Komagataella phaffii*, с высоким выходом продуцирующей прохимозин *Bos taurus*. Разработан метод выделения и очистки рекомбинантного химозина, включающий двухстадийную очистку методами ионнообменной и гидрофобной хроматографии. Получен препарат высокоочищенного (~90%) рекомбинантного химозина с концентрацией 4 мг/мл (1000 ИМСУ/мл) с выходом 62%. Разработанная методика может быть использована при промышленном производстве фермента.

Ключевые слова: химозин, метилотрофные дрожжи, *Pichia pastoris*, *Komagataella phaffii*

DOI: 10.31857/S0555109920060057

Химозин (КФ 3.4.23.4) – аспартатная эндопептидаза обладает специфической протеолитической активностью в отношении пептидной связи Phe105–Met106 [1]. Результатом проявления протеолитической активности химозина является формирование молочного сгустка, что чрезвычайно важно при изготовлении продукции в сыроделии и пищевой промышленности. Штаммы-продуценты на основе *Aspergillus niger* [2] и *Kluyveromyces lactis* [3] активно используются в современной промышленности для продукции рекомбинантного химозина. Создание эффективных штаммов-продуцентов ферментов на основе *Komagataella phaffii* (ранее – *Pichia pastoris*) является важной прикладной задачей промышленной биотехнологии [4, 5].

Ранее была оптимизирована нуклеотидная последовательность для экспрессии в *K. phaffii* [6], получены клоны штамм-продуцентов [7], разработаны методы культивирования при использовании технического глицерина [8]. Однако, достигнутые уровни продуктивности штамм-продуцентов не соответствуют достигнутым уровням в промышленных штаммах-продуцентах *A. niger* и *K. lactis*. Существующие методы позволяют оптимизировать штаммы-продуценты *K. phaffii* как в результате оптимизация метаболизма с увеличением выхода промежуточных интермедиатов и

конечных метаболитов; улучшения механизма геномных интеграций, позволяющих увеличить эффективность встраивания экспрессионных каскадов; оптимизации мультикопийных инсерций методами генетической инженерии; геномного редактирования методами CRISPR/Cas9; коэкспрессии генов для улучшения внутриклеточного транспорта и секреции, а также коэкспрессии шаперонов для улучшения белкового фолдинга [9].

Цель работы – получение высокоэффективного штамма-продуцента химозина в *K. phaffii* и разработка методов выделения и очистки для использования в промышленной биотехнологии.

МЕТОДИКА

Материалы. Для получения штамма-продуцента использовали ген прохимозина В *Bos taurus* (GenBank: E05472.1). Оптимизация последовательности и химический синтез целевого гена выполнены компанией “Twist Bioscience” (США). Ген был получен в составе вектора pTwist (Amp). Реактивы для питательных сред – фирмы “Sigma-Aldrich” (США).

Конструирование вектора для экспрессии прохимозина. Вектор pPICZalphaA (“Thermo Fisher Scientific”, США) был использован для получения секретируемого прохимозина В. Вектор содержал

промотор AOX1 и фактор внеклеточной селекции *Saccharomyces cerevisiae* [10]. Ген прохимозина В и экспрессионный вектор pPICZalphaA были поочередно обработаны эндонуклеазами рестрикции EcoRI и NotI (“Thermo Fisher Scientific”, США), после чего лигированы по образовавшимся “липким” концам лигазой фага T4 (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Трансформация *P. pastoris*. Вектор pPICZalphaA с встроенным геном прохимозина В был предварительно линейаризован по сайту рестрикции *SacI*. Для создания экспрессионного штамма использовали клетки *K. phaffii* штамма X-33 (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Приготовление электрокомпетентных клеток осуществляли согласно протоколу трансформации (http://tools.thermofisher.com/content/sfs-manuals/easysselect_man.pdf). После электропорации клетки инкубировали 1 ч при 30°C в 1.0 мл 1.0 М сорбитола и высевали на чашки с агаризованной средой, следующего состава (%): дрожжевой экстракт – 1.0, пептон – 2.0, глюкоза – 2.0 и 1.0 М сорбитол, а также различные концентрации зеопина (200, 500, 750, 1000 мкг/мл).

Селекция трансформантов. Отобранные трансформанты штамма *K. phaffii* X-33, устойчивые к зеопину, анализировали на наличие вставки гена *Chum1* методом ПЦР-скрининга с олигонуклеотидами Хим1 5'-GAATTCGCTGAAAT-TACTAGAATCCCATTG-3' и Хим2 5'-GCGGCCGCT-TAAATAGCTTTAGC-3' (“Евроген”, Россия). По результатам селекции и ПЦР-скрининга были отобраны клоны с встроенным геном прохимозина В.

Культивирование трансформантов. Для получения инокулята трансформированные клетки выращивали в течение 24 ч при 30°C в шейкере-инкубаторе “Innova 43R”, (“New Brunswick Scientific”, США) при 250 об./мин в жидкой питательной среде YPD (%), дрожжевой экстракт – 1.0, триптон – 1.5, глюкоза – 1.0), как описано ранее [4]. Полученным инокулятом засевали пробирки со средой YPD (5 мл) в соотношении 1 : 10, и выращивали при 30°C и 250 об./мин в течение 96 ч. Через каждые 24 ч культивирования добавляли 1.0% метанола. После окончания культивации определяли активность ферментов в культуральной жидкости.

Определение активности химозина в культуральной жидкости. Для активации химозина из культуральной жидкости (КЖ) каждого выбранного клона после культивирования отбирали по 1 мл, добавляли 100 мкл 1.0 М HCl, инкубировали 2 ч, а затем восстанавливали pH до 5.5 добавлением 90 мкл 1.0 М NaOH с последующей инкубацией в течение 2 ч. Активность химозина определяли в соответствии с ранее разработанной методикой определения молоко-свертывающей

активности [11]. Сухое обезжиренное молоко (“Промакс”, Россия) было восстановлено в виде 26%-ного раствора с добавлением 0.5 г/л CaCl₂, pH 6.5. Молоко перемешивали при 25°C в течение 30 мин и инкубировали при 37°C 20 мин. К 1 мл восстановленного обезжиренного молока, содержащего 0.1 г/мл хлорида кальция добавляли 100 мкл КЖ после активации химозина. Определяли время образования сгустка при 37°C. В качестве положительного контроля использовали контрольный раствор с известной активностью химозина (“Proquiga”, Испания) 600 IMCU/мл (IMCU – International milk clotting units, международные единицы свертываемости молока, ГОСТ 11815-2015).

ДСН-электрофорез белков. Электрофоретический анализ белков осуществляли в денатурирующем полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) по Лэммли [12]. В качестве маркеров молекулярного веса использовали FastRuler Middle Range DNA Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США). Концентрацию химозина определяли денситометрическим методом.

Культивирование штамма – продуцента прохимозина в ферментере. Для культивирования штамма-продуцента прохимозина использовался ферментер “Biostat B+” (“Sartorius”, Германия) объемом 2 л. Для получения посевной культуры штамм-продуцент выращивали в течение 1 сут в шейкере-инкубаторе при 30°C и 250 об./мин на среде VMGY, следующего состава (%): дрожжевой экстракт – 1.0, глицерин – 1.0, пептон – 2.0, дрожжевых азотистых оснований – 1.34, 100 мМ калий-фосфатный буфер, pH 6.0. Засев ферментера осуществляли из 1 колбы (150 мл среды), культивирование проводили на минеральной среде с глицерином, следующего состава (г/л): глицерин – 70, KH₂PO₄ – 9.9, (NH₄)₂SO₄ – 15.7, г/л MgSO₄ – 4.6, CaCl₂ – 0.35, биотин – 4.0, PTM1 – 0.972%, пеногаситель Софэксил (“Софэкс-Силикон”, Россия) – 0.1%, при 30°C. После добавления метанола температуру снижали до 26°C. При выращивании на среде с глицерином поддерживали pH среды 4.0, после индукции метанолом значение pH меняли на 5.5. Сорбитол (2.0%) добавляли одновременно с индукцией метанолом через 24 и 48 ч. Добавление метанола осуществляли раз в три часа до его содержания в среде 1.0%. Для этого использовали 50%-ный раствор метанола с 2.2%-ным PTM1. Автоматическое поддержание значения pH среды осуществляли титрованием 10%-ными растворами NH₄OH и H₂SO₄.

Очистка и получение химозина. Для очистки рекомбинантного химозина использовали сочетание методов ионообменной хроматографии с методами хроматографии гидрофобных взаимодействий. На первом этапе культуральную жидкость отделяли от клеток центрифугированием при

16000 g 15 мин при 4°C. После этого культуральную жидкость разбавляли в отношении 1 : 3 50 мМ фосфатным буфером, pH 5.5, и наносили на колонку с DEAE-Sepharose (“GE Healthcare”, США), предварительно уравновешенную 50 мМ фосфатным буфером, pH 5.5. Элюцию проводили 0.3 М NaCl. К полученным активным фракциям добавляли 5 М NaCl до концентрации 2.0 М NaCl. Полученный раствор наносили на колонку с Phenyl-Sepharose (“GE Healthcare”, США), предварительно уравновешенную 2 М NaCl в 50 мМ Na₂HPO₄, pH 5.5. Элюцию проводили 50 мМ Na₂HPO₄, pH 5.5. Полученные фракции объединяли и анализировали ДСН-ПААГ-электрофорезом.

Статистическая обработка результатов. Данные по ферментативной активности были измерены в 5 повторностях. Статистическая обработка проведена в “Origin 2015” (OriginLab Corporation, США). Для количественных переменных результаты представлены в виде среднего арифметического (\bar{M}) с указанием среднеквадратического отклонения ($\pm SD$), на графиках указан 95% доверительный интервал (CI).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Селекция трансформантов *K. phaffii*. Отобранные после трансформации клоны, несущие ген прохимозина В, названные pPICZ α -Chym1, проанализировали ПЦР-скринингом на наличие вставки. Результаты представлены на рис. 1. Клоны pPICZ α -Chym1 проверяли на возможность проявлять молокосвертывающую активность. Более 75% клонов проявляли ферментативную активность в диапазоне 0.1–5 ИМСУ/мл (рис. 2). Клоны с наибольшей активностью химозина были получены при концентрации зеоцина 750 мкг/мл.

Динамика экспрессии химозина. Для подбора оптимальных условий культивирования в колбах были отобраны 6 клонов с максимальной активностью химозина. При культивировании в колбах (250 об./мин, 30°C) в течении 96 ч при добавлении 50%-ного раствора метанола до конечной концентрации метанола в культуральной среде 1.0% ферментативная активность была на уровне 12.5 ИМСУ/мл. Индукция в среде ВММУ (см. “Методику”) с добавлением 1.0% аскорбиновой кислоты не меняла активность конечного препарата. Однако, добавление 2.0 г/л сорбитола в среду ВММУ с одним из выбранных клонов повышало активность конечного препарата до 20 ИМСУ/мл. Отобранный клон в дальнейшем использовался для оптимизации культивирования в ферментере.

Культивирование дрожжей *K. phaffii* в ферментере. Дрожжи выращивали в ферментере до OD₆₀₀, равной 285. При этом OD₆₀₀ после индукции метанолом значительно не менялась. Для повышения

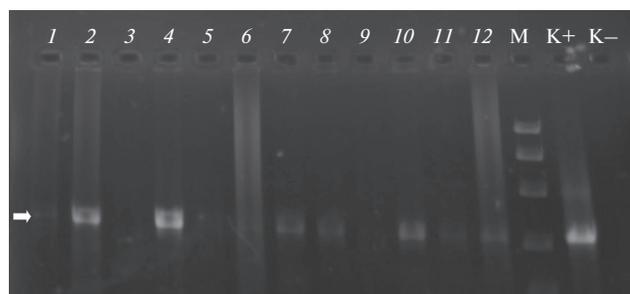


Рис. 1. Результат ПЦР-скрининга клонов *K. phaffii* после трансформации. М – маркеры молекулярной массы, 1–12 – клоны после трансформации конструкцией pPICZ α -Chym1; K+ – положительный и K– – отрицательный контроль ПЦР. Стрелка указывает положение фрагмента ДНК химозина.

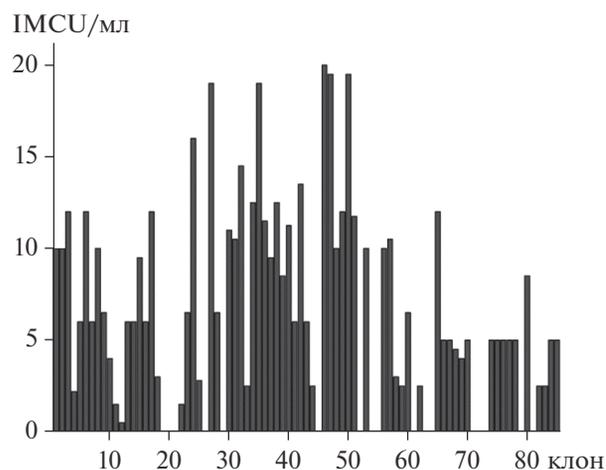


Рис. 2. Молокосвертывающая активность химозина в КЖ клонов *K. phaffii*, выращенных на среде YPD, содержащей зеоцин, при индукции 1%-ным метанолом в течении 72 ч. Клоны 1–10 – 200 мкг/мл зеоцина; клоны 11–20 – 500 мкг/мл зеоцина; клоны 21–60 – 750 мкг/мл зеоцина; клоны 61–85 – 1000 мкг/мл зеоцина.

выхода конечного продукта были протестированы различные режимы ферментации и варианты добавок к основной среде. Максимальный выход продукта (80 мг/л) наблюдался при ферментации pPICZ α -Chym1 в течении 96 ч с двукратным добавлением раствора сорбитола 2.0 г/л через 24 и 48 ч (рис. 3). Полученный выход целевого продукта по уровню экспрессии соответствовал аналогичным разработкам [8]. Добавки сорбитола – одна из стратегий повышения уровня экспрессии при использовании AOX1 промотора [13]. Такая стратегия характерна прежде всего для штаммов-продуцентов с мультикопийной вставкой гена целевого продукта. Оптимизация соотношения метанол/сорбитол позволила добиться в целом более высокого уровня продукции химозина за счет

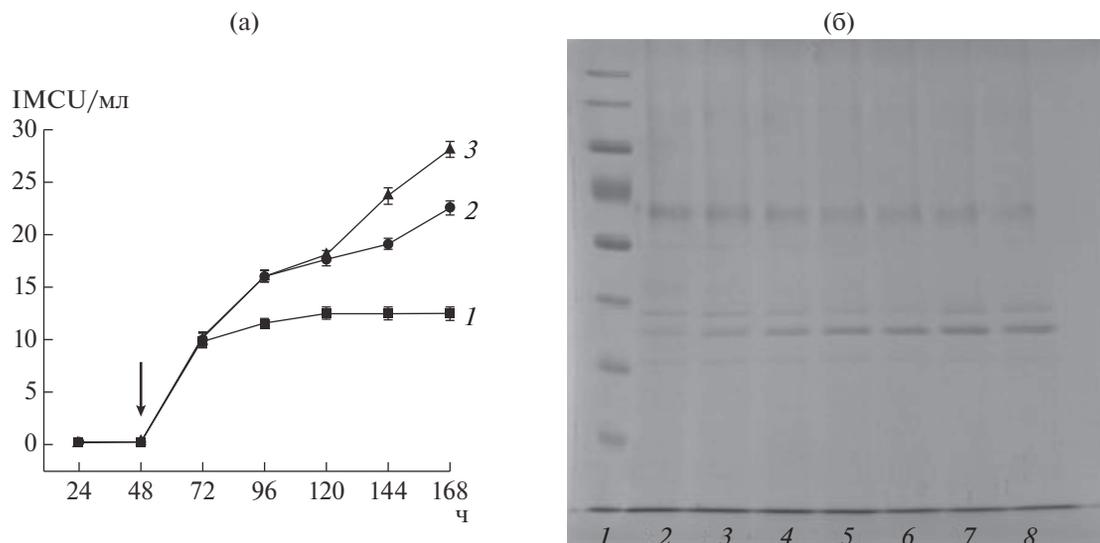


Рис. 3. Биосинтез химозина рPIC α -Chym1 в биореакторе (а) и электрофореграмма КЖ в процессе роста культуры (б). а: 1 – минеральная среда, 2 – та же среда с двукратным добавлением сорбитола по 1.0 г/л, 3 – та же среда с двукратным добавлением сорбитола 2 г/л; стрелкой показано остановка подпитки сорбитолом и начало индукции. б: 1 – маркеры молекулярной массы, 2–8 – 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 ч от начала добавления смеси метанол/сорбитол соответственно; стрелкой обозначена полоса, соответствующая зрелой форме химозина.

улучшения углеводного метаболизма и увеличения биомассы.

Очистка рекомбинантного химозина. Полученную после ферментации КЖ отделяли от клеточной массы центрифугированием и проводили рН-зависимую активацию химозина. Для этого к 400 мл КЖ добавляли 40 мл 1.0 М HCl до значения рН 2.0. При низких значениях рН происходила автокаталитическая активация прохимозина до химозина в результате отщепления N-концевого пептида из 42 аминокислотных остатков. После 2 ч инкубации рН восстанавливали до значения 5.5 добавлением 40 мл 1.0 М NaOH.

Химозин выделяли из КЖ на первом этапе методом анионообменной хроматографии на DEAE-Sepharose. Были подобраны оптимальные условия разбавления в соотношении 1 : 3 КЖ : 50 мМ фосфатный буфер, рН 5.5, при котором удавалось до-

биться максимального связывания химозина с хроматографическим сорбентом с последующей его элюцией. В результате проведенной анионообменной хроматографии раствор химозина удалось сконцентрировать в 5 раз и удалить при этом большинство примесей.

Для следующего этапа очистки использовали хроматографическую колонку с Phenyl-Sepharose объемом 5 мл. К раствору химозина добавляли 5.0 М раствор NaCl до конечной 2.0 М концентрации соли. Хроматографическую колонку Phenyl-Sepharose предварительно уравнивали 50 мМ раствором Na₂HPO₄, рН 5.5, с 2.0 М NaCl. После проведения элюции получали раствор химозина, очищенный в 28 раз, содержащий 85–90% активного белка (табл. 1.). Результаты хроматографической очистки приведены на рис. 4. Суммарные потери по белку на всех этапах активации,

Таблица 1. Стадии выделения и очистки химозина

Стадии очистки	Общее количество химозина, мг	Активность химозина, IMCU/мл	Удельная активность химозина, IMCU/мг белка	Выход химозина по белку, %	Чистота препарата по белку, %
Супернатант КЖ	44	5	7.8	100	30
Супернатант после активации	43.1	42 ± 5	66	95	32
Анион-обменная хроматография	34.5	264 ± 10	152	72	60
Хроматография гидрофобных взаимодействий	31.5	1009 ± 12	220	62	85–90

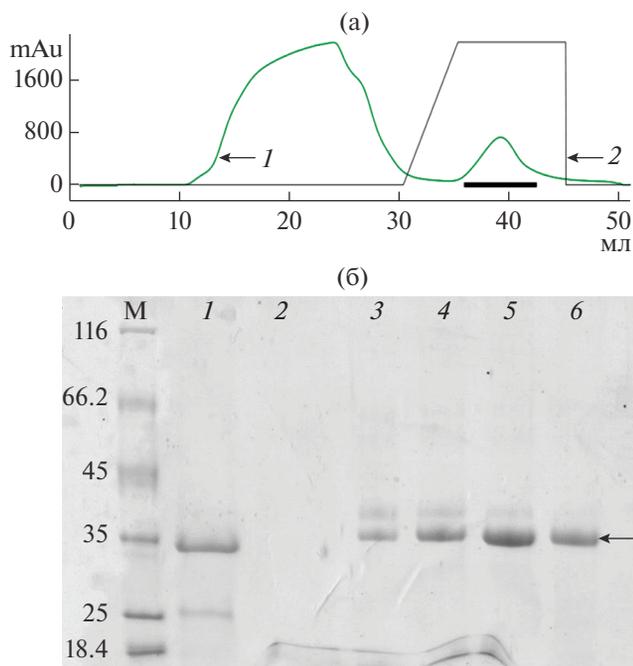


Рис. 4. Очистка рекомбинантного химозина методом хроматографии гидрофобных взаимодействий (а), электрофореграмма фракций (б). а: 1 – OD_{280} , 2 – градиент NaCl; б: М – маркеры молекулярной массы, кДа. 1 – фракция после очистки на DEAE-Sepharose, 2 – не адсорбированная фракция, 3–6 объединенные фракции (36–42 мл). Стрелкой указана полоса, соответствующая зрелой форме химозина.

выделения и очистки составили 38% (табл. 1). Конечный образец удалось сконцентрировать в 44 раза, при этом удельная активность полученного химозина составила 220 ИМСУ/мг.

Полученный рекомбинантный химозин быка обладал физико-химическими свойствами, сопоставимыми с природным химозином и ранее полученными рекомбинантными аналогами химозина быка в *K. phaffii* [8]. При этом рекомбинантный химозин проявлял максимальную активность в диапазоне температур 30–38°C при pH 5.5–5.8. Хранение очищенного фермента при температуре 4°C 30 сут приводило к незначительной потере активности. Хранение при температуре 20°C 30 сут приводило к потере 30% активности.

Использование системы экспрессии *K. phaffii* под контролем промотора АОХ1, индуцируемого метанолом, активно применяется в различных технологических процессах, связанных получением ферментов для промышленности [4]. Тем не менее, в будущем возможно создание штаммов-продуцентов рекомбинантного химозина в системе экспрессии *K. phaffii* с использованием возможно более “сильного” промотора, не требующего использования метанола в качестве индуктора. Разработка таких штаммов является основой будущих разработок.

В ходе выполнения работы был получен высокоэффективный рекомбинантный штамм метилотрофных дрожжей *K. phaffii*, продуцирующий функционально активный рекомбинантный прохимозин и подобраны условия автокаталитической активации прохимозина до химозина. Для рекомбинантного химозина разработан метод очистки и концентрирования до 4 мг/мл (1000 ИМСУ/мл).

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

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках выполнения работ по соглашению от 26.11.2018 г. № 14.607.21.0207 (УИН RFMEFI60718X0207), ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бельская С.В., Балабова Д.В., Белов А.Н., Коваль А.Д., Щербаков Д.Н., Ельчанинов В.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 4. С. 315–326.
2. Bodie E.A., Armstrong G.L., Dunn-Coleman N.S. // Enzyme Microb. Technol. 1994. V. 16. № 5. P. 376–382.
3. Van den Berg J.A., van der Laken K.J., van Ooyen A.J., Renniers T.C., Rietveld K., Schaap A., Brake A.J., Bishop R.J., Schultz K., Moyer. D. // Nat. Biotechnol. 1990. V. 8. № 2. P. 135–139.
4. Филькин С.Ю., Чертова Н.В., Зенин В.А., Липкин А.В., Садыхов Э.Г., Фёдоров А.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 6. С. 578–585.
5. Filkin S.Y., Chertova, N.V. Zenin V.A., Lipkin A.V., Sichev A.A., Bityak D.S., Sadykhov E.G., Popov V.O., Fedorov A.N. // Prep. Biochem. Biotech. 2020. V. 50. № 6. P. 549–555.
6. Noseda D.G., Recúpero M.N., Blasco M., Ortiz G.E., Galvagno M.A. // Protein Expr. Purif. 2013. V. 92. № 2. P. 235–244.
7. Noseda D.G., Blasco M., Recúpero M., Galvagno M.Á. // Protein Expr. Purif. 2014. V. 104. P. 85–91.
8. Noseda D.G., Recúpero M., Blasco M., Bozzo J., Galvagno. M.Á. // Protein Expr. Purif. 2016. V. 123. P. 112–121.
9. Peña D.A., Gasser B., Zanghellini J., Steiger M.G., Mattanovich D. // Metab. Eng. 2018. V. 50. P. 2–15.
10. Higgins D.R., Busser K., Comiskey J., Whittier P.S., Purcell T.J., Hoeffler J.P. // Methods Mol. Biol. 1998. V.103. P. 41–53.
11. Dunn-Coleman N.S., Bloebaum P., Berka R.M., Bodie E., Robinson N., Armstrong G., Ward M., Przetak M., Carter G.L., LaCost R. // Nat. Biotechnol. 1991. V. 9. № 10. P. 976–981.
12. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
13. Niu H., Jost L., Pirlot N., Sassi H., Daukandt M., Rodriguez C., Fickers P. // Microb. Cell Factories. 2013. V. 12. №. 33.

Optimization of Production Method for Recombinant Chymosin in Methylophilic Yeast *Komagataella phaffii*

S. Y. Filkin^a, N. V. Chertova^a, E. A. Vavilova^a, S. S. Zatsepin^a, M. A. Eldarov^b,
E. G. Sadykhov^a, A. N. Fedorov^a, and A. V. Lipkin^{a, *}

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

^b*Institute of Bioengineering, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology"
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

*e-mail: lipus57@yahoo.com

An effective recombinant strain of *Komagataella phaffii* for *Bos taurus* prochymosin production was obtained. A method for the isolation and purification of recombinant chymosin has been developed, which includes two-stage purification by ion exchange and hydrophobic chromatography. A highly purified (~90%) recombinant chymosin with a concentration of 4 mg/ml (1000 IMCU/ml) was obtained with a yield of 62%. The developed method can be used for the industrial application.

Keywords: chymosin, methylophilic yeast, *Pichia pastoris*, *Komagataella phaffii*

УДК 577.214.622+577.27+615.37

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДЫ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ИЗ ПРОКАРИОТ

© 2020 г. Н. Н. Мордкович¹, А. Н. Антипов¹, Н. А. Огорокова¹,
Т. Н. Сафонова¹, К. М. Поляков², В. П. Вейко¹, *

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 11907 Россия

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия
*e-mail: vladveiko@yahoo.com

Поступила в редакцию 09.06.2020 г.

После доработки 26.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

На основе клеток *Escherichia coli* сконструирована библиотека штаммов-продуцентов рекомбинантных нуклеозидфосфорилaz (NP), их мутантных и гибридных форм из различных мезофильных и экстремофильных микроорганизмов. Показано, что субстраты стабилизируют структуру NP при воздействии температуры, при этом именно неорганический фосфат-ион является решающим в этом процессе. С использованием биоинформатических методов анализа сделано предположение, что N-концевая структура белков во многом определяет термостабильность NP. Сконструирован гибридный белок тимидинфосфорилazы (TRP) из *E. coli*, в котором N-концевой фрагмент (1-62 а. о.) заменен на соответствующий фрагмент TRP из термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus*, показано, что термостабильность полученной гибридной формы TRP повысилась. В первичной структуре уридинфосфорилazы (UDP) из *E. coli* выявлена высококонсервативная аминокислотная последовательность 25-Pro-Gly-Asp-Pro-30 для этих ферментов из мезофильных микроорганизмов. Сконструирована мутантная форма (Asp27Gly) UDP из *E. coli*, которая также характеризовалась повышенной термостабильностью по сравнению с исходной формой. Сделано предположение, что именно архитектура строения фосфат-связывающего сайта у UDP и особенности его функционирования, имеют решающее значение в придании этому ферменту термостабильности.

Ключевые слова: нуклеозидфосфорилazа, сайт-направленный мутагенез, термостабильность

DOI: 10.31857/S0555109920060124

Нуклеозидфосфорилazы (NP) – ферменты катаболизма нуклеозидов, катализирующие обратимый фосфорилиз нуклеозидов до рибозо(дезоксирибозо)-1-фосфата и соответствующего гетероциклического основания. Они присутствуют в клетках практически всех организмов, к ним могут быть отнесены: тимидинфосфорилazа (КФ2.4.2.4, TRP), пуридинфосфорилazа (КФ2.4.2.1, PuNP), уридинфосфорилazа (КФ2.4.2.3, UDP) и др. Выяснено, что NP принимают активное участие в формировании и развитии патологических процессов в клетках млекопитающих (ревматоидный артрит, системная склеродермия, подагра, остеоартроз, онкология и т.д.) [1–3]. Так, для TRP и UDP показано резкое возрастание активности этих ферментов в раковых клетках, что привело к созданию диагностического метода определения трансформированных (раковых) клеток. Обнаружено, что TRP и UDP не только разрушают терапевтические агенты нуклеозидной природы, понижая их потенциал, но также способствуют ангиогенезу

незу опухоли и являются антиапоптотическими факторами. Все вышеуказанные факты переводят NP в разряд мишеней для терапевтического воздействия с целью регуляции или ингибирования их активности [4, 5].

NP нашли применение в ферментативном синтезе (“зеленая химия”) [6] производных нуклеозидов, применяемых в практической медицине в качестве противоопухолевых, противовирусных и противопаразитарных агентов. Было показано, что эти ферменты могут быть успешно использованы для синтеза рибозо(дезоксирибозо)-1-фосфата, как важного исходного интермедиата для проведения энзиматического синтеза модифицированных нуклеозидов [7]. При этом для повышения эффективности их ферментативного синтеза важно проведение всего процесса при повышенных температурах, так как растворимость многих гетероциклических соединений, участвующих в синтезе, недостаточно высокая.

Таблица 1. Олигодезоксирибонуклеотиды, использованные при конструировании гена гибридной формы ТРР (*G. stearothermophilus* – *E. coli*) и амплификации структурной части гена ТРР из *G. stearothermophilus* (GeneBank CP016552.1)

Наименование праймера	Структура олигодезоксирибонуклеотидов 5' → 3'	Наименование белка
11С	GCGCTGACGATGGCGATGCGAGATTCAGGAACCGTTCTC	Hyb111
11N	GAGAACGGTTCCTGAATCTCGCATCGCCATCGTCAGCGC	
CPYRgs*	ATCGCCAAGCTTCCCTTACTATACGATGGT	ТРР
NPYRgs	AAAAAGGATCCC GCGATGCGAATGG	

* В структуру олигонуклеотида CPYRgs для обеспечения более эффективной терминации трансляции в клетках *E. coli* введены дополнительные кодоны tta и ста (выделены жирным шрифтом).

Для реализации возможности практического использования NP необходимы углубленные знания об их строении и механизме функционирования, включая принципы формирования термостабильных вариантов этих белков.

Цель работы – изучение рекомбинантных NP, их гибридных и мутантных форм, оценка вклада отдельных фрагментов и а.о. полипептидной цепи в формирование термостабильных вариантов ферментов.

МЕТОДИКА

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

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

Выделение ДНК, очистку, гидролиз эндонуклеазами рестрикции, лигирование фрагментов ДНК, а также трансформацию клеток *E. coli* плазмидами проводили согласно [8].

Штаммы *E. coli* JM110 и C600ΔudpRecA- (*thi thrB leuB lacY supE tonA recA Tn10*) предоставлены Всероссийской коллекцией промышленных микроорганизмов (НИЦ “Курчатовский институт”-ГосНИИгенетика”, Россия).

Источниками рекомбинантных ТРР и UDP служили полученные нами ранее штаммы-продуценты этих ферментов *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Halomonas chromatireducens*, *Shewanella oneidensis* –MR-1 [9–13].

При конструировании экспрессионных плазмид в качестве реципиентного использовали сконструированный ранее бактериальный вектор pUU18 [14], содержащий в своем составе промотор-операторную область гена UDP из *E. coli*.

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

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов и секвенс ДНК проводился фирмой “Синтол” (www.syntol.ru) на коммерческой основе.

Ген гибридного белка (Hyb111) конструировали методом ПЦР аналогично ранее опубликованной работе [15]. Структуры использованных в работе олигодезоксирибонуклеотидов приведены в табл. 1. В качестве матрицы при амплификации структурной части гена ТРР из *Geobacillus stearothermophilus* использовали ДНК самого микроорганизма, а при конструировании Hyb111 – плазмиду, полученную в работе [9].

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

Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [16] с окраской реагентом “Bio-Rad Protein Assay” (“Bio-Rad”, США). В качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (“Sigma”, США).

Электрофоретическое разделение белков проводили по Леммли [17].

Ферментативную активность рекомбинантных NP и их гибридных и мутантных форм определяли в K-фосфатном буфере согласно [9, 18].

Термостабильность белков определяли согласно [19]. Раствор исследуемого белка выдерживали в буфере (20 mM трис-HCl, pH 8.0) при выбранной температуре в течение запланированного времени. Затем пробу этого белка переносили в заранее прогретый до 40°C раствор соответствующих субстратов (5 mM тимидин или 5 mM уридин в 20 mM K-фосфатном буфере, pH 7.4) и инкубировали в течение 5 мин, после чего спектрофотометрически определяли остаточную активность фермента [9, 18]. Температуру инкубации раствора белка при определении термостабильности фермента задавали на 5–10°C ниже значения $T_{\text{опт}}$.

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) в 10 mM Na-фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 150 mM NaCl. Регистрацию осуществляли при длине волны 280 нм. Объем образца – 100 мкл, скорость элюции – 1 мл/мин. В качестве белков-маркеров использовали набор “Gel Filtration Calibration Kits” (“GE Healthcare Life Sciences”, Великобритания), а также рекомбинантные тимидин- и уридинфосфорилазы из *E. coli*.

Выделение и очистку рекомбинантных NP и их мутантных форм проводили, как описано нами ранее для UDP [11].

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В научной литературе широко обсуждается вопрос природы термостабильности белков из различных микроорганизмов (психрофилы, археи, мезофилы, термофилы) [20–26]. Однако приведенные в работах [21, 26] данные сравнительного анализа термостабильности белков из мезо- и термофильных микроорганизмов показывают, что ни показатель плотности упаковки белков, ни сравнительный структурный анализ, ни величина температурного оптимума NP не позволяли отнести эти ферменты к термостабильным или термолabileм. Более того, в ряде случаев, у авторов существуют определенные разногласия при экспериментальном определении этих параметров для аналогичных ферментов [27]. Поэтому определение свойств белков-аналогов, желателно

проводить в условиях не только одной лаборатории, но и с использованием одинаковых реагентов и аппаратного оформления.

К настоящему времени NP из различных организмов (в том числе и термофильных) выделены и достаточно хорошо охарактеризованы. Учитывая, что эти белки хорошо кристаллизуются, для многих из них изучена пространственная организация. Наличие такого большого объема информации о свойствах и структурах этого класса ферментов, казалось бы, может способствовать эффективному решению вопроса об основных принципах формирования термостабильных белков и, в частности, NP. Однако попытки целенаправленно исследовать функциональную роль как фрагментов первичной структуры, так и отдельных а. о. в придании NP термостабильных свойств, не приводили к успеху при объяснении проявления термотолерантности этих ферментов. Среди этих публикаций можно выделить только несколько работ [28, 29].

В литературе на основе анализа множества белков-аналогов из термофильных и мезофильных организмов обнаружено, что они имели аналогичную третичную упаковку. Было показано, что эти белки не организуют в своем составе вторичных или третичных структур, которые можно было бы рассматривать как определяющие в формировании термостабильных белковых молекул. Высказывалось предположение, что именно электростатические взаимодействия заряженных а. о., наряду с водородными связями, являются основным регулятором термотолерантности белков. Кроме того, отмечается, что термостабильные белки как правило не содержат в своей структуре гидрофобных а. о. [26].

Одним из направлений исследования термостабильности белков стало предсказание этого параметра с применением биоинформатических подходов [30–34]. Следует признать, что, несмотря на предпринятые усилия, программное обеспечение еще далеко от совершенства и не дает четкой возможности предсказать термостабильность белков в целом, а также прогнозировать этот параметр при планировании точечных изменений в первичной структуре полипептидов. Причиной этого может являться многофакторность изменений свойств белков и невыясненная до конца природа фолдинга, как самих белков, так и их мутантных форм. Наиболее полно состояние этой проблемы отражено в работах [30, 35], где авторы высказывают пессимистичное мнение что, “несмотря на общий характер супермедленно-разворачивания белков, эволюция может использовать (и использует) все, что направлено на стабилизацию белковой молекулы, и поэтому мы никогда не найдем всеобъемлющее химическое, биофизическое и энергетическое объяснение ги-

Таблица 2. Исследование термостабильности NP и их мутантных форм*

Белок	T_m , °C		Время полуинактивации фермента, мин (°C)	Источник
	предск.	экспер.		
UDP				
<i>E. coli</i> wt	55–65	55 ± 3	340 ± 4 (50)	[10]
<i>E. coli</i> (D27G)	>65	40 ± 2	Потеря активности 15 ± 5%, 1440, (40)	[15]
<i>S. oneidensis</i> MR-1 wt	55–65	60 ± 4	240 ± 3 (50)	[11]
<i>K. aerogenes</i> wt	55–65	70 ± 2	125 ± 2 (50)	[12]
<i>S. typhimurium</i> wt	>65	70 ± 3	1400 ± 3 (60)	[12]
ES1 (гибрид <i>E. coli</i> – <i>S. typhimurium</i>)	55–65	60 ± 2	800 ± 4 (50)	[15]
<i>S. oneidensis</i> (T91S)	55–65	60 ± 1	Потеря активности – 10 ± 5% за 480 мин (50)	[36]
TRP				
<i>E. coli</i> wt	55–65	53 ± 2	12 ± 3	[9]
<i>G. stearothermophilus</i> wt	>65	80 ± 3	Потеря активности 10 ± 4% за 1420 мин (60)	Данная работа
Hyb111(гибрид TRP <i>E. coli</i> – <i>G. stearothermophilus</i>)	55–65	60 ± 3	53 ± 2 (50)	Данная работа
<i>H. chromatireducens</i> wt	>65	60 ± 1	40 ± 3 (50)	[13]

* wt – рекомбинантный белок из штамма дикого типа. Искусственно внесенные замены в первичную структуру белков указаны в скобках в однобуквенном обозначении а. о.

пертермостабильности белка”. С этими выводами практически согласны и авторы обзора [20], в котором рассмотрены предполагаемые принципы формирования термостабильных белков у архей и эубактерий.

Настоящее исследование, направленное на изучение термостабильности одного класса белков – NP, несущих искусственно введенные точечные и протяженные (гибридные белки) замены в первичной структуре ферментов, может дать дополнительную информацию к дальнейшему построению биоинформационных технологий при решении фундаментальной проблемы – выяснению принципов формирования устойчивых к термической денатурации белков.

Ранее на основе клеток *E. coli* нами была сконструирована серия штаммов-продуцентов рекомбинантных NP и их мутантных форм из различных мезофильных и экстремофильного микроорганизмов (*E. coli*, *K. aerogenes*, *S. typhimurium*, *S. oneidensis* MR-1, *H. chromatireducens* AGD 8-3), что позволило создать “библиотеку” этих белков (табл. 2).

В данной библиотеке в качестве своеобразного контроля отсутствовала NP из термофильного микроорганизма. На первом этапе нами были предприняты эксперименты по конструированию штамма-продуцента такой рекомбинантной NP из термофильного микроорганизма. В каче-

стве источника гена термостабильной TRP был выбран штамм *Geobacillus stearothermophilus* (GenBank CP016552.1). Амплификацию гена TRP из этого микроорганизма проводили с использованием праймеров CPYRgs и NPYRgs (табл. 1) аналогично описанному в работе [11]. После проведения амплификации целевой фрагмент ДНК (1336 п. о.) был выделен и клонирован по сайтам *Vam*HI и *Hind*III в составе экспрессионного вектора pUU18 под контроль промотор-операторной области гена UDP из *E. coli*. Соответствие нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента запланированной подтверждали секвенированием. Сконструированный рекомбинантный экспрессионный вектор (рис. 1) был обозначен как pTRP(Gb). Экспрессионной плазмидой pTRP(Gb) трансформировали клетки штамма *E. coli* C600Δ*uidr* и анализировали уровень накопления целевого рекомбинантного белка. Полученные результаты (рис. 2) свидетельствовали о том, что TRP из *G. stearothermophilus* накапливался в растворимой фракции клеток штамма-продуцента. Следовательно, промотор-операторная область гена *udp* из *E. coli* способна осуществлять высокоэффективную транскрипцию гибридного гена TRP (*deoA*) из данного термофильного микроорганизма в условиях гетерологичной экспрессии. Рекомбинантный белок был выделен и показано, что он осуществлял обратимый фосфоролит дезоксити-

мидина, то есть обладал целевой ферментативной активностью.

Все рекомбинантные NP (табл. 2), исследованные в данной работе, были очищены ионообменной хроматографией и проявляли специфическую активность. Первичная структура белков была определена как сиквенсом соответствующих генов, так и MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометрическим анализом их триптических гидролизатов. Методом аналитической гель-фильтрации была также подтверждена четвертичная структура выделенных нативных ферментов, их мутантных и гибридных форм: гексамерная для UDP и димерная для TPP.

Для корректного исследования устойчивости данных белков к тепловой денатурации необходимо было, прежде всего, определить условия проведения данных экспериментов. При этом цель достигнуть полной денатурации белков не ставилась, а в качестве показателя нарушения структуры изучаемых белков был выбран основной показатель — изменение или потеря ферментативной активности NP, имеющий не только теоретический, но и практический смысл [6, 37]. На начальном этапе исследования термальной стабильности изучаемых белков было важно определить влияние на фермент стабилизирующих факторов, в частности субстратов. Следует отметить, что степень этого влияния может зависеть не только от вида субстрата, но и структуры изучаемого белка, то есть, данный фактор не относится к числу предсказуемых и мог вносить существенный вклад в трактовку получаемых данных. В связи с этим были проведены предварительные эксперименты по выявлению стабилизирующего действия субстратов. Исследование проводили с использованием рекомбинантной TPP из *E. coli*. Эксперименты проводили в реакционной смеси, следующего состава: 5 мМ тимидин и 10 мМ фосфат-ион, 50°C. Полученные результаты (рис. 3а) показали, что Pi в концентрации 10 мМ, действительно, оказывал существенное стабилизирующее действие на рекомбинантный фермент. Для подтверждения этого факта было проведено исследование влияния концентрации (дозозависимость) Pi на термальную стабильность TPP (рис. 3б). Выявленный эффект стабилизации NP субстратами, определил тактику постановки исследования термостабильности изучаемых ферментов (см. раздел Методика).

Важно также отметить, что в данной работе были выявлены оптимальные температуры проявления ферментативной активности ($T_{\text{опт}}$) для каждого из исследуемых белков (табл. 2). Этот параметр был важен для определения температуры инкубации раствора белков при исследовании термотолерантности NP (значение температуры понижали на 5–10°C от значения $T_{\text{опт}}$). При определении значения $T_{\text{опт}}$ для анализа предска-

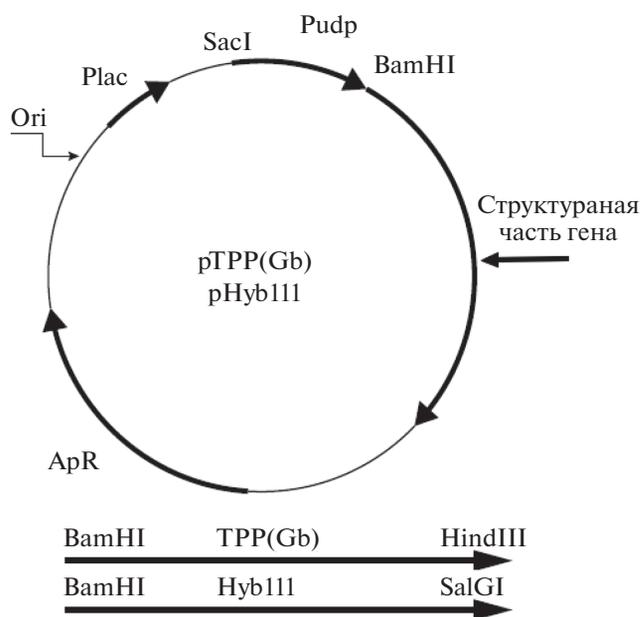


Рис. 1. Общая схема экспрессионных векторов, полученных в работе. Структурные части генов (TPP(Gb) или Hyb111) находятся под контролем промотор-операторной части (Pudp) гена UDP из *E. coli*.

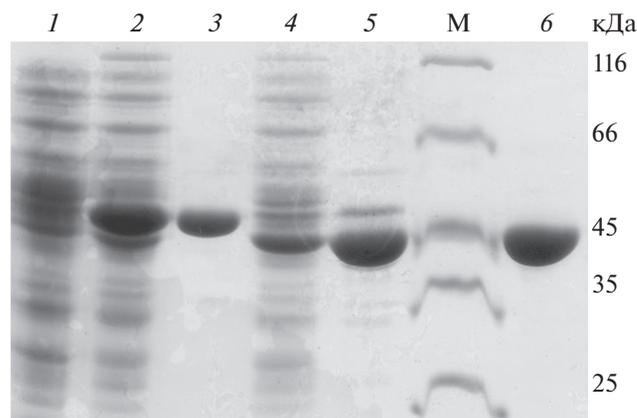


Рис. 2 Электрофоретический анализ рекомбинантных белков в клетках *E. coli* S600Δudp в 12.5%-ном ПААГ с ДСН-Na. М — маркеры молекулярной массы белков; 1, 2, 4 — белки растворимых фракций штамма-реципиента и штаммов-продуцентов, полученные после разрушения ультразвуком клеток *E. coli*; 3, 5, 6 — очищенные рекомбинантные ферменты: TPP из *G. stearothermophilus*, гибридный белок Hyb111 и TPP из *E. coli* соответственно.

зательного потенциала программы Tm Predictor (www.tm.life.nthu.edu.tw) был проведен теоретический расчет температур плавления исследуемых белков. Результаты сравнения экспериментальных и предсказанных T_M в целом показали хорошее совпадение (табл. 2) этих величин не только для нативных белков, но и их мутантных форм, хотя программа T_M Predictor и дает доволь-

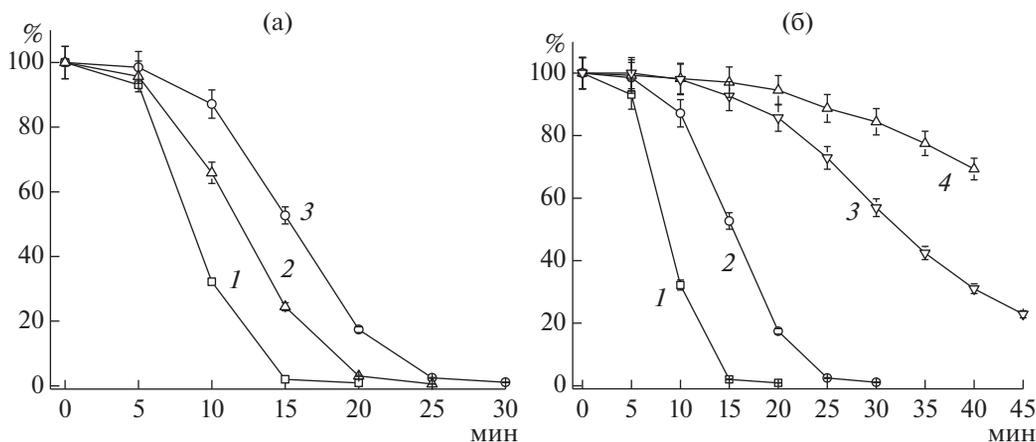


Рис. 3. Влияние субстратов на термостабильность ТТР из *E. coli*: а – 1 – без субстрата, 2 – 5 мМ тимидин, 3 – 10 мМ фосфат; б: 1 – без субстрата, 2 – 10 мМ фосфат, 3 – 20 мМ фосфат, 4 – 40 мМ фосфат. Фермент инкубировали при температуре 50°C.

но широкое значение этого параметра по сравнению с экспериментально выявленными. В случае же мутантного белка UDP (Asp27Gly) из *E. coli*, предсказанная величина T_m значительно отличалась от экспериментальной $T_{\text{опт}}$.

Обращает на себя внимание характер графиков при определении $T_{\text{опт}}$ для исследуемых ферментов. На рис. 4 приведено типичное изменение ферментативной активности под воздействием температуры при экспериментальном анализе $T_{\text{опт}}$ для термостабильной ТТР из *G. stearothermophilus* и ее аналога из мезофильного микроорганизма (*E. coli*).

Из рис. 4 видно, что после достижения $T_{\text{опт}}$ ферментативная активность термолabileй ТТР из *H. chromatireducens* резко снижалась, в то время как аналогичный показатель у ТТР из *G. stearothermophilus* снижался более плавно. Вероятно, характер кривой может быть объяснен тем, что изучаемые белки формируют активную форму в мультимерном комплексе, поэтому даже частичная диссоциация на субъединицы под воздействием температуры может приводить к относительно резкому

снижению ферментативной активности. Кроме того, денатурация, вероятно, носит кооперативный характер, что и приводит к резкому падению ферментативной активности у ТТР из *H. chromatireducens*.

Из полученных нами экспериментальных результатов (табл. 2) можно сделать предварительный вывод о том, что само значение температурного оптимума не указывало на термостабильность белковой молекулы у НР в целом, но характер изменения активности при температурном воздействии может служить, по крайней мере, предварительной оценкой термостабильности для этого класса ферментов. Во многом этот факт отмечен и в работе [38]. Исследование термостабильности ТТР из *G. stearothermophilus* (рис. 5), действительно показало, что этот показатель значительно превышал таковой для аналогичного белка из экстремофильного галофильного микроорганизма *H. chromatireducens*.

В литературе описано исследование, направленное на получение термостабильной формы UDP из *E. coli* методом насыщающего итеративного мутагенеза [28]. Было получено две мутантных формы этого белка UPL7 (Met38Val, Lys40Asp, Lys235Arg, Gln236Ala) и UPL8 (Lys235Arg, Gln236Ala), проявивших повышенную, по сравнению с исходным ферментом, термостабильность. Авторы статьи объяснили влияние замен в мутанте UPL8 тем, что эти а.о. входят в состав спирального участка, сближенного с N-концом белка и сделали предположение, что указанные мутации стабилизируют весь этот район белковой молекулы, тем самым, осуществляя термостабилизацию фермента в целом. Таким образом, вторичная и третичная структуры этого домена (взаимодействие N- и C-концевых а.о. в структуре НР) во многом могут определять как активность самого фермента, так и, предположительно, его термостабильность.

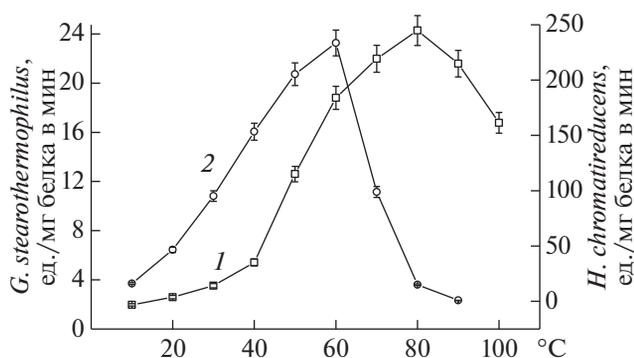


Рис. 4. Влияние температуры на активность ТТР из *G. stearothermophilus* (1) и *H. chromatireducens* (2).

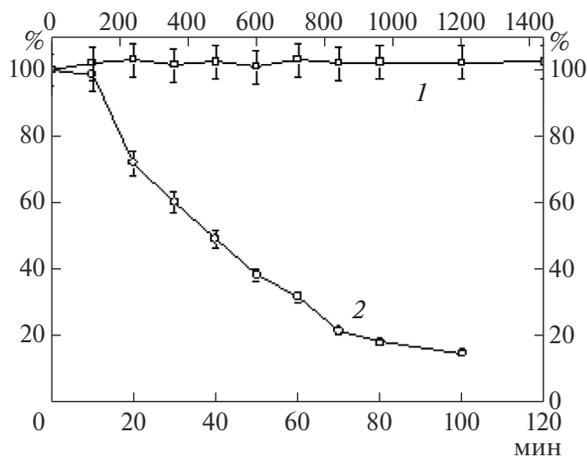


Рис. 5. Термостабильность TPP из *G. stearothermophilus* (1) при 60°C и из *H. chromatireducens* (2) при 50°C. Нижняя временная шкала для фермента 2, верхняя — для фермента 1.

Анализ роли N-концевых а. о. в функционировании UDP, проведенный нами ранее с использованием сайт-направленного мутагенеза показал, что этот участок важен для формирования активной молекулы белка. Были исследованы также ферментативные свойства нативных, мутантных и гибридных (несущих протяженные замены в составе первичной структуры) NP [9–13, 15, 36]. В частности, было показано [15], что замещение N-концевого фрагмента (1–43 а. о.) в UDP из *E. coli* на аналогичный участок UDP из *S. typhimurium* приводило к увеличению ферментативной активности исходного белка. В работе [39] на основе рентгеноструктурного анализа обнаружено, что в гексамере UDP из *E. coli* присутствуют

ионы калия, которые попарно координируют именно N-концевые а. о. (I69, E49 и S73) в соседних субъединицах этого фермента. Аналогичная координация а.о. ионами калия была выявлена и у TPP [40]. Важность именно этой координации в проявлении ферментативной активности белка нами была подтверждена при исследовании свойств мутантной (C212S) формы фермента из *S. oneidensis* MR-1 [41]: ферментативная активность мутантной формы белка была в 5.5 раз выше при использовании К-фосфатного буфера по сравнению с Na-фосфатным. Аналогичные результаты повышения ферментативной активности были отмечены нами при исследовании других мутантных форм UDP из *S. oneidensis* MR-1 [36].

Вышеприведенные факты указывали на важность именно этого участка первичной структуры белка и предопределили проведение исследования, направленного на выяснение роли N-концевых а. о. в проявлении термоустойчивости NP. С этой целью нами был сконструирован ген гибридного белка (Hyb111), в котором фрагмент из 62 а. о. первичной структуры TPP из *E. coli* заменены на соответствующий фрагмент TPP из *G. stearothermophilus*.

Конструирование гена гибридного белка проводили как описано в [15] с использованием праймеров 11N и 11C (табл. 1). Общая структура экспрессионного вектора приведена на рис. 1, а схематическое представление структуры гибридного белка дана на рис. 6. Уровень накопления рекомбинантного белка Hyb111 при гетерологичной экспрессии его гена в клетках *E. coli* и гомогенность выделенного фермента показаны на рис. 2.

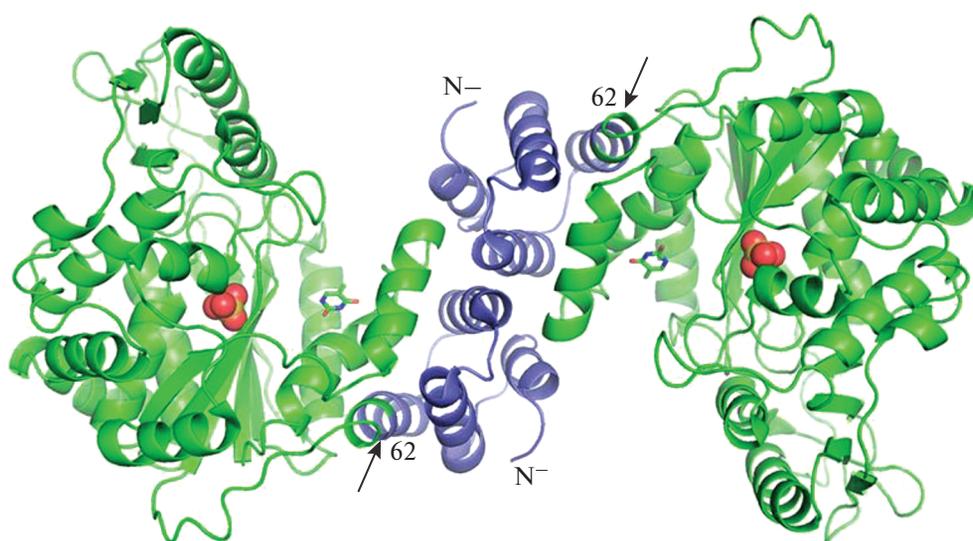


Рис. 6. Структура гибридной (Hyb111) молекулы TPP. Полипептид TPP из *E. coli* выделен зеленым цветом, фрагмент (1–62 а. о.) TPP из *G. stearothermophilus* — синим. Стрелками указан переход первичных структур в гибридном белке. Построено на основе PDB ID 4EAF с использованием программы PyMol (www.pymol.org).

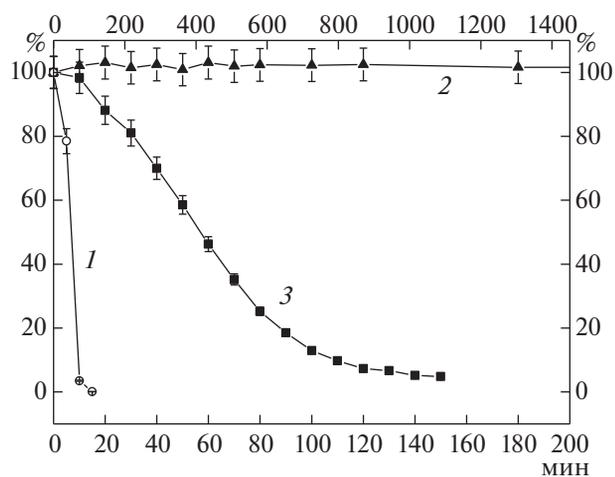


Рис. 7. Термостабильность ТРР (в % от исходной активности) из *E. coli* (1) при 50°C, *G. stearothermophilus* (2) при 60°C и гибридная молекула Нуб111 (3) при 50°C. Нижняя временная шкала для ферментов 1 и 3, верхняя – для фермента 2.

Исследование термостабильности гибридного белка Нуб111 показало (рис. 7, табл. 2), что введенная в N-концевую часть первичной структуры ТРР из *E. coli* протяженная замена (1–62 а. о.) на фрагмент аналогичного белка из *G. stearothermo-*

philus, действительно, повышала толерантность НР к температурному воздействию. Более того, исследование гибридного белка ES1 (гибрид *E. coli*–*S. typhimurium*) [15], также показало существенное увеличение термостабильности гибридного белка (табл. 2). В работе [36] было доказано, что именно эффективность связывания P_i является решающим и, во многом, лимитирующим фактором в проявлении активности у НР.

В литературе также описано [28] успешное применение искусственного эволюционного мутагенеза UDP из *E. coli* для получения ее термостабильной формы.

Анализ особенностей пространственной структуры UDP из *E. coli* и ее мутантных форм, а также результатов для других НР, в табл. 2, позволил предположить, что именно архитектура фосфат-связывающего сайта у НР может во многом определять термостабильность этого класса ферментов. Действительно, полученная в работе [28] термостабильная форма UDP из *E. coli* (рис. 8), несет замены (Lys235Arg, Gln236Ala), которые расположены на N-конце альфа-спирального участка (Met234 – Leu253) и пространственно сближены с участком связывания P_i (рис. 8). Именно в этом же районе белковой молекулы находится и проведенная нами замена Asp27Gly. Следует отметить,

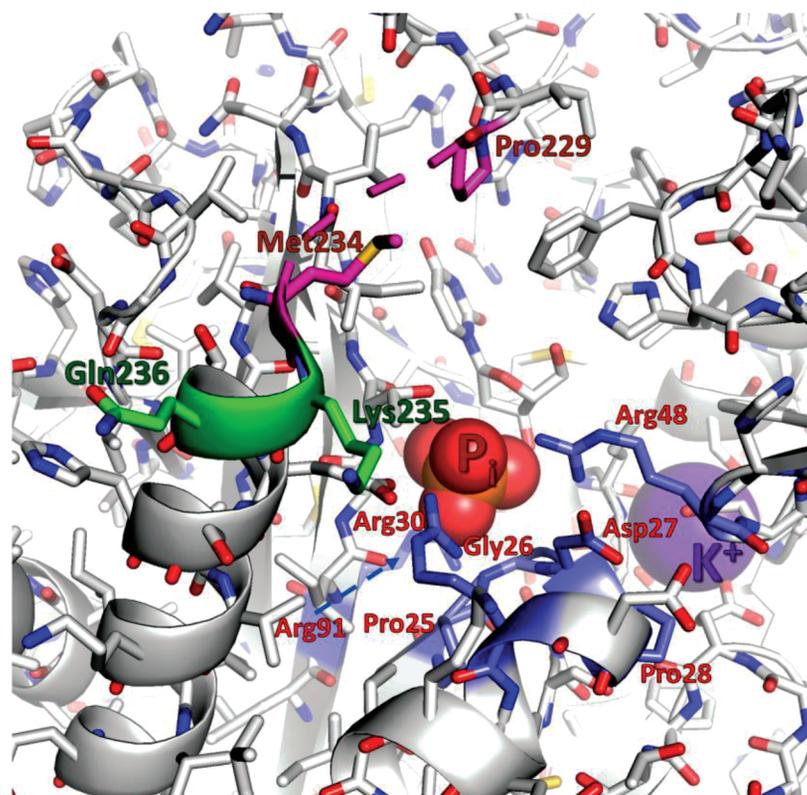


Рис. 8. Элемент третичной структуры мономера UDP из *E. coli* (PDB ID 1RXS) и расположение а. о., подвергавшихся мутагенезу в работах [15, 28]. Построение проводили с использованием программы PyMol (www.pymol.org). P_i – ион неорганического фосфата, K^+ – ион калия. Петля: Pro229 – Met234, альфа-спираль: Met234 – Leu253.

что а. о. Asp27 находится в окружении Pro25 и Pro28, которые могут создавать жесткие конформационные ограничения для пространственной ориентации боковой цепи этого остатка. Важная роль остатка Asp27, как и всей архитектуры именно этого фрагмента в связывании Pi, подтверждается и резким повышением K_m для фосфат-иона у данной мутантной формы белка [15]. Аналогичные данные по уменьшению значения K_m для Pi отмечались нами ранее и для других мутантных форм UDP при изучении особенностей функционирования фосфат-связывающей области у этого фермента из различных микроорганизмов [36]. Совокупность данных, приведенных в табл. 2 и результаты работы [36] позволяют предположить, что уменьшение сродства мутантных белков к Pi сопровождалось повышением термостабильности NP. Одной из структурных особенностей формирования фосфат-связывающего сайта у NP являются малоструктурированные участки первичной структуры этих белков. Эти участки характерны для всех NP, например, у UDP из *S. oneidensis* MR1 один из таких фрагментов представлен 226–236 а. о. [41] и принимает участие в формировании “открытой” и “закрытой” конформаций белка. Термодинамическая подвижность такой петлевой структуры может во многом нарушать элемент третичной структуры белковой молекулы и, как следствие, приводить к потере эффективности связывания белком Pi, потере ферментативной активности белка и, в конечном итоге, инактивации фермента. Анализ фрагмента третичной структуры UDP из *E. coli* показал, что максимально термостабильная форма этого белка, полученная в работе [28], несет мутации Lys235Arg, Gln236Ala (рис. 8), которые находятся в непосредственной близости к малоструктурированному участку Met234 – Pro229. Этот факт позволил предположить, что внесенные замены могут приводить к существенному уменьшению подвижности указанной петли и стабилизировать как ее, так всю молекулу UDP.

К настоящему времени для мутантной (UDP, *E. coli*, Asp27Gly) и гибридной (ES1, *E. coli*–*S. typhimurium*) NP, получены кристаллические формы и проводится рентгеноструктурный анализ их вторичной, третичной и четвертичной структур.

Таким образом, на основании исследования сформированной библиотеки природных и мутантных форм NP получены новые данные о механизме стабилизации белка у этого класса ферментов при температурном воздействии. Сделано предположение об определяющей роли архитектуры фосфат-связывающей области этих белков в приобретении ими термостабильности. Определена роль как отдельных аминокислотных остатков, так и фрагментов полипептидной цепи NP в придании этим ферментам термотолерантности.

Важную роль в термальной дестабилизации NP могут играть также малоструктурированные петлевые участки вторичной и третичной структуры, роль которых предполагается выяснить в последующем исследовании.

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

Исследование выполнено при частичной поддержке РФФИ (Грант № 18-04-00784А).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Liekens S, De Clercq E, Neyts J.* //Biochem. Pharmacol. 2001. V. 61. № 3. P. 253–270.
2. *Carmeliet P.* //Nature. 2005. V. 438. № 7070. 932–936.
3. *Furukawa T, Tabata S, Yamamoto M, Kawahara K, Shinsato Y, Minami K, Shimokawa M, Akiyama S.* // Pharmacological Research. 2018. V. 132. P. 15–20.
4. *Bera H., Chigurupati S.* //Eur. J. Med. Chem. 2016. V. 124. P. 992–1003.
5. *Wei Li, HongYue* // Trend. Card. Med. 2018. V. 28. № 3. P. 157–171.
6. *Михайлопуло И.А., Мирошников А.И.* // Acta naturae. 2010. T. 2 № 2. С. 38–61.
7. *Kulikova I.V., Drenichev M.S., Solyev P.N., Alexeev C.S., Mikhailov S.N.* // Eur. J. Org. Chem. 2019. V. 2019. № 41. P. 6999–7004.
8. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* Molecular Cloning: a Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 545 p.
9. *Вейко В.П., Супрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Андрюхина Р.В., Дебабов В.Г.* // Биотехнология. 1994. № 4. С. 2–4.
10. *Вейко В.П., Супрашвили З.З., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Миронов А.А., Андрюхина Р.В., Дебабов В.Г.* // Докл. Акад. наук. 1994. Т. 339. № 6. С. 819–821.
11. *Мордкович Н.Н., Мануверва В.А., Вейко В.П., Дебабов В.Г.* // Биотехнология. 2012. № 1. С. 21–30.
12. *Вейко В.П., Чеботаев Д.А., Овчарова И.В., Гулько Л.Б.* // Биоорг. химия. 1998. Т. 24. № 5. С. 381–387.
13. *Антипов А.Н., Мордкович Н.Н., Хижняк Т.В., Окоорокова Н.А., Вейко В.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 1. С. 1–7.
14. *Вейко В.П., Осипов А.С., Шехтер И.И., Буленков М.Т., Ратманова К.И., Гулько Л.Б., Чибискова Н.А., Эррайс Л.Л., Деревщикова Е.Б., Дебабов В.Г.* // Биоорг. химия. 1995. Т. 21. № 5. С. 354–358.
15. *Чеботаев Д.В., Гулько Л.Б., Вейко В.П.* // Биоорг. химия. 2001. Т. 27. № 3. С. 184–190.
16. *Bradford M.M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 2. P. 248–254.
17. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.

18. *Leer J.C., Hammer-Jespersen K., Schwartz M.* // Eur. J. Biochem. 1977. V. 75. № 1. P. 217–24.
19. *Cacciapuoti G., Bertoldo C., Brio A., Zappia V., Porcelli M.* // Extremophiles. 2003. V. 7. P. 159–168.
20. *Trivedi S., Gehlot H.S., Rao S.R.* // Gen. Mol. Res. 2006. V.5. № 4. P. 816–827.
21. *Gianese G., Bossa F., Pascarella S.* // Proteins. 2002. V. 47. P. 236–249.
22. *Vieille C. Zeikus G.J.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2001. V. 65. P. 1–43.
23. *Brock T.D.* // Science. 1967. V. 158. P. 1012–1019.
24. *Sawle L., Ghosh K.* // Biophys. J. 2011. V. 101. P. 217–227.
25. *Kumar S., Nussinov R.* // 2011. Cell. Mol. Life Sci. V. 58. P. 1216–1233.
26. *Karshikoff A., Ladenshtein R.* // Prot. Engineering. 1998. V. 11. № 10. P. 867–872.
27. *Kamel S., Thiele I., Neubauer P., Wagner SA.* // BBA Prot. Proteom. 2020. V. 1868. № 2. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140304>
28. *Visser D.F., Hennessy F., Rashamuse J., Pletschke B., Brady D.* // J. Mol. Cat. B: Enzymatic. 2011. V. 68. P. 279–285.
29. *Oliva I., Zuffi G., Barile D., Orsini G., Tonon G., De Gioias L., Ghisotti D.* // J. Biochem. 2004. V. 135. № 4. P. 495–499.
30. *Luke K.A., Higgins C.L., Wittung-Stafshede P.* // FEBS J. 2007. V. 274. P. 4023–4033.
31. *Imanaka T.* // Proc. Jpn. Acad., Ser. 2011. V. 87. № 9. P. 587–602.
32. *Алемасов Н.А., Фомин Э.С.* // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2012. Т. 16. № 4/1. С. 774–783.
33. *Гришин Д.В., Покровская М.В., Подобед О.В., Гладиллина Ю.А., Покровский В.С., Александрова С.С., Соколов Н.Н.* // Биомед. химия. 2017. Т. 63. № 2. С. 124–131.
34. <http://gibk26.bio.kyutech.ac.jp/jouhou/Protherm/protherm.html>
35. *Razvi A., Scholtz J.M.* // Protein Sci. 2006. V. 15. № 7. P. 1569–1578
36. *Мордкович Н.Н., Сафонова Т.Н., Антипов А.Н., Манувера В.А., Поляков К.М., Окорокова Н.А., Вейко В.П.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 1. С. 16–25.
37. *Dumorne K., Cordova D.C., Astorga-Elo M., Renganaathan P.* // J. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 27. № 4. P. 649–659.
38. *Pucci F., Dhanani M., Dehouck Y., Rooman M.* // PLoS ONE. 2014. V. 9. № 3. e91659.
39. *Caradoc-Davies T.T., Cutfield S.M., Lamont I.L., Cutfield J.F.* // J. Mol. Biol. 2004. V. 337. № 2. P. 337–354.
40. *Pugmire M.J., Ealick S.E.* // Structure. 1998. V. 6. № 11. P. 1467–147.
41. *Safonova T.N., Mordkovich N.N., Veiko V.P., Okorokova N.A., Manuvera V.A., Dorovatovskii P.V., Popov V.O., Polyakov K.M.* // Acta Crystallogr. D Struct. Biol. 2016. V. 72. № 2. P. 203–210.

Study of the Nature of Thermal Stability of Nucleoside Phosphorylases from Prokaryotes

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

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

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

*e-mail: vladveiko@yahoo.com

Based on *Escherichia coli* cells, a library of producer strains of recombinant nucleoside phosphorylases (NP), their mutant and hybrid forms from various mesophilic and extremophilic microorganisms were constructed. It was shown that substrates stabilize the NP installation upon thermal exposure to these proteins. In this case, it is the inorganic phosphate ion that is decisive in this process. Using bioinformatic analysis methods, it is suggested that the N-terminal structure of proteins is largely determined by the thermal stability of NP. A thymidine phosphorylase from *E. coli* hybrid protein was constructed, in which the N-terminal fragment (1–62 amino acid residues) was replaced with the corresponding TPP fragment from thermophilic bacteria *Geobacillus stearothermophilus*, and it was shown that the thermal stability of the obtained hybrid form of TPP was increased. In the primary structure of uridine phosphorylase (UDP) from *E. coli*, a highly conserved sequence of 25-Pro-Gly-Asp-Pro-30 (the number of amino acid residues by UDP from *E. coli*) for these enzymes from mesophilic microorganisms was revealed. Constructed mutant form UDP (Asp27Gly) from *E. coli*, which also showed increased thermal stability compared to the original form. The highest assumption is that it is architecture of the phosphate-binding site, and the features of its functioning are crucial for the development of enzyme stability.

Keywords: nucleoside phosphorylase, site-directed mutagenesis, thermal stability

УДК: 57.088.3

ОДНОСТАДИЙНАЯ ОЧИСТКА CRISPR-НУКЛЕАЗЫ Cas13a МЕТОДОМ МЕТАЛЛ-ХЕЛАТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПОСЛЕ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ С СОХРАНЕНИЕМ КОЛЛАТЕРАЛЬНОЙ РИБОНУКЛЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2020 г. Л. К. Курбатов^{1, *}, С. П. Радько^{1, **}, С. В. Кравченко²,
О. И. Киселёва¹, Н. Д. Дурманов², А. В. Лисица^{1, 2}

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия

²Тюменский государственный университет, Западно-Сибирский межрегиональный научно-образовательный центр, Тюмень, 625003 Россия

*e-mail: kurbatovl@mail.ru

**e-mail: radkos@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.04.2020 г.

После доработки 24.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

CRISPR/Cas13a-нуклеаза рассматривается сегодня как основа для создания нового поколения биосенсоров для ультрачувствительной, в том числе полевой детекции бактериальных и вирусных патогенов. Получена рекомбинантная Cas13a-нуклеаза с функциональной активностью в результате гетерологической экспрессии в *E. coli* с помощью простой одностадийной очистки металл-хелатной хроматографией с использованием N-концевой полигистидиновой метки. Упрощение процедуры очистки Cas13a-нуклеазы расширяет возможности разработки и практического использования диагностических биосенсорных систем на её основе. Масс-спектрометрическая идентификация показала, что неохарактеризованный ранее белок U2PWF1 *Leptotrichia wadei* является Cas13a-нуклеазой.

Ключевые слова: CRISPR-Cas, рибонуклеаза Cas13a, очистка, металл-хелатная хроматография, коллатеральная активность

DOI: 10.31857/S0555109920060070

CRISPR-нуклеазы являются неотъемлемой частью молекулярных систем CRISPR-Cas (CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; Cas, CRISPR associated protein), ответственных за иммунитет бактерий и архей к чужеродным генетическим элементам, таким как бактериофаги и плазмиды [1, 2]. Способность систем CRISPR-Cas селективно узнавать последовательности ДНК и расщеплять их в определенных местах легла в основу наиболее широко распространенной на сегодня технологии направленного редактирования геномов, в первую очередь с использованием нуклеазы Cas9 и ее генетически модифицированных вариантов (технология CRISPR-Cas9 [3]). Селективность узнавания определяется формированием комплекса Cas-нуклеазы с направляющей РНК (нРНК – guide RNA – gRNA), которая содержит участок (спейсер), комплементарный участку целевой ДНК (протоспейсер), и участок, ответственный за связывание с Cas-нуклеазой (повтор). При формировании гетеродуплекса “спейсер-протоспейсер” находящаяся в ком-

плексе с нРНК Cas-нуклеаза расщепляет ДНК-мишень при наличии в непосредственной близости к протоспейсеру определённого нуклеотидного мотива (PAM, protospacer adjacent motif) [3].

CRISPR-нуклеаза Cas13a принадлежит к VI типу CRISPR-Cas систем и обладает рядом особенностей, отличающих ее от большей части CRISPR-нуклеаз, включая Cas9. Cas13a является рибонуклеазой с функцией селективного узнавания целевой молекулы РНК (через формирование комплементарного дуплекса спейсера нРНК с соответствующим участком РНК-мишени) с последующим ее расщеплением, которое не зависит от наличия PAM [4, 5]. После активации и расщепления РНК-мишени нуклеаза теряет специфичность (активность только в отношении РНК-мишени) и приобретает так называемую ‘коллатеральную активность’, начиная расщеплять любые молекулы РНК. При этом коллатеральная активность Cas13a проявляется в условиях *in vitro* и при гетерологической коэкспрессии Cas13a и нРНК в бактериальных клетках, но отсутствует при их

экспрессии в эукариотических клетках [6, 7]. Следует отметить, что последнее создаёт основу для развития технологии направленного редактирования транскриптома.

Локусы, кодирующие нуклеазу Cas13a (ранее известную как C2c2), были впервые идентифицированы в геномах пяти бактериальных таксонов: α -протеобактерии, *Bacilli*, *Clostridia*, *Fusobacteria* и *Bacteroidetes* [8]. В настоящее время в экспериментальных исследованиях наиболее интенсивно используются Cas13a-нуклеазы, кодируемые геномами бактерий рода *Leptotrichia* [4, 6, 9–11]. Экспериментальное тестирование 15 ортологов Cas13a показало, что LwaCas13a – Cas13a-нуклеаза, обнаруженная у вида *Leptotrichia wadei* – наиболее эффективно подавляет рост клеток *E. coli* при гетерологичной коэкспрессии Cas13a и нРНК [6]. Нуклеотидная последовательность гена нуклеазы LwaCas13a включает ~3.5 тыс. пар оснований и кодирует полипептид длиной 1162 аминокислотных остатка (а. о.), молекулярный вес белка ~138 кДа. Коллатеральная активность LwaCas13 была положена в основу недавно предложенного метода ультрачувствительной детекции бактерий и вирусов, получившего название SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) [11–13]. В методе SHERLOCK на первом этапе проводится изотермическая амплификация целевого фрагмента нуклеиновой кислоты, а затем – детекция продуктов амплификации с применением LwaCas13a в комплексе с нРНК. Коллатеральная активность LwaCas13a приводит к деградации добавленных в реакционную смесь коротких молекул РНК, меченных флуорофором и тушителем (РНК-субстрат или РНК-репортеры), с последующей регистрацией флуоресцентного сигнала [11–13]. Все реакции не требуют специализированного оборудования, а детекция может проводиться в формате тест-полосок (при замене флуорофора на биотиновую метку), что открывает перспективы для полевой диагностики бактериальных и вирусных патогенов [14]. Cas13a и аналогичные ей CRISPR-нуклеазы, чья коллатеральная активность проявляется при селективном узнавании заданных последовательностей в целевых ДНК и РНК, рассматриваются сегодня как основа для создания нового поколения биосенсоров с чувствительностью детекции на уровне единичных ДНК/РНК молекул [15].

В настоящее время рибонуклеазы Cas13a с высокой удельной коллатеральной активностью получают путем гетерологической экспрессии в *E. coli* с последующей трёхстадийной очисткой, включающей последовательно аффинную хроматографию (Strep-tag, 1), ионообменную хроматографию (2) и эксклюзионную ВЭЖХ (гель-фильтрацию, 3) [11–13].

Цель работы – показать возможность получения рекомбинантного белка Cas13a с высокой удельной коллатеральной РНКазной активностью в результате гетерологической экспрессии в *E. coli* с помощью одностадийной очистки методом металл-хелатной хроматографии с использованием *N*-концевой полигистидиновой метки (6xHis-tag) и гравитационных хроматографических колонок.

МЕТОДИКА

Для бактериальной экспрессии белка Cas13a использовали плазмидный вектор pET His6-TwinStrep-SUMO-LwaCas13a, предоставленный компанией “Novoprolabs” (КНР; Кат. №V10159). Согласно спецификации поставщика, вектор идентичен плазмиде pC013 His6-TwinStrep-SUMO-LwCas13a, депонированной в репозиторий ADDGENE (www.addgene.org/90097), которая была сконструирована для гетерологичной экспрессии рекомбинантного белка LwaCas13a [11]. Конструкция данного вектора предполагает индуцированную экспрессию с T7-промотора, при этом в последовательность целевого белка с *N*-конца включены последовательно 6xHis-tag/(Twin)Strep-tag/SUMO. Это позволило проводить очистку рекомбинантного белка с помощью либо металл-хелатной хроматографии, либо аффинной хроматографии на сефарозе с иммобилизованным Strep-Tactin.

Экспрессионный вектор pET His6-TwinStrep-SUMO-LwaCas13a был трансформирован в штамм Rosetta™ 2(DE3)pLysS Singles™ Competent Cells (“Merck”, Германия). Ночную культуру (2 мл) *E. coli*, выращенную на среде LB (“ДиаМ”, Россия) с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) и хлорамфеникола (34 мкг/мл), вносили в 300 мл среды Terrific Broth следующего состава (г/л): триптон – 12, пептон – 2, дрожжевой экстракт – 24 (“Becton Dickinson”, Франция), глицерин – 5, K_2HPO_4 – 12.5, KH_2PO_4 – 2.3 и после добавления ампициллина до конечной концентрации 100 мкг/мл клетки культивировали при 37°C. Рост клеток контролировали измерением оптической плотности при 600 нм (D_{600}). При достижении значения D_{600} – 0.6 в культуру добавляли индуктор экспрессии изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 50 мкМ. Экспрессию целевого белка проводили в течение 16 ч при 18°C (если не указано иначе). Клетки осаждали центрифугированием (4000 g, 15 мин, 4°C), промывали фосфатно-солевым буфером (“Sigma-Aldrich”, США) и использовали для получения целевого белка.

Все операции по получению целевого белка проводились при 4°C. Осадок, полученный после осаждения клеток из 300 мл экспрессионной сре-

ды, ресуспендировали в буфере LEW (50 мМ NaH_2PO_4 , 300 мМ NaCl , pH 8.0) из набора к колонкам Protino Ni-TED 1000. Дополнительно в буфер вносился лизоцим (“Sigma-Aldrich”, США) до конечной концентрации 1 мг/мл, фенилметансульфонил фторид (“Sigma-Aldrich”, США) до 1 мМ и ДНКаза (DNase I, “Roche”, Швейцария) до 1 мг/мл. После инкубации на льду в течение 30 мин клетки разрушали механическим способом на френч-прессе FA-078AE (“Thermo Electron Corporation”, США). Полученный гомогенат осветляли центрифугированием при 20 000 g, 40 мин, 4°C – и делили на две равные части. Каждую часть наносили на колонку Ni-TED. Очистку рекомбинантного белка проводили на колонках Protino Ni-TED 1000 (“Macherey-Nagel”, Германия) в соответствии с протоколом производителя. После промывания колонок, связавшийся белок элюировали буфером, содержащим 250 мМ имидазола, последовательно собирая фракции объемом 0.5 мл. Фракции анализировали методом электрофореза по Лэммли в 9%-ном ПААГ с окраской красителем Кумасси G-250 (“Bio-Rad”, США). Относительное количество целевого белка оценивали, сопоставляя площади пиков, соответствующих белковым полосам на геле, после их денситометрии на гель-сканере ImageScanner III (“GE Healthcare”, США). Очищенный аффинной хроматографией целевой белок переводили в буфер для хранения (600 мМ NaCl , 50 мМ трис- HCl , pH 7.5, 5%-ный глицерин, 2 мМ ДТТ) с помощью диализа. Диализ проводили с использованием мембран SnakeSkin Dialysis Tubing 7000 MWCO (“Thermo Fisher Scientific”, США). Концентрацию целевого белка измеряли методом Брэдфорда, используя растворы БСА в качестве стандартов. Аликвоты раствора целевого белка хранили на –80°C.

Для масс-спектрометрической идентификации целевого белка представляющие интерес белковые полосы после электрофореза в ПААГ вырезали из полиакриламидного геля и подвергали трипсинолизу в геле в соответствии с протоколом, описанным в работе [16]. Полученную смесь пептидов анализировали на времяпролетном MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре Bruker Ultraflex II (“Bruker Daltonics”, Германия) и методом тандемной хромато-масс-спектрометрии (LC-ESI-MS/MS) на масс-спектрометре Orbitrap Q-Exactive (“Thermo Fisher Scientific”, США), соединенным с хроматографической системой Agilent HPLC 1100 Series (“Agilent Technologies”, США). В последнем случае использовали аналитическую колонку Zorbax 300SB-C18 (“Agilent Technologies”, США) с обращенной фазой.

Спектры пептидов, полученные методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, сравнивали с теоретически ожидаемыми спектрами из базы данных NCBI при помощи веб-платформы Mas-

cot Peptide Mass Fingerprint (“Matrix Science”, Великобритания), используя следующие параметры: точность измерения моноизотопных масс пептидов не хуже 50 м.д., пропионамидирование цистеина считали фиксированной модификацией, окисление метионина – вариабельной, допускали один пропуск сайта трипсинолиза. В случае LC-ESI-MS/MS, масс-спектры обрабатывали с помощью программных продуктов SearchGUI (v. 3.3.16) [17] и PeptideShaker (v. 1.16.42) [18]. Поиск проводили тремя поисковыми алгоритмами (X! Tandem, MS-GF+ и OMSSA) [19–21] в кастомизированных библиотеках белковых последовательностей, включающих последовательности белков *E. coli* K12 (Swiss-Prot, release 09-2019, 4533 белковые последовательности) и лабораторных белков-контaminантов cRAP (Swiss-Prot, release 01-2012, 115 последовательностей), а также последовательности белков *Leptotrichia wadei* (штамм F0279; UniProt Proteome ID UP000016626, 2277 белков) и *Leptotrichia buccalis* (UniProt Proteome ID UP000001910; 2218 белков). При обработке результатов хромато-масс-спектрометрического анализа устанавливали следующие параметры поиска: погрешность определения массы пептидного иона – 10 ppm, фрагментного иона – 0.05 Да, один пропуск сайта трипсинолиза, фиксированная модификация – карбамидометилирование цистеина, вариабельная – окисление метионина. Белок считали идентифицированным, если удавалось детектировать не менее двух протеотипических пептидов, на каждый из которых приходилось не меньше 2 совпадений теоретического спектра со спектром экспериментальным (peptide-spectra match, PSM). Отсечение по ложноположительным идентификациям как для пептидов, так и для белков было установлено на уровне 1%.

Для синтеза нРНК использовали ДНК-матрицу D8R, содержащую на 3'-конце участок, комплементарный последовательности промотора ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага T7, и олигонуклеотид T7F с последовательностью T7-промотора (табл. 1). ДНК-олигонуклеотиды были синтезированы компанией “Синтол” (Россия). Эквимолярную смесь олигонуклеотидов D8R и T7F отжигали для формирования дуплекса (2 мин при 96°C с охлаждением до 25°C со скоростью 2°C/с) и использовали для синтеза *in vitro* нРНК с помощью набора TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США), согласно инструкции производителя. Очистку нРНК от примесей проводили смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт 25 : 24 : 1 (“Acros Organics”, Бельгия) с последующим осаждением этанолом. Осадок растворяли в воде, свободной от нуклеаз, концентрацию нРНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Аликвоты рас-

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе. (Последовательность, комплементарная последовательности T7-промотора, показана курсивом. Полу жирным шрифтом выделена последовательность спейсера)

Название	Последовательность (5' → 3')
D8R	TTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGGTTT TAGTCCCCTT CGTTTTTGGGGTAGTCTAAATCCCCTATAGTGAGTCGTATTA
T7F	TAATACGACTCACTATAGGG
нРНК	GGGGAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACC CAGCGUUCAAUCUGAGCCAUGAUCAAA

твора нРНК хранили при температуре -80°C . Последовательность нРНК представлена в табл. 1.

В качестве мишени для оценки эндонуклеазной активности полученного рекомбинантного белка использовали рибосомальную РНК 16S *E. coli* штамма XL1 Blue. Суммарную РНК *E. coli* выделяли с помощью реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия) согласно инструкции производителя. Реакционная смесь для оценки коллатеральной активности включала буфер (40 мМ Трис-НСI pH 7.3; 60 мМ NaCl; 6 мМ MgCl₂), 45 нМ рекомбинантный белок, 22.5 нМ нРНК, 125 нМ субстрат из набора RNase Alert v2 (“Thermo Fisher Scientific”, США), 2 мкл ингибитора РНКаз (Murine RNase Inhibitor, “New England Biolabs”, Великобритания), 100 нг референсной РНК (Universal Human Reference RNA, “Agilent Technologies”, США) в качестве фона и различное количество суммарной РНК *E. coli*. Перед добавлением суммарной РНК *E. coli*, референсной РНК и субстрата из набора RNase Alert v2, смесь инкубировали в течение 15 мин при 37°C . После их добавления, реакционную смесь инкубировали 1.5–2 ч при 37°C . Флуоресценция, возникающая при деградации субстрата из набора RNase Alert v2 для оценки РНКазной активности, детектировалась с помощью планшетного ридера Infinite M200 PRO (“TECAN”, Швейцария), используя длины волн 490 и 520 нм для возбуждения и эмиссии, соответственно. Значения флуоресценции в указанный момент времени, F , и флуоресценции в начальный момент в отсутствии целевого белка, F_0 , использовали для вычисления относительной флуоресценции, F/F_0 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время для очистки рекомбинантных рибонуклеаз Cas13a используется трёхстадийная схема, последовательно включающая аффинную (с помощью колонок с Strep-Tactin, иммобилизованным на сепарозе за счет Strep-tag целевого белка), катион-обменную и гель-фильтрационную хроматографию с промежуточным этапом концентрирования продукта и заменой буфера методом диализа для последующего хра-

нения препарата очищенного белка при -80°C [11–13]. Следует отметить, что стадия аффинной хроматографии в этой схеме включает длительное инкубирование Strep-Tactin-сепарозы со связавшимся целевым белком с SUMO-протеазами для его элюции с сепарозы путем энзиматического удаления Strep-tag с N-конца полипептидной цепи целевого белка. Поскольку последовательность целевого белка, кодируемого вектором pET His6-TwinStrep-SUMO-LwaCas13a, также содержит гистидиновую метку – 6xHis-tag, в рамках данной работы мы исследовали возможность одностадийной очистки предполагаемой рекомбинантной Cas13a-нуклеазы с помощью колонок Ni-TED. Как видно из рис. 1, после пропускания через колонки гомогената клеток *E. coli*, трансфицированных плазмидой pET His6-TwinStrep-SUMO-LwaCas13a, последующая элюция связавшегося материала содержащим имидазол буфером характеризуется присутствием белка с молекулярной массой, соответствующей с ожидаемой (~140 кДа), который является доминирующей белковой компонентой элюата.

MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ пептидов, полученных в результате трипсинолиза белкового материала доминантной полосы в геле после ПААГ-электрофореза элюатов (отмечена стрелкой, рис. 1), позволил идентифицировать белок с высокой достоверностью как неохарактеризованный белок U2PWF1 *L. wadei*, штамм F0279 (ожидаемая длина белка – 1152 а. о.). Было зарегистрировано 38 пептидов, соответствующих расчетным пептидам – продуктам гидролиза белка U2PWF1 трипсином, которые покрывали 31% его последовательности (данные не показаны). Значение параметра ‘Mowse score’, определяющего достоверность идентификации белка в поисковой программе ‘Mascot’, составляло 172 (значение выше 96 соответствует достоверности идентификации более 95%; www.matrixscience.com). В настоящее время для генома *L. wadei* в базе данных NCBI присутствуют шесть геномных сборок, относящихся к шести штаммам, при этом ген, кодирующий не охарактеризованный белок U2PWF1, отсутствует по меньшей мере у двух штаммов – DSM 19186 и KA00185. Следует отметить, что в гено-

ме штамма F0279 *L. wadei* присутствует последовательность, аннотированная как Cas13a-нуклеаза, однако уровень ее сходства с последовательностью белка U2PWF1 составляла 26.2%. При поиске в базе данных UniProt с использованием программы BLAST наибольшая гомология найдена с Cas13a-нуклеазой из *L. buccalis* (80.7%). Во всех остальных случаях, включая Cas13a-нуклеазу из *Leptotrichia shahii*, гомология не превышала 25%. Предположение, что экспрессированный белок может представлять Cas13a-нуклеазу из *L. buccalis* (UniProt идентификатор C7NBY4), было опровергнуто хромато-масс-спектрометрическим анализом, в ходе которого было надежно детектировано 44 триптических пептида, равномерно картирующихся по всей аминокислотной последовательности U2PWF1 (данные не представлены). Значительная часть детектированных пептидов (15 из 44) являлась протектипическими, то есть соответствующими исключительно последовательности белка U2PWF1 и никаким прочим белкам, включая Cas13a-нуклеазу из *L. buccalis*. Тем не менее, высокая гомология между белком U2PWF1 и Cas13a-нуклеазой из *L. buccalis* указывала на то, что с высокой вероятностью экспрессированный белок (соответственно, неохарактеризованный белок U2PWF1 *L. wadei*, штамм F0279) также являлся Cas13a-нуклеазой.

С целью исключения ошибки на уровне экспрессирующего вектора (поскольку он был получен не напрямую от ADDGENE) было проведено полное секвенирование вставки. По результатам данного секвенирования кодирующая белок вставка полностью соответствовала гену Lw-Cas13a из плазмиды pC013 [11]. В то же время следует отметить, что прямое сравнение в BLAST данного гена LwCas13a с кодирующей неохарактеризованный белок U2PWF1 последовательностью HMPREF9015_01858 дает лишь 70% идентичности при 99% покрытии. Это обусловлено тем, что в вектор включена оптимизированная по кодонам последовательность для экспрессии в клетках млекопитающих.

Выход предполагаемой рекомбинантной Cas13a-нуклеазы при элюции с колонки был максимальным в третьей фракции (рис. 1), при этом в первой и восьмой фракциях целевой белок полностью отсутствовал. Существенное количество целевого белка также присутствовало в четвертой фракции. Материал третьей и четвертой фракций был объединен и использован для тестирования функциональной активности рекомбинантного белка как Cas13a-нуклеазы. Чистота препаратов Cas13a, полученных объединением третьей и четвертой фракций элюата, была в пределах 80–90%.

В качестве мишени для проверки функциональной активности очищенного белка была выбрана рибосомальная РНК 16S штамма XL1 Blue

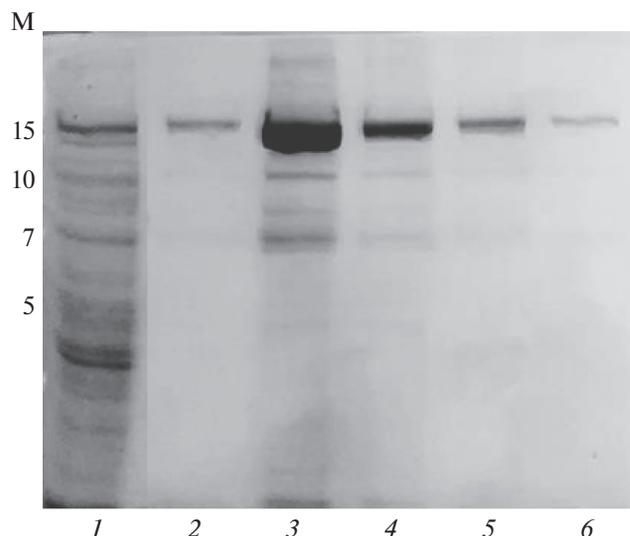


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ исходного гомогената клеток *E. coli* и фракций элюата при очистке целевого белка металл-хелатной хроматографией на колонках Protino Ni-TED 1000. 1 – гомогенат клеток, 2–6 – фракции элюата, целевой белок обозначен стрелкой. М – метчики молекулярные массы, кДа.

E. coli. Такой выбор определялся доступностью данного штамма и простотой получения суммарной РНК, в которой рибосомальная РНК 16S была одной из доминирующих. Последовательности возможных нРНК были подобраны с помощью программы CRISPR-RT [22], исходя из того, что полученный рекомбинантный белок представлял рибонуклеазу LwaCas13a. Последующий анализ вторичной структуры предложенных программой CRISPR-RT последовательностей нРНК с помощью программы Mfold [23] показал, что среди них присутствовало значительное число последовательностей, у которых с высокой вероятностью могли образовываться нежелательные дуплексные участки между последовательностями спейсера и повтора. Такие дуплексы могли препятствовать формированию последовательностью повтора характерной шпилечной структуры, ответственной за взаимодействие с Cas13a [11]. В результате проведенного анализа, последовательность нРНК, представленная в табл. 1, была выбрана как наиболее оптимальная. Последовательность спейсера данной нРНК комплементарна участку с 12 по 40 нуклеотид молекулы 16S РНК *E. coli* (протоспейсер).

Оценка функциональной рибонуклеазной активности полученного рекомбинантного белка, проведенная с помощью набора для детекции рибонуклеазной активности RNase Alert v2, показала, что в отсутствие РНК-мишени белок не проявлял рибонуклеазной активности (рис. 2). Однако при добавлении РНК-мишени наблюдалось развитие флуоресцентного сигнала, связанное с расщеплением РНК-репортеров в результате по-

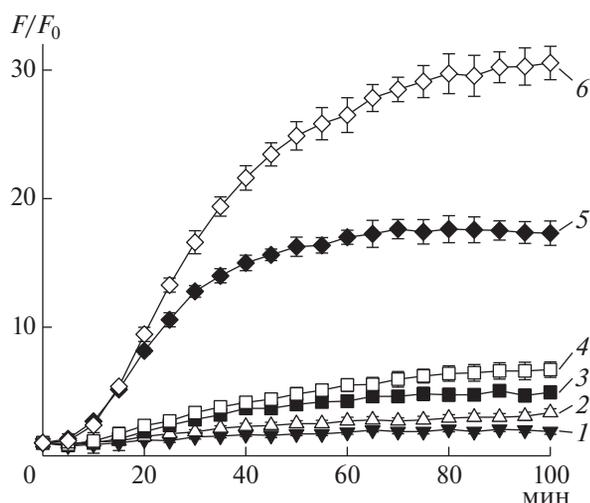


Рис. 2. Зависимость относительной флуоресценции (F/F_0), флуоресцентно-меченного РНК-субстрата от времени инкубации (мин) с целевым белком при 37°C. 1 – изменение флуоресценции в отсутствии РНК-мишени; 2, 3, 4, 5 и 6 – в присутствии 10, 25, 80, 250 и 800 нг суммарной РНК *E. coli* соответственно. Показаны среднеарифметические значения и среднеквадратичные отклонения для трехкратных измерений.

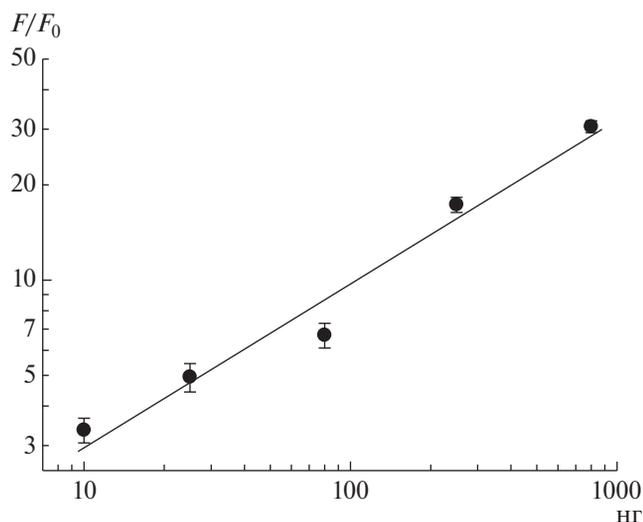


Рис. 3. Изменение относительной флуоресценции F/F_0 после инкубации в течение 100 мин флуоресцентно-меченного РНК-субстрата с целевым белком при 37°C как функция количества суммарной РНК *E. coli* (нг).

явившейся рибонуклеазной активности. Таким образом, полученный рекомбинантный белок обладает мишень-зависимой коллатеральной рибонуклеазной активностью, типичной для Cas13a-нуклеаз. В серии последовательных разведений суммарной РНК *E. coli* была показана зависимость развития флуоресцентного сигнала от кон-

центрации мишени, которая в логарифмических координатах могла быть хорошо аппроксимирована линейной функцией (рис. 3).

Экспрессия функционально активной рекомбинантной рибонуклеазы Cas13a проводилась при 18°C. В рамках данной работы были протестированы разные температуры культивирования клеток после индукции экспрессии (от 18 до 37°C) и их влияние на уровень экспрессии и функциональную активность целевого белка. Установлено, что повышение температуры до 37°C приводило к тому, что целевой белок за 16 ч инкубации практически весь переходил в клетках в нерастворимую форму. Интересно, что инкубация в температурном диапазоне от 25 до 30°C позволяла получать Cas13a-нуклеазу в растворимой форме, однако полученный при этом рекомбинантный белок проявлял неспецифическую рибонуклеазную активность. Это проявлялось в том, что рекомбинантная Cas13a-нуклеаза расщепляла РНК-репортеры в отсутствие РНК-мишени. Можно предположить, что фолдинг Cas13a-нуклеазы протекал различно при разных температурах. Хотя культивирование при 18°C приводило к относительно невысокому уровню экспрессии целевого белка (количество чистого белка, которое получается в этих условиях, составляло ~1 мг на 100 мл среды), оно обеспечивало экспрессию функционально активной Cas13a-нуклеазы. Также дополнительно кроме штамма Rosetta™ 2(DE3)pLysS была исследована возможность экспрессии Cas13a-нуклеазы в таких штаммах *E. coli*, как BL21(DE3)pLysS и BL21-Gold, трансформированных вектором pET His6-TwinStrep-SUMO-LwaCas13a. Однако уровень экспрессии целевого белка в этих штаммах был крайне низким.

Было протестировано также, как длительность хранения полученного рекомбинантного белка влияла на его мишень-зависимую коллатеральную рибонуклеазную активность. Как видно из рис. 4, в течение 5-месячного хранения белка в концентрации 1.3 мг/мл при -80°C, коллатеральная активность несколько уменьшалась со временем. В отсутствие мишени существенной рибонуклеазной активности не наблюдалось во всех экспериментах. Однако это уменьшение больше проявлялось в замедлении кинетики расщепления РНК-репортеров, и в меньшей степени в уровне флуоресценции, достигаемом к концу 2-часовой инкубации.

Возможность одностадийной очистки Cas13a-нуклеазы была также недавно показана в работе [24]. Используя экспрессионную конструкцию, содержащую ген *cas13a L. wadei* с оптимизированным кодоновым составом, авторы получили функционально активный препарат Cas13a с помощью гетерологической экспрессии в *E. coli*. Однако удельная активность полученного препарата была

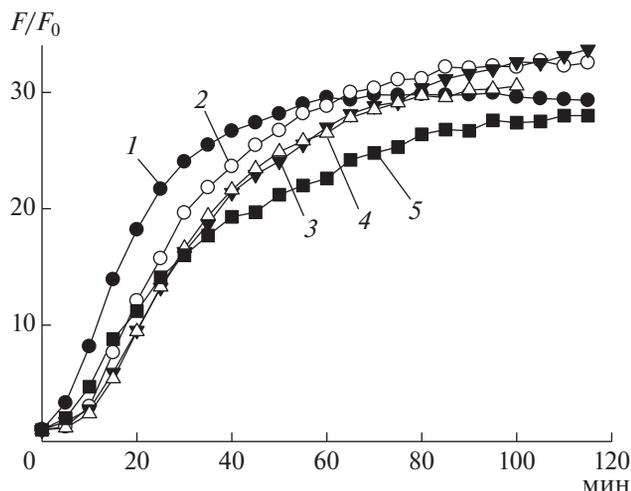


Рис. 4. Зависимость функциональной активности Cas13a-нуклеазы от времени хранения. 1 — кинетика относительной флуоресценции (F/F_0) при инкубации флуоресцентно-меченного РНК-субстрата со свежеприготовленной Cas13a-нуклеазой; 2, 3, 4 и 5 — то же после хранения при -80°C в течении 1, 2, 3.5 и 5 мес. соответственно. Количество суммарной РНК *E. coli* — 800 нг. Показаны среднеарифметические значения для трехкратных измерений; относительные среднеквадратичные отклонения не превышали 15%.

сравнительно низка — деградация субстрата из набора RNase Alert наблюдалась при концентрации Cas13a 450 нМ, тогда как в экспериментах в настоящей работе для достижения сопоставимой активности было достаточно 45 нМ Cas13a-нуклеазы. Возможно, чистота препарата целевого белка методом одностадийной очистки, предложенном в работе [24], была ниже, чем в настоящей. Различие в активности также могло быть обусловлено функциональными свойствами белков, полученных в разных штаммах, при разных условиях культивирования и с использованием по-разному оптимизированных генных последовательностей.

Таким образом показано, что рекомбинантная Cas13a-нуклеаза с мишень-зависимой коллатеральной РНКазной активностью может быть получена после гетерологической экспрессии в *E. coli* с помощью простой одностадийной очистки металл-хелатной хроматографии с использованием N-концевой полигистидиновой метки. Это расширяет возможности исследования Cas13a-нуклеаз как основы для разработки диагностических биосенсорных систем нового поколения и их последующего практического использования. Кроме того, полученные результаты указывают на то, что неохарактеризованный белок U2PWF1 *L. wadei* представляет собой Cas13a-нуклеазу.

Авторы выражают благодарность Ю.В. Колтевцеву (Сколтех) за дискуссию о перспективах CRISPR-детекторов и сотрудникам ИБМХ

им. В.Н. Ореховича И.Ю. Торопыгину и В.Г. Згода за помощь в проведении масс-спектрометрического анализа.

В работе использовалось оборудование ЦКП “Протеом человека” ИБМХ им. В.Н. Ореховича

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. van der Oost J., Westra E.R., Jackson R.N., Wiedenheft B. // Nat. Rev. Microbiol. 2014. V. 12. № 7. P. 479–492.
2. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F. // Curr. Opin. Microbiol. 2017. V. 37. P. 67–78.
3. Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. // Cell. 2014. V. 157. № 6. P. 1262–1278.
4. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Konermann S., Joung J., Slaymaker I.M., Cox D.B., Shmakov S., Makarova K.S., Semenova E., Minakhin L., Severinov K., Regev A., Lander E.S., Koonin E.V., Zhang F. // Science. 2016. V. 353. № 6299. P. aaf5573.
5. Pickar-Oliver A., Gersbach C.A. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019. V. 20. № 8. P. 490–507.
6. Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S., Essletzbichler P., Han S., Joung J., Belanto J.J., Verdine V., Cox D.B.T., Kellner M.J., Regev A., Lander E.S., Voytas D.F., Ting A.Y., Zhang F. // Nature. 2017. V. 550. № 7675. P. 280–284.
7. Cox D.B.T., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Franklin B., Kellner M.J., Joung J., Zhang F. // Science. 2017. V. 358. № 6366. P. 1019–1027.
8. Shmakov S., Abudayyeh O.O., Makarova K.S., Wolf Y.I., Gootenberg J.S., Semenova E., Minakhin L., Joung J., Konermann S., Severinov K., Zhang F., Koonin E.V. // Mol. Cell. 2015. V. 60. № 3. P. 385–397.
9. Tambe A., East-Seletsky A., Knott G.J., Doudna J.A., O’Connell M.R. // Cell Rep. 2018. V. 24. № 4. P. 1025–1036.
10. East-Seletsky A., O’Connell M.R., Knight S.C., Burstein D., Cate J.H., Tjian R., Doudna J.A. // Nature. 2016. V. 538. № 7624. P. 270–273.
11. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Lee J.W., Essletzbichler P., Dy A.J., Joung J., Verdine V., Donghia N., Daringer N.M., Freije C.A., Myhrvold C., Bhattacharyya R.P., Livny J., Regev A., Koonin E.V., Hung D.T., Sabeti P.C., Collins J.J., Zhang F. // Science. 2017. V. 356. № 6336. P. 438–442.
12. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Kellner M.J., Joung J., Collins J.J., Zhang F. // Science. 2018. V. 360. № 6387. P. 439–444.
13. Kellner M.J., Koob J.G., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Zhang F. // Nat. Protoc. 2019. V. 14. № 10. P. 2986–3012.
14. Myhrvold C., Freije C.A., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Metsky H.C., Durbin A.F. et al. // Science. 2018. V. 360. № 6387. P. 444–448.
15. Li Y., Li S., Wang J., Liu G. // Trends Biotechnol. 2019. V. 37. № 7. P. 730–743.

16. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. // Nat. Protoc. 2006. V. 1. № 6. P. 2856–2860.
17. Barsnes H., Vaudel M. Searchgui: // J. Proteome Res. 2018. V. 17. № 7. P. 2552–2555.
18. Vaudel M., Burkhart J.M., Zahedi R.P., Oveland E., Berven F.S., Sickmann A., Martens L., Barsnes H. // Nat. Biotechnol. 2015. V. 33. № 1. P. 22–24.
19. Bjornson R.D., Carriero N.J., Colangelo C., Shifman M., Cheung K.H., Miller P.L., Williams K. // Proteome Res. 2008. V. 7. № 1. P. 293–299.
20. Kim S., Pevzner P.A. // Nat. Commun. 2014. V. 5. P. 5277.
21. Geer L.Y., Markey S.P., Kowalak J.A., Wagner L., Xu M., Maynard D.M., Yang X., Shi W., Bryant S.H. // J. Proteome Res. 2004. V. 3. № 5. P. 958–964.
22. Zhu H., Richmond E., Liang C. // Bioinformatics. 2018. V. 34. № 1. P. 117–119.
23. Zuker M. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. № 13. P. 3406–3415.
24. Савинова А.С., Контев Е.Ю., Усачев Е.В., Ткачук А.П., Гушин В.А. // Вестник РГМУ. 2018. Т. 2. P. 21.

Single Stage Purification of CRISPR/Cas13a Nuclease by Metal-Chelating Chromatography Following Heterologous Expression with Preservation of Collateral Ribonuclease Activity

L. K. Kurbatov^{a,*}, S. P. Radko^{a,**}, S. V. Kravchenko^b, O. I. Kiseleva^a,
N. D. Durmanov^b, and A. V. Lisitsa^{a,b}

^a*N.V. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121 Russia*

^b*University of Tyumen, West Siberia Interregional Research and Educational Center, Tyumen, 625003 Russia*

*e-mail: kurbatovl@mail.ru

**e-mail: radkos@yandex.ru

CRISPR/Cas13a nucleases whose collateral ribonuclease activity is revealed upon selective recognition of targeted RNA sequences are considered today as a basis for the development of new generation biosensors for the ultrasensitive in-field detection of bacterial and viral pathogens. To produce the recombinant Cas13a nuclease, a three stage purification procedure is presently employed including consequently affinity (Strep-tag), ion-exchange, and exclusion chromatography. In this work we demonstrated that recombinant Cas13a nuclease can be purified after heterologous expression in *E. coli* by a single step metal-chelating chromatography, utilizing the *N*-terminal polyhistidine tag. The simplified procedure of Cas13a nuclease purification broadens possibilities for a development and further practical application of Cas13a based diagnostic biosensing systems. Besides, our results indicate that currently uncharacterized proteins U2PWF1 of *Leptotrichia wadei* represents Cas13a nuclease.

Keywords: CRISPR-Cas, Cas13a ribonuclease, purification, metal-chelating chromatography, collateral activity

УДК 578.81;

ПРЕПАРАТИВНАЯ ОЧИСТКА БАКТЕРИОФАГОВ *Pseudomonas aeruginosa* КОМБИНАЦИЕЙ ГЕЛЬ-ПРОНИКАЮЩЕЙ И АНИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 2020 г. Н. Н. Ландышев¹, Я. Г. Воронько¹, Е. Е. Куликов²,
Н. Н. Сыкилинда³, К. А. Мирошников³, *

¹Российский университет дружбы народов, Медицинский институт, Москва, 117198 Россия

²Институт микробиологии им. Виноградского ФИЦ “Биотехнологии” РАН, Москва, 117312 Россия

³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

*e-mail kmi@ibch.ru

Поступила в редакцию 15.06.2020 г.

После доработки 30.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

Разработана и описана схема очистки бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*, состоящая из последовательных этапов гель-фильтрационной и анионообменной хроматографии. Испытание схемы на пяти фагах различных размеров и морфологии показало одинаковые результаты, что позволяет рассматривать предложенный подход как универсальный и хорошо масштабируемый.

Ключевые слова: бактериофаги, *Pseudomonas aeruginosa*, анионообменная хроматография, стекло с контролируемым размером пор

DOI: 10.31857/S0555109920060094

Бактериофаги (фаги), открытые в начале XX в., нашли свое применение во многих сферах. Они используются как противомикробные агенты, средства для фагового дисплея в изучении пептидов, инструменты эффективной вакцинации, доставки генов, а также специфического обнаружения и типирования бактерий. Чистота бактериофагов, необходимая для каждого применения, значительно различается. При этом фаговые препараты, предназначенные для медицинского и пищевого использования, должны содержать минимальное количество бактериальных токсинов [1–5]. Первые успешные попытки хроматографической очистки фагов были предприняты в 60–70 гг. прошлого столетия [6], однако впоследствии осаждение полиэтиленгликолем (ПЭГ) и ультрацентрифугирование в градиенте плотности CsCl стали общепринятыми методами на несколько десятилетий. Такие способы обеспечивают получение бактериофагов необходимой чистоты в лабораторном масштабе, однако они неприемлемы для промышленного применения из-за ограничений в масштабировании, невысокого выхода и необходимости последующего удаления CsCl [7].

В последние годы наблюдается возрождение интереса к применению хроматографических методов очистки фагов. Многочисленные исследования показали эффективность анионообменной хроматографии (АОХ) на метилметакрилатных мо-

нолитных смолах, однако высокая цена и сложность регенерации носителя остаются существенными препятствиями для массового внедрения метода [8–11]. Таким образом, потребность в доступных, масштабируемых и эффективных методах очистки бактериофагов остается открытой.

Цель работы – изучение возможности комбинированной хроматографической очистки (гель-фильтрация и анионообменная хроматография) для препаративной очистки бактериофагов.

МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы и бактериофаги. В работе в качестве модельных использовали охарактеризованные бактериофаги *Pseudomonas aeruginosa*, относящиеся к различным группам порядка *Caudovirales*: phiKZ [12], SN [13], phiKMV [14], YuA [15], а также нитчатый (*Inoviridae*) фаг pFB, по размерам частицы и генома сходный с описанным фагом pF5 [16]. Морфология, размеры и другие параметры фагов приведены в табл. 1. Первые три бактериофага могут быть обнаружены в составе экспериментальных [17] и промышленных [18, 19] фаговых препаратов для лечения вторичных инфекций ран и ожогов, вызванных синегнойной палочкой. Для культивирования бактериофагов использовали лабораторный штамм *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692). Несмотря на отсутствие в этом штамме факторов вирулентности

Таблица 1. Бактериофаги *Pseudomonas aeruginosa*, использованные в работе (таксономические данные представлены в соответствии с выпуском ICTV-2018b)

Фаг	Семейство/подсемейство	Род	Размер (капсид/хвост)	Геном, п.н.	NCBI Genbank №	Ссылка
PhiKZ	<i>Myoviridae</i>	Phikzvirus	145/200	280.334	NC_004629	[12]
SN	<i>Myoviridae</i>	Pbunavirus	74/140	66.390	NC_011756	[13]
YuA	<i>Siphoviridae</i>	Yuavirus	72 × 51/145	58.663	AM_749441	[15]
phiKMV	<i>Podoviridae/Autographivirinae</i>	Phikmvvirus	60/20	42.519	NC_005045	[14]
pFB1*	<i>Inoviridae</i>	—	—	12.409	Родственнен pF5	[16]

* В настоящий момент не представлен в ICTV.

и пониженный уровень синтеза экзополисахаридов, лизаты РАО1 обладают высоким уровнем пирогенности [20]. Таким образом, выбранная модель позволяет адекватно верифицировать метод в контексте медицинского и ветеринарного применения бактериофагов.

Культивирование и первичное выделение бактериофагов. Фаголизаты были получены традиционным способом [21]. Клетки штамма РАО1 *P. aeruginosa* культивировали при 37°C и интенсивной аэрации в жидкой среде 2хТУ (бакто-триптон – 16 г/л, дрожжевой экстракт – 10 г/л, NaCl – 5 г/л) до плотности 2×10^8 кл./мл, затем инфицировали суспензией фага и инкубировали до полного лизиса клеток. Дополнительно клетки лизировали обработкой 0.5%-ным (об./об.) раствором хлороформа в течение 2 ч при 4°C. Затем фаголизат обрабатывали ДНКазой I (“Sigma”, США, 20 г/мл) в течение 1 ч. Фрагменты клеток удаляли центрифугированием при 4000 g (Megafuge 2.0 R, “Heraeus”, Германия) в течение 20 мин. Титр фагов в фаголизате составил 10^{10} – 10^{11} БОЕ/мл

Жидкостная хроматография. Хроматографию проводили на полуавтоматической хроматографической системе Pharmacia FPLC (“GE Healthcare”, США) с проточной детекцией продуктов по поглощению УФ-излучения с длиной волны 280 нм (A_{280}). Для оценки воспроизводимости и точности метода, а также емкости колонки, все эксперименты проводили для каждого фага трижды. Схематическое представление эксперимента показано на рис. 1.

Гель-проникающая хроматография. Микропористое стекло с контролируемым размером пор 500 Å, mesh 120/200 (“Serva”, Германия) ресуспендировали в воде и заполняли колонку 1.5 × 75 см, снабженную верхним адаптером (“Bio-Rad”, США). Сорбент уравнивали буферным раствором А (20 мМ трис–HCl, pH 8.0) и промывали 3%-ным (вес./об.) полиэтиленгликолем (ПЭГ) 20.000 (“Fluka Analytics”, США) в буферном растворе А до стабилизации базовой линии. Бактериофаги осадили центрифугированием при 24000 g (Sorvall RS 5, ротор SA600, “Thermo Fisher Scientific”, США) в течение 1 ч при 4°C. Осадок ресуспендировали в 2 мл среды 2хТУ и наносили на колонку. Изократическую элюцию буферным

раствором А проводили при скорости 4 мл/мин. После каждой хроматограммы колонку стерилизовали 2 об. 30%-ного этанола в буферном растворе А.

Анионообменная хроматография. Для хроматографии использовали картриджи на 5 мл EconoPac High Q (“Bio Rad”, США). Фракции, полученные после гель-проникающей хроматографии, соответствующие частично очищенному фагу, наносили на колонку, уравновешенную буферным раствором А. Сорбированный материал элюировали линейным градиентом (0–1.0 М) NaCl в буферном растворе А. Фракции, содержащие инфекционные фаговые частицы, диализовали против фагового буферного раствора (10 мМ Трис–HCl pH 7.5; 200 мМ NaCl, 2 мМ MgSO₄) и, при необходимости, концентрировали с помощью центрифужного ультрацентрифугатора Centricon YM 100 (“Millipore”, США).

Активность бактериофагов. Инфекционную активность в лизатах и фракциях при хроматографии определяли традиционным титрованием с использованием двуслойного агара на культуре штамма РАО1 *P. aeruginosa* [21].

Электрофорез в полиакриламидном геле. Чистоту и целостность частиц бактериофагов оценивали посредством разделения структурных белков электрофорезом в 12%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с последующей окраской Coomassie Blue [22] и визуальным сравнением профилей белковых полос с образцовыми структурными электрофореграммами препаратов бактериофагов, очищенных ультрацентрифугированием в градиенте CsCl.

Электронная микроскопия. Препараты бактериофагов наносили на покрытую коллоидной пленкой и напыленную аморфным углеродом сетку и контрастировали 1%-ным раствором уранил-ацетата в метаноле [23]. Изображения бактериофагов были получены методом просвечивающей электронной микроскопии с использованием микроскопа Jeol-JEM CX100 (“Jeol”, Япония) с ускоряющим напряжением 100 кВ.

Контроль концентрации эндотоксина. Концентрацию эндотоксина в образцах бактериофагов оценивали в абсолютных значениях, выраженных

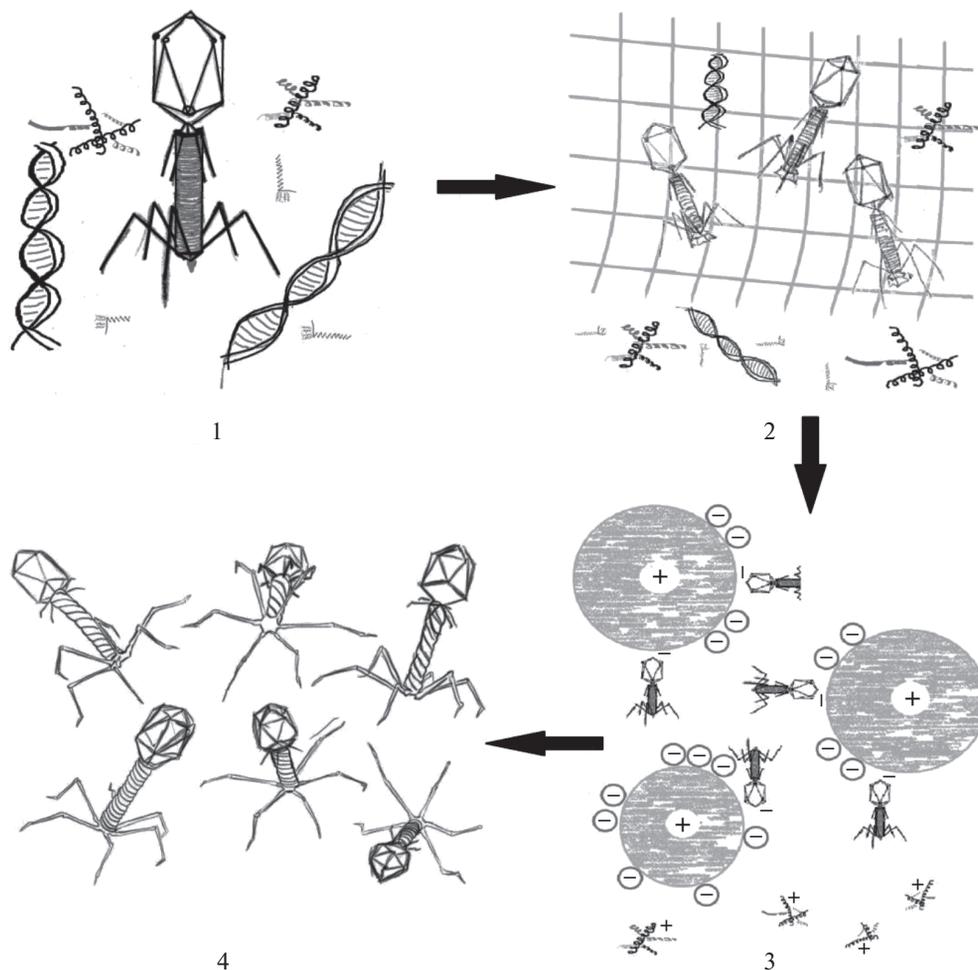


Рис. 1. Схематическое изображение эксперимента: 1 этап – лизат с бактериофагами и примесями клеточных метаболитов, белков, ДНК; 2 этап – гель-фильтрационная хроматография (задержка бактериофага и крупных белков/ДНК в матрице стекла с контролируемым размером пор); 3 этап – анионообменная хроматография (показано взаимодействие отрицательно заряженных бактериофагов с положительно заряженной смолой); 4 этап – очищенные бактериофаги.

в единицах эндотоксина/мл (ЕЭ/мл), с помощью фармакопейного полуколичественного LAL-теста согласно инструкции производителя (“Merck”, Германия).

Статистический анализ проводили в системе Microsoft Excel 2016.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Очистка бактериофагов с использованием комбинированного подхода. В настоящем исследовании была использована комбинация хроматографических методов (гель-фильтрации и анионообменной хроматографии) для очистки бактериофагов. Применение такой системы позволило достичь снижения концентрации эндотоксинов в препарате до <150 ЕЭ/мл, вне зависимости от размера и морфологии вируса. Чистоту полученных препаратов подтверждали результатами электронной микроскопии, убедительно показавшими просветление фона и уменьшение количества загрязняющих

везикулярных частиц (рис. 2). В то же время инфекционность фаговых частиц оставалась на высоком уровне $1-5^{10-11}$ БОЕ/мл, выход метода составил >59% в зависимости от вида очищаемого вируса. Параметры чистоты и выхода конкретных бактериофагов представлены в табл. 2. Несмотря на использование в эксперименте бактериофагов с различной морфологией и размером капсида, выход метода показал высокую сходимость (коэффициент вариации 8.3%), что позволило утверждать, что такой подход может быть универсальным.

Применение хроматографии представляет собой перспективную альтернативу существующим методам в контексте крупномасштабного промышленного получения медицинских препаратов. Однако на сегодняшний день не существует метода, который удовлетворял бы всем требованиям “золотого стандарта”, дающего возможность получения препаратов высокой степени очистки, имеющих невысокую стоимость, универсально подходящих для очистки фагов разной

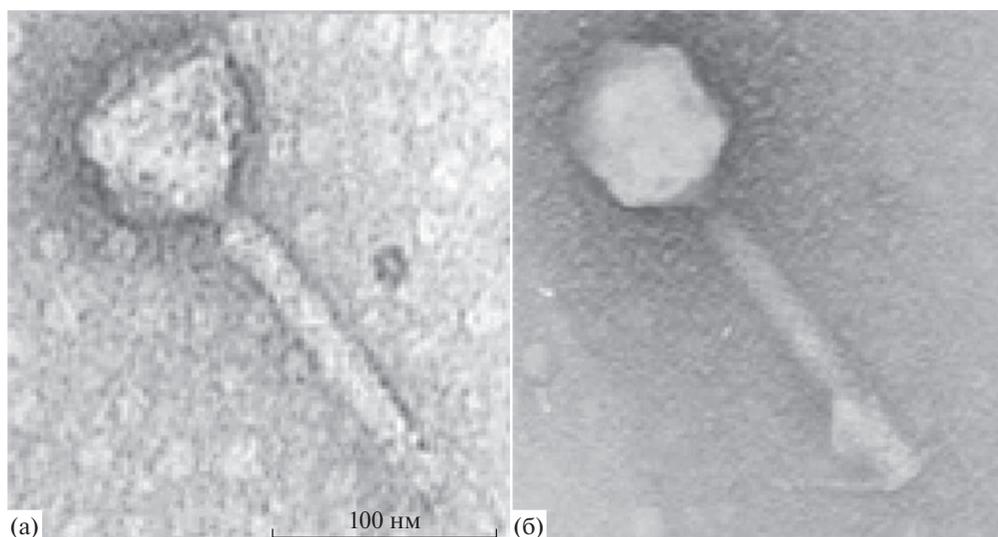


Рис. 2. Электронная микрофотография фага SN с негативным контрастированием: а – после гель-фильтрации, б – очищенный фаг (шкала – 100 нм).

морфологии и размера, экологических и масштабируемых. Предложенная нами комбинация хроматографических подходов направлена на достижение оптимального баланса между указанными требованиями.

Гель-проникающая хроматография на стекле с контролируруемыми порами. Выбор такого метода хроматографии в качестве первого этапа очистки был обусловлен необходимостью максимального удаления ионогенных биомолекул ДНК и РНК перед анионообменной хроматографией. Согласно полученным результатам, выход фага показал высокую сходимость (коэффициент вариации 12%), хроматографические профили также были сопоставимы (рис. 3), что позволило утверждать, что гель-проникающая хроматография может быть использована для первичной очистки бактериофагов разной морфологии и размера. Корреляционный анализ показал, что выход метода слабо зависит от размера капсида ($r = -0.34$) – слабая отрицательная связь согласно шкале Чеддока и очень слабо зависит от размера хвоста и общей длины вируса ($r = 0.25$ и 0.05 соответственно) – очень слабая положительная связь согласно шкале Чеддока.

Каркасы из пористого стекла с контролируемым размером пор (controlled-pore glass, GPG) являются распространенными матрицами для синтеза хроматографических сорбентов. Такие матрицы могут быть использованы для хроматографии и без модификации. Разделение на стеклянных носителях основано на сочетании гель-фильтрации и обратной сорбции компонентов на поверхности. Термодинамические основы сорбции вирусов описаны в работе [24]. Адсорбирующая поверхность пор может быть уменьшена за счет обработки ПЭГ [25]. На этапе планирования эксперимента предполагали, что неспецифическое связывание фагов частицами смолы значительно снизит выход метода, однако в ходе эксперимента гипотеза о необходимости добавления ПЭГ была опровергнута. Вероятно, низкий уровень необратимого связывания фагов объясняется более высоким сродством низкомолекулярных компонентов лизата к частицам сорбента, что препятствовало адсорбции фага.

Успех хроматографической очистки бактериофагов зависит от понимания того, как эндотоксины бактерий ведут себя на различных сорбентах. Благодаря амфифильной природе молекулы липополисахарида, а также его ассоциации с мем-

Таблица 2. Результаты гель-фильтрационной и анионообменной хроматографии

Фаг	PhiKZ	SN	YuA	phiKMV	pFB1
Титр в лизате БОЕ*10 ¹¹ /мл	1.7	7	3	4	1
Титр после гель-фильтрации БОЕ*10 ¹¹ /мл	1.3	5.8	3	3	0.8
Выход после гель-фильтрации, %	76	84	100	75	80
Титр после анионообменной хроматографии БОЕ *10 ¹¹ /мл	1	5	2.1	2.5	0.7
Выход после анионообменной хроматографии, в %	77	86	70	83	88
Выход после комбинированной очистки, %	59	71	70	62	70
Концентрация эндотоксина	< 150 ЕЭ/мл				

бренными липидами в водном растворе в присутствии двухвалентных катионов линейные эндотоксины формируют мицеллы и везикулы с молекулярной массой более 1000 кДа [26]. Получившиеся структуры отличаются по своему размеру от фаговой частицы меньше, чем мономеры эндотоксинов, что усложняет выбор среды для эффективной очистки от липополисахаридов методом гель-фильтрации [27]. В настоящем исследовании показано, что размер пор 500 Å оптимален для такого применения.

Большинство исследований, посвященных применению хроматографии со стеклом с контролируемым размером пор, были проведены в 70 гг прошлого века. Последующее развитие синтетической химии привело к появлению сорбентов для гель-фильтрационной хроматографии, имеющих высокую стабильность и выраженную зависимость объема элюции от объема и массы элюата. Таким образом, хроматография с использованием СРГ была признана устаревшей для использования в биологии. Однако такой вид разделения имеет множество преимуществ: низкую себестоимость, высокие механическую и химическую стабильность по сравнению с агарозой, целлюлозой, декстраном и поливиниловыми смолами и, кроме того, позволяет легко масштабировать процесс и применять высокую скорость элюции без заметного воздействия на разделение. Отдельным преимуществом является возможность использования доступных и экологичных реагентов для очистки и стерилизации колонки.

В литературе приведено множество примеров успешного применения СРГ хроматографии для очистки крупных мицелл [28], токсинов [29], а также вирусов растений [30, 31], животных и бактерий [32]. Применение данного метода для вирусов позволяет добиться чистоты, сопоставимой с таковой при ультрацентрифугировании в градиенте сахарозы, что подтверждается параметрами оптической плотности, тестами на инфекционность и серологическими методами.

Анионообменная хроматография (АОХ). Выбор АОХ в качестве второго этапа очистки бактериофагов обусловлен большим опытом применения данного метода для очистки вирусов, что было подробно рассмотрено в обзоре [33]. Согласно полученным данным, выход фага после этого метода составил более 70% (табл. 2). Коэффициент вариации выхода, равный 9%, и сходимость полученных хроматограмм (рис. 4) позволили утверждать, что АОХ применима для очистки фагов разной морфологии и размеров.

Несмотря на ряд преимуществ, у данного метода есть и некоторые ограничения: распределение частиц сорбента по размерам не оптимально для прохождения между ними больших частиц, клеточные лизаты содержат большое количество заряженных примесей (особенно нуклеиновых кислот), которые конкурируют с бактериофагами

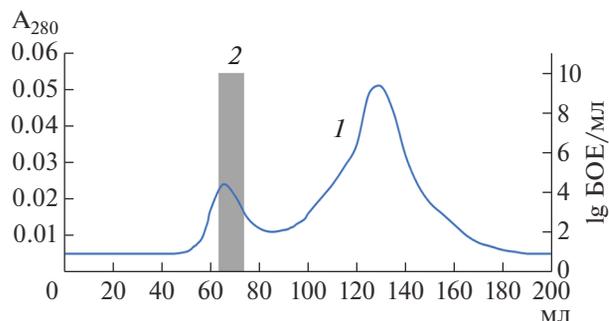


Рис. 3. Хроматограмма, полученная при гель-фильтрации фаголизата на стекле с контролируемым размером пор. 1 — A_{280} ; 2 — инфекционность фага в собранных фракциях, lg БОЕ/мл.

за участки связывания. Первый недостаток может быть преодолен использованием расширенной упаковки колонок [34] или монолитных сорбентов с большим размером каналов, которые улучшают прохождение вирусов через колонку и повышают степень иммобилизации [11]. Использование метилметакрилатных монолитов, однако, не удовлетворяло условиям идеальной колонки из-за высокой цены и, как следствие, трудностей масштабирования. Второе ограничение может быть преодолено предварительной очисткой препарата от нуклеиновых кислот. В данной работе большая часть бактериальной ДНК и мРНК была удалена во время первого этапа хроматографии, что позволило достичь удовлетворительной емкости колонки ($\sim 10^{10}$ фаговых частиц/мл смолы). Сравнительные эксперименты с сорбентами, модифицированными четвертичными аминогруппами, от различных производителей: Q-Sepharose Fast Flow (“GE Healthcare”, США), Toyopearl SuperQ 650M (“Tosoh biosciences”, Япония), Macro-Prep HighQ (“Bio Rad”, США), не показали значимых преимуществ какого-то продукта по емкости или разрешению.

Также при сравнении хроматограмм была отмечена интересная особенность: во всех экспериментах концентрации NaCl, при которых проходила элюция фага, были близки вне зависимости от размера или морфологии фаговых частиц (рис. 3), что открыло возможности для изолирования сообществ нитчатых и хвостатых фагов с последующей одновременной элюцией с колонки.

Контроль содержания бактериальных эндотоксинов. Клеточные лизаты содержат большое количество компонентов среды, фрагментов клеточных стенок бактерий, эндо- и экзотоксинов, пептидогликанов, органелл и других потенциально иммуногенных факторов. Потенциальная опасность конкретных загрязнителей зависит от вида и штамма бактерий. В то время как компоненты лизата клеток *Escherichia coli* не вызывают, как правило, серьезных проблем и даже повышают противомикробный ответ, лизаты клеток *Sal-*

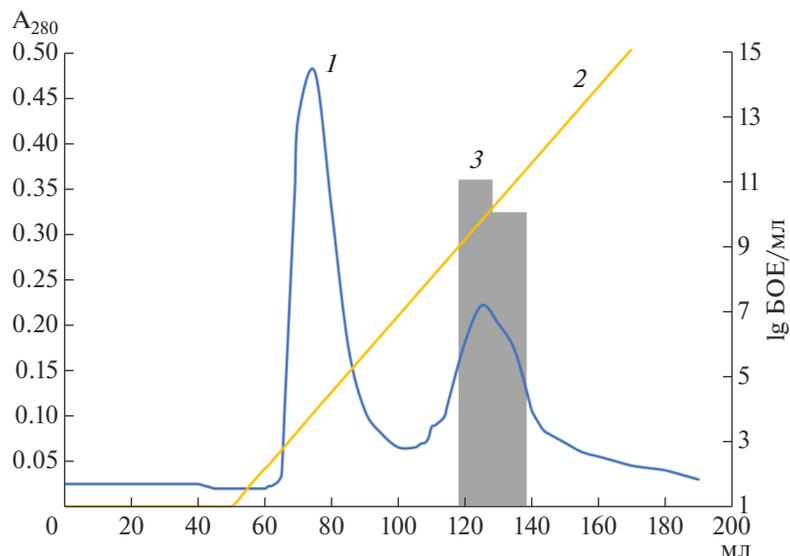


Рис. 4. Анионообменная хроматография образца частично очищенных фракций после гель-фильтрации. 1 – A_{280} , 2 – градиент NaCl от 0 до 1.0 М, 3 – инфекционность фага в собранных фракциях, lg БОЕ/мл.

monella enteridis pv *typhimurium* крайне токсичны из-за наличия в них фрагментов полисахаридов клеточных стенок. В настоящей работе не была исследована концентрация эндотоксинов в процессе хроматографической очистки, однако экспериментально определенное конечное содержание эндотоксинов в очищенном препарате составило <150 ЕЭ/мл раствора бактериофага с концентрацией $\sim 10^{11}$ БОЕ/мл. Растворы с таким значением могут применяться как местно, так и внутрь без дополнительной очистки [35, 36].

В настоящем исследовании продемонстрирована оптимальная комбинация хроматографических методов для препаративной очистки бактериофагов из клеточных лизатов. Оценку метода проводили на 5 бактериофагах *P. aeruginosa*, отличающихся по морфологии и размерам. Во всех случаях двухстадийная очистка позволяла избавиться от нежелательных примесей без значительных потерь титра и инфекционной способности фаговых частиц. Выход метода превышал 60%, а чистота полученных фаговых препаратов была равна или превосходила чистоту образцов, полученных методом градиентного ультрацентрифугирования. В процессе очистки использовались недорогие хроматографические сорбенты, масштабируемость которых была продемонстрирована зарубежными исследователями [37], использовалось простое аппаратное оформление (перистальтический насос и УФ-монитор). Например, фракции, полученные при хроматографии на стекле с контролируемым размером пор, могли быть сразу же нанесены на колонку для анионообменной хроматографии. Отдельно стоит отметить, что значения pH буферов, используемых при очистке, близки к физиологическим, что поз-

волило сохранить инфекционную способность бактериофагов. Полученные нами результаты были подтверждены и другими авторами [11, 38].

Необходимо отметить, что разработанный метод имеет и недостатки. Например, нам не удалось избежать этапа центрифугирования из-за необходимости концентрирования лизата перед нанесением на колонку СРГ. Использование буферных растворов с высокой ионной силой (600–700 мМ NaCl) не было оптимальным для хранения и применения бактериофагов, так как требовало последующего диализа. Однако разработанный протокол требует меньше времени и более универсален, по сравнению с широко используемым методом преципитации ПЭГ и ультрацентрифугирования в градиенте CsCl, что позволяет применять его для очистки фагов различной морфологии.

Авторы благодарят Е.Д. Шибанову (ИБХ РАН) за проведение LAL-теста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abedon S.T., Kuhl S.J., Blasdel B.G., Kutter E.M.* // Bacteriophage. 2011. V. 1. № 2. P. 66–85.
2. *Górski A., Międzybrodzki R., Borysowski J., Weber-Dąbrowska B., Łobočka M., Fortuna W., Letkiewicz S., Zimecki M., Filby G.* // Curr. Opin. Investig. Drugs. 2009. V. 10. № 8. P. 766–774.
3. *Skurnik M., Pajunen M., Kiljunen S.* // Biotechnol. Lett. 2007. V. 29. № 7. P. 995–1003.
4. *Cooper C.J., Denyer S.P., Maillard J.Y.* // Lett. Appl. Microbiol. 2014. V. 58. № 2. P. 118–122.
5. *Gill J.J., Hyman P.* // Curr. Pharm. Biotechnol. 2010. V. 11. № 1. P. 2–14.
6. *Bachrach U., Friedmann A.* // Appl. Microbiol. 1971. V. 22. № 4. P. 706–715.
7. *Mutti M., Corsini L.* // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 2289

8. *Adriaenssens E.M., Lehman S.M., Vandersteegen K., Vandenheuveld D., Philippe D.L., Cornelissen A., Clokie M.R.J., García A.J., De Proft M., Maes M., Lavigne R.* // *Virology*. 2012. V. 434. № 2. P. 265–270.
9. *Vandenheuveld D., Rombouts S., Adriaenssens E.M.* Purification of Bacteriophages Using Anion-Exchange Chromatography. In: *Methods in Molecular Biology*. N.Y.: Humana Press, 2018. P. 59–69.
10. *Oksanen H.M., Domanska A., Bamford D.H.* // *Virology*. 2012. V. 434. № 2. P. 271–277.
11. *Smrekar F., Ciringer M., Štrancar A., Podgornik A.* // *J. Chromatogr. A*. 2011. V. 1218. № 17. P. 2438–2444.
12. *Mesyanzhinov V.V., Robben J., Grymonprez B., Kostyuchenko V.A., Bourkal'tseva M.V., Sykilinda N.N., Krylov V.N., Volckaert G.* // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 317. № 1. P. 1–19.
13. *Ceyssens P.J., Miroshnikov K., Mattheus W., Krylov V., Robben J., Noben J. P., Vanderschraeghe S., Sykilinda N., Kropinski A.M., Volckaert G., Mesyanzhinov V., Lavigne R.* // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. № 11. P. 2874–2883.
14. *Lavigne R., Burkal'tseva M.V., Robben J., Sykilinda N.N., Kurochkina L.P., Grymonprez B., Jonckx B., Krylov V.N., Mesyanzhinov V.V., Volckaert G.* // *Virology*. 2003. V. 312. № 1. P. 49–59.
15. *Ceyssens P.J., Mesyanzhinov V., Sykilinda N., Briers Y., Roucourt B., Lavigne R., Robben J., Domashin A., Miroshnikov K., Volckaert G., Hertveldt K.* // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190. № 4. P. 1429–1435.
16. *Mooij M.J., Drenkard E., Llamas M.A., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E., Savelkoul P.H.M., Ausubel F.M., Bitter W.* // *Microbiology*. 2007. V. 153. № 6. P. 1790–1798.
17. *Merabishvili M., Pirnay J.P., Verbeke G., Chanishvili N., Tediashvili M., Lashkhi N., Glonti T., Krylov V., Mast J., Van Parys L., Lavigne R., Volckaert G., Mattheus W., Verween G., De Corte P., Rose T., Jennes S., Zizi M., De Vos D., Vaneechoutte M.* // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 3. P. e4944.
18. *Мирошников К.А., Куликов Е.Е., Дарбеева О.С., Лыско К.А., Игнатъев Г.М.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2014. Т. 50. № 3. С. 338–344.
19. *McCallin S., Sarker S.A., Sultana S., Oechslin F., Brüssow H.* // *Environ. Microbiol.* 2018. V. 20. № 9. P. 3278–3293.
20. *Devleeschouwer M.J., Cornil M.F., Dony J.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 1985. V. 50. № 6. P. 1509–1511.
21. *Sambrook J., Russell D.W.* *Molecular Cloning*—Sambrook & Russel. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. P. 200–214.
22. *Brunelle J.L., Green R.* // *Methods Enzymol.* 2014. V. 541. P. 151–159.
23. *Clokie M.R.J., Kropinski A.M.* *Bacteriophages: Methods and Protocols*. 2009. V. XXII. P. 113–127.
24. *Loveland J.P., Ryan J.N., Amy G.L., Harvey R.W.* // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 1996. V. 107. P. 205–221.
25. *Hawk G.L., Cameron J.A., Dufault L.B.* // *Prep. Biochem.* 1972. V. 2. № 2. P. 193–203.
26. *Ongkudon C.M., Chew J.H., Liu B., Danquah M.K.* // *ISRN Chromatogr.* 2012. V. 2012. P. 1–9.
27. *Lee S.H., Kim J.S., Kim C.W.* // *Process Biochem.* 2003. V. 38. № 7. P. 1091–1098.
28. *Mcneili G.P., Donnelly W.J.* // *J. Dairy Res.* 1987. V. 54. № 1. P. 19–28.
29. *Cassidy P., Harshman S.* // *Infect. Immun.* 1976. V. 13. № 3. P. 982–986.
30. *Marcinka K.* // *Acta Virol.* 1972. V. 16. № 1. P. 53–62.
31. *Krasilnikov I.V., Elbert L.B., Borisova V.N., Nakhatpetyan L.A.* // *Acta Virol.* 1985. V. 29. № 4. P. 273–278.
32. *Gschwender H.H., Haller W., Hofschneider P.H.* // *BBA Sect. Nucleic Acids Protein Synth.* 1969. V. 190. № 2. P. 460–469.
33. *Trilisky E.I., Lenhoff A.M.* // *J. Chromatogr. A*. 2007. V. 1142. № 1 SPEC. ISS. P. 2–12.
34. *Anspach F.B., Curbelo D., Hartmann R., Garke G., Deckwer W.D.* // *J. Chromatogr. A*. 1999. V. 865. № 1–2. P. 129–144.
35. Бактериальные эндотоксины. ОФС.1.2.4.0006.15 Государственная фармакопея Российской Федерации IV издания. Т. 1. М.: Министерство Здравоохранения Российской Федерации, 2018. С. 1233–1250.
36. Bacterial endotoxins test In: *European Pharmacopoeia (Ph. Eur.)* 2019. P. 161–168. <https://gmpua.com/Validation/Method/LAL/EUPHARMACOPOEIA.pdf>
37. *Langer P., Schnabel R.* Separation with Porous Glass Membranes and Controlled Pore Glass (CPG) Chromatography In: *Separations for Biotechnology 2*. Dordrecht, Netherlands: Springer, 1990. P. 371–380.
38. *Smrekar F., Ciringer M., Peterka M., Podgornik A., Štrancar A.* // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2008. V. 861. № 2. P. 177–180.

Preparative Purification of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages Using a Combination of Gel-Permeation and Anion-Exchange Chromatography

N. N. Landyshev^a, Y. G. Voronko^a, E. E. Kulikov^b, N. N. Sykilinda^c, and K. A. Miroshnikov^{c,*}

^a*Institute of Medicine, RUDN University, Moscow, 117198 Russia*

^b*Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

^c*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

*e-mail: kmi@ibch.ru

We developed and described the method for purification of the *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages, that consists of sequential steps of size-exclusion and anion-exchange chromatography. Testing the technique on five bacteriophages of different size and morphology showed similar results, that allows us to consider the proposed approach as universal and highly scalable.

Keywords: bacteriophages, *Pseudomonas aeruginosa*, anion-exchange chromatography, controlled-pore glass

УДК: 579.873.11:579.66

БИОСИНТЕЗ ТАКРОЛИМУСА ШТАММОМ *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д В ПРИСУТСТВИИ ПОЛИМЕРНЫХ СОРБЕНТОВ И РАЗРАБОТКА МЕТОДА ЕГО ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ

© 2020 г. Д. С. Салионов^{1,2}, В. Ю. Пошихонцева^{3,4}, В. В. Фокина^{3,4,*},
А. А. Шутов^{3,4}, В. М. Николаева^{3,4}, Г. Г. Васяров², Е. В. Титова²,
В. С. Карасев², С. М. Староверов^{1,2}, М. В. Донова^{3,4}

¹Химический факультет, Московский Государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

²АО “БиоХимМак СТ”, Москва, 119234 Россия

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

⁴ООО “Фарминс”, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: fokina@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 14.05.2020 г.

После доработки 14.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

Такролимус, признанный мировой медициной как наиболее эффективный иммуносупрессивный агент, синтезируется актинобактериями рода *Streptomyces*, однако процесс сопровождается нежелательным образованием близких структурных аналогов. Разработан оригинальный метод его биосинтеза штаммом актинобактерий *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д с применением бромированного стирол-дивинилбензолного сорбента SP-207. Этот подход позволил предотвратить нежелательную деструкцию такролимуса, упростить процедуру его выделения из культуральной среды и повысить его выход. Оптимизирована стадия предварительной очистки за счет использования регенерируемых сорбентов на основе метилметакрилата (HP2MG) и химически модифицированного силикагеля (Диасорб-100-Диол). При реализации технологического процесса применение сорбентов с привитыми к силикагелю сульфогруппами и ионами серебра при конечной очистке такролимуса позволило значительно увеличить производительность данной стадии. При этом выход такролимуса-сырца составил 60–70%. Полученные результаты могут быть использованы при создании полного цикла производства фармацевтической субстанции такролимуса.

Ключевые слова: биосинтез, такролимус, *Streptomyces tsukubensis*, сорбент SP-207, хроматография, выделение, очистка, аскомицин, 8-пропил-аналог такролимуса

DOI: 10.31857/S055510992006015X

Такролимус (FK-506) – это международное непатентованное название лекарственного препарата из группы иммуносупрессантов, представляющего собой 23-членный макролидный поликетид (822 Да), широко применяемый в мировой медицинской практике.

В настоящее время он используется при трансплантации костного мозга, почки и сердца [1–3], для лечения таких иммунных заболеваний, как ревматоидный артрит и кишечные воспаления [4, 5], в терапии atopического дерматита [6, 7], а также аллергических глазных заболеваний [8]. FK-506 проявляет активность против ортопоксвируса, ВИЧ и вируса иммунодефицита кошек [9, 10]. Сообщается о его нейропротекторных и нейрогенеративных свойствах [11, 12], а также о возможном применении в лечении рака [13].

Эффективность такролимуса в предотвращении отторжения после трансплантации, а также при заболеваниях, резистентным к другим видам терапии, лежит в основе его медицинского применения и значимости.

Биосинтез такролимуса начинается с образования (4R,5R)-4,5-дигидроксициклогекс-1-ен-карбоновой кислоты с последующим удлинением углеродного скелета путем присоединения двух малонил-КоА, пяти метилмалонил-КоА, двух метоксималонил-АПБ и одного аллилмалонил-КоА. В дальнейшем углеродная цепь замыкается в кольцо, что обеспечивается включением в нее L-пипеколата, образуемого из L-лизина [14, 15], в результате этого синтезируется промежуточное соединение – пре-такролимус. Завершается синтез такролимуса двумя модификациями пре-такролимуса, включающими метилирование гид-

роксильной группы в положении С31 и окисление атома углерода в положении С20 [15].

Аскомицин и С8-пропил-аналог такролимуса (рис. 1) существенно осложняют получение чистого такролимуса при промышленной ферментации и являются причиной значительных потерь целевого продукта на стадии очистки [16].

Сложности очистки такролимуса также связаны с особенностями поведения молекулы в водных растворах, что обусловлено его цис-транс-конформационной изомеризацией [17], поскольку известно, что в растворе он существует в трех формах, представленных на рис. 2.

Согласно Фармакопее США [18] в фармацевтической субстанции содержание целевого компонента, такролимуса, должно быть не менее 98%, при этом допустимо, что неидентифицированные примеси и такая его изомерная форма, как С19-эпимер, составляют не более 0.1%, а такие его близкородственные аналоги, как аскомицин и С8-пропил-аналог такролимуса – 0.5 и 0.15% соответственно.

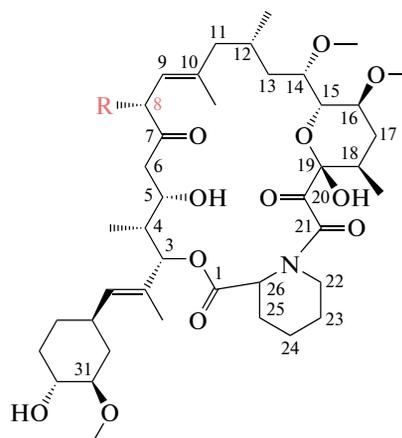
Процесс выделения и очистки такролимуса от примесных соединений включает следующие этапы: (1) выделение такролимуса и его аналогов из культуральной среды, (2) предварительную очистку такролимуса, (3) отделение такролимуса от его близкородственных аналогов и (4) кристаллизацию целевого вещества.

1. Первый этап очистки включает экстракцию такролимуса и его аналогов из культуральной среды органическими растворителями с последующей сорбцией целевого компонента на неионогенном сорбенте [19–21].

2. На второй стадии происходит удаление балластных компонентов, в частности, окрашенных соединений. Как правило, данный этап выполняют в режиме нормально-фазовой жидкостной хроматографии (**НФ ЖХ**) на сорбентах на основе силикагеля или оксида алюминия с использованием в качестве подвижной фазы смеси гексан/этилацетат или гексан/ацетон [19–28].

3. Третий этап необходим для отделения близкородственных аналогов такролимуса, аскомицина и 8-пропил-аналога такролимуса. Данная стадия является ключевой, так как ее производительность и затраты на очистку единицы продукции вносят наибольший вклад в эффективность всей схемы выделения и получения конечного продукта как по показателю качества, так и по стоимости.

Как правило, разделение близкородственных примесей реализуется в режиме **НФ-ВЭЖХ** с использованием силикагелей, импрегнированных ионами серебра [19, 20, 26–28], или ионов серебра, которые добавляют непосредственно в элюент [21, 24]. Такой вариант очистки является наиболее эффективным с точки зрения селективности



- R₁ —CH₂—CH=CH₂ Такролимус
 R₂ —CH₂—CH₃ Аскомицин
 R₃ —CH₂—CH₂=CH₃ С8-Пропил-аналог такролимуса

Рис. 1. Структура такролимуса – 23-членного макроциклического поликететида (R₁), и его близких структурных аналогов: аскомицина (R₂) и 8-пропил-аналога такролимуса (R₃). Нумерация атомов в молекуле такролимуса соответствует действующей фармакопее [18].

и обеспечивает большую нагрузку и выход целевого компонента. Однако эти сорбенты имеют существенный недостаток, связанный со смыванием серебра в процессе проведения разделения, что приводит к потере сорбентом сорбционно-хроматографических свойств [26–28].

Прочное удерживание ионов серебра на сорбенте обеспечивают сульфокатиониты в Ag⁺-форме, однако особенности процесса очистки на таких сорбентах недостаточно изучены, отсутствуют также корректные данные об их селективности, нагрузочных характеристиках и производительности.

4. Четвертой завершающей стадией очистки такролимуса является его кристаллизация из водно-органических смесей, что позволяет получить целевой продукт в правильной конформации.

В предыдущих работах было подтверждено филогенетическое положение штамма-продуцента такролимуса и уточнено его видовое название как *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, а также разработан метод и оптимизированы условия биосинтеза поликететида, обеспечивающие высокий выход [29–31].

Цель работы – изучение биосинтеза такролимуса в присутствии полимерных сорбентов и разработка метода его выделения из культуральной среды *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и очистки для получения кристаллического продукта высокой степени чистоты.

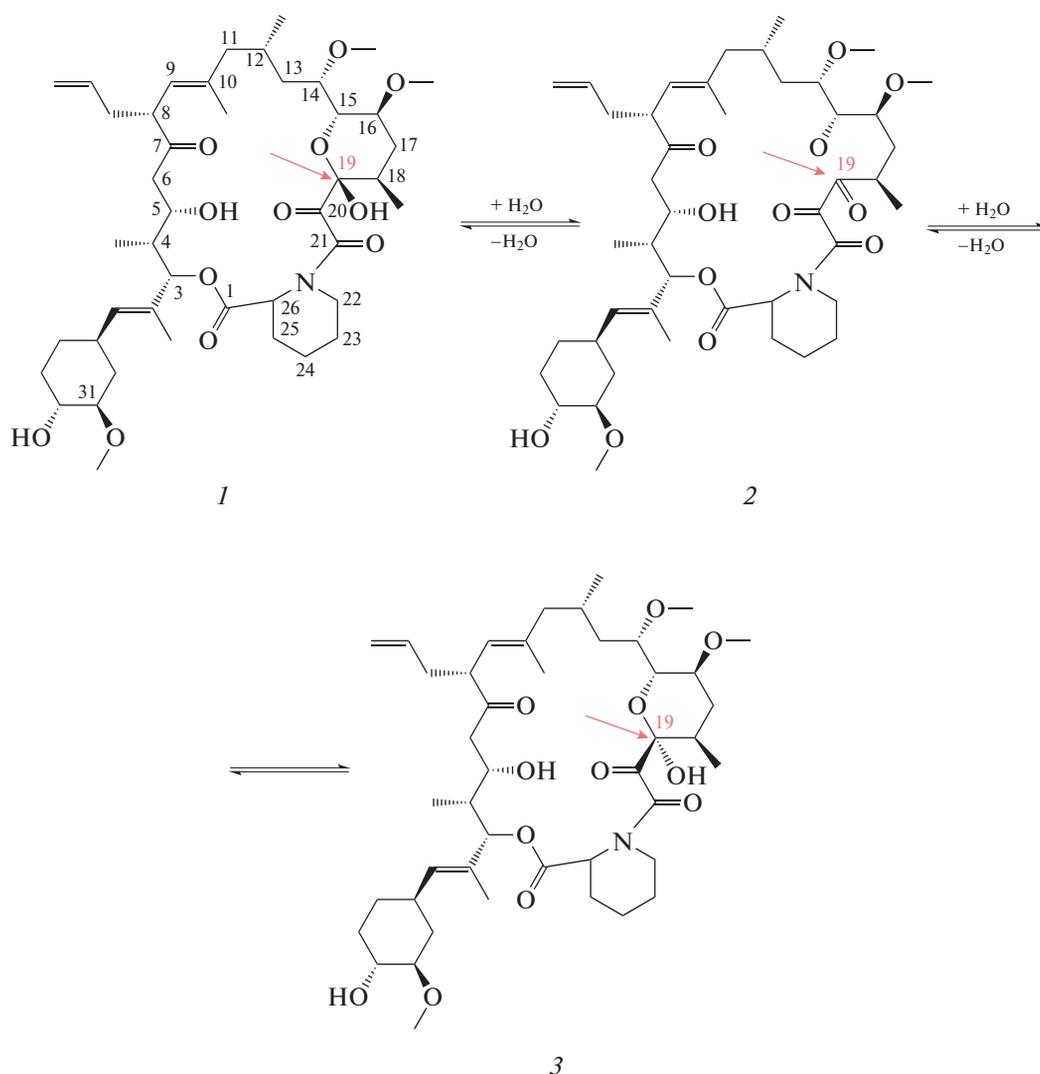


Рис. 2. Процесс изомеризации такролимуса (1) в водных растворах с образованием эимерных форм: такролимус-открытое кольцо (2) и C19-эимер такролимуса (3). Таутомерный центр молекулы показан стрелкой [17].

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы: сорбент XAD-7 HP (“Sigma-Aldrich”, США), сорбенты SP-207 и HP2MG (“Mitsubishi chemical corporation”, Япония), силикагель (“Merck”, Германия), Диасорб-100-Диол, Диасфер-АК-СП-100, Диасорб-60-СП и Диасорб-100-Сульфо (АО “БиоХимМак СТ”, Россия), Relisorb SP400/SS (“Resindion”, Италия), Dowex 50WX8 (“Dow”, США), ацетонитрил для ВЭЖХ (“Panreac”, Испания), ацетон, толуол, изооктан для спектроскопии, этилацетат, метилтретбутиловый эфир, фосфорная кислота, нитрат серебра (“Компонент-Реактив”, Россия). Также использовали растворимый крахмал (“Купавнареактив”, Россия), глюкозу (“Диа-М”, Россия), пекарские дрожжи (“Саф-Момент”, Франция), кукурузный экстракт (“Sigma-Aldrich”, США), моногидрохлорид L-лизина (“PanReac”, США), пеногаситель

Лапрол (ПАО “Владимирский химический завод”, Россия) и стандартный препарат такролимуса для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (“Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co. Ltd.”, Китай). Остальные реактивы и растворители марок хч и чда были получены от коммерческих производителей (Россия).

Микроорганизм и условия культивирования. Штамм *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН.

Поддержание культуры и получение инокулята проводили, как описано ранее [30, 31]. В экспериментах по выявлению лучшего сорбента в среду биосинтеза до стерилизации вносили SP-207 или HP2MG в концентрации 40 г/л, а XAD-7HP служил в качестве контрольного сорбента. Биосинтез такролимуса проводили в биореакторе

АНКУМ-2М объемом 10 в 5 л среды (рН 7.0) следующего состава (г/л): растворимый крахмал – 75, кукурузный экстракт – 12.5, пекарские дрожжи – 16.6, $MnSO_4$ – 0.05, $CaCO_3$ – 3, сорбент – 40, пеногаситель Лапрол – 0.4 (мл/л), в которую дополнительно вносили стерильные растворы глюкозы и L-лизина (5 г/л). Ферментацию осуществляли в течение 10 сут при 25°C, поддерживая рН среды в диапазоне 6.8–7.2 и концентрацию растворенного кислорода (pO_2) – 30–60%, со 2 по 7 сут культивирования проводили подпитку 6%-ным раствором крахмала. В качестве сорбента был выбран SP-207 на основании его сорбционных характеристик, а также способности лучше осаждаться.

Выделение такролимуса. Для отмывки сорбента от остатков среды биосинтеза и мицелия культуральную жидкость порциями по ~500 мл помещали в стакан объемом 3 л, добавляли 2–2.5 л воды и активно перемешивали. Взвесь мицелия из верхних слоев культуральной жидкости удаляли вакуумным насосом. Операцию повторяли до полного удаления мицелия и получали промытый сорбент.

Такролимус с сорбента элюировали водно-ацетоновой смесью. Для этого сорбент помещали на фильтр Шотта, промывали 500 мл смеси вода/ацетон (45 : 55, об. %) и целевое вещество элюировали 500 мл смеси вода/ацетон (25 : 75, об. %). Процедуру элюции целевого вещества повторяли до полной экстракции такролимуса с сорбента. Фракции, содержащие целевое вещество, объединяли, и упаривали на роторном испарителе до маслообразного состояния. К маслянистой субстанции добавляли толуол в соотношении 1 : 10 по объему для экстракции целевого компонента и получившуюся двухфазную смесь разделяли на делительной воронке. Данную операцию повторяли 3 раза. Верхние слои, содержавшие раствор такролимуса в толуоле, объединяли. Количество такролимуса определяли методом ВЭЖХ, как описано ниже. Для регенерации сорбента добавляли равный объем смеси 0.5 М NaOH и изопропилового спирта (1 : 1). Раствор декантировали и приливали свежую смесь щелочи и спирта. Операцию проводили до полной потери окраски раствора над сорбентом. Затем сорбент многократно промывали водой и высушивали при 50°C.

Предварительная очистка такролимуса. Предварительную очистку осуществляли на силикагеле (Диасорб-100-Диол), модифицированном диольными группами, или метакрилатном сорбенте HP2MG. Для этого сорбент упаковывали в колонку (120 × 14 мм, объемом 18.5 мл) и уравнивали изооктаном. Целевой компонент элюировали ступенчатым градиентом ацетона (от 10 до 30 об. %) в изооктане. Фракции, содержащие такролимус, объединяли и упаривали под вакуумом. Количество вещества во фракциях определяли методом ВЭЖХ, как описано ниже.

Регенерация сорбентов после проведения предварительной очистки. Регенерацию сорбентов осуществляли путем последовательного промывания их ацетоном (2 объема колонки) и водой (3 объема колонки). Сорбент HP2MG дополнительно регенерировали смесью изопропанол/0.5 М NaOH, 1 : 1 об. (2 объема колонки) и водой (3 объема колонки). Сорбенты после регенерации промывали ацетоном (3 объемами колонки) для удаления воды.

Финишная очистка такролимуса. Конечную очистку такролимуса проводили с использованием сульфокатионитов, содержащих связанные ионы серебра. Было испытано пять различных катионообменных смол, модифицированных серебром: Relisorb SP400/SS, Dowex 50WX8, Диасфер-АК-СП-100, Диасорб-60-СП и Диасорб-100-Сульфо. Сульфокатиониты загружали в колонку (140 × 14 мм, объем 21.5 мл) и промывали (по 3 объема) дистиллированной водой, 0.1 М азотной кислотой и снова дистиллированной водой. Затем сорбент дополнительно последовательно промывали 1 М раствором нитрата серебра (2 объема) и дистиллированной водой (3 объема) для удаления не связавшихся ионов серебра и ацетоном (3 объема) для удаления из него воды. Смесь такролимуса и его близкородственных аналогов, полученную на стадии предварительной очистки, растворяли в подвижной фазе до достижения концентрации такролимуса 10 мг/мл в случае использования сорбентов Диасфер-АК-СП-100 и Dowex 50 WX8, 30 мг/мл при использовании сорбента Relisorb SP 400/SS, а также 100 мг/мл – сорбентов Диасорб-60-СП и Диасорб-100-Сульфо.

В качестве подвижных фаз для разделения такролимуса на серебросодержащих сорбентах использовали следующие смеси: изооктан/ацетон, метанол/этилацетат и ацетон/ацетонитрил. Скорость потока составляла 0.1–2 мл/мин. Качественный и количественный состав разделенных фракций определяли методом ВЭЖХ, как описано ниже.

Кристаллизация такролимуса. Фракции, содержащие такролимус, объединяли, определяли содержание макролида и упаривали на роторном испарителе досуха. В соответствии с методикой, описанной в работе [21], к полученной маслянистой субстанции добавляли ацетонитрил из расчета 10 мл ацетонитрила на 1 мг такролимуса. Затем при перемешивании медленно добавляли дистиллированную воду в количестве, в 1.7 раза превышающем количество ацетонитрила. Раствор оставляли на 12–14 ч при 5°C для кристаллизации продукта. Образовавшиеся кристаллы отфильтровывали и взвешивали.

Аналитический контроль стадий выделения и очистки такролимуса. Количественный ВЭЖХ-

Таблица 1. Характеристика сорбентов, использованных на стадии микробиологического синтеза такролимуса

Сорбент	Диаметр пор, Å	Поверхность, м ² /г	Размер частиц, мкм	Плотность, г/л
XAD-7 HP	60	450	560–710	1.05
SP-207	105	600	250–840	1.18
HP2MG	170	600	300–700	1.09

анализ такролимуса на стадии десорбции целевого вещества с сорбента после ферментации осуществляли на хроматографе Smartline (“Knauer”, Германия) с колонкой Диасфер С-18 (5 мкм, 4 × 250 мм) (АО “БиоХимМак СТ”, Россия). Условия хроматографии: состав мобильной фазы – ацетон/0.1% фосфорная кислота (60 : 40, об. %), скорость потока 1 мл/мин, температура колонки 25°C. Детектирование осуществляли при 220 нм.

Качественный и количественный ВЭЖХ-анализ такролимуса на стадии предварительной и финишной очистки осуществляли на хроматографе Smartline (“Knauer”, Германия) с колонкой Диасфер-130-Нитрил (5 мкм, 4 × 250 мм) (АО “БиоХимМак СТ”, Россия). Условия хроматографии: состав мобильной фазы – изооктан/метилтретбутиловый эфир/ацетонитрил (6 : 3 : 1 об./об./об.), скорость потока 0.8 мл/мин, температура колонки 25°C. Детектирование осуществляли при 220 нм.

Качественный состав продукта (включающий наличие таких примесей, как аскомицин, десметилтакролимус, С8-эпимер такролимуса и С8-пропил-аналог такролимуса) определяли согласно методике, описанной в Фармакопее США [18]. Анализ проводили на хроматографе PlatinBlue (“Knauer”, Германия) с колонкой BlueShell 80-С18 (4.5 мкм, 3 × 150 мм) (“Knauer”, Германия). Условия хроматографии: изократическое элюирование А/Б = 68 : 32 об. %, где А – 6 мМ фосфорная кислота/смесь ацетонитрил – метилтретбутиловый эфир (81 : 19 об. %), смешанные в соотношении 80 : 20 об. % и Б – 6 мМ фосфорная кислота/смесь ацетонитрил – метилтретбутиловый эфир (81 : 19 об. %), смешанные в соотношении 20 : 80 об. %; скорость элюента 0.7 мл/мин, температура колонки 60°C. Детектирование осуществляли при 220 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе для биосинтеза такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д использовали среду, содержащую гидрофобный полимерный сорбент, что являлось наиболее технологичным подходом, поскольку сорбция целевого вещества проходила в течение культивирования. Это позволяло устранить деградацию такролимуса продуцентом [30, 31] и увеличить выход продукта, а также упростить процесс его извлечения из среды по завершении биосинтеза.

Сравнительное изучение влияния на выход такролимуса таких сорбентов, как амберлит XAD-7 HP, метакрилатный HP2MG и бромированный стиролдивинилбензолный SP-207, показало, что динамика сорбции макролида на указанных сорбентах в процессе культивирования имела схожий характер, достигаемые его выходы для XAD-7 HP, HP2MG или SP-207 имели близкие значения (690.0 ± 11.8 мг/л, 660.0 ± 12.6 и 662.0 ± 11.3 мг/л соответственно).

В табл. 1 приведены физико-химические характеристики сорбентов, использованных в работе (XAD-7 HP, HP2MG и SP-207).

Проведенные исследования показали, что мицеллий и сорбенты XAD-7 HP или HP2MG вследствие мало различающихся значений плотности осаждались с близкими скоростями седиментации, что осложняло процедуру отделения сорбента от бактериальной биомассы. В свою очередь элюция такролимуса с остатками мицелия приводила к потере сорбционных характеристик сорбентов и осложняла их последующую регенерацию и повторное использование.

Сорбент SP-207 обладал наибольшей плотностью по сравнению с другими использованными в работе сорбентами (табл. 1), что делало его технологически наиболее пригодным, так как он легко отделялся от биомассы за счет высокой скорости седиментации. Отделенный от мицелия сорбент SP-207 можно было регенерировать и далее использовать в процессе ферментации.

Выход такролимуса в среде с исходным сорбентом SP-207 и прошедшим 3 цикла регенерации составил 662.0 ± 11.3 и 657.0 ± 13.5 мг/л соответственно, что свидетельствовало о сохранении его сорбционных свойств после многократной регенерации.

При проведении биосинтеза в биореакторе в среде с сорбентом SP-207 выход такролимуса составил 694.5 ± 57.7 мг/л после 10 сут культивирования с подпиткой. Всего было проведено 11 ферментаций в 10 л биореакторе АНКУМ-2М с коэффициентом заполнения 0.5.

Предварительная очистка такролимуса. В рамках данной работы была исследована возможность замены таких нерегенерируемых сорбентов, как оксид алюминия или силикагель, на сорбенты на основе полиметилметакрилата (HP2MG) и модифицированного диольной фазой кремнезема (Диасорб

Таблица 2. Характеристика сорбентов, использованных на стадии предварительной очистки такролимуса

Сорбент	Размер частиц, мкм	Диаметр пор, Å	Тип сорбционных центров
Силикагель	63–200	100	Силанольные группы
HP2MG	300–700	170	Сложноэфирные группы
Диасорб 100-Диол	60–200	100	Диольные группы

Таблица 3. Нагрузочная характеристика сорбентов, использованных на стадии предварительной очистки такролимуса

Сорбент	Нагрузка по FK-506, мг/мл	Регенерируемость	Выход такролимуса, %	Объем израсходованного органического растворителя, количество объемов колонки
Силикагель	4	–	80	6
HP2MG	5	+	85	6
Диасорб 100-Диол	5	+	80	6

Таблица 4. Состав целевых фракций после очистки такролимуса на сорбентах HP2MG и Диасорб 100-Диол

Компонент	Содержание компонента в смеси после очистки на сорбенте, %	
	Диасорб 100-Диол	HP2MG
Такролимус	75	76
Аскомицин	10	10
8-Пропил аналог такролимуса	3	4
Неидентифицированные примеси	12	10

100-Диол), которые можно было регенерировать. Эти сорбенты были выбраны вследствие их близкого к силикагелю и оксиду алюминия сорбционно-хроматографического поведения (табл. 2).

Для сравнения были использованы предыдущие данные, описанные в работах [20–26], о производительности процесса предварительной очистки такролимуса в условиях, при которых в качестве сорбента использовался силикагель.

Были оптимизированы концентрации и объемы промывочного и элюирующего растворов изооктан/ацетон для сорбентов HP2MG и Диасорб-100-Диол. В результате была предложена следующая схема предварительной очистки: целевое вещество, растворенное в толуоле, наносили на сорбент, затем последовательно промывали изооктаном (2 объема колонки), 10 об. % ацетона в изооктане (2 объема колонки) и элюировали 30 об. % ацетона в изооктане (2 объема колонки). Нагрузочные характеристики сорбентов и выходы такролимуса при проведении процесса предварительной очистки представлены в табл. 3.

В табл. 4 приведены сравнительные данные о содержании целевого компонента относительно суммы такролимуса и основных примесей для двух сорбентов, испытанных на стадии предварительной очистки. Как можно отметить, целевые фракции не отличались по составу и, таким обра-

зом, данные сорбенты показали одинаковую эффективность при удалении балластных компонентов сырья.

На основании полученных данных для последующей работы был выбран сорбент HP2MG. В табл. 5 приведен состав целевой фракции после одного и пяти циклов препаративной очистки – регенерации на данном сорбенте, которые свидетельствовали об устойчивости этого метода очистки.

Финишная очистка такролимуса. В табл. 6 приведены характеристики сульфокатионитов на основе метилметакрилата (Relisorb SP 400/SS и Диасфер-АК-СП-100), стирол-дивинилбензола (Dowex 50WX8) и силикагеля (Диасорб-60-СП и Диасорб-100-Сульфо), отличающиеся как природой матрицы, так и строением привитой группы.

Все изученные полимерные сульфокатиониты не показали достаточной селективности при отделении такролимуса от аналогов.

Наилучшие результаты были получены при использовании сорбента Relisorb SP 400/SS и в качестве элюента смеси изооктан/ацетон при нагрузке сорбента 3 мг/мл, скорости потока 1 объем колонки в 1 ч по следующей схеме элюирования: 0–2 объема колонки – 5 об. % ацетон/изооктан, 2–4 объема колонки – 20 об. % ацетон/изооктан, 4–5 объема колонки – 30 об. % ацетон/изооктан,

Таблица 5. Состав целевых фракции после 1 и 5 циклов препаративной очистки такролимуса на сорбенте HP2MG

Компонент	Содержание компонента в смеси, %	
	после 1 цикла очистки	после 5 циклов очистки –регенерации
Такролимус	76	75
Аскомицин	12	13
8-Пропил аналог такролимуса	3	4
Неидентифицированные примеси	9	8

Таблица 6. Характеристика сорбентов, использованных на стадии финишной очистки такролимуса

Сорбент	Тип матрицы	Размер частиц, мкм	Диаметр пор, Å	Емкость, ммоль экв/г
Relisorb SP 400/SS	Полиметилметакрилат	50–150	800–1000	0.1
Диасфер-АК-СП-100	Полиметилметакрилат	40–120	500–800	0.7
Dowex 50WX8	Стиролдивинилбензол	37–74	45–60	1.7
Диасорб-60-СП	Силикагель	50–70	60	0.6
Диасорб-100-Сульфо	Силикагель	63–200	100	0.49

5–6 объема колонки – 40 об. % ацетон/изооктан. При этом можно отметить, что сорбент обладал низкой селективностью и не позволял добиться хорошего разделения такролимуса и его аналогов (рис. 3а).

Заметная селективность достигалась при использовании сорбента Диасфер-АК-СП-100 и в качестве элюента этилацетата при нагрузке 3 мг/мл и скорости потока 1.5 объема колонки в 1 ч в режиме изократического элюирования. Как видно на рис. 3б, выход целевого вещества при этом составил около 50%, а значительная часть такролимуса (43%) элюировалась вместе с аскомицином и 8-пропил-аналогом такролимуса. Снижение нагрузки не приводило к значительному улучшению разделения компонентов.

Подобрать условия разделения не удалось и на сорбенте Dowex WX8. Аскомицин, 8-пропил-аналог такролимуса и такролимус элюировались практически одновременно (рис. 3в). Можно предположить, что это связано с недоступностью большей части внутренней поверхности сорбента для разделяемых молекул такролимуса и его примесей вследствие набухания сорбента в органическом растворителе.

Сульфокатиониты на основе силикагеля (Диасорб-60-СП и Диасорб-100-Сульфо) показали высокую селективность при разделении такролимуса и его аналогов.

Для сорбента Диасорб-100-Сульфо высокая селективность была достигнута при использовании в качестве элюента ацетона. При нагрузке 8 мг/мл и скорости потока 2.35 объема колонки в 1 ч выход целевого вещества составил 70%, степень очистки продукта – 96.7% (рис. 3г), а производительность – 2.95 мг такролимуса/(мл сорбента × ч).

Неожиданный результат был получен для сорбента Диасорб-60-СП (рис. 3д). При использовании в качестве элюента 100%-ного ацетона (нагрузка 10.5 мг/мл сорбента, поток 3.5 объема колонки в час) в двух объемах колонки элюировались только аналоги такролимуса (аскомицин и 8-пропил-аналог-такролимуса), а для элюции такролимуса была необходима добавка ацетонитрила в ацетон (не менее 5 об. %). При 30 об. % ацетонитрила такролимус элюировался в следующих двух объемах колонки.

Таким образом, было показано, что отделение такролимуса от аналогов можно провести даже в сорбционном режиме. Производительность данного метода составила 8.35 мг такролимуса/(мл сорбента × ч), что оказалось в 28 раз эффективнее процесса разделения на цианосеребряных сорбентах [27], которые считаются наиболее эффективными из импрегнированных сорбентов. Характеристики разделения были устойчивы после проведения 15 последовательных циклов очистки, а снижения селективности процесса не было выявлено.

Процесс очистки такролимуса на сорбенте Диасорб-60-СП был реализован также и в режиме проточной хроматографии (рис. 3е). При изократическом элюировании в системе 5 об. % ацетонитрила в ацетоне, нагрузке 8.8 мг/мл и скорости потока 2.55 объема колонки в 1 ч выход целевого вещества составил 80%. Производительность метода – 7.04 мг такролимуса/(мл сорбента × ч), содержание аскомицина – 1–1.2%, чистота целевой фракции – 96.2% (сумма площадей пиков такролимуса, С19-эпимера такролимуса и такролимуса-открытое кольцо).

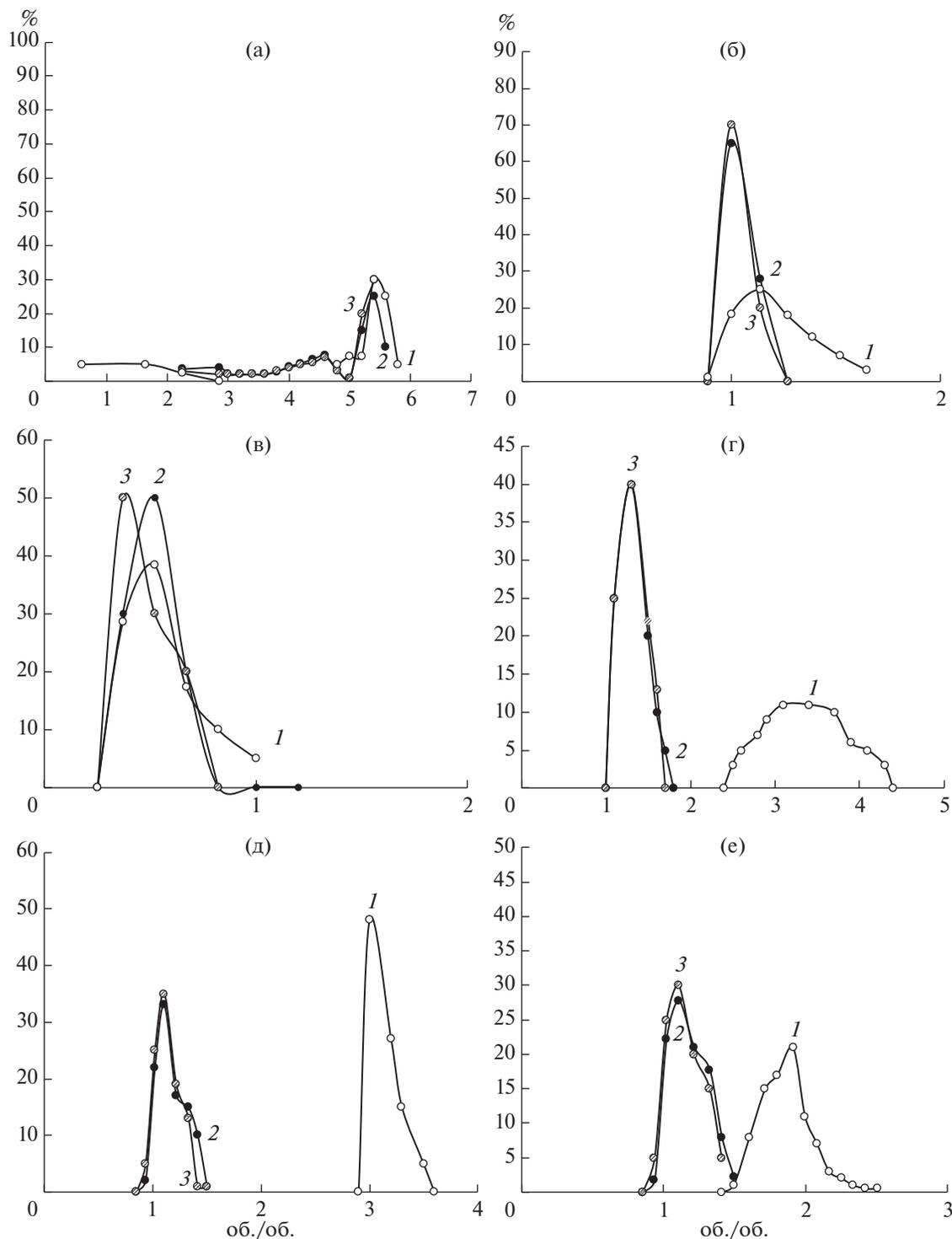


Рис. 3. Хроматограммы препаративного разделения такролимуса (1) и его аналогов – аскоцинина (2) и 8-пропил-аналога такролимуса (3) на сорбентах Relisorb SP 400/SS (а), Диасфер-АК-СП-100 (б), Dowex 50 WX8 (в), Диасорб-100-Сульфо (г), Диасорб-60-СП (д, е) (на оси X об./об. – объем фракций, выраженный в объемах колонки).

Таким образом, использование сульфокатионитов на основе силикагеля позволяло реализовать процесс очистки такролимуса от аналогов с высокой селективностью и выходом, а также производи-

тельностью, превышающей известную [19–28] более чем в 20 раз.

Дальнейшее увеличение производительности может быть достигнуто за счет оптимизации фрак-

Таблица 7. Качественный и количественный состав кристаллов такролимуса

Компонент	Содержание, %	Критерий приемлемости, %, по USP [18]
Такролимус	99.3 (суммарно с С19-эпимером такролимуса 99.8)	98–102
С19-Эпимер такролимуса	0.5	Не нормируется
Аскомицин (+ неидентифицированное соединение)	0.2	0.5
С19-Эпимер аскомицина	–	0.1
С8-Эпимер такролимуса	–	0.15
С8-Пропил-аналог такролимуса	–	0.15
Такролимус-открытое кольцо	–	Не нормируется
Десметилтакролимус	–	0.1
Общее количество нормируемых и неидентифицированных примесей	0.2	1.0

ционного состава сорбентов и нагрузочных характеристик процесса.

Сравнение хроматограмм на рис. 3г и 3д показало, что сорбент с размером частиц 50–70 мкм (рис. 3д) обеспечивал меньшую ширину хроматографических зон по сравнению с сорбентом с размером частиц 63–200 мкм (рис. 3г). Для сорбента Диасорб-100-Сульфо при достигнутой селективности процесса нагрузочные характеристики и производительность могут быть заметно увеличены при переходе к частицам с размером 50 мкм.

На рис. 3д видно, что емкость сорбента Диасорб-60-СП в сорбционном режиме очистки использовалась лишь частично, и нагрузочные характеристики процесса и производительность могут быть значительно увеличены.

После кристаллизации такролимус соответствовал требованиям фармакопеи [18] по хро-

мографической чистоте продукта, равной 99.3% (рис. 4 и табл. 7).

Таким образом, разработана схема выделения и очистки такролимуса со значительно возросшей производительностью на ключевой стадии процесса, при которой соблюдались требования по чистоте, предъявляемые к субстанции такролимуса. Использование на стадии биосинтеза бромированного стирол-дивинилбензольного сорбента SP-207 с повышенной плотностью позволило упростить стадию выделения такролимуса из культуральной среды. На стадии первичной очистки показана возможность использования регенерируемых сорбентов на основе метилметакрилата (HP2MG) и химически модифицированного силикагеля. Применение на стадии конечной очистки сорбентов с силикагелевой матрицей с привитыми сульфопропильными группами, модифицированными ионами серебра, приводило к достижению высокой селективности и производительности процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания (проект № АААА-А16-116062110077-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Trede N.S., Warwick A.B., Rosoff P.M., Rohrer R., Bierer B.E., Guinan E.* // Bone Marrow Transplant. 1997. V. 20. № 3. P. 257–260.
2. *Meier-Kriesche Li S., Gruessner R., Fung J., Bustami R., Barr M., Leichtman A.* // Am. J. Transplant. 2006. V. 6. № 5. P. 1111–1131.
3. *McCormack P.L., Keating G.M.* // Drugs. 2006. V. 66. № 17. P. 2269–2279.
4. *Akimoto K., Kusunoki Y., Nishio S., Takagi K., Kawai S.* // Clin. Rheumatol. 2008. V. 27. № 11. P. 1393–1397.
5. *Benson A., Barrett T., Sparberg M., Buchman A.L.* // Inflamm. Bowel Dis. 2008. V. 14. № 1. P. 7–12.
6. *Remitz A., Reitamo S.* // Expert Opin. Drug Saf. 2009. V. 8. № 4. P. 501–506.
7. *Ingram J.R., Martin J.A., Finlay A.Y.* // Am. J. Clin. Dermatol. 2009. V. 10. № 4. P. 229–237.

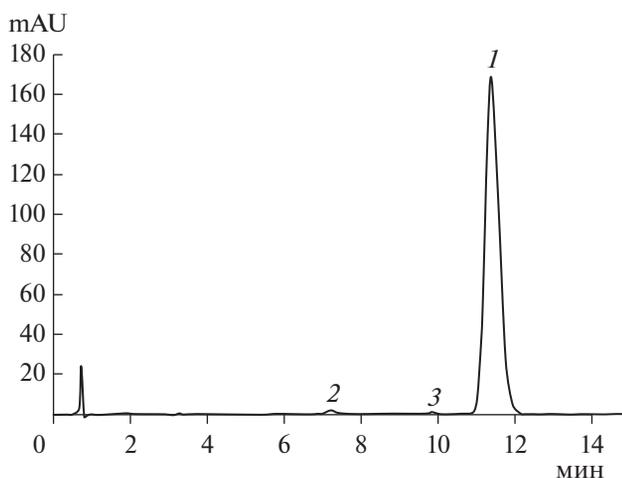


Рис. 4. ВЭЖХ-анализ свежеприготовленного раствора кристаллов такролимуса: такролимус (1), С19-эпимер такролимуса (2), аскомицин (3).

8. Barot R.K., Shitole S.C., Bhagat N., Patil D., Sawant P., Patil K. // J. Clin. Diagn. Res. 2016. V. 10. № 6. P. 5–9.
9. Reis S.A., Moussatche N., Damaso C.R.A. // J. Appl. Microbiol. 2006. V. 100. № 6. P. 1373–1380.
10. Karpas A., Lowdell M., Jacobson S.K., Hill F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. № 17. P. 8351–8355.
11. Klettner A., Herdegen T. // Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord. 2003. V. 2. № 3. P. 153–162.
12. Konofaos P., Terzis J.K. // J. Reconstr. Microsurg. 2013. V. 29. № 3. P. 141–148.
13. Periyasamy S., Warriar M., Tillekeratne M.P.M., Shou W., Sanchez E.R. // Endocrinology. 2007. V. 148. № 10. P. 4716–4726.
14. Goranovic D., Blazic M., Magdevska V., Horvat J., Kuscer E., Polak T., Santos-Aberturas J., Martinez-Castro M., Barreiro C., Mrak P. // BMC Microbiol. 2012. V. 12. № 1. P. 238–243.
15. Barreiro C., Martinez-Castro M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. № 2. P. 497–507.
16. Jung S., Lee K., Park Y.-J., Yoon S., Yoo J. // Biotechnol. Bioprocess. Eng. 2011. V. 16. № 6. P. 1208–1213.
17. Akashi T., Nefuji T., Yoshida M., Hosoda J. // J. Pharm. Biomed. Anal. 1996. V. 14. № 3. P. 339–346.
18. The United States Pharmacopeial Convention. // USP 37 – NF 32 The United States Pharmacopeia and National Formulary 2014: Main Edition Plus Supplements 1 and 2, 2013.
19. Международный патент. 2005. № 2006/069386 A1.
20. Международный патент. 2005. № 2006/031664 A1.
21. Международный патент. 2006. № 2006/048145 A1.
22. Международный патент. 2005. № 2005/098011 A1.
23. Международный патент. 2000. № 2000/71546 A1.
24. Международный патент. 2007. № 2007/017029 A1.
25. Международный патент. 2009. № 2009/116729 A2.
26. Международный патент. 2007. № 2007/013017 A1.
27. Международный патент. 2005. № 2007/106587 A2.
28. Патент США. 2008. № 0000834 A1.
29. Poshekhontseva V.Y., Bragin E.Y., Fokina V.V., Shtratnikova V.Y., Starodumova I.P., Tarlachkov S.V., Donova M.V. // Microbiol. Resour. Announc. 2019. V. 8. № 24. e00510-19.
30. Патент РФ. 2013. № 2495937.
31. Пошехонцева В.Ю., Фокина В.В., Суходольская Г.В., Шутов А.А., Донов М.В. // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 5. С. 42–50.

Biosynthesis of Tacrolimus by the *Streptomyces tsukubensis* VKM Ac-2618D Strain in the Presence of Polymeric Sorbents and Development of a Method for Its Isolation and Purification

D. S. Salionov^{a, b}, V. Yu. Poshekhontseva^{c, d}, V. V. Fokina^{c, d, *}, A. A. Shutov^{c, d}, V. M. Nikolaeva^{c, d}, G. G. Vasiarov^b, E. V. Titova^b, V. S. Karasev^b, S. M. Staroverov^{a, b}, and M. V. Donova^{c, d}

^aChemistry Department of the Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^b“BioChemMack S&T”, Moscow, 119234 Russia

^cSkryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, “Pushchino scientific center for biological research RAS”, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

^d“Pharmins”, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

*e-mail: fokina@ibpm.pushchino.ru

Tacrolimus is known as one of the most effective immunosuppressive agents. This macrocyclic polyketide is synthesized by actinobacteria of the genus *Streptomyces*, however, the process is accompanied by the undesirable formation of close structural analogues. For now, the problem of the efficient isolation and purification of tacrolimus according to the requirements of pharmacopeia is still unsolved. An original method of tacrolimus biosynthesis by the actinobacterial strain *Streptomyces tsukubensis* VKM Ac-2618D using brominated styrene-divinylbenzene sorbent SP-207 was developed. This approach allowed to reduce the undesirable destruction of tacrolimus, increase its yield and simplifying the isolation procedure from the culture medium. The preliminary purification stage was optimized by utilization of regenerated sorbents based on methyl methacrylate (HP2MG) and chemically modified silica gel (Diasorb-100-Diol). The implementation of the silica gel sorbents with grafted sulfonic groups modified with silver ions at the finishing purification step allowed significantly increase the productivity of this key stage. The yield of tacrolimus according to the developed method was around 60–70%. The results could be implemented for the full-cycle production development of the pharmaceutical grade tacrolimus.

Keywords: biosynthesis, tacrolimus, *Streptomyces tsukubensis*, sorbent SP-207, chromatography, isolation, purification, ascomycin, tacrolimus 8-propyl-analog

УДК 579.2

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ И АДГЕЗИЮ К *n*-ГЕКСАДЕКАНУ КЛЕТОК *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231

© 2020 г. М. С. Куюкина^{1,2, *}, А. М. Варушкина^{1,2}, И. Б. Ившина^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН,
Пермь, 614081 Россия

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990 Россия

*e-mail: kyukina@iegm.ru

Поступила в редакцию 30.04.2020 г.

После доработки 12.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

Изучено влияние электропорации на жизнеспособность, чувствительность к антибиотикам и адгезивную активность по отношению к *n*-гексадекану клеток *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231. Установлено, что после электропорации при напряжении 9 и 12.5 кВ/см жизнеспособность родококков снижалась на 85–96%, а их чувствительность к бензилпенициллину, гентамицину, клотримазолу, неомицину и цефазолину повышалась на 8–46%. При этом динамика повышения чувствительности зависела от природы антибиотика и времени восстановления клеток после электропорации. Наиболее высокая антибиотикочувствительность, коррелирующая с повышением степени адгезии к углеводороду, была зарегистрирована для электропорированных клеток после 24-часового периода восстановления, соответствующего переходу культуры в стационарную фазу роста. Отмечено появление спонтанных мутантов *R. ruber* ИЭГМ 231, устойчивых к воздействию 200 мкг/мл канамицина и характеризующихся пониженной гидрофобностью клеточной стенки. Полученные результаты могут быть использованы при подборе оптимального режима электротрансформации родококков, в частности, повышения выживаемости клеток и сокращения периода их восстановления после электропорации, а также снижения концентрации антибиотика в селективной среде для эффективного отбора рекомбинантных клонов.

Ключевые слова: актинобактерии, *Rhodococcus*, электропорация, антибиотикочувствительность, гидрофобность, клеточная адгезия

DOI: 10.31857/S0555109920060082

Электропорация — создание пор в клеточной мембране под воздействием кратковременного электрического импульса высокого напряжения, широко используется в медицине и является удобным инструментом в решении таких биотехнологических задач, как генетическая трансформация клеток, экстракция биомолекул, инактивация микроорганизмов в сточных водах, нетермическая пастеризация продуктов питания и др. [1]. Диполи воды проникают в липидный бислой мембраны под влиянием короткого импульса продолжительностью от 10 мкс до 10 мс и мощностью от 1 до 20 кВ/см и вызывают переориентацию фосфолипидов, формируя поры для транспорта макромолекул как внутрь, так и наружу клетки [2]. Электрический импульс высокого напряжения оказывает действие также на клеточную стенку бактерий, в которой под его воздействием формируются многочисленные перфорации пептидогликанового слоя, облегчающие транспорт молекул [3].

Была доказана связь между действием электрического тока на бактериальные клетки и повышением их чувствительности к антибиотикам, биоцидам и растворителям, которая получила название “биоэлектрический эффект” [4]. Биоэлектрический эффект исследован при воздействии постоянного слабого электрического тока, однако практически не изучено влияние тока высокого напряжения на эффективность антибиотических препаратов [5, 6].

Трансформация бактерий с использованием электропорации (или электротрансформация) относится к распространенному методу доставки генетического материала внутрь клеток. При этом в качестве селективных маркеров для отбора трансформированных клеток часто используют генные кассеты антибиотикорезистентности [7]. Однако многие исследователи сталкиваются с проблемой восстановления трансформантов после электропорации, так как высокое напряжение оказывает

комплексное стрессорное воздействие на бактериальные клетки. Было отмечено, что жизнеспособность клеток падает после электропорации [3], в связи с этим для повышения эффективности трансформации предложено увеличить время восстановления бактерий в питательном бульоне или на агаре [8]. Оказалось также, что для отбора рекомбинантных клонов довольно трудно подобрать оптимальную концентрацию антибиотика в селективной среде, поскольку его низкая концентрация приводит к появлению “ложноположительных” колоний, а слишком высокая – вызывает гибель трансформированных клеток.

Углекислородоокисляющие актинобактерии рода *Rhodococcus* метаболизируют сложные органические субстраты, обладают уникальными ферментными комплексами и устойчивостью к экстремальным условиям среды, что обуславливает не только их биотехнологический потенциал в качестве нефтедеструкторов и продуцентов биосурфактантов, но и интерес к созданию генетически модифицированных штаммов родококков [8–11]. При этом родококки относят к традиционно трудной для электротрансформации группе бактерий вследствие их мощной гидрофобной клеточной стенки и сложного морфогенетического цикла развития [8, 9, 11]. Важным этапом нефтедеструкции является адгезия к углеводородным субстратам [12], что подразумевает изучение адгезивной активности родококков при воздействии различных физических факторов, в том числе электропорации.

Цель работы – изучение влияния электропорации на жизнеспособность, антибиотикочувствительность и адгезивную активность родококков по отношению к углеводородному субстрату.

МЕТОДИКА

Объект исследования и условия культивирования. В работе использовали культуру актинобактерии *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231, поддерживаемую в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ УрО РАН (WFCC #768; www.iegmc.ru). Клетки выращивали на питательном агаре при 28°C.

Приготовление электрокомпетентных клеток и условия электропорации. В колбах Эрленмейера к 200 мл бульона Луриа–Бертани (LB), содержащего 2% глицина, вносили 10 мл стационарной культуры. Культуру предварительно выращивали на качалке (160 об./мин) при 28°C до достижения поздней экспоненциальной фазы (ОП₅₅₀ не более 0.9), охлаждали на льду в течение 20 мин, клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 20 мин при 4°C. Клеточный осадок дважды промывали деионизированной водой при 4°C и ресуспендировали в 15%-ном глицерине [8]. Суспензию электрокомпетентных клеток (100 мкл)

электропорировали в кюветах (0.2 см) при 2.5 кВ (12.5 кВ/см) или 1.8 кВ (9 кВ/см) с использованием электропоратора Pulser Transformation Apparatus (“Bio-Rad”, США). Затем к клеткам добавляли 0.9 мл LB и высевали на агаризованную среду LB незамедлительно или после 2, 4 и 24 ч инкубации при 28°C.

Определение жизнеспособности клеток. Для определения жизнеспособности клеток использовали набор LIVE/DEAD® *BacLight*TM (Bacterial Viability Kit, “Invitrogen”, США). Каплю бактериальной суспензии (10 мкл) помещали на покровное стекло (24 × 50 × 0.15 мм), смешивали с эквивалентным объемом красителя и подсушивали на воздухе в темноте в течение 10 мин. Затем клетки промывали деионизированной водой и сканировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Olympus FV1000 (“Olympus Corporation”, Япония) с использованием иммерсионного объектива Plan Apo VC (увеличение 100x, числовая апертура 1.4). Для возбуждения флуоресценции красителей SYTO 9 и пропидиум йодида применяли аргоновый лазер ($\lambda = 488$ нм) с 505–525 нм барьерным фильтром и гелий-неоновый лазер ($\lambda = 543$ нм) с 560–660 нм барьерным фильтром соответственно. Анализ полученных изображений проводили с помощью программы FV10 ASW 3.1 (“Olympus Corporation”, Япония).

Определение антибиотикочувствительности родококков. Чувствительность клеток к антибиотикам определяли дискодиффузионным методом с использованием индикаторных дисков, пропитанных антибиотическими препаратами следующих групп: аминогликозидов (неомицин, гентамицин и канамицин), бета-лактамов антибиотиков из группы цефалоспоринов (цефазолин) и пенициллинов (бензилпенициллин), а также производного имидазола широкого спектра действия (клотримазол) (“НИЦФ”, Россия). Результаты учитывали на 3 сут, измеряя диаметр (в мм) зоны отсутствия бактериального роста вокруг соответствующего диска. Изменение чувствительности клеток выражали в процентах по отношению к контролю. Дополнительно определяли чувствительность родококков к канамицину (10–100 мкг/мл) методом серийных разведений в агаре. Эксперименты проводили в пятикратной повторности.

Определение адгезии клеток к *n*-гексадекану. Адгезивную активность родококков определяли по отношению к *n*-гексадекану (массовая доля основного вещества 98%, “Вектон”, Россия) с помощью МАТН-теста (Microbial Adhesion to Hydrocarbons – микробная адгезия к углеводородам) по модифицированной методике [12]. Эксперименты проводили в десятикратной повторности.

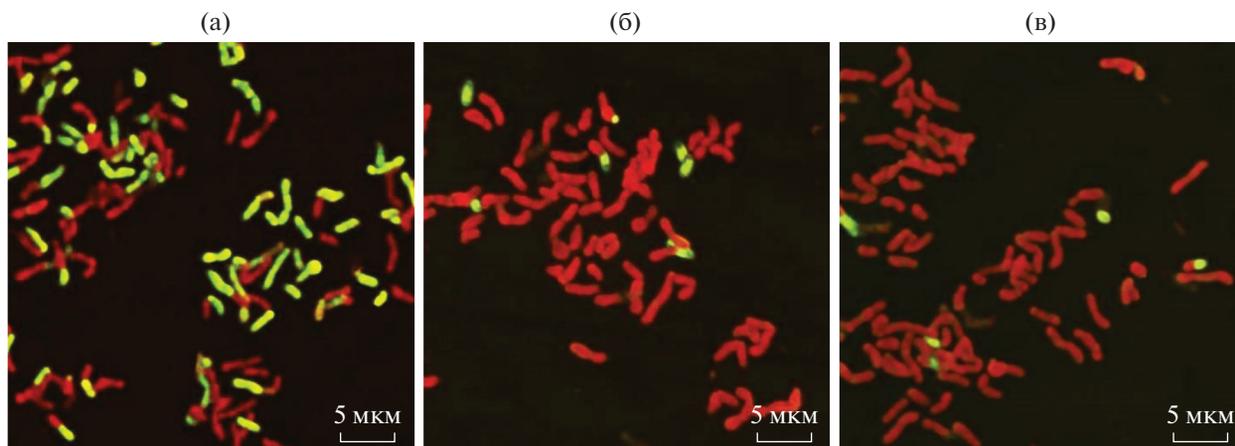


Рис. 1. КЛСМ изображения контрольных клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 (а), после их электропорации при 9 кВ/см (б) и 12.5 кВ/см (в); живые клетки светятся зеленым светом, мертвые – красным

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние электропорации на жизнеспособность родококков. Как видно на рис. 1, электропорация при напряжении 9.0 и 12.5 кВ/см вызвала снижение степени жизнеспособности бактериальных клеток на 85 и 96% соответственно ($p < 0.05$), что согласовывалось с данными работ [3, 7]. Так, электропорация при более низком напряжении (7.5 кВ/см) снижала жизнеспособность представителей *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* на 5–17% [3]. В работе гибель клеток объяснялась потерей клеточного содержимого при формировании пор и перекисным окислением липидов мембраны.

Влияние электропорации на антибиотикочувствительность родококков. Как видно на рис. 2, изменение антибиотикочувствительности электропорированных и контрольных клеток *R. ruber* зависело от природы антибиотика и времени последующего восстановления после электропорации. Так, диаметры зоны отсутствия роста электропорированных клеток под действием бензилпенициллина и цефазолина на 1–6 мм превышали контрольные значения в течение всего периода восстановления, при этом характеризуюсь сходной динамикой. Чувствительность электропорированных и контрольных клеток к неомицину и клотримазолу изменялась аналогичным образом в первые 4 ч, но становилась различной – к 24 ч культивирования. В то же время по отношению к гентамицину и канамицину наблюдались противоположные изменения чувствительности клеток на протяжении всего периода наблюдения. После 24 ч культивирования антибиотикочувствительность контрольных клеток, как правило, снижалась, а электропорированных – повышалась. При этом если через 0–4 ч после электропорации значения диаметра стерильных зон под действием большинства исследованных антибиотиков превышали контрольные значения лишь на 1–5 мм, то после 24 ч – уже на 4–9 мм. Особенно большие

различия через 24 ч опытных и контрольных значений отмечены по отношению к неомицину (19.2 и 28.0 мм соответственно), гентамицину (29.9 и 36.9 мм) и клотримазолу (14.1 и 18.1 мм). Среди исследуемых антибиотиков наблюдали понижение чувствительности через 4 и 24 ч после электропорации лишь по отношению к канамицину как у контрольных, так и опытных клеток.

Сравнительный анализ изменения антибиотикочувствительности родококков под действием электропорации показал (табл. 1), что чувствительность клеток ко всем антибиотикам за исключением канамицина повышалась в среднем на 16%, причем этот эффект был наиболее выражен у культур после 24-часового периода восстановления и составлял 27% (ANOVA, $p = 0.047$). Это указывало на формирование электропорированными клетками *R. ruber* ИЭГМ 231 значительно более чувствительной к антибиотикам культуры стационарной фазы роста, характеризующейся распадом ветвящегося первичного мицелия на укороченные палочковидные и кокковидные формы (рис. 1). В то же время контрольные клетки в данной фазе роста характеризовались постоянной или несколько пониженной антибиотикочувствительностью (за исключением бензилпенициллина, рис. 2). В работе [11] было показано резкое снижение эффективности электротрансформации клеток родококков в стационарной фазе роста и последующего восстановления трансформантов на среде с ампициллином и тиострептоном по сравнению с экспоненциально растущими клетками.

В целом, наиболее выраженное повышение чувствительности клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 после электропорации наблюдалось к антибиотикам бета-лактаманного ряда (цефазолину и бензилпенициллину) и неомицину (табл. 1). Наименьший эффект электропорация оказывала на чувствительность родококков к канамицину, при этом

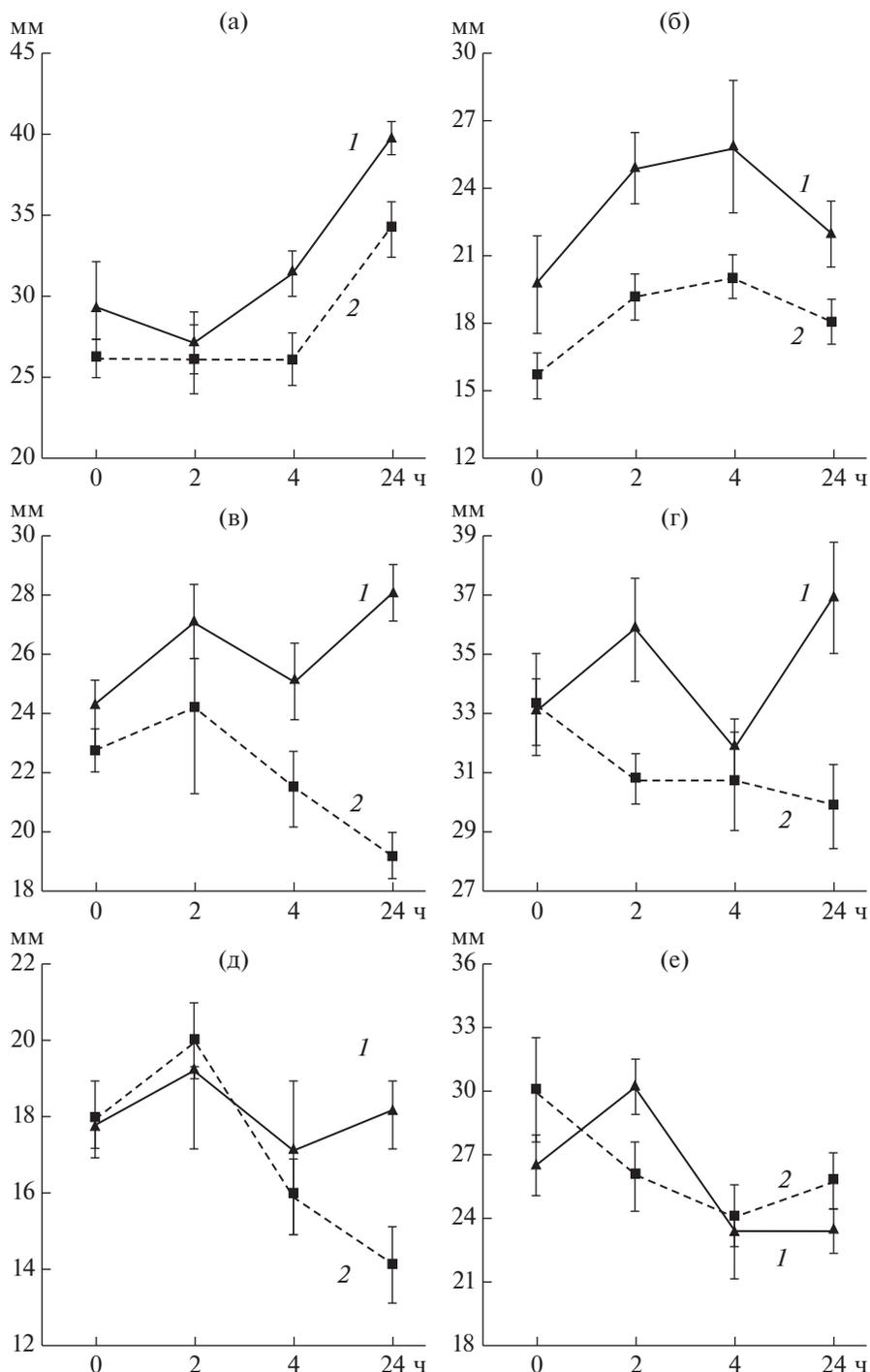


Рис. 2. Зависимость показателя антибиотикочувствительности (1 и 2 диаметр зоны отсутствия роста в опыте и контроле, мм) клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 по отношению к бензилпенициллину (а), цефазолону (б), неомицину (в), гентамицину (г), клотримазолу (д) и канамицину (е) от времени их восстановления после электропорации

появление спонтанно устойчивых к канамицину колоний наблюдалось, как в случае электропорированных, так и контрольных клеток. Поскольку при отборе трансформированных клеток ген резистентности к канамицину часто используется в качестве маркерного [8], обнаруженное повышение устойчивости родококков к данному антибиотику,

спонтанное или обусловленное электропорацией, может значительно снижать эффективность их электротрансформации из-за большого числа “ложноположительных” колоний.

Определение чувствительности родококков к различным концентрациям (10–100 мкг/мл) канамицина выявило 60%-ное повышение жизне-

Таблица 1. Изменение антибиотикочувствительности (% к контролю) клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 после электропорации

Антибиотик	Время восстановления после электропорации, ч				
	0	2	4	24	Среднее значение
Бензилпенициллин	12.03	3.83	20.42	16.37	13.16
Цефазолин	25.84	29.66	28.86	21.61	26.49
Клотримазол	-0.94	-3.75	7.43	28.30	7.76
Неомицин	6.87	11.91	16.73	46.18	20.42
Гентамицин	-1.00	16.61	3.55	23.66	10.71
Канамицин	-11.76	16.07	-3.01	-9.02	-1.93

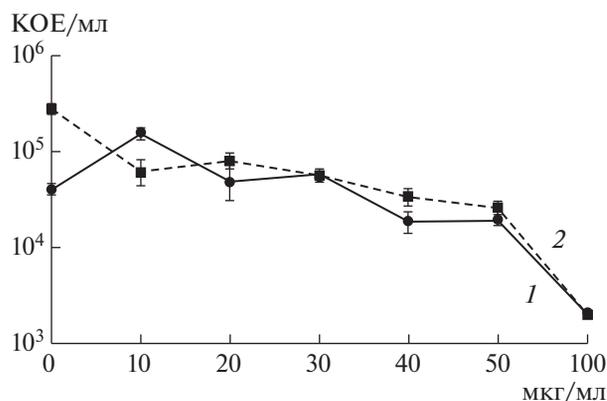
способности электропорированных клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 при использовании 10 мкг/мл канамицина и снижение на 38–44% относительно контроля в присутствии более высоких (20 и 40 мкг/мл) концентраций антибиотика (рис. 3). В работе [13] показано, что под воздействием постоянного электрического тока низкого напряжения (0.8 В/см) жизнеспособность почвенных актинобактерий также снижалась на 40% при добавлении в среду субингибиторных (5 мкг/мл) концентраций тетрациклина, хлортетрациклина, и окситетрациклина. Как видно на рис. 3, жизнеспособность электропорированных и контрольных клеток снижалась практически одинаково в присутствии 30, 50 и 100 мкг/мл канамицина, что согласовывалось с данными, полученными дискодиффузионным методом. Таким образом, для отбора трансформантов *R. ruber* с маркером резистентности к канамицину целесообразно использование повышенной (50–100 мкг/мл) концентрации антибиотика в селективной среде.

Влияние электропорации на адгезию родококков к *n*-гексадекану. Проблема формирования биопленок микроорганизмами в экстремальных условиях существования стимулировала изучение воздействия физических факторов на адгезивные свойства клеток. Было показано [14], что воздействие слабого постоянного тока (20–40 мА) способствовало повышению гидрофобности клеточной поверхности и отрицательного заряда смешанной культуры почвенных бактерий-деструкторов фенола, влияя на эффективность их адгезии к различным субстратам. Изменение поверхностных свойств бактерий происходило преимущественно после 3–5 ч воздействия током, при этом более высокая сила тока оказывала более выраженный эффект на клеточную адгезию к *n*-октану.

По полученным данным адгезивная активность клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 по отношению к *n*-гексадекану не изменялась через 4 ч после электропорации, однако уровень адгезии клеток к гидрофобному субстрату возрастал от 95.6 до 98% ($p < 0.05$) после 24-часового периода восстановления (рис. 4). Можно предположить, что электропорация приводила к повышению степени гидро-

фобности клеточной поверхности и, как следствие, увеличению адгезии к *n*-гексадекану, но при этом требовалось время для изменения липидного состава и электростатических свойств клеток [12]. Обнаруженное повышение в результате электропорации адгезивной активности родококков к углеводородному субстрату необходимо учитывать при изучении экспрессии генов адгезии к жидким углеводородам у бактерий-нефтедеструкторов с использованием полученных ранее Tn5-мутантных клонов *R. ruber* ИЭГМ 231 [12].

Сделана попытка выявления связи между повышением чувствительности родококков к антибиотикам и их адгезивной активностью к гидрофобному субстрату после электропорации. В результате не было обнаружено статистически значимой корреляции ($R = 0.03$, $p < 0.05$) между гидрофобностью антибиотиков, измеряемой как коэффициент распределения в системе октанол–вода ($\log P_{o/w}$) [15, 16], и повышением чувствительности к ним электропорированных клеток родококков (табл. 2). Тем не менее, отмечено, что чувствительность родококков к наиболее гидрофобным антибиотикам – бензилпенициллину и клотримазолу, в первые 2 ч после электропора-

**Рис. 3.** Жизнеспособность клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 после электропорации (2, контроль) и 4 ч инкубации в присутствии субингибиторных концентраций канамицина (1).

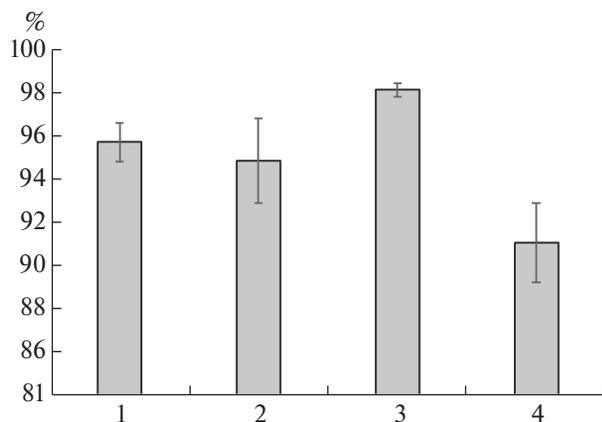


Рис. 4. Адгезия (%) к *n*-гексадекану клеток *R. ruber* ИЭГМ 231, выращенных в среде LB (1, контроль), через 4 (2) и 24 ч (3) после электропорации, спонтанно резистентные к канамицину (4, 200 мкг/мл)

ции практически не отличалась от контрольных показателей и лишь через 4 ч начинала постепенно возрастать (рис. 2). Это согласовывалось с результатами МАТН-теста: степень адгезии клеток к гидрофобному субстрату увеличилась через 24 ч после электропорации, что, по-видимому, облегчало транспорт гидрофобных антибиотиков внутрь клеток вследствие повышения гидрофобности клеточной стенки. В то же время чувствительность клеток к действию наиболее гидрофильных антибиотиков из группы аминогликозидов (неомицина, канамицина и гентамицина) возрастала уже в первые часы после электропорации, а через 24 ч были выявлены разнонаправленные эффекты: повышение чувствительности к неомицину и гентамицину и снижение — к канамицину (рис. 2). Следует отметить, что спонтанные мутанты *R. ruber* ИЭГМ 231, устойчивые к воздействию 200 мкг/мл канамицина, обладали пониженной адгезией к *n*-гексадекану по сравнению с контролем ($p < 0.05$) (рис. 4), что свидетельствовало о специфическом механизме резистентности к данному антибиотику, не связанном с изменением гидрофобности клеточной стенки. Согласно [17], степень гидрофобности клеток

Staphylococcus aureus, *S. saprophyticus* и *Pseudomonas aeruginosa* снижалась на 23–47% в присутствии субингибиторной и повышенной концентрации цефуроксима, цефотаксима и амикацина. Однако результаты других работ [18–21] сильно различались, и зависели от вида бактерий и антибиотика. Например, в работе [21] установлено, что степень гидрофобности клеток *Streptococcus sobrinus* под воздействием субингибиторных концентраций канамицина, гентамицина, стрептомицина, хлорамфеникола, ванкомицина и новобиоцина повышалась на 6–75%, но в присутствии таких же количеств эритромицина, линкомицина, клоксациллина, оксациллина и рифампинома — снижалась на 18–74%. Полученные данные объяснялись влиянием антибиотиков на активность глюкансвязывающих лектинов, увеличение которой приводило к пропорциональному снижению степени гидрофобности клеток, однако механизм этого процесса остался не выясненным.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствовали о том, что связь между молекулярной массой антибиотиков и повышением чувствительности к ним родококков после электропорации слабая или совсем отсутствует ($R = -0.03$, $p < 0.05$). Например, увеличение чувствительности к неомицину, в молекуле которого содержится три остатка аминокислот, было в 2 раза выше, чем к содержащему всего два остатка гентамицину (табл. 2). Это согласовывалось с результатами исследования [22] планктонных и иммобилизованных форм коагулазонегативных стафилококков, в котором было показано, что размеры молекул цефазолина, ванкомицина, диклоксациллина, тетрациклина и рифампицина не оказывали видимого эффекта на чувствительность к ним бактериальных клеток.

Таким образом, выявленное в настоящей работе повышение антибиотикочувствительности клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 в результате электропорации, коррелирующее с увеличением степени их адгезии к *n*-гексадекану, требует дальнейшего изучения. Полученные результаты могут быть использованы при подборе оптимального режима электротрансформации родококков, в частности,

Таблица 2. Зависимость изменения антибиотикочувствительности электропорированных клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 от молекулярной массы и гидрофобности антибиотиков

Антибиотик	M_r , г/моль	$\log P_{o/w}$	Изменение антибиотикочувствительности клеток после электропорации, %
Бензилпенициллин	334.39	1.8	13.16
Гентамицин	477.60	-3.1	10.71
Канамицин	484.50	-6.3	-1.93
Клотримазол	344.84	0.5	7.76
Неомицин	614.64	-7.8	20.42
Цефазолин	454.51	-0.6	26.49

уменьшения напряженности электрического поля для повышения выживаемости клеток, а также сокращения периода их восстановления после электротрансформации и снижения концентрации антибиотика в селективной среде для эффективного отбора рекомбинантных клонов. При этом целесообразно избежать перехода культуры электропорированных клеток *R. ruber* в стационарную фазу роста, при которой значительно возрастает их антибиотикочувствительность.

Работа выполнена в рамках госзаданий ААААА19-119112290010-7 (ИЭГМ УрО РАН) и АААА-А20-120070600010-9 (ПГНИУ) и при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-05006).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kotnik T., Frey W., Sack M., Meglič S. H., Peterka M., Miklavčič D. // Trends Biotechnol. 2015. V. 33. № 8. P. 480–488.
2. Kotnik T., Rems L., Tarek M., Miklavčič D. // Ann. Rev. Biophys. 2019. V. 48. № 1. P. 63–91.
3. Yeo S.K., Liong M.T. // J. Sci. Food Agric. 2013. V. 93. № 2. P. 396–409.
4. Blenkinsopp S.A., Khoury A.E., Costerton J.W. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. № 11. P. 3770–3773.
5. Matl F.D., Obermeier A., Zlotnyk J., Friess W., Stemberger A., Burgkart R. // Bioelectromagnetics. 2011. V. 32. № 5. P. 367–377.
6. Martens S.L., Klein S., Barnes R.A., Trejo Sanchez P., Roth C.C., Ibey B.L. // AMB Express. 2020. V. 10. № 1. P. 1–11.
7. Provenzano D., Trevino V., Ermolinsky B. Handbook of Electroporation / Ed. D. Miclavcic. Berlin, Heidelberg: Springer, 2019. P. 1–22.
8. Fernandes P.J., Powell J.A.C., Archer J.A.C. // Microbiol. 2001. V. 147. № 9. P. 2529–2536.
9. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Industrial Applications. / Ed. I. Kurtböke. Amsterdam: Elsevier, 2017. P. 121–148.
10. Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Production of Trehalolipid Biosurfactants by *Rhodococcus*. Biology of *Rhodococcus*, 2nd edition. / Ed. H. Alvarez. Springer Nature, 2019. P. 271–298.
11. Shao Z., Dick W.A., Behki R.M. // Lett. Appl. Microbiol. 1995. V. 21. № 4. P. 261–266.
12. Рубцова Е.В., Кююкина М.С., Ившина И.Б. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 5. С. 501–509.
13. Li H., Li B., Zhang Z., Zhu C., Tian Y., Ye J. // Ecotoxicol. Env. Safety. 2018. V. 148. № 2. P. 842–850.
14. Luo Q., Wang H., Zhang X., Qian Y. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 1. P. 423–427.
15. Organic Pollutants in the Water Cycle: Properties, Occurrence, Analysis and Environmental Relevance of Polar Compounds. / Ed. T. Reemtsma, M. Jekel. Weinheim: John Wiley & Sons, 2006. 350 p.
16. Пшенкина Н.Н., Софронов Г.А. // Общая реаниматология. 2011. Т. 7. № 3. С. 14–18.
17. Kustos T., Kustos I., Kilár F., Rappai G., Kocsis B. // Chemother. 2003. V. 49. № 5. P. 237–242.
18. Savoia D., Malcangi A., Martinetto P. // J. Chemother. 1990. V. 2. № 1. P. 20–25.
19. Wojnicz D., Jankowski S. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2007. V. 29. № 6. P. 700–704.
20. Furneri P.M., Garozzo A., Musumarra M.P., Scuderi A.C., Russo A., Bonfiglio G. // Int. J. Antimicrob. Agents. 2003. V. 22. № 2. P. 164–167.
21. Wu Q., Wang Q., Taylor K.G., Doyle R.J. // J. Bacteriol. 1995. V. 177. № 5. P. 1399–1401.
22. Cerca N., Martins S., Cerca F., Jefferson K.K., Pier G.B., Oliveira R., Azeredo J. // J. Antimicrob. Chemother. 2005. V. 56. № 2. P. 331–336.

Electroporation Effects on *Rhodococcus ruber* IEGM 231 Antibiotic Susceptibility and Adhesive Activity Towards *n*-Hexadecane

M. S. Kuyukina^{a, b, *}, A. M. Varushkina^{a, b}, and I. B. Ivshina^{a, b}

^aInstitute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia

^bPerm State University, Perm, 614990 Russia

*e-mail: kuyukina@iegm.ru

Electroporation effects on viability, antibiotic susceptibility and adhesive activity of *Rhodococcus ruber* IEGM 231 towards *n*-hexadecane were investigated. An 85–96% reduction of cell viability was observed after electroporation at 9 and 12.5 kV/cm. As a result of electroporation, the antibiotic susceptibility of rhodococci increased by 8–46% towards benzylpenicillin, gentamicin, clotrimazole, neomycin and cefazolin. Different dynamics of antibiotic susceptibility was revealed depending on the antibiotic used and the cell recovery time after electroporation. The highest antibiotic susceptibility correlated with increased adhesion to hydrocarbon was recorded for electroporated cells after a 24 h recovery period corresponding to the culture entrance into the stationary growth phase. However, spontaneous mutants of *R. ruber* IEGM 231 resistant to 200 µg/ml of kanamycin were characterized by reduced cell wall hydrophobicity. These findings can be used for electrotransformation of hydrocarbon-oxidizing rhodococci in order to increase the efficiency of recombinant clone selection by reducing the cell recovery period and lowering the antibiotic concentration in a selective medium.

Keywords: actinobacteria, *Rhodococcus*, electroporation, antibiotic susceptibility, hydrophobicity, cell adhesion

УДК 579.62

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДВУХФАЗНОГО АНАЭРОБНОГО СБРАЖИВАНИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОРГАНИЧЕСКОЙ ФРАКЦИИ ТВЕРДЫХ КОММУНАЛЬНЫХ ОТХОДОВ, ПРЕДОБРАБОТАННЫХ В АППАРАТЕ ВИХРЕВОГО СЛОЯ

© 2020 г. Э. Р. Михеева¹, И. В. Катраева², Д. Л. Ворожцов¹, Ю. В. Литти^{3, *}, А. Н. Ножевникова³

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950 Россия

²Нижегородский государственный архитектурно-строительный университет, Н. Новгород, 603950 Россия

³Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: litty-yuriy@mail.ru

Поступила в редакцию 20.03.2020 г.

После доработки 19.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

Предварительная обработка органической фракции твердых коммунальных отходов (ОФ-ТКО) – необходимая стадия процесса для ускорения анаэробного сбраживания, которая позволяет избежать быстрого закисления и ингибирования метаногенеза. Впервые показано влияние предобработки в аппарате вихревого слоя (АВС) на физико-химические свойства и характеристики анаэробного термофильного двухфазного сбраживания ОФ-ТКО. Предобработка в АВС приводила к снижению содержания жира, увеличению рН, небольшому увеличению содержанию белка в расчете на сухое вещество, изменению плотности и содержания сухих веществ. Обработка ОФ-ТКО в АВС в течение 2 мин позволяла увеличить удельный выход биогаза и метана на 11.6 и 15.8% соответственно.

Ключевые слова: органическая фракция твердых коммунальных отходов, аппарат вихревого слоя, предварительная обработка, двухфазная анаэробная ферментация, термофильный процесс, биогаз

DOI: 10.31857/S0555109920060112

С ростом населения Земли проблема переработки и утилизации твердых коммунальных отходов (ТКО) становится все более актуальной. Микробиологическая переработка органической фракции твердых коммунальных отходов (ОФ-ТКО), состоящей в основном из пищевых отходов и бумаги, является более привлекательным и экологичным подходом, по сравнению с термохимической конверсией или захоронением на полигонах ТКО. Компостирование – наиболее часто используемый вариант переработки ТКО не только в России, но и других развитых странах США, Англия, Франция и др. [1, 2]. Однако длительность процесса, влияние на изменение климата за счет выделения CO₂, метана, а также пахучих летучих органических соединений и возможное распространение патогенных микроорганизмов являются основными проблемами компостирования. В европейских странах все большее внимание стали уделять анаэробным процессам переработки биоотходов, поскольку они позволяют исключить упомянутые выше негативные последствия процесса ком-

постирования и получить энергию и биоудобрение [3].

Традиционно, анаэробное сбраживание в метантенках осуществляется в условиях высокой влажности (содержание сухих веществ не более 15%) сбраживаемой массы и применяется для переработки жидких отходов, таких как сточные воды, осадки сточных вод, животноводческие стоки и стоки скотобоен. Для переработки сухих и полусухих отходов, в частности ОФ-ТКО, более перспективной является технология твердофазной анаэробной ферментации, которая проводится при влажности не более 85%. По сравнению с жидкофазной анаэробной ферментацией ОФ-ТКО, твердофазная имеет ряд преимуществ: для переработки одного и того же количества отхода требуется реактор меньшего объема, при этом получаемое биоудобрение имеет меньшую влажность, что облегчает его дальнейшую переработку (не требуется обезвоживание), ниже затраты энергии на обогрев системы, нет необходимости проводить очистку иловых вод метантенков [4, 5].

Пищевые отходы, входящие в состав ОФ-ТКО, содержат натуральные волокна, углеводы, белки, жиры и липиды, витамины и минеральные вещества [6]. Помимо пищевых отходов, ОФ-ТКО содержит бумагу, картон, растительные остатки. Фракционный и компонентный состав ОФ-ТКО очень неоднороден, является специфичным для разных регионов, а это существенно влияет на биохимические характеристики и, следовательно, на процесс микробиологической трансформации ОФ-ТКО [7]. Для снижения неоднородности состава и увеличения доступности субстрата для биодеградации микроорганизмами подбираются и изучаются различные способы предобработки ОФ-ТКО.

В настоящее время можно выделить четыре основных типа предварительной обработки органических отходов [8]: 1) физические и механические методы, изменяющие в первую очередь физические свойства образца (размер частиц, вязкость, плотность и т.д.); 2) термические методы – наиболее простые и быстрые, позволяющие растворить сахара, обеспечить более однородную массу, дезактивировать опасные и нежелательные микроорганизмы; 3) химические методы – тоже достаточно быстрые, но требующие специальной оптимизации в зависимости от субстрата, поскольку в результате обработки могут образоваться соединения (например, фенольные или фурановые вещества), ингибирующие метаногенное микробное сообщество; 4) биологическая обработка – как правило наиболее медленный процесс из-за конкуренции внесенных в отход и аборигенных микроорганизмов, содержащихся в самом отходе. Альтернативой могут быть ферментные препараты, которые, однако, достаточно дороги. Кроме перечисленных методов все больший интерес вызывают комбинированные методы: термохимические, термомеханические и др. [9]. Однако в настоящее время сведений о каком-либо наиболее эффективном и универсальном методе предобработки ОФ-ТКО нет.

ОФ-ТКО содержит большое количество легко разлагаемых органических веществ, которые быстро трансформируются в летучие жирные кислоты (ЛЖК) на начальной стадии анаэробного сбраживания, что может привести к резкому падению рН и ингибированию процесса метаногенеза. Использование двухфазной системы с разделением процессов гидролиза и кислотогенеза от стадии метаногенеза помогает избежать органических перегрузок в метаногенном процессе и тем самым повысить удельную метаногенную активность. Такая организация анаэробного процесса отличается стабильностью, увеличением выхода биогаза и более полным разложением органического вещества [10–12].

Для увеличения эффективности двухфазного анаэробного сбраживания ОФ-ТКО был исполь-

зован новый способ механической предобработки ОФ-ТКО в аппарате вихревого слоя (АВС) ферромагнитных частиц [13]. АВС в настоящее время считается одним из наиболее перспективных и эффективных типов оборудования для измельчения [14]. Аппарат используется в производстве строительных материалов, порошков, пигментов [14], он показал свою эффективность также для предобработки осадка сточных вод [15]. Принцип функционирования АВС достаточно прост. Измельчение осуществляется ферромагнитными рабочими телами цилиндрической формы (стальные иглы), помещенными в трубу из немагнитного материала, в которой создается вращающееся магнитное поле. Из-за высокой скорости вращения поля (3600 об./мин) начинают двигаться и соударяться ферромагнитные тела, вызывая диспергирование обрабатываемого материала, находящегося в рабочем пространстве аппарата. Кроме ударного воздействия ферромагнитных частиц интенсивному диспергированию материала способствуют и кавитационные явления, также возникающие в процессе работы АВС. Кроме того в процессе обработки в аппарате происходит нагревание образца, что, с одной стороны способствует его обеззараживанию, с другой – позволяет подогреть его до необходимой температуры перед подачей в анаэробный реактор, что исключает температурный шок и способствует стабильной работе метаногенного микробного сообщества.

Цель работы – исследование основных характеристик процесса двухфазного анаэробного термофильного сбраживания ОФ-ТКО и влияния предобработки в АВС на физико-химические свойства сбраживаемого субстрата.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В качестве образца ОФ-ТКО использовали модельный субстрат, который содержал (мас. %): фрукты – 1.4, картофель – 29, капуста – 2.7, картон – 3.3, крупа – 19.5, скорлупа яичная – 0.9, хлеб – 7.4, мясо – 15.5, кофе – 0.9, рыба – 4.6, творог – 4.6, чай (заварка) – 10.2. Состав модельного субстрата был выбран, исходя из данных о составе ОФ-ТКО, характерного для России [3]. Предварительно образец ОФ-ТКО был измельчен вручную (нож, ножницы) и гомогенизирован с помощью ручного перемешивания.

Модельный образец ОФ-ТКО имел следующие характеристики: содержание сухих веществ (СВ) – 36% и органических сухих веществ (оСВ) – 84% СВ. Для изучения процесса анаэробного сбраживания ОФ-ТКО разбавляли водопроводной водой до содержания СВ_{исх} – 29.7% и оСВ_{исх} – 95.1% СВ.

Образец ОФ-ТКО (150–180 г) подвергали обработке в АВС (“Регионметтранс”, Нижний Новгород, Россия) в течение 2, 4, 6, 8 и 10 мин. Условия обработки были следующие: $U = 180$ В, $I = 52$ А, $f = 65$ Гц, использовались ферромагнитные тела 3.5×35 мм в количестве 98 шт.

В качестве инокулята (источника метаногенного сообщества микроорганизмов) использовали анаэробный ил из лабораторного реактора, в котором стабильно протекал процесс анаэробного термофильного сбраживания комбикорма (КК-65). Инокулят имел следующие характеристики: СВ–3%, оСВ–69.8 % СВ, рН водной суспензии 7.78. Инокулят предварительно подвергался дображиванию при $(57 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение недели.

Постановка эксперимента. Процесс двухфазного термофильного анаэробного сбраживания проводили в стеклянных флаконах объёмом 200 мл. Во флаконы вносили 100 мл инокулята, а также 6 г ОФ-ТКО, обработанного в АВС в течение 2 мин. В качестве контроля (К) использовали ОФ-ТКО, не обработанный в АВС. ОФ-ТКО предварительно помещали в мешочки из перфорированного нейлона и подвешивали над инокулятом, как показано на рис. 1. Соотношение субстрата (твёрдая фаза в мешочке) к инокуляту (жидкая фаза на дне флакона) в опытных смесях составляло $\text{oСВ}_{\text{ОФ-ТКО}}/\text{oСВ}_{\text{инокулята}} (S/X) = 0.81$. Для создания анаэробных условий, флаконы продували азотом и герметично закупоривали резиновыми пробками. Флаконы инкубировали без перемешивания при 57°C в течение 34 сут. Регулярно, один раз в сутки, орошали содержащуюся в мешочках ОФ-ТКО инокулятом путем встряхивания ручную содержимого флакона. Ежедневно измеряли объём образующегося биогаза. Периодически, раз в 3–4 сут, отбирали пробы образующегося биогаза для анализа содержания CH_4 и CO_2 , а также пробы жидкой фазы для анализа содержания ЛЖК. Эксперименты ставили в двух повторностях.

Аналитические методы. Для измерения объёма образующегося биогаза использовали волюметрический метод (вытеснение воды) [16]. Состав биогаза определяли с использованием газового хроматографа GC-2010 Plus (“Shimadzu”, Япония).

Содержание общего углерода ($\text{C}_{\text{общ}}$) и общего азота ($\text{N}_{\text{общ}}$) определяли на элементном анализаторе Vario EL cube (“Elementar”, Германия).

Количество и состав ЛЖК, накапливающихся в жидкой фазе флакона, определяли на хромато-масс-спектрометре GCMSQP2010 Ultra (“Shimadzu”, Япония), созданного на базе хроматографа GC-2010 Plus (“Shimadzu”) и нового сверхбыстрого квадрупольного масс-селективного детектора. Жидкую пробу образца сброженной массы центрифугировали при 4200 об./мин в течение 5 мин и фильтровали через шприцевые фильтры с

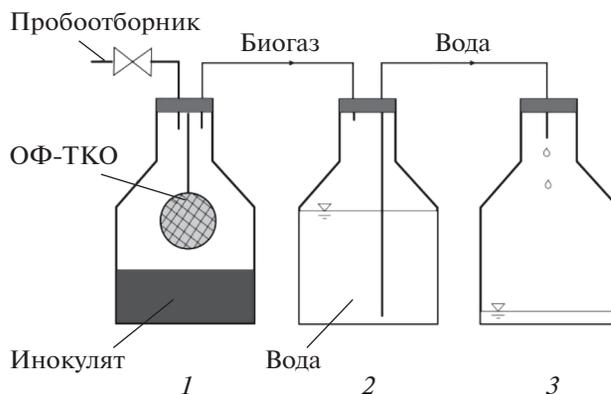


Рис. 1. Схема эксперимента по анаэробному сбраживанию ОФ-ТКО. В анаэробном реакторе (1) происходит двухфазное анаэробное сбраживание ОФ-ТКО, образующийся биогаз поступает в сосуд с соленой водой 5 М NaCl (2), которая вытесняется во флакон 3. Объем вытесненной воды соответствует объему образовавшегося биогаза.

диаметром пор 0.45 мкм. Пробу объёмом 0.2 мкл вводили в инжектор хромато-масс-спектрометра. Испарение анализируемого вещества происходило в потоке газа-носителя (гелий 6.0) при температуре 250°C . Далее, компоненты образца разделялись на капиллярной хроматографической колонке ZB-FFAP в течение 19 мин. Обработку результатов хромато-масс-спектрометрического анализа проводили с использованием программного обеспечения Shimadzu (GCMS Solution ver. 4.11). ЛЖК идентифицировали с помощью базы данных NIST 11. Концентрацию ЛЖК в пробах жидкой фазы флаконов определяли по площадям хроматографических пиков в режиме селективного мониторинга выбранных ионов, относящихся к наиболее интенсивным линиям в масс-спектрах определяемых веществ, методом внутреннего стандарта.

Содержание сухого вещества (СВ) определяли после высушивания образцов до постоянной массы при 105°C . Зольный остаток определяли при сжигании сухого образца в муфельной печи при 650°C . Содержание органического сухого вещества (оСВ) рассчитывали, как разницу между СВ и зольным остатком. Расчет удаленного оСВ ($\text{oСВ}_{\text{уд}}$) осуществляли по формуле:

$$\begin{aligned} \text{oСВ}_{\text{уд}} (\% \text{ СВ}) &= \\ &= \text{oСВ}_{\text{исх}} (\% \text{ СВ}) - \text{oСВ}_{\text{конечн}} (\% \text{ СВ}), \end{aligned}$$

где $\text{oСВ}_{\text{исх}} (\% \text{ СВ})$ – исходное содержание оСВ в ОФ-ТКО после обработки в АВС (до обработки в АВС – для контрольного образца ОФ-ТКО), $\text{oСВ}_{\text{конечн}} (\% \text{ СВ})$ – содержание оСВ в ОФ-ТКО после окончания эксперимента по двухфазному термофильному анаэробному сбраживанию.

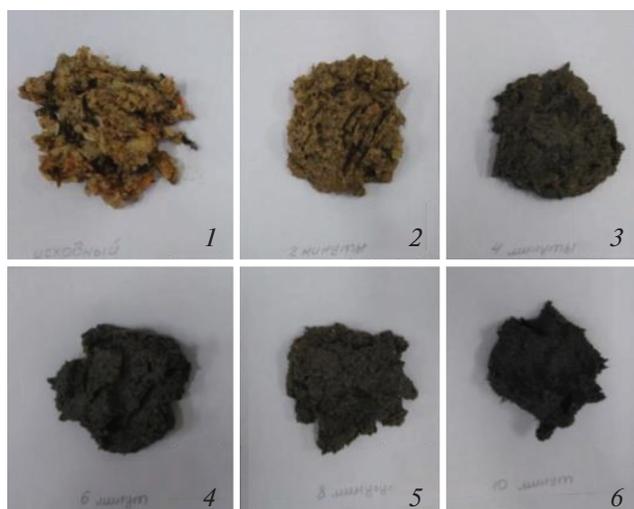


Рис. 2. Внешний вид образцов ОФ-ТКО до и после обработки в АВС: 1 – контроль, исходный образец ОФ-ТКО, 2 – 2 мин обработки, 3 – 4 мин, 4 – 6 мин, 5 – 8 мин, 6 – 10 мин обработки в АВС.

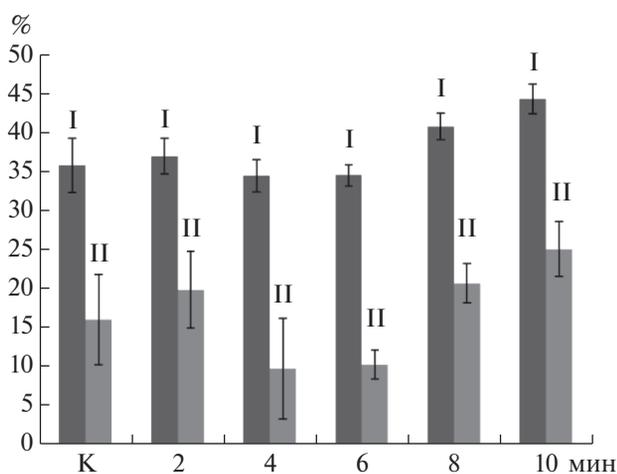


Рис. 3. Содержание СВ (%) и оСВ (%) в образце ОФ-ТКО до (К – контроль) и после обработки в АВС: I – СВ (%), II – оСВ (%).

Плотность ОФ-ТКО до и после обработки в АВС определяли согласно ГОСТ Р 55450-2013, основанном на измерении массы ОФ-ТКО в предварительно взвешенном контейнере известной вместимости. Внешний вид образца ОФ-ТКО до и после обработки в АВС оценивали визуально. рН образца ОФ-ТКО измеряли согласно ГОСТ 26423-85, предварительно разбавив ОФ-ТКО дистиллированной водой в соотношении 1 : 5 по массе. Содержание аммонийного азота определяли фотометрическим методом с реактивом Несслера, согласно ГОСТ 26716-85. Содержание органического азота проводили методом Кьельдаля, согласно ГОСТ 26715-85. Определение содержания

жира проводили путем его экстракции петролейным эфиром в экстракционном аппарате Сокслета и последующем взвешивании, согласно ГОСТ 15113.9-77. Измерения проводили в 2-кратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние обработки в АВС на физико-химические свойства ОФ-ТКО. В результате обработки в АВС наблюдали изменение внешнего вида образцов ОФ-ТКО. Чем дольше осуществлялась обработка в АВС, тем более гомогенной становилась смесь, при этом цвет образцов изменялся от желто-коричневого до серо-черного (рис. 2). Изменение цвета было вызвано механическим разрушением и, возможно, частичным гидролизом компонентов ОФ-ТКО, а также небольшим увеличением содержания в ОФ-ТКО железа за счет соударения и истирания ферромагнитных частиц в процессе работы АВС, как было показано ранее [13].

Плотность контрольного образца (необработанный, исходный образец ОФ-ТКО) составляла 0.904–0.914 г/см³. После 2 и 4 мин обработки в АВС наблюдали увеличение плотности образцов ОФ-ТКО, которая составила 0.978–1.054 г/см³, в то же время после 6 и 8 мин обработки плотность значительно уменьшилась (0.768–0.790 г/см³). Таким образом, относительно кратковременная обработка в АВС вызывала незначительное уплотнение образцов ОФ-ТКО, при более продолжительной обработке они становились более рыхлыми. Следует также отметить, что с увеличением продолжительности обработки возрастала температура образцов: после 2 мин до 48–50°C, после 4 мин до 58–60°C, после 6 мин до 72–74°C; после 8 мин до 84–85°C и после 10 мин до 90–93°C. Влажность образцов увеличивалась после 4 и 6 мин обработки в АВС по сравнению с контрольным образцом (ОФ-ТКО без обработки), а после 8 и 10 мин она стала уменьшаться, вероятно, из-за значительного нагрева образцов ОФ-ТКО. Изменение содержания оСВ коррелировало с изменением содержания СВ в обрабатываемых образцах (рис. 3).

Обработка образца ОФ-ТКО в АВС способствовала увеличению рН его водной вытяжки с 4.54 ± 0.02 в контроле, до 5.99 ± 0.01 после 10 мин обработки. Это могло быть вызвано частичным разложением азотистых органических соединений и высвобождением аммонийного азота, который подщелачивает среду. В результате предобработки образца ОФ-ТКО в АВС изменения соотношения общего углерода к общему азоту, существенно влияющего на АС [5, 6], не было выявлено, оно составляло от 13.5 до 14.3. При этом, массовая доля общего углерода в образце составила $50 \pm 5\%$ СВ, а общего азота – $3.7 \pm 0.4\%$ СВ.

Обработка в АВС приводила к незначительному увеличению содержания белков в сухом веществе при увеличении времени обработки в АВС: содержание белка в образце ОФ-ТКО без обработки в АВС составляло в % от СВ – 21.4 ± 1.9 , после 4 мин обработки – 23.2 ± 2.0 ; после 8 – 23.4 ± 2.0 и после 10 мин – 24.0 ± 1.9 % СВ. Наблюдаемое повышение после 8 и 10 мин предобработки в АВС, возможно, связано с методом расчета, в котором учитывалось содержание СВ в пробе, а оно, вследствие нагрева и снижения влажности, увеличивалось, то есть происходило концентрирование образца.

Содержание жира в образце ОФ-ТКО уменьшилось в 4.25 раза после 2 мин обработки в АВС. Дальнейшее увеличение времени обработки в АВС не оказывало существенного влияния на содержание жира в образце (рис. 4).

Таким образом, предобработка в АВС образца ОФ-ТКО приводила к снижению содержания жира, увеличению рН, небольшому увеличению содержания белка в расчете на СВ, к изменению влажности и содержанию СВ. Содержание оСВ увеличивалось после 2, 8 и 10 мин предобработки и уменьшалось после 4 и 6 мин по сравнению с контролем. Плотность образца также изменялась, причем уменьшалась после 6 и 8 мин обработки и увеличивалась после 2 и 4 мин. Следовательно, уже после 2 мин предобработки в АВС наблюдали как визуальные изменения, так и изменения физико-химических свойств образцов ОФ-ТКО.

Влияние предобработки ОФ-ТКО в АВС на стабильность, биохимический метановый потенциал и на скорость анаэробного двухфазного сбраживания в термофильном режиме. Для создания двухфазной системы анаэробного сбраживания процессы гидролиза и кислотогенеза пространственно отделяют от процесса метаногенеза, обычно в двух или более реакторах. Удачным примером таких систем являются: Biocel (Нидерланды), SEBAC (США), APS (США), Векон (Германия), в которых твердые органические отходы помещают в анаэробные реакторы периодического действия и орошают водой (перколятом) для увеличения влажности твердых отходов. Перколят растворяет и вымывает из толщи отхода накапливаемые ЛЖК и рециркулируется обратно в толщу отхода, предварительно проходя очистку в анаэробном метаногенном реакторе (например, биофильтре). Помимо увлажнения твердого отхода, рециркуляция перколята позволяет постоянно инокулировать (вносить) метаногенные микроорганизмы из метаногенного реактора в толщу отхода в твердофазном реакторе, постепенно переводя его на режим метаногенного сбраживания. Таким образом, использование двухфазных систем позволяет избежать проблемы необратимого закисления реакто-

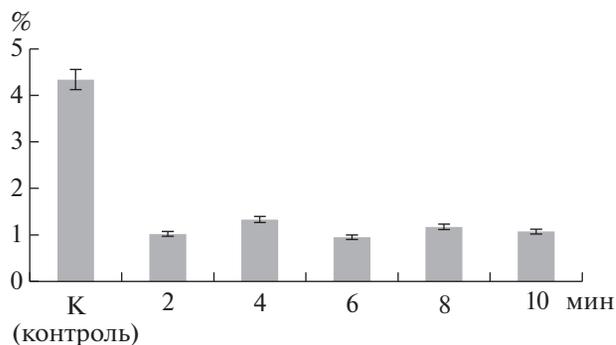


Рис. 4. Массовая доля жира в образце ОФ-ТКО до (контроль) и после обработки в АВС.

ров за счет избыточного накопления ЛЖК [3–5, 10–12].

В работе пространственное разделение процессов кислотогенеза и метаногенеза было оригинально реализовано в одном реакторе. В толще ОФ-ТКО (твердой фазе), содержащемся в подвешенном мешочке, происходили преимущественно процессы образования ЛЖК, которые вымывались в жидкую фазу, находящуюся на дне реактора (флакона). В жидкой фазе, содержащей метаногенное сообщество микроорганизмов, происходил процесс метаногенеза.

Для анализа влияния предобработки ОФ-ТКО в АВС на характеристики метанового сбраживания использовали образец ОФ-ТКО, обработанный в течение 2 мин. Этого времени было достаточно для существенного изменения физико-химических характеристик (рис. 3, 4), а также довольно высокого повышения температуры отхода (до 48°C), необходимого для проведения термофильного режима анаэробного сбраживания ($50\text{--}57^\circ\text{C}$). Результаты, полученные ранее [17], показали, что для жидкофазного анаэробного сбраживания модели ОФ-ТКО наиболее экономически целесообразным являлось время предварительной обработки в АВС, равное 0.5 мин, так как прирост выхода метана при большей длительности обработки был не существенен.

На рис. 5 и 6 представлены среднесуточная скорость выделения и общий объем выделившегося биогаза (смесь метана и углекислого газа). Скорость выделения биогаза при двухфазном анаэробном сбраживании ОФ-ТКО, предварительно обработанного в АВС, в первые сутки эксперимента значительно превышала таковые в контрольном образце без обработки. Это объяснялось созданием более благоприятных условий для микроорганизмов-гидролитиков и бродильщиков в толще ОФ-ТКО в случае предварительной обработки образца в АВС. Гидролитики и бродильщики образуют субстраты (водород и ЛЖК), которые потребляются затем синтрофными бактериями и ме-

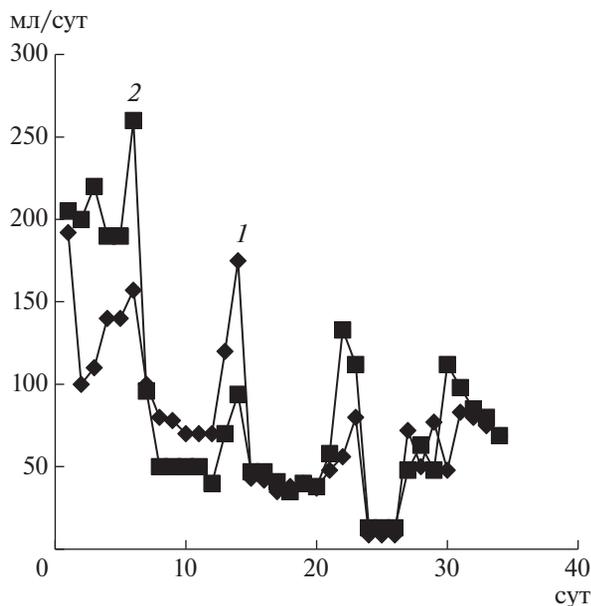


Рис. 5. Изменение скорости выделения биогаза (мл/сут) при анаэробном сбраживании ОФ-ТКО без обработки (1) и обработанного в АВС в течение 2 мин (2).

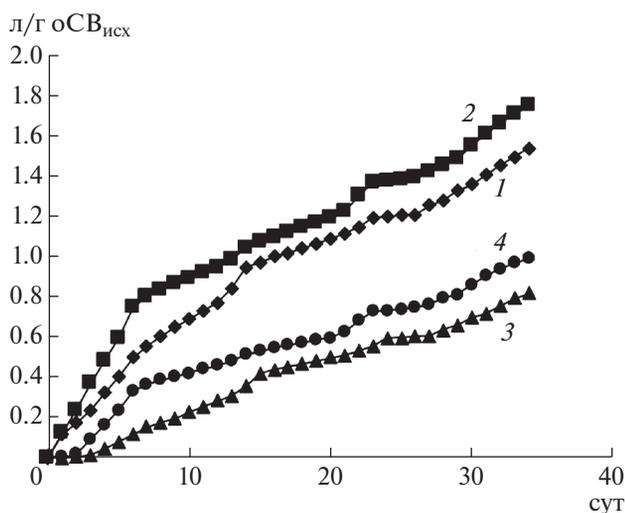


Рис. 6. Динамика образования биогаза (1, 2) и метана (3, 4) при анаэробном сбраживании ОФ-ТКО без обработки (1, 3) и обработанного в АВС в течение 2 мин (2, 4).

таногенами, преимущественно находящимися в жидкой фазе, с образованием биогаза. На 8 сут скорость образования биогаза снижалась, однако содержание метана в нем было одинаково высоким и в контрольном, и в обработанном в АВС образце ОФ-ТКО: для необработанного – 67.6 об. %, для обработанного в АВС – 65.6 об. %. С 12 по 14 сут скорость образования биогаза снова увеличивалась. На 14 сут рН становился щелочным во всех флаконах: для необработанного ОФ-ТКО – 8.45, для обработанного в АВС – 8.03. Эти значения находились за пределами допустимого диапазона рН 6.8–7.4, при котором можно говорить о стабильном протекании процесса анаэробного сбраживания [18]. В то же время в литературе встречаются работы, в которых при более высоких рН (более 7.7) процесс метаногенеза был стабилен [19].

На 21 сут скорость образования биогаза начала расти, а содержание метана в биогазе достигало максимума 76.3 и 72.3 об. % для необработанного и обработанного в АВС ОФ-ТКО, соответственно. Небольшое увеличение скорости наблюдали на 31 сут, однако при этом содержание метана в газе снижалось: для необработанного ОФ-ТКО – до 57.3 об. %, для обработанного в АВС – до 59.0 об. %. Общее количество образовавшегося биогаза и метана за 34 сут анаэробной ферментации составило: для необработанного ОФ-ТКО – 1.54 и 0.84 л/г оСВ_{исх}, для обработанного в АВС – 1.72 и 0.97 л/г оСВ_{исх}, соответственно. Таким образом, обработка ОФ-ТКО в АВС способствовала увеличению производительности анаэробной двухфазной ферментации. Так, удельный выход биогаза увеличивался на 11.6%, метана – на 15.8% (табл. 1).

Необходимо отметить, что удаление сухого органического вещества в обработанных в АВС ОФ-ТКО было ниже (14.6%), чем в контроле (20.3%). Вероятно, это объясняется особенностью методики определения сухого вещества. Так, в результате обработки в АВС часть компонентов ОФ-ТКО, в частности жиры (рис. 4), разлагались на более простые и, вероятно, летучие компоненты, например органические кислоты, которые при нагревании улетучивались и не учи-

Таблица 1. Производительность двухфазного анаэробного сбраживания ОФ-ТКО

Биогаз, метан	ОФ-ТКО, обработанный в АВС	
	ОФ-ТКО без обработки (контроль)	в течение 2 мин (изменение по сравнению с контролем, %)
Биогаз, л/г оСВ _{исх}	1.54	1.72 (11.6)
Метан, л/г оСВ _{исх}	0.84	0.97 (15.8)
Биогаз, л/г оСВ _{уд}	17.0	39.3 (131)
Метан, л/г оСВ _{уд}	9.3	22.3 (140)

Таблица 2. Содержание летучих жирных кислот в жидкой фазе

Образец	Концентрация ЛЖК, мг/л					
	14 сут			31 сут		
	уксусная	пропионовая	масляная	уксусная	пропионовая	масляная
ОФ-ТКО	309.9	23.3	15.8	117.1	9.2	2.8
ОФ-ТКО + АВС 2 мин*	604.3	72.5	37.61	241.8	13.6	1.9

тивались в расчете сухого вещества. В то же время, летучие продукты разложения жиров и других компонентов в результате анаэробного сбраживания превращались в биогаз. Разница между удельным выходом биогаза и метана в расчете на удаленное оСВ при сбраживании необработанного и обработанного в АВС ОФ-ТКО была достаточно высокой и составляла 131% для биогаза и 140% для метана (табл. 1).

Концентрация ЛЖК, являющаяся одним из основных индикаторов стабильности процесса анаэробного сбраживания [20], в жидкой фазе была в пределах нормы. Причем и в контрольных, и в опытных флаконах основной ЛЖК была уксусная кислота, а пропионовая и масляная кислоты присутствовали в небольших количествах (табл. 2). Содержание уксусной кислоты на 14 сут в жидкой фазе опыта с обработанным в АВС образцом ОФ-ТКО составляло 0.6 г/л, что было практически в два раза выше, чем в контрольном образце ОФ-ТКО. Это свидетельствовало о том, что благодаря измельчению и частичному гидролизу, микроорганизмы более полно использовали органическое вещество ОФ-ТКО, обработанного в АВС [13]. На 31 сут анаэробного сбраживания содержание уксусной кислоты снижалось в 2.65 раза для АВС ОФ-ТКО и в 2.49 раз для контрольного образца. Соотношение пропионата к ацетату было значительно ниже 1.4 – уровня, превышение которого свидетельствует о нестабильности процесса анаэробного сбраживания [19]. Таким образом, учитывая, что рН жидкой фазы на 34 сут составлял 8.35 ± 0.11 во флаконах с предобработанными образцами ОФ-ТКО и 8.25 ± 0.25 во флаконах с контрольным образцом (без обработки), процесс двухфазного сбраживания был стабилен.

* * *

В работе впервые исследовано влияние нового метода предобработки ОФ-ТКО в аппарате вихревого слоя (АВС) на ее физико-химические свойства и характеристики двухфазного термофильного анаэробного сбраживания, реализованного в одном реакторе.

Обработка в АВС приводила к нагреванию образца ОФ-ТКО, небольшому увеличению содер-

жания белков и значительному снижению содержания жира в нем, а также увеличению рН среды, вероятно за счет высвобождения аммония. В то же время не наблюдалось четкой зависимости между длительностью обработки в АВС и такими показателями, как плотность, содержание сухого вещества и сухого органического вещества.

Использование двухфазной системы, где имелась возможность разделения в объеме реактора процессов гидролиза и кислого брожения, которые протекают в большей степени в твердой фазе системы (в ОФ-ТКО) и метаногенеза, протекающего в жидкой фазе в нижней части реактора, позволило создать наиболее благоприятные условия для кислотогенного и метаногенного микробных сообществ и провести процесс анаэробного термофильного сбраживания ОФ-ТКО без закисления, часто возникающего в реакторах анаэробного сбраживания [5, 6].

Предварительная обработка ОФ-ТКО в АВС, за счет измельчения и частичного гидролиза компонентов отхода, в частности жиров, улучшала доступ метаногенному микробному сообществу к субстрату, что отразилось на увеличении выхода биогаза и метана на 11.6 и 15.8% соответственно.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-38-00275.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Курсанов С.А., Мустафин Г.В.* // Вестник Омского университета. 2014. № 2. С. 114–120.
2. *Майков К.М.* // Твердые бытовые отходы. 2016. № 3(115). С. 34–39.
3. Биотехнология и микробиология анаэробной переработки органических коммунальных отходов. / Ред. А.Н. Ножевникова, А.Ю. Каллистова, Ю.В. Литти, М.В. Кевбрина. М.: Университетская книга, 2016. 320 с.
4. *Li Y., Park S.Y., Zhu J.* // Renew. Sust. Energ. Rev. 2011. V. 15. № 1. P. 821–826.
5. *Zhou H., Wen Z.* // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2019. V. 169. P. 147–168.
6. *Morales-Polo C., Cledera-Castro M.M., Moratilla B.Y.* // Appl. Sci. 2018. V. 8. № 10. P. 1804.
7. *Kigozi R., Aboyade A.O., Muzenda E.* // Int'l J. Research in Chemical, Metallurgical and Civil Engg. (IJRCMCE). 2014. V. 1. № 1. P. 107–114.

8. Carlsson M., Lagerkvist A., Morgan-Sagastume F. // Waste Management. 2012. V. 32. № 19. P. 1634–1650.
9. Dahadha S., Amin Z., B. Lakeh A.A., Elbeshbishy E. // Energy Fuels. 2017. V. 31. № 10. P. 10335–10347.
10. Chatterjee B., Mazumder D. // Renew. Sust. Energ. Rev. 2019. V. 104. P. 439–469.
11. Karthik O., Trably E., Mehariya S. // Bioresour. Technol. 2017. V. 249. P. 1025–1039.
12. Ren Y., Yu M., Wu C., Wang Q., Gao M., Huang Q., Liu Y. // Bioresour. Technol. 2018. V. 247. P. 1069–1076.
13. Литти Ю.В., Ковалев Д.А., Ковалев А.А., Катраева И.В., Михеева Э.Р., Ножевникова А.Н. // Водоснабжение и санитарная техника. 2019. № 11. С. 32–40.
14. Войтович В.А., Шварев Р.Р., Захарычев Е.А., Феоктистова Е.П., Дебердеев Р.Д., Захарычева Н.С. // Новые огнеупоры. 2017. № 10. С. 48–53.
15. Litti Y., Katraeva I., Kovalev D., Mikheeva E. // Procedia Environmental Science, Engineering and Management. 2019. V. 6. № 3. P. 413–421.
16. Procházka, J., Mrázek, J., Štrosová, L., Fliegerová, K., Záborská, J., Dohányos, M. // Eng. Life Sci. 2012. V. 12. № 3. P. 343–351.
17. Litti Yu., Kovalev D., Kovalev A., Katraeva I., Russkova J., Nozhevnikova A. // J. Phys. Conf. Ser. 2018. V. 1111. P. 012013.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1111/1/012013>
18. Yi J., Dong B., Jin J., Dai X. // PLoS One. 2014. V. 9. № 7. P. e102548
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102548>
19. Franke-Whittle I.H., Walter A., Ebner C., Insam H. // Waste Manag. 2014. V. 34. № 11. P. 2080–2089.
20. Litti Y., Nikitina A., Kovalev D., Ermoshin A., Mahajan R., Goel G., Nozhevnikova A. // Environ. Technol. 2017. V. 40. № 9. P. 1146–1155.

Efficiency of Two-Phase Anaerobic Fermentation and Physicochemical Properties of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes Processed in the Vortex Layer Apparatus

E. R. Mikheeva^a, I. V. Katraeva^b, D. L. Vorozhtsov^a, Yu. V. Litti^{c,*}, and A. N. Nozhevnikova^c

^aLobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

^bNizhny Novgorod State University of Architecture and Civil Engineering, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

^cWinogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center “Biotechnology”, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: litty-yuriy@mail.ru

Pretreatment of the organic fraction of municipal solid waste (**OF-MSW**) is a necessary step to accelerate the process of anaerobic digestion in order to avoid rapid acidification and inhibition of methanogenesis. The work shows for the first time the effect of pretreatment in a vortex layer apparatus (**VLA**) on the physicochemical properties and characteristics of anaerobic thermophilic two-phase fermentation of OF-MSW. Pretreatment in VLA led to a decrease in fat content, an increase in pH, a slight increase in protein content in the dry matter, and a change in density and dry matter content. Processing OF-MSW in VLA for 2 min allowed increasing the specific yield of biogas and methane by 11.6 and 15.8%, respectively.

Keywords: organic fraction of municipal solid waste, vortex layer apparatus, pretreatment, biogas, thermophilic process, two-phase anaerobic fermentation