



ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 60, номер 5, 2024

Микоплазма: свойства, методы обнаружения и деконтаминации клеточных культур и вирусных штаммов (Обзор) <i>О. А. Леонович</i>	435
Перспективность акустических сенсорных систем для иммунодетекции вирусов (Обзор) <i>О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, О. А. Караваева, И. А. Бородина</i>	445
Конструирование вариантов рекомбинантного эндолизина LysSi3 для повышения его антибактериальной активности <i>Н. П. Антонова, И. В. Григорьев, А. М. Лендел, О. В. Усачева, А. А. Климова, Е. В. Усачев, В. А. Гуцин, Д. В. Васина</i>	455
Антиоксидантное действие карнозина и карнозиновых динитрозильных комплексов железа в условиях, моделирующих перекисное окисление биомолекул <i>Э. И. Насыбуллина, О. В. Космачевская, К. Б. Шумаев, А. Ф. Топунов</i>	465
Влияние различных концентраций сахарозы на биосинтез поли-3-оксибутирата и альгината бактериальным штаммом <i>Azotobacter vinelandii</i> 12 при разных уровнях аэрации <i>А. А. Дудун, Т. К. Махина, А. П. Бонарцев, Г. А. Бонарцева</i>	475
Влияние нейротрансмиттеров на состав жирных кислот и фотосинтетических пигментов зеленой микроводоросли <i>Scenedesmus quadricauda</i> <i>Цао Боян, О. Б. Чивкунова, А. Е. Соловченко, Е. С. Лобакова, А. В. Олескин</i>	487
Влияние факторов космического полета на взаимодействие клеток <i>Escherichia coli</i> с бактериофагом T7 <i>Н. Н. Сыкилинда, А. А. Лукьянова, В. В. Лаврикова, И. В. Кутник, Н. В. Панин, Н. А. Старицын, К. А. Мирошников</i>	499
АБК-деградирующие штаммы бактерий рода <i>Pseudomonas</i> и их влияние на рост пшеницы <i>А. С. Рябова, Л. Ю. Кузьмина, Е. А. Гильванова, Н. Ф. Галимзянова, Е. В. Мартыненко, Л. Б. Высоцкая, Г. Р. Кудоярова</i>	507
Влияние этанола на рост красной микроводоросли <i>Galdieria sulphuraria</i> <i>Ю. В. Большевцева, И. Н. Стадничук</i>	514
Способы предобработки тростника для получения ферментативных гидролизатов с высоким содержанием сахаров <i>М. В. Семенова, А. М. Рожкова, Д. О. Осипов, В. Д. Телицин, Е. А. Рубцова, Е. Г. Кондратьева, И. С. Васильева, О. В. Морозова, А. И. Яропов, А. П. Сеницын</i>	524
Разработка биоселектирующего агента на основе иммобилизованных клеток бактерий с активностью амидазы для биодетекции акриламида <i>Е. М. Протасова, Ю. Г. Максимова</i>	536
Индукцируемый цельноклеточный биосенсор для детекции ионов формиата <i>А. А. Черенкова, Т. В. Юзбашев, О. Е. Мелькина</i>	545
Метод <i>in vivo</i> биотинилирования рекомбинантных белков вируса натуральной оспы <i>В. Н. Никитин, Ю. А. Меркульева, Д. Н. Шербаков</i>	552

CONTENTS

Vol. 60, No. 5, 2024

Mycoplasma: Properties, Detection and Decontamination Methods of Cell Cultures and Viral Strains (Review) <i>O. A. Leonovich</i>	435
Prospects of Acoustic Sensor Systems for Virus Immunodetection (Review) <i>O. I. Guliy, B. D. Zaitsev, O. A. Karavaeva, and I. A. Borodina</i>	445
Engineering of Recombinant Endolysin LysSi3 to Increase Its Antibacterial Properties <i>N. P. Antonova, I. V. Grigoriev, A. M. Lendel, O. V. Usacheva, A. A. Klimova, E. V. Usachev, V. A. Gushchin, and D. V. Vasina</i>	455
Antioxidant Effect of Carnosine and Carnosine Dinitrosyl Iron Complexes at the Conditions Modeling Peroxidation of Biomolecules <i>E. I. Nasybullina, O. V. Kosmachevskaya, K. B. Shumaev, and A. F. Topunov</i>	465
Effect of Different Sucrose Concentrations on the Biosynthesis of POLY-3-Hydroxybutyrate and Alginate by the Bacterial Strain <i>Azotobacter vinelandii</i> 12 Under Different Aeration Conditions <i>A. A. Dudun, T. K. Makhina, A. P. Bonartsev, and G. A. Bonartseva</i>	475
Impact of Neurotransmitters on the Fatty Acid Composition and Photosynthetic Pigments of the Green Microalga <i>Scenedesmus quadricauda</i> <i>Cao Boyang, O. B. Chivkunova, A. E. Solovchenko, E. S. Lobakova, and A. V. Oleskin</i>	487
The Effect of Space Flight Factors on the Interaction of <i>Escherichia coli</i> with Bacteriophage T7 <i>N. N. Sykilinda, A. A. Lukianova, V. V. Lavrikova, I. V. Kutnik, N. V. Panin, N. A. Staritsyn, and K. A. Miroshnikov</i>	499
ABA-Degrading Strains of Bacteria of the Genus <i>Pseudomonas</i> and Their Influence on Wheat Growth <i>A. S. Ryabova, L. Yu. Kuzmina, E. A. Gilvanova, N. F. Galimsyanova, E. V. Martynenko, L. B. Vysotskaya, and G. R. Kudoyarova</i>	507
Effect of Ethanol on the Growth of the Red Microalga <i>Galdieria sulphuraria</i> <i>Yu. V. Bolychevtseva and I. N. Stadnichuk</i>	514
Methods for Pre-Processing Cane to Obtain Enzymatic Hydrolysates with High Sugar Content <i>M. V. Semenova, A. M. Rozhkova, D. O. Osipov, V. D. Telitsin, E. A. Rubtsova, E. G. Kondrat'eva, I. S. Vasil'eva, O. V. Morozova, A. I. Yaropolov, and A. P. Sinitsyn</i>	524
Development of a Bio-Selecting Agent Based on Immobilized Bacterial Cells with Amidase Activity for Bio-Detection of Acrylamide <i>E. M. Protasova and Yu. G. Maksimova</i>	536
Inducible Whole-Cell Biosensor for Detection of Formate Ions <i>A. A. Cherenkova, T. V. Yuzbashev, and O. E. Melkina</i>	545
<i>In vivo</i> Method for Biotinylation of Recombinant Variola Virus Proteins <i>V. N. Nikitin, Yu. A. Merkuleva, and D. N. Shcherbakov</i>	552

УДК 579.66;663.18

МИКОПЛАЗМА: СВОЙСТВА, МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ И ДЕКОНТАМИНАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР И ВИРУСНЫХ ШТАММОВ (ОБЗОР)

© 2024 г. О. А. Леонович^{1, *}

¹Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, 108819 Россия

*e-mail: leonovich_oa@chumakovs.su

Поступила в редакцию 19.02.2024 г.

После доработки 11.04.2024 г.

Принята к печати 26.04.2024 г.

Загрязнение микоплазмой перевиваемых клеточных культур и коллекционных вирусных штаммов остается серьезной проблемой в биотехнологической промышленности и экспериментальных исследованиях. Частота заражения микоплазмой культивируемых линий клеток и вирусов составляет 15–35%, в некоторых случаях доходит до 80%. Микоплазмы вызывают различные изменения в контаминированных ими культурах, вплоть до гибели клетки, обладают иммуномодулирующими свойствами, влияют на урожай некоторых вирусов, размноженных в культуре клеток. Микоплазмы не имеют клеточной стенки, способны проходить через бактериальный фильтр, имеют самый маленький геном (~580 тыс. н.п) среди бактерий, способны к самостоятельному размножению и существованию. Эти микроорганизмы устойчивы к большинству антибиотиков, обычно используемых при культивировании клеток. Определенную эффективность в деконтаминации от микоплазм вирусных штаммов и клеточных культур показали производные группы тетрациклинов и фторхинолонов (BM-Cyclin®, Ciprobay®, Baytril®, Plasmocin®, MRA). Большое значение имеет своевременная высокочувствительная детекция и профилактика заражения микоплазмой. Для рутинного сканирования микоплазменного заражения перевиваемых клеточных культур и вирусных штаммов рекомендованы методы индикаторной клеточной культуры (цитохимический) и полимеразной цепной реакции (ПЦР), для более точного – микробиологический анализ колоний микоплазм на специальной среде.

Ключевые слова: микоплазма, деконтаминация, перевиваемые клеточные культуры, вирусные штаммы

DOI: 10.31857/S0555109924050011 EDN: QUBAGW

Перевиваемые клеточные культуры и ценные вирусные штаммы являются важным инструментом как для производства биотехнологических препаратов (вакцин, моноклональных антител), так и для научных исследований. Среди наиболее часто встречающихся проблем, связанных с поддержанием чистоты культур (перекрестное заражение и заражение микроорганизмами), особую роль занимает инфицированность культур микоплазмами, частота заражения которыми в перевиваемых клеточных культурах человека и животных варьирует от 15 до 35%. Первичные клеточные культуры и культуры на раннем пассаже (3–5 пассажей) загрязняются реже – 1 и 5% заражения соответственно. Ряд исследований показал, что инфицирование перевиваемых клеточных культур микоплазмой в отдельных случаях может достигать 65–80% [1–4]. Этому способствует широкое использование клеточных культур в вирусологических исследованиях,

биотехнологии и растущее использование антибиотиков, которые лишь подавляют развитие микоплазм, при этом, не удаляя их полностью.

Строение и свойства микоплазм, взаимодействие с клеткой. Микоплазмы являются представителями довольно большой группы микроорганизмов, характеризующихся отсутствием клеточной стенки. Микоплазмы относятся к прокариотам, класс Mollicutes, включающий более 200 видов. Термины “микоплазма” (введен А. Франком в 1889 г.) и “Mollicutes” часто используют как синонимы. О выделении и культивировании микоплазмы в 1898 г. впервые сообщили Нукар и Ру, из зараженной культуры клеток микоплазмы были выделены в 1956 г. Подробные сведения о биологии и таксономии микоплазм описаны в специальной литературе [4–7].

Микоплазмы являются чрезвычайно распространенными во всех формах жизни (у людей,

почти всех видов животных, растений и насекомых) внутриклеточными контаминантами [8–12]. Микоплазмы видов *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans* обнаруживаются у человека как внутриклеточные бактериальные инфекции, вызывающие хронические заболевания [8, 10, 13–15]. Патогенные свойства микоплазм и их проявление в организме человека долго оставались спорными, поскольку они также были обнаружены как часть нормальной флоры здоровых людей [8, 9].

Микоплазмы могут успешно существовать как на внешней мембране инфицированных клеток, так и иметь внутриклеточное расположение (виды *M. fermentans*, *M. genitalium* и *M. pneumoniae*), что позволяет им успешно скрываться от действия противомикоплазменных препаратов. Показана *in vivo* и *in vitro* способность микоплазмы вида *Mycoplasma penetrans* проникать в различные клетки человека [16].

Одна клетка микоплазмы может дать до 10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ) на мл в течение 3–5 дней в инфицированной культуре клеток. Клеточные культуры, контаминированные микоплазмой, могут содержать от 10^6 до 10^8 клеток микоплазмы на мл (от 100 до 1000 микоплазм на каждую зараженную клетку) [17].

Микоплазмы внутриклеточно растут медленнее по сравнению с другими внеклеточными бактериями с высокой скоростью деления для опережения и уклонения от иммунных ответов клетки-хозяина. Время генерации клеток микоплазмы в среднем составляет 1–3 ч, но может достигать и до 9 ч, что связано с продолжительностью лаг-фазы микоплазмы. Это значительно затрудняет идентификацию микоплазмы бактериологическими методами и увеличивает время анализа, поскольку время инкубации на твердых средах для получения идентифицируемых колоний микоплазм занимает до двух недель и более. Медленный внутриклеточный рост микоплазм также может объясняет хроническую природу микоплазменных инфекций.

Микоплазмы характеризуются отсутствием внешней клеточной стенки и наличием псевдотрехслойной мембранной структуры (рис. 1) [18], в настоящее время считаются наименьшими самовоспроизводящимися организмами, способными к автономному существованию. Небольшой размер 0.1–0.8 мкм в диаметре и отсутствие жесткой мембраны позволяет микоплазмам проходить через антибактериальные фильтры. Микоплазмы не имеют ядра (ДНК находится в свободном состоянии) и других органелл, помимо рибосом. Микоплазмы имеют небольшой геном и рассматриваются как простые живые модели для идентификации минимального набора генов, необходимых для выживания и роста свободноживущего организма [8, 19–21]. Геном *M. genitalium* (всего 482 гена,



Рис. 1. Структурная схема микоплазмы. Показано наличие липопротеиновой мембраны с растворимым содержимым в виде белков, РНК, ДНК и отсутствие клеточной стенки и ядерной оболочки [18].

кодирующих белок ≈ 580 тыс. н. п.) является самым маленьким геномом среди всех известных свободноживущих организмов, способных к самостоятельному размножению и существованию [21]. Это минимальное значение для прокариотов. Для сравнения, геном *Escherichia coli* кодирует около 4000 белков [13]. Микоплазмы имеют все основные гены для их репликации, транскрипции и трансляции, а также минимальное количество генов энергетического метаболизма, необходимых для их внутриклеточного паразитического образа жизни [20, 21].

Основную роль в возникновении микоплазменных инфекций играет способность адгезии микоплазмы к клеточной оболочке, поэтому значительная часть генома микоплазм предназначена для кодирования белков, позволяющих им проникать в клетки [8, 9, 11, 13, 22]. Важным фактором патогенности микоплазмы является также их способность быстро адаптироваться к новым условиям, особенно внутриклеточным средам [14, 23, 24] и уклоняться от защитных систем клетки благодаря их довольно разнообразной и быстро меняющейся геномной структуре [9, 12, 22, 24], а также присутствию в геноме небольших повторяющиеся элементов (например, у *M. genitalium* в гене, кодирующим липопротеин). Такие участки генома вариабельно транскрибируются и обеспечивают разнообразие поверхностных белков микоплазмы, служащих для прикрепления и проникновения в клетку-хозяина [25]. Микоплазмы часто используют стратегию изменения клеточных структурных белков и гликопротеинов [8, 9, 11, 22, 23], могут заменять некоторые структуры клетки-хозяина на свои собственные гликомолекулы [11, 23], что также помогает им обходить системы защиты клетки. У *M. pneumoniae* хорошо изучен белок поверхностной адгезии P1 с молекулярной массой 165 кД,

вступающий во взаимодействие с гликопротеиновыми компонентами мембраны клетки хозяина [26]. Адгезином у *M. genitalium*, посредством которых микоплазма прикрепляется к клетке-хозяину, являются белки P140 и P110 [25].

Другим возможным фактором влияния микоплазм на клетку-хозяина является внутриклеточная конкуренция за питательные вещества и метаболиты [9, 27]. Микоплазмы могут истощать биосинтетические предшественники (аргинин-зависимая *M. pneumoniae* конкурирует с клеткой за аргинин [28]), стимулировать выработку различных ферментов клетки-хозяина и своих собственных (патогенные микоплазмы обладают высокой протеазной и эндонуклеазной активностью) и нарушать метаболические и синтетические пути клетки [9, 23].

Микоплазмы обладают способностью стимулировать образование молекул перекиси водорода и супероксидных радикалов, которые повреждают клеточные мембраны и другие структуры хозяина [29]. Микоплазмы могут также нарушать клеточные структуры и нормальные клеточные процессы хозяина путем прямых межмембранных взаимодействий при клеточной адгезии, слиянии мембран, вакуолизации и высвобождении токсинов или цитопатических молекул из клеток [8, 9, 25–30]. *M. pneumoniae* выделяет CARDS-токсин с АДФ-рибозилтрансферазной активностью, вызывающий обширную вакуолизацию и гибель клеток [28, 31]. Липопротеины микоплазм проявляют иммуномодулирующие эффекты аналогично эндотоксинам, полученным из других патогенных бактерий [30, 31, 33], стимулируя индукцию цитокинов моноцитов и хемокинов [32, 34].

Одним из свойств патогенных микоплазм является способность инициировать запрограммированную гибель клеток или апоптоз [28, 35, 36]. Некоторые виды микоплазм, такие как *M. fermentans* и *M. penetrans* обладают высокой цитотоксической активностью [36].

Таким образом, патогенные микоплазмы имеют сложные взаимоотношения с клеткой-хозяином. Они могут оказывать различное влияние, включая изменение уровня синтеза белка, РНК и ДНК, клеточного метаболизма, состава клеточной мембраны, индукцию/ингибирование активации лимфоцитов и экспрессии цитокинов [32, 34], увеличение/уменьшение размножения вируса в клетке, а также могут либо активировать, либо подавлять иммунный ответ клетки [8, 30, 37].

Разные виды микоплазм оказывают неодинаковые эффекты на разные виды клеточных культур. Некоторые виды микоплазм вызывают тяжелые цитопатические эффекты, в то время как другие могут вызывать лишь небольшую цитопатологию (*M. pneumoniae*) [38]. Степень влияния микоплазм зависит от вида микоплазмы, условий культивирования, типа зараженной клеточной культуры,

интенсивности и продолжительности инфекции, дополнительного заражения вирусами и др.

Основные виды и источники микоплазмы, контаминирующие клеточные культуры и вирусные штаммы. Из контаминированных клеточных линий выделено более 20 видов микоплазм. Основная часть инфекции (90–95%) была вызвана такими видами как как *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis* или *Acholeplasma laylawii*. Соотношение этих видов может сильно варьировать [17]. До 20–40% всех микоплазменных инфекций в культурах клеток приходится на *M. orale*, который является наиболее распространенным видом микоплазмы в полости рта клинически здоровых людей. *M. fermentans* и *M. hominis* – также непатогенные виды микоплазмы нормальной микробной флоры ротоглотки человека, которые также обнаруживаются в зараженных культурах клеток (10–20%) [17]. Около трети всех штаммов, выделенных из клеточных культур, приходится на группу микоплазм крупного рогатого скота. Здесь наиболее частыми возбудителями являются *M. arginini* и *A. laylawii* (20–30% и 5–20% соответственно) [17]. Эти два вида были выделены от крупного рогатого скота, овец, коз, а также от множества других млекопитающих, птиц и насекомых. *M. hyorhinis*, представитель нормальной флоры носовой полости свиней, также составляет большую долю (10–40%) обнаруживаемых микоплазм в инфицированных клеточных культурах [17].

Что касается источников заражения, то образцы ткани, используемые для инициации первичных клеточных культур, не представляют собой основные источники микоплазменной инфекции. Частота заражения первичных клеточных культур низкая, около 1% [1, 29]. Бычья сыворотка плода или новорожденного крупного рогатого скота, используемая для выращивания клеточных культур, была основным источником инфицирования культур в 1960 и 1970 гг. Показано, что 25–40% коммерческого препарата было загрязнено микоплазмой [1]. Это связано с высокой заболеваемостью микоплазмами крупного рогатого скота в то время, преимущественно видами *A. laidlawii* и *M. arginini*, и отсутствием точных методов их детекции. В настоящее время, благодаря усиленным и улучшенным методам профилактики и тестирования коммерческих препаратов, загрязнение бычьей сывороткой клеточных культур значительно уменьшилось. Лабораторный персонал является еще одним источником заражения, т.к. основной процент микоплазм, обнаруживаемых в клеточных культурах, имеют человеческое происхождение. Установлено также, что большинство инфицированных культур в лабораториях содержат одни и те же виды микоплазм [27], поскольку линии клеток и вирусных штаммов, инфицированные микоплазмой, сами

по себе являются источником дальнейшего распространения загрязнения.

Методы обнаружения микоплазменной контаминации. Методы обнаружения микоплазмы можно традиционно разделить на прямые и косвенные [39]. К прямым методам относятся метод индикаторной клеточной культуры (цитохимический) с использованием флюоресцирующего красителя ДНК (DAPI, Hoechst 33258 и реже оливомицином) и микробиологический анализ колоний микоплазм на специальной среде, которые считаются “золотым стандартом” обнаружения заражения микоплазмой [1, 29]. К непрямым (косвенным) методам анализа можно отнести гистологические, иммунологические методы, ПЦР и др.

Согласно ОФС.1.7.2.0031.15 РФ “Испытание на присутствие микоплазм” [40], выявление наличия/отсутствия микоплазм в клеточных культурах и вирусных стоках рекомендуется проводить микробиологическим и цитохимическим методами. Для выявления ДНК *Mycoplasma species* (spp.) также допускается ПЦР при условии проведения соответствующей валидации.

Микробиологический метод обнаружения проводят либо прямым посевом испытуемого образца на полужидкую питательную среду для выделения и культивирования микоплазм (среда Каган полужидкая) с последующим инкубированием до 14 сут, либо посевом в среду Каган жидкую, инкубированием 5–7 сут с последующим пересевом на среду с агаром. Результаты оцениваются визуально. Большинство микоплазм при этом образует микроскопические колонии (диаметром 100–400 мкм) с внешним видом “глазуньи”, растущей под поверхностью агара (рис. 2) [41]. Преимущество этой методики состоит в простоте манипуляций

и возможности визуального наблюдения колоний микоплазмы. Метод является недорогим, высокочувствительным и обеспечивает высокоэффективное обнаружение микоплазмы в клеточных субстратах и продуктах, полученных из клеток. Недостатки заключаются в длительном инкубационном периоде (колонии обычно визуализируются на агаре в среднем через 3–6 сут, но могут появиться и позже), субъективной интерпретации (необходимость различать колонии из скоплений клеток и псевдоколонии – кристаллы, пузырьки воздуха), необходимости поддерживать положительные контроли, а также то, что не все микоплазмы можно успешно культивировать (*M. hyorhinis* не размножается в бесклеточной среде). Также существуют большие различия в морфологии и скорости роста колоний микоплазмы из разных культур.

Другим стандартным методом обнаружения микоплазмы, согласно ОФС.1.7.2.0031.15 РФ, является цитохимический метод, который особенно рекомендуется для микоплазм, некультивируемых в питательных средах. Метод основан на способности флюорохромоов (DAPI, Hoechst 33258 и оливомицин) связываться с ДНК и окрашивать ее с последующей индикацией свечения с помощью флюоресцентного микроскопа (рис. 3) [42]. Испытания могут быть выполнены непосредственно на образце, взятом из данной культуры клеток или косвенно с помощью процедуры пересева, при которой исследуемый образец инокулируется в другую культуру клеток, о которой известно, что она свободна от микоплазм (линия клеток обезьяны Vero, линии клеток мышей NIH 3T3 или 3T6). Использование индикаторной клеточной культуры способствует лучшей стандартизации и позволяет получить соответствующие положительные и отрицательные контроли. Метод является

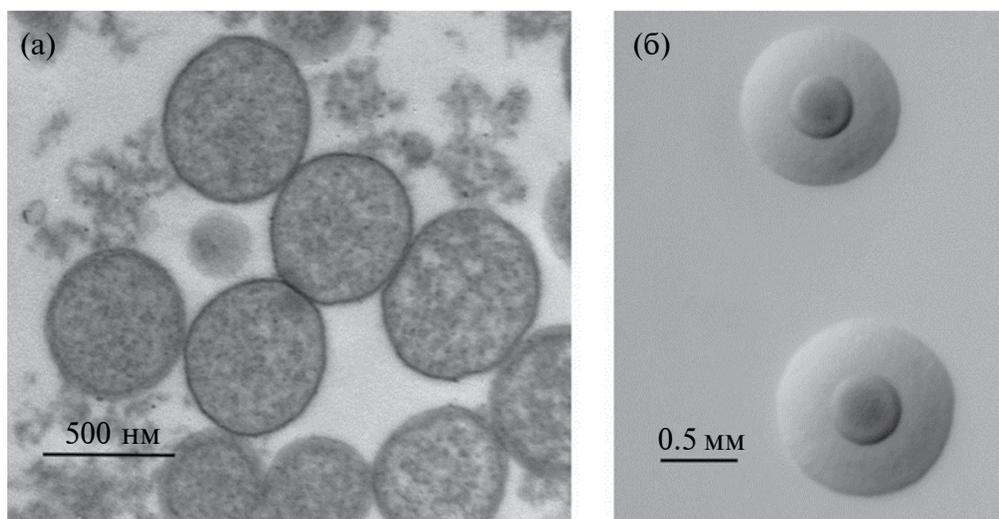


Рис 2. (а) Трансмиссионная электронная микроскопия *Mycoplasma agalactiae*: видны клетки с ровными очертаниями и микоплазма в виде неровных пятен [41]. (б) Колонии микоплазм на агаре: типичная форма яичницы на плотных средах, видна верхушечная структура, с помощью которой микоплазмы прикрепляются к клетке-хозяину.

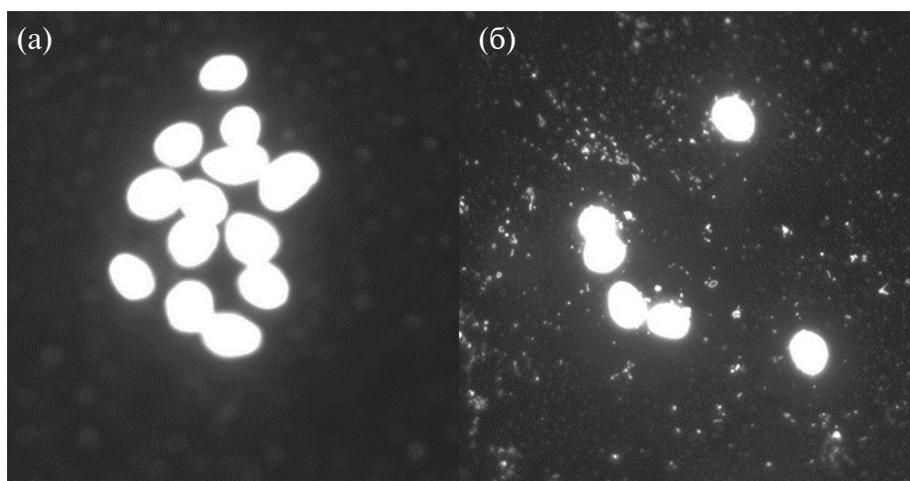


Рис 3. Окрашивание культуры клеток Hoescht 33258 [42]. Образец инкубировали в течение 3-х суток с чистой индикаторной культурой, клетки фиксировали, окрашивали Hoescht 33258 и наблюдали во флюоресцентном микроскопе ($\times 40$): (а) культура клеток Vero без микоплазмы; (б) видны округлые ядра клеток Vero и микоплазма в виде отдельных мелких иерархических пятен.

высокоэффективным и простым, поскольку позволяет использовать жизнеспособные микоплазмы. Исследование применения в качестве флюорохрома DAPI или Hoescht 33258 показало их сходную способность связываться с ДНК и выявлять микоплазму при отсутствии ложноположительных результатов.

Европейская Фармакопея 11.0 (статья 2.6.7. Микоплазмы) [43] также предписывает для выявления микоплазмы в культурах клеток и при производстве вакцин использовать “золотой стандарт” — микробиологический метод на жидких и твердых средах (рекомендована среда Хефлика) в качестве основного с обязательным использованием в качестве положительного контроля хотя бы 1 из 6 видов микоплазм: *A. laylawii*, *M. orale*, *M. pneumoniae* и *M. hyorhinis* (при производстве вакцины для человека и ветеринарии), *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae* (вакцины в птицеводстве), а также метод с использованием индикаторной клеточной культуры.

В качестве альтернативы этим двум методам, либо в дополнение к ним с 2006 г. для выявления микоплазмы из исследуемого образца в Европейскую Фармакопею официально включены методы амплификации нуклеиновых кислот [44, 45]. Методы позволяют обеспечить преимущество по сравнению с обычными микробиологическими методами с точки зрения аналитической производительности и времени выполнения. Отлично подходят для рутинных испытаний на производстве и для продуктов с коротким сроком хранения [45] и все чаще используются в качестве альтернативы культуральным методам. В настоящее время получил широкое использование чувствительный, конкретный и быстрый метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Впервые ПЦР в диагностике микоплазменных инфекций был применен в 1989 г. В основу анализа легли известные последовательности микоплазменной 16S рРНК с использованием универсальных праймеров, позволяющих обнаружить ДНК любой микоплазмы. Для обнаружения микоплазмы и одновременной идентификации [44–46] используют праймеры на межгенные участки 16S-23S. ПЦР-анализ на микоплазму можно проводить с замороженными и лиофилизированными материалами, что дает возможность ретроспективного анализа и облегчает транспортировку, сбор и хранение образцов. Однако остается вопрос о пределе обнаружения ПЦР метода, поскольку в отличие от культуральных, он не позволяет различать жизнеспособные и нежизнеспособные микоплазмы, что может приводить к ложноположительным результатам. Другой возможной проблемой могут быть ложноотрицательные данные, вызванные ингибированием Taq полимеразы в образцах. При этом очевидно, что метод ПЦР явно превосходит во многом другие методы обнаружения микоплазм, так как сочетает в себе простоту, скорость, высокую специфичность, а также объективность, точность и воспроизводимость результатов, и при соответствующей валидации является достаточно перспективным [47].

Деконтаминация клеточных линий и вирусных штаммов от микоплазмы. Имеются многочисленные данные о способах элиминации микоплазмы из инфицированной культуры клеток и вирусных штаммов. Все встречающиеся в литературе методы можно условно разделить на четыре основных типа процедур: физические (термическая обработка, фотосенсибилизирующие агенты, фильтрация), химические (моющие агенты, метилглициновый буфер, полианетолсульфонат натрия [48, 49],

промывки вирусной суспензии спиртами [50] и хлороформом [51]), иммунологические (культивирование с макрофагами) и химиотерапевтические (лечение антибиотиками) [17, 52–57]. Физические, химические и иммунологические методы достаточно трудоемки и малоэффективны, часто приводят к гибели клеток или потери вируса. Использование химиотерапевтических препаратов является относительно простым и доступным способом элиминации микоплазм до неопределяемого уровня с сохранением вирусной активности.

Поскольку микоплазмы лишены клеточной стенки, они не чувствительны к пенициллину и его аналогам, эффективным против большинства бактерий – контаминантов клеточных культур. Показано, что некоторые пеницилины в определенных концентрациях подавляют рост микоплазмы, полностью не уничтожая ее. Аминогликозиды, линкозамиды являются умеренно или высокоэффективными препаратами для деконтаминации клеток от микоплазм, но при этом проявляют цитотоксичность в лечебной концентрации.

Ряд антибиотиков был достаточно эффективно использован для деконтаминации микоплазмы [52, 53]. Показано, что тетрациклины ингибируют биосинтез белка путем связывания с субъединицами рибосом, блокируя тем самым синтез полипептидной цепи, как в прокариотических, так и эукариотических клетках. Коммерческий препарат VM-Cyclin® (“Roche”, Германия) сочетает в себе макролид тиамулин (VM-Cyclin I) и тетрациклинаминоциклин (VM-Cyclin II) [52, 54, 55] и является одним из признанных высокоэффективных противомикоплазменных препаратов. Исследования [42] подтвердили эффективность применения антибиотика VM-Cyclin® для микоплазменной деконтаминации вирусных штаммов. Особенную эффективность VM-Cyclin® проявлял против микоплазм *A. laidlawii*, *M. arginini*, *M. hyorhinae* и *M. orale*. Эффективность препарата составляет 87% и более. Устойчивость к данному антибиотику по данным производителя не наблюдается [54]. Лечебные концентрации VM-Cyclin I и VM-Cyclin II составляют 10 мкг/мл (3 сут) и 5 мкг/мл (4 сут) соответственно. Рекомендовано 3 цикла лечения [52].

Антибиотики фторхинолонового ряда, такие как ципрофлоксацин (Ciprobay® 100; “Bayer”, Германия), энрофлоксацин (Baytril®; “Bayer”, Германия), хинолоновый реагент для удаления микоплазмы (MRA; “ICN” Германия), смесь фторхинолона и макролида (Plasmocin®, “InvivoGen”, Франция) также зарекомендовали себя в качестве реагентов, способствующих элиминации микоплазм из культур клеток [52, 54–58]. Особенно они эффективны против *M. hominis* и *M. pneumoniae*. Лечебные концентрации составляют: Baytril® – 25 мкг/мл в течение 14 сут, Ciprobay® – 10 мкг/мл (14 сут), MRA 0,5 мкг/мл (7 сут), Plasmocin® – 25 мкг/мл (14 сут) [52]. Есть

также данные по успешному использованию спарфлоксацина [59]. Механизм действия хинолонов включает связывание и ингибирование бактериальной ДНК-гиразы, необходимой для репликации ДНК, транскрипции, репарации и рекомбинации. Несмотря на их подтвержденную селективность в отношении прокариотических ферментов, хинолоны также могут оказывать ингибирующее действие на эукариотическую ДНК-полимеразу, топоизомеразу и ДНК дезоксирибонуклеотидтрансферазу. Однако показано, что селективность хинолонов в отношении бактериальной клетки все же выше по сравнению с клетками млекопитающих. Эффективность излечения фторхинолонами составляет по данным разных исследований 69–75% [52–54, 56, 58]. Устойчивость к действию антибиотиков фторхинолонового ряда составляет до 20%.

Одним из основных побочных исходов лечения антибиотиками является цитологический эффект, наблюдаемый у 5–13% исследованных культур, что может привести к потере клеточной культуры. VM-Cyclin® показывает наибольший ингибирующий (цитостатический или цитотоксический) эффект, который проходит через неделю после прекращения лечения, и рост клеток возвращается к норме. Цитостатический и цитотоксические эффекты антибиотиков особенно характерны для хронически инфицированных клеток, что можно объяснить плохим состоянием зараженных клеточных культур. В экспериментально зараженных микоплазмой клетках нет ярко выраженного цитологического эффекта антибиотиков. Согласно исследованиям [42], в ряде случаев применение антибиотиков для элиминации микоплазм ингибирует размножение вируса, культивируемого в клетках, вплоть до нулевых значений, что так же является нежелательным побочным эффектом.

Исследования показали высокую перекрестную резистентность микоплазм к фторхинолонам, что объясняется структурным сходством всех хинолонов [55]. Перекрестная устойчивость была отмечена между MRA и Ciprobay® в четырех из пяти клеточных линий, не очищенных ни одним из реагентов. Проблема перекрестной резистентности решается последовательным введением VM-Cyclin® к тем же клеткам, которые были под воздействием хинолона. Использование более высоких концентрации антибиотиков для преодоления перекрестной резистентности могут оказаться эффективными, однако в этом случае наблюдается высокая цитотоксичность. Подробные протоколы применения антибиотиков для элиминации микоплазм из инфицированных клеточных линий были опубликованы [42, 57]. С целью исключения резистентности к антибиотикам, в среды для роста культур и размножения вируса не рекомендуется на регулярной основе добавлять антибиотики, используемые для лечения микоплазменной инфекции.

Лечение от микоплазмы создает стресс для эукариотических клеток, что может выражаться в снижении ростовых качеств клетки, выхода урожая вируса. Метод хотя и обладает рядом недостатков (продолжительность лечения, цитотоксические эффекты), однако является технически простым способом, удобным для рутинных процедур. Уровень излечения в 75% случаев (отсутствие индикации микоплазм в трех последовательных пассажах) является хорошим результатом.

* * *

Очевидно, что нет единого доступного метода деконтаминации со 100% эффективностью, при этом эффективность некоторых методов доказана только в экспериментально загрязненных клеточных культурах, что может не соответствовать реальным условиям, поскольку, как упоминалось выше, хронические микоплазменные инфекции сложным образом влияют на клетку. Усилия по удалению микоплазм из контаминированных перевиваемых клеточных линий и вирусных штаммов следует рассматривать как последнюю возможность. В большинстве случаев лучше полностью решить проблему контаминации путем замены инфицированных культур и штаммов свежими запасами, свободными от микоплазм [60]. Однако на практике не все культуры и особенно ценные вирусные штаммы могут быть заменены на чистые (вследствие отсутствия таковых), поэтому лечение от микоплазмы в таком случае является необходимостью.

Поскольку элиминация микоплазмы из зараженных клеток и вирусных штаммов является достаточно сложным процессом и не всегда результативным, большое значение имеет профилактика заражения микоплазмой. Профилактику можно разделить на профилактику оборудования для культивирования клеток и вирусов, профилактику культуральных сред и реагентов, и технику лабораторного персонала [61, 62]. Хотя предлагаемые меры и не будут предотвращать любую микоплазменную инфекцию, они значительно уменьшат ее вероятность, а также будут способствовать предотвращению перекрестного заражения клеток. Основные требования к профилактике микоплазменного заражения включают в себя работу в специальных стерильных помещениях и сертифицированных вертикальных боксах биологической безопасности с ламинарным потоком, дезинфекции рабочих поверхностей до и после работы (70%-ный этанол для рутинного использования и 2%-ный фенол в 70%-ном этаноле при подозрении на загрязнение), поскольку микоплазмы показали продолжительную выживаемость в высушенном состоянии. Кроме этого необходима регулярная дезинфекция посуды, утилизация материалов для культивирования клеток и вирусов путем стерилизации. Запрещается содержание животных в помещении для культивирования клеток.

В лаборатории и в производстве вакцин должны применяться надежные методы обнаружения микоплазмы. Для рутинного сканирования может быть рекомендован метод ПЦР, для более тщательного исследования и уточнения данных — культуральные методы. Компоненты сред, сыворотки следует проверять перед применением на отсутствие микоплазменной контаминации. Поскольку регулярное использование антибиотиков может привести к появлению антибиотикоустойчивых микроорганизмов, а также ослабить обнаружение микоплазменной инфекции, не следует постоянно использовать среды с антибиотиками для выращивания клеток и вируса. Используемые клеточные линии должны проходить периодическое тестирование на микоплазму (раз в месяц), новые клеточные культуры и вирусные штаммы — обязательно проверяться при поступлении. При обнаружении микоплазмы инфицированные клеточные линии и вирусные штаммы должны быть как можно быстрее отделены от чистых культур, и либо немедленно уничтожены, либо обработаны микоплазмацидными средствами. В лаборатории и на производстве всегда должен храниться запас замороженных безмикоплазменных клеточных линий и вакцинных вирусных штаммов на случай заражения.

Соблюдение правил общей асептики, знание методов культивирования и своевременная детекция микоплазм являются основными механизмами, способными предотвратить контаминацию биотехнологических продуктов.

В настоящее время ведутся постоянные исследования и разработки методов борьбы с микоплазмой. Наиболее перспективными научными направлениями в этой области являются применение моделей машинного обучения, использующих сигнатуры автофлуоресценции индивидуальных клеток для детекции инфицированных микоплазмой клеток (точность достигает 70% и более) [63], использование нанотехнологий (наносенсоры, нанобиотехнологические чипы и нанотерапия) для обнаружения [64] и уничтожения микоплазмы [65], а также поиск новых эффективных антибиотиков [66]. Новые научные подходы необходимы для преодоления существующих ограничений и создания более точных и оперативных инструментов в области детекции и деконтаминации микоплазмы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания ФГАНУ ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Barile M.F., Rottem S.* Rapid Diagnosis of Mycoplasmas. / Eds. I. Kahane, A. Adoni. N. Y.: FEMS, 1993. V. 62. P. 155–193.
2. *Drexler H.G., Uphoff C.C., Dirks W.G., MacLeod R.A.F.* // *Leukemia Research*. 2002. V. 26. № 4. P. 329–333. [https://doi.org/10.1016/s0145-2126\(01\)00136-9](https://doi.org/10.1016/s0145-2126(01)00136-9)
3. *Hay R.J., Macy M.L., Chen T.R.* // *Nature*. 1989. V. 339. № 6224. P. 487–488. <https://doi.org/10.1038/339487a0>
4. *Drexler H.G., Uphoff C.C.* Encyclopedia of Cell Technology. / Eds R.S. Spier. N. Y.: John Wiley & Sons, Inc., 2003. V. 1. P. 609–627. <https://doi.org/10.1002/0471250570.spi054>
5. *Archer D.B., Daniels M.J.* Plant and Insect Mycoplasma Techniques. / Eds M.J. Daniels, P.G. Markham. Springer, 1982. P. 9–39.
6. *Razin S.* The prokaryotes / Eds A. Balows. N. Y.: 1991. P. 1937–1959.
7. *Tully J.G.* Rapid Diagnosis of Mycoplasmas. / Eds I. Kahane, A. Adoni. N. Y.: FEMS, 1993. V. 62. P. 3–14. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2478-6_2
8. *Nicolson G.L.* // *Int. J. Clin. Med.* 2019. V. 10. P. 477–522. <https://doi.org/10.4236/ijcm.2019.1010041>
9. *Baseman J.B., Tully J.G.* // *Emerg. Infect. Dis.* 1997. V. 3. P. 21–32. <https://doi.org/10.3201/eid0301.970103>
10. *Nicolson G.L., Nasralla M.Y., Franco A.R., Meirleir K De, Nicolson N.L., Ngwenya R., Haier J.* // *J. Chronic Fatigue Syndr.* 2000. V. 6. P. 23–39. https://doi.org/10.1300/J092v06n03_03
11. *Taylor-Robinson D., Jensen J.S.* // *Clin. Microbiol. Rev.* 2011. V. 24. P. 498–514. <https://doi.org/10.1128/CMR.00006-11>
12. *Razin S., Yogev D., Naot Y.* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998. V. 62. P. 1094–1156. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.4.1094-1156.1998>
13. *Razin S.* // *Microbiol Rev.* 1985. V. 49. № 4. P. 419–455. <https://doi.org/10.1128/mr.49.4.419-455.1985>
14. *Kokkayil P., Dhawan B.* // *Indian J. Med. Microbiol.* 2015. V. 33. P. 205–214. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.154850>
15. *Nicolson G.L., Nasralla M., Haier J., Nicolson N.L.* // *Biomedical Therapy*. 1998. V. 16. P. 266–271.
16. *Lo S.C., Hayes M.M., Tully J.G., Wang R.Y.H., Kotani H., Pierce P.S. et al.* // *Int. J. Sys. Bact.* 1992. V. 42. P. 357–364. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-3-357>
17. *Drexler H.G., Uphoff C.C.* // *Cytotechnology*. 2002. V. 39. P. 75–90. <https://doi.org/10.1023/A:1022913015916>
18. *Ferreira G., Santander A., Savio F., Guirado M., Sobrevia L., Nicolson G. L.* // *BBA - Molecular Basis of Disease*. 2021. V. 1867. № 12 P. 166264. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166264>
19. *Fadiel A., Eichenbaum K.D., Semary N.E., Epperson B.* // *Front. Biosci.* 2007. V. 2. P. 2020–2028. <https://doi.org/10.2741/2207>
20. *Fraser C.M., Gocayne J.D., White O., Adams M.D., Clayton R.A., Fleischmann R.D. et al.* // *Science*. 1995. V. 270. № 5235. P. 397–404. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.397>
21. *Glass J.I., Assad-Garcia N., Alperovich N., Yooseph S., Lewis M.R., Maruf M. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. V. 103. № 2. P. 425–430. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510013103>
22. *Cazanave C., Manhart L.E., Bébéar C.* // *Med. Mal. Infect.* 2012. V. 42. № 9. P. 381–392. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.05.006.201>
23. *Rottem S.* // *Physiol. Rev.* 2003. V. 83. P. 417–432. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2002>
24. *Zhang Q., Wise K.S.* // *Infect. Immun.* 1996. V. 64. P. 2737–2744. <https://doi.org/10.1128/iai.64.7.2737-2744.1996>
25. *Burgos R., Pich O.Q., Ferrer-Navarro M., Baseman J.B., Querol E., Piño J.* // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. P. 8627–8637. <https://doi.org/10.1128/JB.00978-06>
26. *Baseman J.B., Cole R.M., Krause D.C., Leith D.K.* // *J. Bacteriol.* 1982. V. 151. № 3. P. 1514–1522. <https://doi.org/10.1128/jb.151.3.1514-1522.1982>
27. *McGarrity G.J., Kotani H., Burler H.* Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis. /Eds. J. Maniloff, R. N. McElhaney, L.R. Finch, J.B. Baseman. Washington. 1992. P. 445–456.
28. *He J., Liu M., Ye Z., Tan T., Liu X., You X., Zeng Y., Wu Y.* // *Mol. Med. Rep.* 2016. V. 14. P. 4030–4036. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5765>
29. *McGarrity G.J., Vanaman V., Sarama J.* // *Am. Soc. Microbiol. News*. 1985. V. 51. P. 170–183.
30. *Christodoulides A., Gupta N., Yacoubian V., Maithel N., Parker J., Kelesidis T.* // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 1682. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01682>
31. *Becker A., Kannan T.R., Taylor A.B., Pakhomova O.N., Zhang Y., Somarajan S.R. et al.* // *PNAS*. 2015. V. 112. № 16. P. 5165–5170. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420308112>
32. *Frisch M., Gradehandt G., Mühlradt P.F.* // *Eur. J. Immunol.* 1996. V. 26. P. 1050–1057. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260514>
33. *Mühlradt P.F., Kieß M., Meyer H., Süßmuth R., Jung G.* // *J. Exp. Med.* 1997. V. 185. P. 1951–1958. <https://doi.org/10.1084/jem.185.11.1951>

34. Kaufmann A., Mühlrad P.F., Gerns D., Sprenger H. // *Infect. Immun.* 1999. V. 67. P. 6303–6308. <https://doi.org/10.1128/iai.67.12.6303-6308.1999>
35. Bendjennat M., Blanchard A., Loufi M., Montagnier L., Bahraoui E. // *Infect. Immun.* 1999. V. 67. P. 4456–4462. <https://doi.org/10.1128/iai.67.9.4456-4462.1999>
36. Rawadi G., Roman-Roman S., Castedo M., Dutilleul V., Susin S., Marchetti P. et al. // *J. Immunol.* 1996. V. 156. P. 670–678.
37. Qin L., Chen Y. You X. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 1934. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01934>
38. Chaudhry R., Ghosh A., Chandolia A. // *Indian Journal of Medical Microbiology.* 2016. V. 34. № 1. P. 7–16. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.174112>
39. Uphoff C.C., Gignac S.M., Drexler H.G. // *J. Immunol. Methods.* 1992. V. 149. P. 43–53. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(12\)80047-0](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(12)80047-0)
40. ОФС.1.7.2.0031.15. Приказ Минздрава России от 31.10.2018 N 749. Государственная фармакопея РФ. XIV издание. Том II. <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/>
41. Citti C., Blanchard A. // *Trends Microbiol.* 2013. V. 21. № 4. P. 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.01.003>
42. Леонович О.А., Ишмухаметов А.А., Дзагурова Т.К. // *Вет. Пат.* 2020. V. 3. P. 29–37. <https://doi.org/10.25690/VETPAT.2020.57.93.006>
43. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 11.0. 2022. P. 210–215.
44. Milne C., Daas A. // *Pharmeuropa Bio.* 2006. V. 1. P. 57–72.
45. Nübling C.M., Baylis S.A., Hanschmann K.-M., Montag-Lessing T., Chudy M., Kreß J. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. V. 81. № 17. P. 5694–5702. <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-15>
46. Rawadi G., Dussurget O. // *PCR Methods Appl.* 1995. V. 4. P. 199–208. <https://doi.org/10.1101/gr.4.4.199>
47. Hopert A., Uphoff C.C., Wirth M., Hauser H., Drexler H.G. // *J. Immunol. Methods.* 1993. V. 164. P. 91–100. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90279-g](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90279-g)
48. Freundt E.A., Andrews B.E., Erna H., Kunze M., Black F.T. // *Zentralbl Bakteriolog. Orig.* 1973. V. 225/ № 1. P. 104–112.
49. Evans G.L., Cekoric Jr T., Schoemakers M., Searcy R.L. // *Antimicrob. Agents Chemother. (Bethesda).* 1967. V. 7. P. 687–691.
50. Staal S.P., Rowe W.P. // *J. Virol.* 1974. V. 14. № (6). P. 1620–1622. <https://doi.org/10.1128/JVI.14.6.1620-1622.1974>
51. Baronti C., Pastorino B., Charrel R., de Lamballerie X. // *J. Virol. Methods.* 2013. V. 187. № 2. P. 234–237. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.09.014>
52. Uphoff C.C., Denkmann S.A., Drexler H.G. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. 267678. <https://doi.org/10.1155/2012/267678>
53. Jung H., Wang S.-Y., Yang I.-W., Hsueh D.-W., Yang W.J., Wang T.-H., Wang H.-S. // *Chang Gung. Med. J.* 2003. V. 26. № 4. P. 250–258.
54. Drexler H.G., Gignac S.M., Hu Z.B., Hopert A., Fleckenstein E., Voges M., Uphoff C.C. // *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1994. V. 30 A. P. 344–347. <https://doi.org/10.1007/BF02631456>
55. Uphoff C.C., Gignac S.M., Drexler H.G. // *J. Immunol. Methods.* 1992. V. 149. P. 55–62. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(12\)80048-2](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(12)80048-2)
56. Fleckenstein E., Uphoff C.C., Drexler H.G. // *Leukemia.* 1994. V. 8. P. 1424–1434.
57. Uphoff C.C., Drexler H.G. // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2014. V. 106. P. 28.4.1–28.4.14. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2804s106>
58. Gignac S.M., Uphoff C.C., MacLeod R.A., Steube K., Voges M., Drexler H.G. // *Leukemia Res.* 1992. V. 16. P. 815–822. [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(92\)90161-y](https://doi.org/10.1016/0145-2126(92)90161-y)
59. Uphoff C.C., Drexler H.G. // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2002. V. 38. P. 86–89. [https://doi.org/10.1290/1071-2690\(2002\)038<0086:CAEOMI>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1071-2690(2002)038<0086:CAEOMI>2.0.CO;2)
60. Hay R.J., Macy M.L., Chen T.R. // *Nature.* 1989. V. 339. P. 487–488. <https://doi.org/10.1038/339487a0>
61. Uphoff C.C., Drexler H.G. // *Human Cell.* 2001. V. 14. P. 244–247.
62. Huang X., Yu M., Wang B., Zhang Y., Xue J., Fu Y., Wang X. // *J. Biol. Methods.* 2023. 10:e99010005. <https://doi.org/10.14440/jbm.2023.407>
63. Bamba K., Takabe K., Daitoku H., Tanaka Y., Ohtani A., Ozawa M. et al. // *Sens. Diagn.* 2024. V. 3. P. 287–294. <https://doi.org/10.1039/D3SD00175J>
64. Matini A., Naghib S.M. // *Sensing and Bio-Sensing Research.* 2024. V. 43. 100631. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2024.100631>
65. Liling W., Liwei L., Shen C., Jiawen Z., Huanlai X., Wentan Z. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2024. V. 698. 149540. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.149540>
66. Malave-Ramos D.R., Kennedy K., Key M.N., Dou Z., Kafsack B.F.C. // *Microbiol. Spectr.* 2022. V. 10. № 5:e0349722. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03497-22>

Mycoplasma: Properties, Detection and Decontamination Methods of Cell Cultures and Viral Strains (Review)

O. A. Leonovich^{a, *}

^aChumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, 108819 Russia

**e-mail: leonovich_oa@chumakovs.su*

Mycoplasma contamination of continuous cell cultures and collection viral strains remains a serious problem in the biotechnology industry and experimental research. The frequency of mycoplasma contamination of cultured cell lines and viruses is 15–35%, in some cases up to 80%. Mycoplasmas cause various changes in cultures contaminated by them, up to cell death, have immunomodulatory properties, and affect the yield of certain viruses propagated in cell culture. Mycoplasmas do not have a cell wall, are able to pass through a bacterial filter, have the smallest genome (≈ 580 kb) among bacteria, and are capable of independent reproduction and existence. These microorganisms are resistant to most antibiotics commonly used in cell culture. Derivative groups of tetracyclines and fluoroquinolones (BM-Cyclin®, Ciprobay®, Baytril®, Plasmocin®, MRA) have shown certain effectiveness in decontaminating viral strains and cell cultures from mycoplasmas. Timely, highly sensitive detection and prevention of mycoplasma infection is of great importance. For routine scanning of mycoplasma infection of continuous cell cultures and viral strains, the methods of indicator cell culture (cytochemical) and polymerase chain reaction (PCR) are recommended, for more accurate – microbiological analysis of mycoplasma colonies on a special medium.

Keywords: mycoplasma, decontamination, continuous cell cultures, viral strains

УДК 57.083

ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ АКУСТИЧЕСКИХ СЕНСОРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ ИММУНОДЕТЕКЦИИ ВИРУСОВ (ОБЗОР)

© 2024 г. О. И. Гулий¹, *; Б. Д. Зайцев², О. А. Караваева¹, И. А. Бородина²

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук”, Саратов, 410049 Россия

²Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Саратов, 410019 Россия

*e-mail: guliy_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 03.04.2024 г.

После доработки 17.04.2024 г.

Принята к печати 28.04.2024 г.

Вспышки вирусных инфекционных заболеваний у человека и животных остаются одной из глобальных проблем нашего времени. Одним из наиболее востребованных направлений в прикладной микробиологии является разработка быстрых и чувствительных методов определения вирусов, в том числе на основе биосенсорных методов анализа. В обзоре показана перспективность акустических сенсорных систем для определения вирусов. Обсуждаются оптимальные возможности электроакустических датчиков при определении вирусов, возможность проведения анализа в присутствии мешающих факторов (вирусных частиц и микрофлоры) и многократного использования датчиков. Представленные результаты демонстрируют перспективность использования акустических датчиков для определения вирусов в микробиологии, медицине, ветеринарии.

Ключевые слова: акустические методы анализа, вирусы, детекция, антитела, пьезоэлектрический резонатор с поперечным электрическим полем, акустическая линия задержки

DOI: 10.31857/S0555109924050028 EDN: QTYGJG

Последние несколько десятилетий вирусы представляют реальную угрозу безопасности человечества, поскольку вызывают серьезные инфекционные заболевания не только человека, но и животных и растений [1]. С начала 21 века наблюдаются вспышки смертельных вирусных заболеваний, таких как тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС) в 2003 г., H1N1 (вирус свиного гриппа А) в 2009 г., Ближневосточный респираторный синдром (MERS) в 2012 году, Зика в 2016 г. В 1981 г. впервые сообщалось о вирусе иммунодефицита человека (ВИЧ), эпидемия которого продолжается по настоящее время [2]. Важно, что все вирусы быстро эволюционируют, чему способствуют многократно усилившиеся в последние годы миграционные процессы в мире. В этих условиях человечество всё чаще встречается с появлением новых вирусов или с проявлением новых заболеваний из-за изменчивости хорошо известных вирусов. Так, например, различные виды коронавирусов широко распространены в природе и вызывают различные инфекционные заболевания, как у человека, так и у животных. В конце 2019 г. описан SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2*),

способный вызывать вирусную пневмонию у людей [3]. На рис. 1 представлено животное происхождение коронавирусов человека [4]. Заражение MERS-CoV, SARS Coronavirus-2 или SARS-CoV вызывает тяжелые и часто летальные последствия, основные различия между которыми заключаются, главным образом, в скорости передачи, инкубационном периоде заболеваемости на уровне смертности [4]. Глобальный кризис, связанный с SARS-CoV, привел к потерям как в области здравоохранения, так и глобальной экономики, более чем 90 трлн \$ [5], чего не происходило почти столетие.

Одной из причин масштабных вирусных пандемий является отсутствие эффективных методов детекции вирионов и быстрой диагностики вирусной инфекции [6]. Ранее выявление вируса необходимо не только для подбора и проведения специфической терапии, но и для своевременного блокирования передачи вирусных частиц с целью профилактики распространения инфекции. Именно поэтому развитие быстрых методов идентификации вирусов является одним из лучших способов предотвращения вспышек вирусных заболеваний.

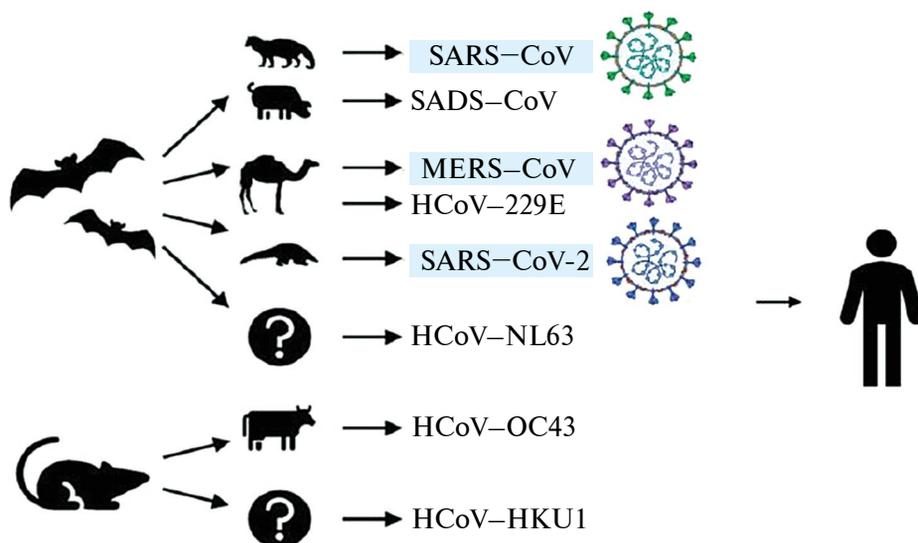


Рис. 1. Происхождение коронавирусов человека (коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), коронавирус человека (HCoV), коронавирус синдрома острой диареи свиней (SADS-CoV) [4].

Традиционные методы обнаружения вирусов, основанные на выделении и культивировании, проведении электронно-микроскопических исследований, полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА) трудоемки, продолжительны по времени анализа и требуют квалифицированного персонала для грамотной интерпретации результатов [7–9]. Лабораторная диагностика вирусных инфекций также включает технологию ДНК-микрочипов (DNA microarray) [10–12], преимуществом которых является высокая специфичность, чувствительность, но невозможность проведения анализа при высокой рабочей нагрузке, например, во время пандемий.

Для преодоления ограничений, связанных с традиционными методами определения вирусов, необходимо разрабатывать альтернативные высокочувствительные и специфичные диагностические тест-системы. Реализация новых методов позволит ускорить идентификацию вирусных частиц и инициировать необходимые меры сдерживания вирусной инфекции. Среди различных методов обнаружения вирусов наиболее перспективными являются сенсорные системы, в том числе созданные с использованием нанотехнологий [13–18]. Недавняя вспышка коронавирусной инфекции (COVID-19) показала всему миру недостатки применяемых в настоящее время систем определения вирусов, а также необходимость развития новых направлений сенсорных методов анализа для получения результата на месте. Среди сенсорных систем определения вирусных частиц существуют электрохимические биосенсоры [19–22], биосенсоры на основе молекулярно-импринтированных полимеров (МИП) [23], оптические сенсоры [24–27],

биосенсоры, действие которых основано на спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса (ППР) [28] и гигантском комбинационном рассеянии света [29]. Несмотря на то, что опубликованы обзоры, посвященные сенсорным технологиям для определения вирусов [16–18, 30–33], применение акустических сенсорных систем для индикации вирусов не нашло достаточно полного освещения в литературе. Поэтому, цель настоящей работы заключается в описании перспективности акустических сенсорных систем для определения вирусов.

Основные принципы действия биосенсоров. Для определения вирусных частиц применяются биосенсоры, обладающие различной конструкцией и механизмом действия. Биосенсоры – био-химико-физические системы, состоящие из двух компонентов: чувствительного биологического элемента (биорецептора) и системы детекции (физический преобразователь), которые позволяют регистрировать концентрацию или активность различных аналитов, присутствующих в образце [16]. Биосенсоры классифицируются в зависимости от вида биорецептора (ферменты, микроорганизмы, бактериофаги, ДНК, антитела, ткани, органеллы и хеморецепторы и др.) и типа датчика (оптические, амперометрические, потенциометрические, полупроводниковые, термометрические, фотометрические и пьезоэлектрические) [34, 35]. Биосенсоры позволяют значительно уменьшить время проведения анализа, благодаря относительной простоте проведения процедур, и, как показывают литературные данные, являются довольно чувствительными и требуют минимальной предварительной обработки исследуемого материала. Общая схема биосенсора представлена на рис. 2 [15].

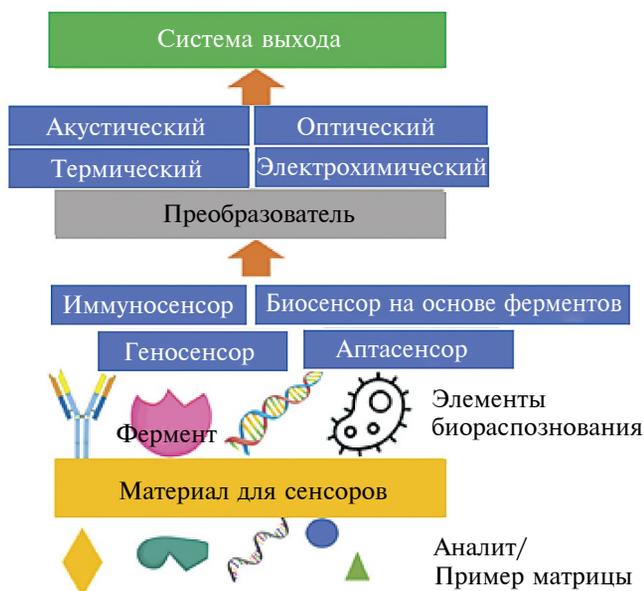


Рис. 2. Общая схема биосенсора [15].

На первом этапе действия биосенсора происходит “узнавание” биорецептором специфичного для него вещества из многокомпонентной смеси. На второй стадии происходит преобразование информации о протекании биохимической реакции в форму электрохимического или иного (например, оптического, акустического и др.) сигнала. Эта стадия, которую можно назвать стадией сопряжения биохимической и электродной реакций является ключевой для осуществления работы биосенсора. На последней стадии электрический сигнал преобразовывается в соответствующую для обработки форму.

Акустические сенсоры для определения вирусов. Разновидностью сенсорных систем являются акустические пьезоэлектрические биосенсоры, которые проявляют чувствительность к изменению массы на поверхности физического носителя (гравиметрические биосенсоры), или к изменению плотности, вязкости, проводимости контактирующей со звукопроводом среды.

Акустические сенсорные системы позволяют проводить анализ биологических объектов не только с помощью иммобилизации активных реагентов на поверхности биодатчика, но и непосредственно в жидкой фазе. В этом случае анализ проводится в течение короткого промежутка времени. Именно это преимущество позволяет использовать метод электроакустического анализа для быстрого определения вирусов при их взаимодействии с селективным агентом (антителами, микробными клетками).

Принцип действия электроакустических методов анализа вирусов основан на регистрации протекания биоспецифической реакции в

анализируемой суспензии или на поверхности слоя, содержащего иммобилизованный специфичный агент, контактирующий с поверхностью пьезоэлектрического звукопровода, по которому распространяется пьезоактивная акустическая волна. Изменения параметров анализируемого биологического объекта на поверхности акустического звукопровода приводит к изменению скорости акустической волны, что, в свою очередь, приводит к изменению измеряемых характеристик акустического датчика (электрический импеданс, частота, вносимые потери, фаза выходного сигнала) [16].

Для создания акустических сенсоров широко используются пьезоэлектрические резонаторы или линии задержки с распространяющейся поверхностной или пластинчатой акустической волной. Такие сенсоры чувствительны к изменению механических или электрических свойств биологического объекта, контактирующего с поверхностью звукопровода. Акустические биосенсоры чаще всего выполняются на основе таких пьезоэлектрических материалов, как кварц, ниобат лития, или танталат лития, поскольку они характеризуются высокой химической устойчивостью. Акустические волны, возбуждаемые в пьезоэлектрике, позволяют создать целое семейство датчиков, характеризующихся высокой чувствительностью, быстротой проведения анализа, дешевизной, и небольшими размерами [36]. Современные акустические датчики могут использовать все типы волн, а именно объемные акустические волны (**ОАВ**), поверхностные акустические волны (**ПАВ**) и акустические пластинчатые моды (**АПМ**) [37], как показано на рис. 3 [38].

Датчики на основе объемных акустических волн представляют собой резонаторы, в которых акустическая волна распространяется между двумя сторонами пьезоэлектрической пластины. Эти резонаторы можно разделить на две группы: резонаторы с продольным электрическим полем (электроды нанесены на противоположные стороны пьезоэлектрика) и резонаторы с поперечным электрическим полем (электроды нанесены на одну сторону пьезоэлектрика, другая сторона остается свободной).

В ПАВ датчиках поверхностная акустическая волна возбуждается с помощью излучающего встречно-штыревого преобразователя (**ВШП**), распространяется вдоль поверхности пьезоэлектрической пластины и преобразуется в электрический сигнал с помощью приемного ВШП. Такой датчик может работать на частотах в диапазоне от нескольких МГц до нескольких ГГц. К поверхностным волнам относятся волны Рэлея, волны с поперечно – горизонтальной поляризацией (**SH**) и волны Лява.

Перспективность акустических сенсоров для определения вирусов на основе волны Лява с поперечной горизонтальной поляризацией на примере

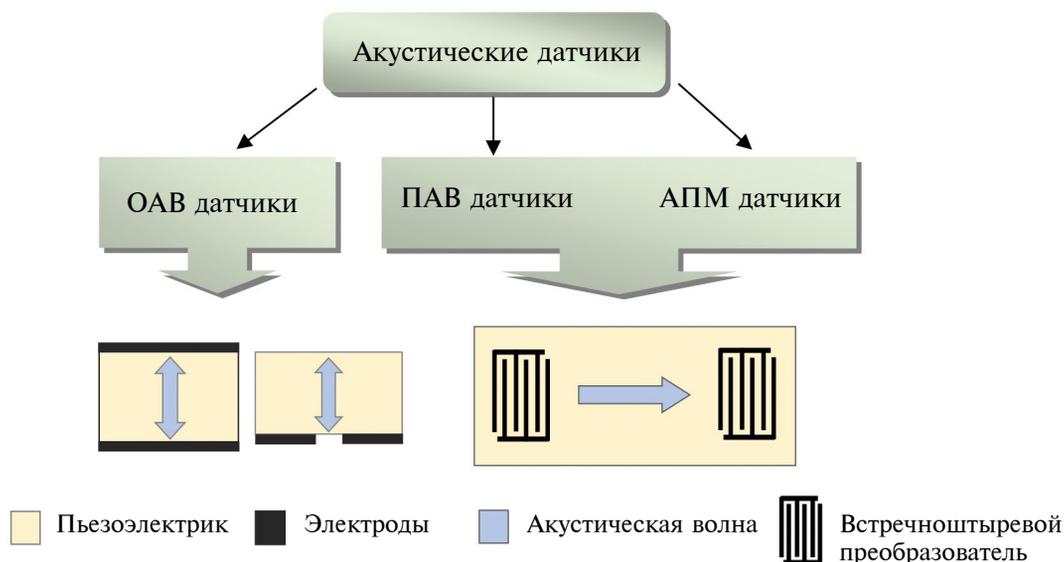


Рис. 3. Классификация акустических датчиков: ОАВ – объемные акустические волны, ПАВ – поверхностные акустические волны; и АПП – акустические пластинчатые моды [38].

бактериофага М13 была продемонстрирована в работе [39] в режиме реального времени. Предварительно антитела, специфичные к бактериофагу М13, необратимо иммобилизуются на подложке из оксида кремния, и после иммунореакции между бактериофагом М13 и специфичными антителами на подложке образуется многослойная поверхность, которая анализируется при помощи волн Лява.

Разработан иммуносенсор для селективного определения вирусов герпеса в крови человека на основе пьезоэлектрического резонатора с иммобилизованными на его поверхности соответствующими антивирусными антителами [40]. Подобный биосенсор на основе пьезоэлектрического резонатора успешно применен для детекции вирусов в природных и искусственных водоемах (реки, канализация и сточные воды) без предварительной обработки анализируемого субстрата [41].

Ряд исследований продемонстрировали, что акустические датчики на основе горизонтально-поперечных поверхностных волн являются более перспективными для измерения в жидкостях, чем датчики, использующие волны с нормальной к поверхности звукопровода компонентой механического смещения [42]. Иммуносенсор на волнах Лява (Love Wave) был успешно использован для обнаружения вирусов [37]. Конструкция на поверхностных акустических волнах имеет такие неотъемлемые преимущества, как высокая чувствительность и портативность, массовая производительность и широкий частотный диапазон (от 10 МГц до 1 ГГц) за счет изменения геометрии встречно-штыревых преобразователей (IDT) [43, 44].

Основные преимущества и недостатки указанных датчиков для анализа биологических исследований представлены в работах [16, 38, 45, 46].

Акустические сенсоры для иммунодиагностики вирусов. Среди ускоренных методов определения вирусов лидирующее положение занимают сенсорные системы с применением антител (иммунологические методы). Серологическая диагностика позволяет идентифицировать вирус даже в том случае, когда выделение вирусных частиц из образца не дает никаких результатов. В основу иммунологического метода положено явление взаимодействия антиген-антитело, а для визуализации взаимодействия используют фермент в качестве метки, который анализируют физико-химическими методами.

На основе акустических биосенсоров разработаны иммуносенсоры для обнаружения вирусов. Биосенсоры на объемных акустических волнах способны обнаруживать биохимические образования при определении вирусов [30, 47, 48]. Резонансная частота пьезоэлектрического резонатора, контактирующего с изучаемым анализом, изменяется в результате его взаимодействия со специфичным агентом.

Пьезоэлектрические биосенсоры на основе кристалла кварца привлекли внимание для биологических применений, особенно для обнаружения вирусов гриппа из-за их простоты, прямого определения и возможности анализа в реальном времени [49–51]. В работе [49] была изготовлена оригинальная структура нанолунок для создания аптамера на поверхности кварцевого резонатора для быстрого, чувствительного и безметочного обнаружения вируса птичьего гриппа H5N1 (AIV). Нанопористую

пленку золота толщиной 120 нм с размером пор ~20 нм иммобилизовали на поверхности золотого электрода с использованием самоорганизующегося монослоя для формирования электрода на основе наноямок. Специфический аптамер оцДНК H5N1 AIV с конъюгированным с NH₂ 5'-концом использован при изготовлении аптасенсора посредством ковалентной связи. Поэтапную сборку аптасенсора характеризовали путем измерения частоты резонатора. Результат показал, что связывание целевого H5N1 AIV с иммобилизованными аптамерами снижало резонансную частоту сенсора, а изменение частоты коррелировало с титром вируса. Разработанный аптасенсор с использованием нанолунок может значительно сократить время обнаружения до 10 мин с использованием анализа без меток. Связывание целевого вируса H5N1 с поверхностью электрода на основе нанолунок дополнительно подтверждено с помощью сканирующей электронной микроскопии. Никакого вмешательства со стороны нецелевых подтипов AIV H1N1, H2N2, H7N2 и H5N3 не наблюдалось. Аптасенсор, использующий аптамер H5N1, проверен на обнаружение AIV H5N1 в образцах мазков из трахеи кур. Разработанный аптасенсор может быть использован для обнаружения и других вирусов.

Помимо кварца в качестве материала резонатора используют титанат бария, сегнетову соль, турмалин и др. Поверхность кристалла покрывают специфическими антителами. При адсорбции веществ на поверхности кристалла меняется его резонансная частота, используемая в качестве аналитического сигнала [52, 53].

Акустический датчик с использованием поверхностной акустической волной и специфических моноклональных антител применялся для определения вирусов Эбола, HIV-1 and HIV-2 с возможностью многократного использования при времени анализа 5–10 мин [54, 55].

На основе резонаторов с поперечным электрическим полем существует два типа акустических биодатчиков для детекции вирусов. Датчики первого типа используют пленки-биорецепторы, которые закрепляются на поверхности пьезоэлектрического материала [56]. Биологический материал, например, суспензия, содержащая измеряемый объект, контактирует с биодатчиком через указанную пленку. Биологическое взаимодействие между измеряемым объектом и биорецептором приводит к соответствующему изменению электрического импеданса датчика. Однако датчики, которые используют активные покрытия, имеют ряд существенных недостатков. К ним относятся длительное время детекции в течение нескольких часов и невозможность многократного использования активного слоя. Сразу же после первого эксперимента отработавшую активную пленку необходимо удалять и наносить новую. Это существенно

ограничивает возможности использования датчиков первого типа.

Датчики второго типа свободны от вышеперечисленных недостатков. В этих датчиках исследуемая суспензия вирусов контактирует непосредственно с пьезоэлектриком без использования активной пленки с иммобилизованными антителами. Датчик фиксирует изменение физических свойств суспензии в результате специфического взаимодействия вирусов с добавляемыми антителами. Эти изменения соответственно приводят к изменению характерного аналитического сигнала. Такой подход для индикации вирусов принципиально отличается от известных способов определения вирусов при помощи акустических резонаторов с использованием иммобилизованных антител [40, 41, 56, 57] отсутствием необходимости иммобилизации антител, простотой выполнения процедуры анализа и быстротой получения результата. Разработан биосенсор на основе пьезоэлектрического резонатора для обнаружения SARS-ассоциированного коронавируса (SARS-CoV) [58].

В работе [59] разработана сенсорная система на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем для детекции вирусов с помощью специфичных антител. В качестве объекта исследования использовали вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней. Установлено, что добавление специфичных антител к вирусной суспензии приводило к значительному изменению реальной и мнимой частей электрического импеданса резонатора (рис. 4).

Для определения вирусов наиболее предпочтительными являются датчики, которые позволяют проводить многократные измерения и легко очищаются от используемого образца после измерений без потери чувствительности датчика к анализируемой реакции. Примером может служить акустический датчик на основе щелевой моды в акустической линии задержки с поперечно-горизонтальной волной нулевого порядка. Основным преимуществом данного датчика является возможность бесконтактного анализа, в котором контейнер с исследуемой суспензией изолирован от поверхности линии задержки. Такая конструкция позволяет проводить многократные измерения и очистку жидкостного контейнера без повреждения линии задержки [60].

В работе [61] показана перспективность акустического датчика на основе щелевой моды в акустической линии задержки. Добавление антител, специфичных к вирусу ТГС, приводило к изменению глубины и частоты резонансных пиков на частотной зависимости полных потерь датчика (рис. 5). По разнице выходных параметров датчика до и после биологического взаимодействия вируса ТГС в растворах со специфическими антителами можно сделать заключение о наличии/отсутствии

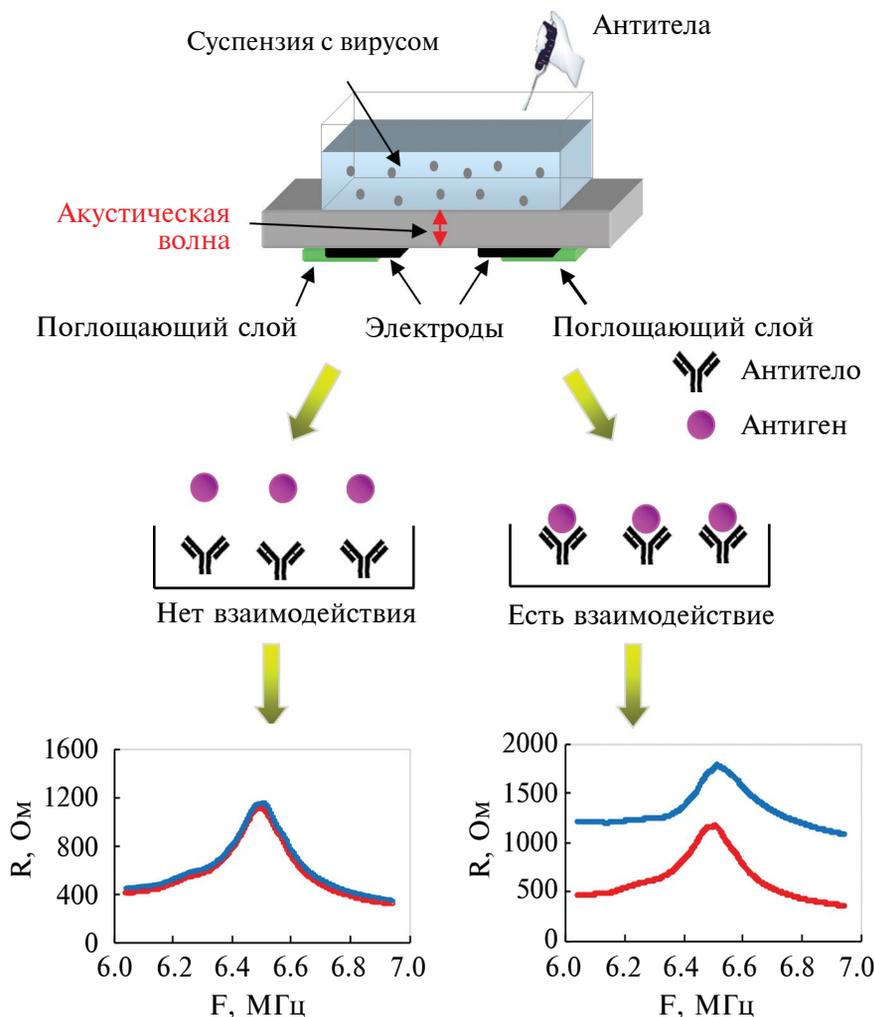


Рис. 4. Схема сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем для детекции вирусов с помощью специфичных антител.

исследуемых вирусов в анализируемом растворе. Продемонстрирована возможность диагностики вируса в водных растворах с проводимостью от 1.9 до 900 мкСм/см, а также в присутствии посторонних вирусных частиц. Время анализа не превышало 10 мин.

Основные преимущества акустических иммуносенсоров для определения вирусов непосредственно в жидкой фазе [59–61] заключаются в следующем:

- нет необходимости иммобилизации компонентов анализа (антител);
- возможность проведения анализа непосредственно в жидкой фазе, а также в присутствии посторонних мешающих факторов (микробные клетки, посторонние вирусные частицы);
- предел детекции составляет 10^4 вирусных частиц/мл, но есть возможности увеличения чувствительности метода;
- время анализа в среднем 10 мин;

– объем анализируемого образца не более 5 мл;

– возможность многократного использования датчика без повреждения датчика и искажения аналитического сигнала.

В другой работе [54] представлен датчик на основе линии задержки с ПАВ без специальных меток для быстрого обнаружения антигенов Эболы, без необходимости добавления реагентов, обработки проб и подготовки специализированного персонала. Линия задержки представляла собой пластину из танталата лития (LiTaO_3) с двумя встречно-штыревыми преобразователями (IDT). Входной преобразователь возбуждал в пластине поверхностную акустическую волну с поперечно-горизонтальной поляризацией с частотой 80–400 МГц. Фаза выходного электрического сигнала с выходного преобразователя использовалась в качестве аналитического сигнала. Молекулярные взаимодействия между вирусом и антителом в пространстве между преобразователями приводили к изменению фазы

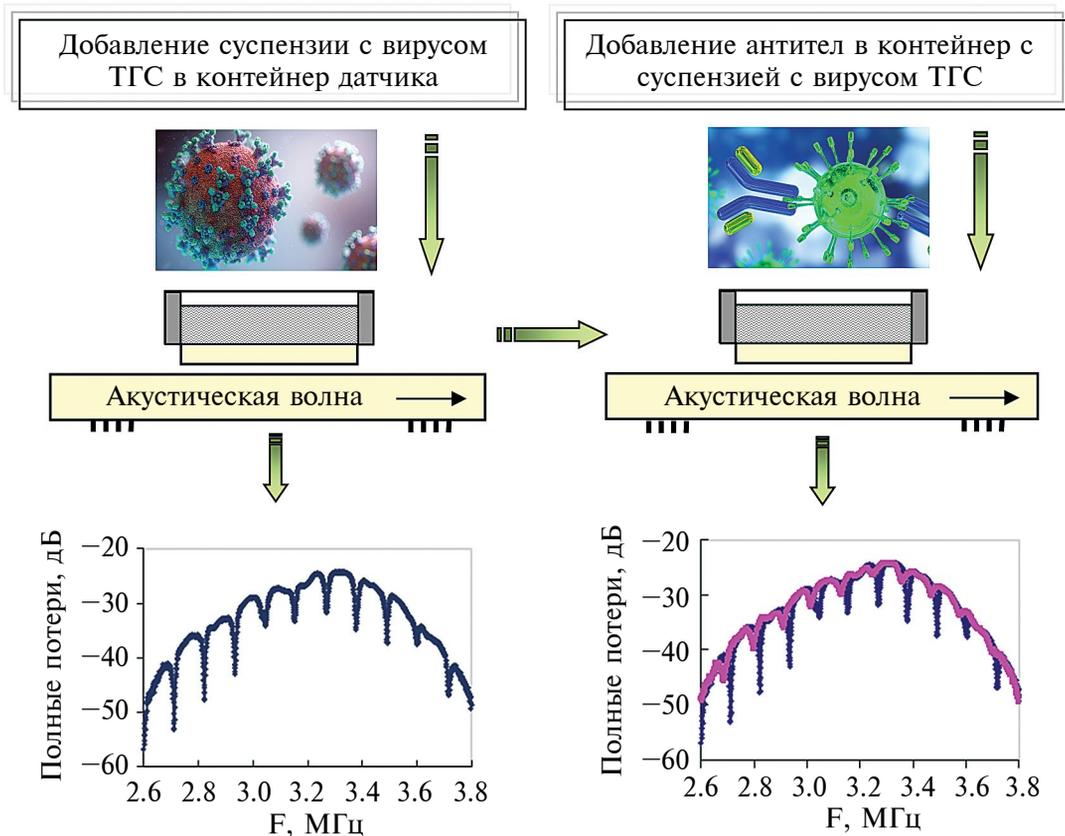


Рис. 5. Анализ вируса ТГС акустическим датчиком на основе щелевой моды в акустической линии задержки.

выходного сигнала. Наблюдался логарифмически линейный отклик сенсора на частицы вируса Эбола с пределом обнаружения 1.9×10^4 БОЕ/мл.

С помощью сенсора на основе кварцевого резонатора показана возможность обнаружения в мазках из ротовой полости нескольких респираторных вирусов, таких как грипп: SARS-CoV и 2019-nCoV [58, 62–64]. Такой подход можно использовать для проведения тестирования без меток в режиме реального времени с высокой чувствительностью. Кроме того, с помощью подобного биосенсора можно определять шиповый белок SARS-CoV-2 [64] с использованием взаимодействия между шиповым гликопротеином и поверхностью сенсора. Показана возможность обнаружения адсорбированных шиповых белков с чувствительностью на уровне нг.

Установлено, что для обнаружения SARS-CoV использование пьезоэлектрического иммуносенсора на основе пьезоэлектрического резонатора является целесообразным, поскольку это дает быстрый, стабильный и адекватный результат [58], а использование парамагнитных наночастиц [63] позволяет повысить чувствительность обнаружения белковых биомаркеров в течение одной минуты вплоть до 3.5 нг/мл.

* * *

Анализируя развитие пьезоэлектрических биосенсоров, используемых для определения вирусных частиц, можно отметить, что развитие технологий обнаружения вирусов сосредоточено на улучшении чувствительности, экономической эффективности и возможности многократного использования датчика. Чтобы вызвать наиболее эффективный ответ на воздействие вируса, необходима сеть биосенсоров “скоростного типа”, чтобы служить в качестве первоначального предупреждения о наличии, распространении и вирусности инфекционного агента. Для достижения этой цели желательно использовать портативный биосенсор с высокой чувствительностью и точностью, который может обнаруживать вирусы в режиме реального времени. Продолжение исследований для улучшения зондов и платформ должно привести к созданию эффективных биосенсоров, которые могут быть использованы в реальных образцах. В данном контексте методы электроакустического анализа на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем и щелевой моды показали перспективность применения для решения вопросов детекции вирусов. Дальнейшая стандартизация и автоматизация метода электроакустического анализа позволит расширить круг его применения и использования в

микробиологии, биотехнологии, ветеринарии, медицине, в том числе в области фаговой терапии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания Саратовского научного центра РАН и Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Santo L., Kang K.* National Ambulatory Medical Care Survey: 2019 National Summary Tables. // Series: National Ambulatory Medical Care Survey. 2023. <https://doi.org/10.15620/cdc:123251>
2. *Ruhan A., Wang H., Wang W., Tan W.* // *Virol Sin.* 2020. V. 35. № 6. P. 699–712. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00331-1>
3. *Beeching N.J., Fletcher T.E., Fowler R.* COVID-19. // *BMJ Best Practices.* BMJ Publishing Group. 2020. <http://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/3000168>
4. *Rabi F.A., Al Zoubi M.S., Kasasbeh G.A., Salameh D.M., Al-Nasser A.D.* // *Pathogens* 2020. V. 9. 231. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030231>
5. *Jackson J.K., Weiss M.A., Schwarzenberg A.B., Nelson R.M.* Global Economic Effects of Covid-19. 2020. www.hSDL.org/?view&did=835306
6. *Kang J., Tahir A., Wang H., Chang J.* // *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2021. 13. № 4. e1700. <https://doi.org/10.1002/wnan.1700>
7. *Hematian A., Sadeghifard N., Mohebi R., Taherikalani M., Nasrolahi A., Amraei M., Ghafourian S.* // *Osong Public Health Res Perspect* 2016. V. 7. № 2. P. 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2015.11.011>
8. *Lukose J., Barik A.K., Mithun N., Sanoop Pavithran M., George S.D., Murukeshan V.M., Chidangil S.* // *Biophys Rev.* 2023. V. 15. № 2. P. 199–221. <https://doi.org/10.1007/s12551-023-01059-4>
9. *Chen L., Ruan F., Sun Y., Chen H., Liu M., Zhou J., Qin K.* // *J. Med. Virol.* 2019. V. 91. № 6. P. 1168–1171. <https://doi.org/10.1002/jmv.25408>
10. *Lin B., Blaney K.M., Malanoski A.P., Ligler A.G., Schnur J.M., Metzgar D. et al.* // *J. Clin. Microbiol.* 2007. V. 45. № 2. P. 443–452. <https://doi.org/10.1128/JCM.01870-06>
11. *Mehlmann M., Bonner A.B., Williams J.V., Dankbar D.M., Moore C.L., Kuchta R.D. et al.* // *J. Clin. Microbiol.* 2007. V. 45 № 4. P. 1234–1237. <https://doi.org/10.1128/JCM.02202-06>
12. *Huguenin A., Moutte L., Renois F., Lévêque N., Talmud D., Abely M. et al.* // *J. Med. Virol.* 2012. V. 84. № 6. P. 979–985. <https://doi.org/10.1002/jmv.23272>
13. *Choi Y., Hwang J.H., Lee S.Y.* // *Small Methods.* 2018. V. 2. 1700351. <https://doi.org/10.1002/smt.201700351>
14. *Mokhtarzadeh A., Eivazzadeh-Keihan R., Pashazadeh P., Hejazi M., Gharaatifar N., Hasanzadeh et al.* // *Trends Analyt Chem.* 2017. V. 97. P. 445–457. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.005>
15. *Goksu O., Kaya S.I., Cetinkaya A., Ozkan S.A.* // *Biosens. Bioelectron: X* 2022. V. 12. 100260. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100260>
16. *Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A.* Biosensors for Virus Detection in the Book *Macro, Micro and Nano-biosensors. Potential Applications and Possible Limitations.* /Eds.: M. Rai, A. Reshetilov, Y. Plekhanova, A.P. Ingle. 2020. Chapter 6. P. 95–116. ISBN 978-3-030-55489-7. Chapter doi 10.1007/978-3-030-55490-3_6.
17. *Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Ларионова О.С., Бородина И.А.* // *Биофизика.* 2019. Т. 64, № 6. С. 1094–1102. <https://doi.org/10.1134/S0006302919060073>
18. *Alhalaili B., Popescu I.N., Kamoun O., Alzubi F., Alawadhia S., Vidu R.* // *Sensors (Basel).* 2020. V. 20. № 22. 6591. <https://doi.org/10.3390/s20226591>
19. *Grabowska I., Malecka K., Jarocka U., Radecki J., Radecka H.* // *Acta Biochim Pol.* 2014. V. 61. № 3. P. 471–478.
20. *Khan M.Z.H., Hasan M.R., Hossain S.I., Ahommed M.S., Daizy M.* // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 166. 112431. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112431>
21. *Han J.-H., Lee D., Chew C.H.C., Kim T., Pak J.J.* // *Sens. Actuators B Chem.* 2016. V. 228. 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.07.068>
22. *Han K.N., Li C.A., Bui M.-P.N., Pham X.-H., Kim B.S., Choa Y.H. et al.* // *Sens. Actuators B Chem.* 2013. V. 177. P. 472–477. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.11.030>
23. *Yadav A.K., Verma D., Dalal N., Kumar A., Solanki P.R.* // *Biosens. Bioelectron: X.* 2022. V. 12. 100257. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100257>
24. *Guliy O.I., Kanevskiy M.V., Fomin A.S., Staroverov S.A., Bunin V.D.* // *Optics Communications.* 2020. V. 465. 125605. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2020.125605>
25. *Erickson D., Mandal S., Yang A., Cordovez B.* // *J. Microfluid Nanofluid.* 2008. V. 4. P. 33–52. <https://doi.org/10.1007/s10404-007-0198-8>
26. *Fan X., White I.M., Shopova S.I., Zhu H., Suter J.D., Sun Y.* // *Anal Chim Acta.* 2008. V. 620. № 1–2. P. 8–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.022>
27. *Garcia-Aljaro C., Munoz-Berbel X., Jenkins A.T.A., Blanch A.R., Munoz F.X.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. V. 74. № 13. P. 4054–4058. <https://doi.org/10.1128/AEM.02806-07>

28. *Homola J.* Surface Plasmon Resonance Based Sensors. Berlin, Germany: Springer, 2006. 251 p. <https://doi.org/10.1007/b100321>
29. *Monzon-Hernandez D., Villatoro J.* // Sens. Actuator B. Chem. 2006. V. 115 № 1. P. 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.09.006>.
30. *Saylan Y., Denizli A.* In Nanosensors for Smart Cities. / Eds. B. Han, V.K. Tomer, T.A. Nguyen, A. Farmani, P. Kumar Singh., Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2020. P. 501–511.
31. *Deng J., Zhao S., Liu Y., Liu C., Sun J.* // ACS Appl. Bio Mater. 2021, 4, 5, 3863–3879. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01247>.
32. *Yong Xiang Leong, Emily Xi Tan, Shi Xuan Leong, Charlynn Sher Lin Koh, Lam Bang Thanh Nguyen, Jaslyn Ru Ting Chen, Kelin Xia, Xing Yi Ling* // ACS Nano 2022, V. 16. № 9. 13279–13293. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.2c05731>
33. *Singh N., Dkhar D.S., Chandra P., Azad U.P.* // Biosensors 2023. V. 13. 166. <https://doi.org/10.3390/bios13020166>
34. *Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A.* in Nanobioanalytical Approaches to Medical Diagnostics, Eds. P.K. Maurya, P. Chandra, Sawston: Woodhead Publishing, 2022. P. 143–177. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85147-3.00004-9>
35. *Purohit B., Vernekar P.R., Shetti N.P., Chandra P.* // Sensors International. 2020. V. 1. 100040. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100040>
36. *Gözde Durmuş N., Linb R.L., Kozberg M., Dermicid D., Khademhosseini A., Demirci U.* // Encyclopedia of microfluidics and Nanofluidics. New York: Springer Science+Business Media, 2014. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27758-0_10-2
37. *Rocha-Gaso M.-I., García J.-V., García P., March-Iborra C., Jimenez Y., Francis L.-A., Montoya A., Arnau A.* // Sensors 2014. V. 14. № 9. P. 16434–16453. <https://doi.org/10.3390/s140916434>
38. *Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A.* // Sensors 2023. V. 23. 6292. <https://doi.org/10.3390/s23146292>
39. *Tamarin O., Comeau S., Déjous C., Moynet D., Rebière D., Bezian J., Pistréa J.* // Biosens. Bioelectron. 2003. V. 18. № 5-6. P. 755–763. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00022-8](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00022-8)
40. *Koenig B. Graetzel M.* // Anal. Chem. 1994. V. 66. № 3. P. 341–348. <https://doi.org/10.1021/ac00075a005>
41. *Bisoffi M., Hjelle B., Brown D.C., Branch D.W., Edwards T.L., Brozik, et al.* // Biosens. Bioelectron. 2008. V. 23. № 9. P. 1397–1403. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.12.016>
42. *Drobe H., Leidl A., Rost M., Ruge I.* // Sensors and Actuators A: Physical. 1993. V. 37. P. 141–148. [https://doi.org/10.1016/0924-4247\(93\)80026-D](https://doi.org/10.1016/0924-4247(93)80026-D)
43. *Petroni S., Tripoli G., Combi C., Vigna B., De Vittorio M., Todaro M., et al.* // Applied physics letters 2004. V. 85 (6). P. 1039–1041. <https://doi.org/10.1063/1.1780598>
44. *Go D. B., Atashbar M.Z., Ramshani Z., Chang H.-C.* // Analytical Methods 2017. V. 9. № 28. P. 4112–4134. <https://doi.org/10.1039/C7AY00690J>
45. *Caliendo C.* // Sensors 2023. V. 23. 2988. <https://doi.org/10.3390/s23062988>
46. *Skládal P.* // Microchim. Acta. 2024. V. 191. 184. <https://doi.org/10.1007/s00604-024-06257-9>
47. *Kizek R., Krejčová L., Michálek P., Rodrigo M.M., Heger Z., Krizkova S. et al.* // Dis. Diagn. 2015. V. 4. P. 47–66. <https://doi.org/10.2147/NDD.S56771>
48. *Srivastava A.K., Dev A., Karmakar S.* // Environ. Chem. Lett. 2018. V. 16. № 4. P. 161–182. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0674-7>
49. *Wang R., Wang L., Callaway Z.T., Lu H., Huang T.J., Li Y.* // Sens. Actuators B Chem. 2017. V. 240. P. 934–940. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.09.067>
50. *Erofeev A.S., Gorelkin P.V., Kolesov D.V., Kiselev G.A., Dubrovin E.V., Yaminsky I.V.* // R. Soc. Open Sci. 2019. V. 6. 190255. <https://doi.org/10.1098/rsos.190255>
51. *Wangchareansak T., Sangma C., Ngerneemesri P., Thitithanyanont A., Lieberzeit P.A.* // Anal. Bioanal. Chem. 2013. V. 405. P. 6471–6478. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7057-0>
52. *Gajendragad M.R., Kamath K.N.Y., Anil P.Y., Prabhudas K., Natarajan C.* // Veterinary Microbiology 2001. V.78. P. 319–330. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00307-2](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00307-2)
53. *Rickert J., Weiss T., Kraas W., Jung G., Göpel W.* // Biosens. Bioelectron. 1996. V. 11. P. 591–598. [https://doi.org/10.1016/0956-5663\(96\)83294-5](https://doi.org/10.1016/0956-5663(96)83294-5)
54. *Baca J.T., Severns V., Lovato D., Branch D.W., Larson R.S.* // Sensors. 2015. V. 15. № 4. P. 8605–8614. <https://doi.org/10.3390/s150408605>
55. *Towner J.S., Rollin P.E., Bausch D.G., Sanchez A., Crary M.S., Vincent M., et al.* // J. Virol. 2004. V. 78. № 8. P. 4330–4341. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.8.4330-4341.2004>
56. *Vetelino J.F.* In: Proc. of the IEEE Ultrason. Symp. 2010, San-Diego, 2269–2272. Publisher IEEE. <https://doi.org/10.1109/ULTSYM.2010.5935621>
57. *Narita F., Wang Z., Kurita H., Li Z., Shi Y., Jia Y., Soutis C.* // Adv. Mater. 2021. V. 33. 2005448. <https://doi.org/10.1002/adma.202005448>
58. *Zuo B., Li S., Guo Z., Zhang J., Chen C.* // Anal. Chem. 2004. V. 76. 3536–3540. <https://doi.org/10.1021/ac035367b>

59. *Guliy O.I., Zaitsev B.D., Semyonov A.P., Karavaeva O.A., Fomin A.S., Burov et al.* // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2022. V. 48. № 5. P. 901–911.
<https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2022.01.013>
60. *Borodina I.A., Zaitsev B.D., Burygin G.L., Guliy O.I.* // *Sens. Actuators B Chem.* 2018. V. 268. P. 217–222.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.04.063>
61. *Guliy O., Zaitsev B., Teplykh A., Balashov S., Fomin A., Staroverov S., Borodina I.* // *Sensors (Switzerland)* 2021. V. 21. № 5. 1822.
<https://doi.org/10.3390/s21051822>
62. *Jiang Y., Tan C.Y., Tan S.Y., Wong M.S.F., Chen Y.F., Zhang L. et al.* // *Sens. Actuators B Chem.* 2015. V. 209. P. 78–84.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.11.103>
63. *Albano D., Shum K., Tanner J., Fung Y.* In: *Proceedings of the 17th International Meeting on Chemical Sensors—IMCS 2018, Vienna, Austria, 2018.* P. 211–213.
64. *Pandey L.M.* // *Expert Rev. Proteom.* 2020. V. 17. P. 425–432.
<https://doi.org/10.1080/14789450.2020.1794831>

Prospects of Acoustic Sensor Systems for Virus Immunodetection (Review)

O. I. Guliy^{a, *}, B. D. Zaitsev^b, O. A. Karavaeva^a, and I. A. Borodina^b

^a*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Subdivision of the Federal State Budgetary Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), Saratov, 410049 Russia*

^b*Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Russian Academy of Sciences, Saratov Branch, Saratov, 410019 Russia*

*e-mail: guliy_olga@mail.ru

Outbreaks of viral infectious diseases in humans and animals remain one of the global problems of our time. Therefore, one of the most popular areas in applied microbiology is the development of fast and sensitive methods for viruses detection, including those based on biosensor analysis methods. The paper describes the promise of acoustic sensor systems for viruses detection. The optimal capabilities of electroacoustic sensors in viruses detection, the possibility of conducting analysis in the presence of interfering factors (viral particles and microflora) and the repeated use of sensors are shown. The presented results demonstrate the promise of using acoustic sensors to viruses detection in microbiology, medicine, and veterinary medicine.

Keywords: acoustic methods of analysis, viruses, detection, antibodies, piezoelectric resonator with a transverse electric field, acoustic delay line

УДК 615.339;579.61

КОНСТРУИРОВАНИЕ ВАРИАНТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ЭНДОЛИЗИНА LysSi3 ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЕГО АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2024 г. Н. П. Антонова¹, И. В. Григорьев¹, А. М. Лендел¹, О. В. Усачева¹,
А. А. Климова¹, Е. В. Усачев¹, В. А. Гущин^{1,2}, Д. В. Васина^{1,*}

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, 123098 Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119048 Россия

*e-mail: d.v.vasina@gmail.com

Поступила в редакцию 05.04.2024 г.

После доработки 15.04.2024 г.

Принята к публикации 26.04.2024 г.

Изучен потенциал применения новых генно-инженерных эндолизинов в качестве противомикробных агентов в отношении грамотрицательных бактерий. Для этого был получен ряд рекомбинантных лизинов на основе мурамидазы LysSi3 за счет модификации ее последовательности противомикробными пептидами из различных групп. Показана возможность получения сконструированных ферментов в рекомбинантной системе экспрессии *Escherichia coli*. Модификация LysSi3 позволила получить ферменты, обладающие более высокой бактериолитической активностью и скоростью действия в отношении модельного изолята *Acinetobacter baumannii* по сравнению с нативным ферментом. Изучены цитотоксические свойства новых генно-инженерных лизинов на клеточных линиях HEK293 и HaCaT, и показано, что модификация LysSi3 противомикробными пептидами не приводила к значительному повышению токсического действия *in vitro*.

Ключевые слова: модифицированные эндолизины, антимикробные пептиды, рекомбинантная экспрессия, грамотрицательные бактерии, биопленки, цитотоксичность

DOI: 10.31857/S0555109924050033 EDN: QTWCJY

Перспективным направлением разработки средств профилактики и лечения устойчивых к действию антибиотиков бактериальных инфекций является терапия препаратами на основе литических ферментов бактериофагов – эндолизинов. За счет действия на консервативные структуры клеток риск быстрого развития бактериальной устойчивости к таким препаратам минимален. Широкий спектр действия эндолизинов, выделенных из бактериофагов грамотрицательных бактерий, позволяет использовать такие препараты при лечении системных инфекций различной этиологии, а их способность действовать в отношении бактериальных пленок открывает широкие возможности применения для профилактики и лечения раневых инфекций [1].

Относительно небольшое количество проектов, связанное с использованием рекомбинантных лизинов против грамотрицательных бактерий, обусловлено трудностью преодоления внешней мембраны этих патогенов, что отложило развитие

данного направления на несколько лет по сравнению с эндолизинами против грамположительных бактерий. Для повышения пермеабилizующей способности лизинов предложены различные подходы, например, комбинирование эндолизинов с агентами, повышающими проницаемость мембран, таких как ЭДТА и органические кислоты [2].

Другим подходом является получение гибридных молекул лизинов с последовательностями, обеспечивающими активный транспорт лизинов через белковые каналы, пронизывающие мембраны грамотрицательных бактерий. Например, был получен гибридный лизин PyS2-GN4, включающий фрагмент бактериоцина синегнойной палочки PyS2, позволявшего ферменту связываться с поверхностным рецептором бактерий и транслоцироваться через наружную мембрану [3]. Кроме того, известен пример химерной молекулы лизин-колицин А, способной пересекать внешнюю мембрану *Escherichia coli* с помощью поверхностного рецептора BtuB и порообразующего канала OmpF [4].

Однако наиболее универсальным считается применение методов модификации белка антимикробными пептидами пермеабилizующего действия (АМП). Такой инженерный подход позволил решить проблему проницаемости и значительно расширить спектр действия препаратов на основе ферментов для борьбы с критически важными возбудителями, такими как *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* и *Klebsiella pneumoniae* [5, 6]. Модификации нативных полипептидов эндолизина путем введения в последовательность рекомбинантного белка АМП позволяет такой гибридной молекуле эффективно проникать через наружную мембрану бактериальной клетки к своей мишени – пептидогликану и разрушать его. Пермеабилizующие пептиды неспецифично взаимодействуют с гидрофобными или ионными связями ЛПС наружных мембран и таким образом дестабилизируют мембрану и приводят к ее локальным нарушениям [7]. Спектр известных противомикробных пептидов крайне широк и включает группы, различающиеся по структуре и свойствам [5]. В качестве пептидов используют такие как антимикробный пептид SMAP-29 [8], цекропин А [9], пептид PCNP [10], последовательности, насыщенные гидрофобными аминокислотами [11], и другие. Они значительно различаются по свойствам и спектру действия, но системного исследования влияния модификаций пептидами на свойства гибридных молекул не проводилось. Тем не менее, простая гибридизация АМП на N- или C-конце лизина не всегда приводит к созданию высокоактивного фермента. Для получения вариантов адекватно действующих при низких концентрациях необходимо перебрать широкий спектр комбинаций функциональных доменов, возможность включения линкеров и др.

Цель работы – получение новых бактериолитических ферментов, обладающих высокой активностью в отношении грамотрицательных бактерий, на основе рекомбинантных эндолизина, модифицированных противомикробными пептидами различных групп, а также исследование влияния вводимых пептидов на *in vitro* свойства получаемых ферментов.

МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы и условия культивирования. В работе были использованы штаммы *E. coli* для рекомбинантной экспрессии белков, а также клинический изолят *A. baumannii*, выделенный из мокроты пациента, для исследования свойств ферментов (коллекция лаборатории трансляционной биомедицины НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи). Была проведена оценка устойчивости изолята *A. baumannii* к противомикробным препаратам по минимальным ингибирующим концентрациям препаратов (МИК) методом серийных микроразведений. Показано, что изолят обладал устойчивостью к ампициллину и хлорамфениколу. Все культуры хранили при -80°C , культивировали в соответствующей среде при 37°C

при перемешивании 250 об./мин в течение ночи перед проведением анализов.

Получение генетических конструкций модифицированных вариантов эндолизина. Выбор пептидов для модификации эндолизина LysSi3 и поиск последовательностей для создания генно-инженерных конструкций проводили с использованием публичных баз данных Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides (DBAASP) [12] и Antimicrobial peptide database APD3 (<https://aps.unmc.edu>).

Для получения ферментов, модифицированных противомикробными пептидами (LysSi3-АМП), была использована генетическая конструкция на основе экспрессионного вектора pET-42b (+), кодирующая последовательность эндолизина LysSi3 (pET42b-LysSi3) [13]. Все нуклеотидные последовательности дополнительной вставки, соответствующей пептидам, были сконструированы из олигонуклеотидных праймеров (“GenTerra”, Россия) длиной до 70 нуклеотидов путем их перекрытия (табл. 1). Полученные ПЦР фрагменты нуклеотидной последовательности эндолизина с АМП и вектора сливали методом Гибсона.

Смесь собранных фрагментов ДНК трансформировали в химически компетентные клетки *E. coli* Top10 (“Invitrogen”, США) методом теплового шока. Клеточную культуру после трансформации высевали на чашки Петри с агаризованной средой 2YT (состав, г/л: пептон – 16,0; дрожжевой экстракт – 10,0, NaCl – 5,0, агар – 15,0), содержащей селективный антибиотик канамицин. Для выросших колоний проверялось наличие нуклеотидного фрагмента исследуемого эндолизина методом ПЦР. Плазмидную ДНК выделяли из культуры бактерий, выращенных в среде 2YT в течение 18–20 ч, набором Plasmid Miniprep (“Евроген”, Россия), согласно протоколу производителя.

Соответствие последовательности полученных конструкций теоретическим подтверждали секвенированием открытой рамки считывания плазмидной ДНК с эндолизином и АМП-модификациями методом Сэнгера с использованием BigDay™ Terminator V3.1 (“Applied Biosystems”, USA). В качестве олигонуклеотидных праймеров для секвенирования использовали lacOseqF и ACPRseq как универсальные праймеры для кольцевого вектора pET42b и хромопротеина, Si3seqF (5'-CAGCGTAGAATGGAAGCT-3') и Si3R как специфические, комплементарные нуклеотидной последовательности лизина Si3 (5'-CTCGAGCTTTGGGTATACACTGTCAAGA-3').

Экспрессия модифицированных белков. Полученные химерные конструкции трансформировали методом теплового шока в экспрессионный лабораторный штамм *E. coli* Rosetta(DE3) (“Novagen”, Германия), после чего нарабатывали биомассу, содержащую лизины в среде 2YT и селективные

Таблица 1. Праймеры, используемые для получения конструкций

№	Название конструкции	Праймер	Последовательность использованных олигонуклеотидных праймеров, 5'–3'
1	Вектор (pET42b-LysSi3)	ACPvecF	CGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCT
		ACPR	AGCCAACCTCAGCTTCCTTTTCGCTAGGCGACCACAGGTTT-GCG
2	pET42b-LysSi3-CeA	CeaR	AATcTtTcTtgAACAGcTTCCAcTTCTCGAGCTTTGGGTATACACT-GTC
		CeaF	AAGTGGAAGCTGTTCAAGAAGATTTA-AGGGAATTAGAAGAATGAGTGTGATCGCTAAAC
3	pET42b LysSi3-HIS5	His5R	CTTCTCGTGGAACCTTGCCTTATAGCCGTGATGGCGTTTC-GCGTGGCTATCCTCGAGCTTTGGGTATACACTGTCAAG
		His5F	AGCGCAAGTTCACGAGAAGCACCATAGCCATCGCGGCTAT-TAAGGGAATTAGAAGAATGAGTGTGATCGCTAAAC
4	pET42b LysSi3-GG3	GG3R	CGCCTTTCAACCACAACCTACCACCCTTCAGCCACAGTTT-GCCCTCGAGCTTTGGGTATACACTGTCAAG
		GG3F	GTGGTAAGTTGTGGTTGAAAGGCGGGAAACTGTGGTTA-AAGGGCTAAGGGAATTAGAAGAATGAGTGTGATCGCTAAAC

антибиотики (канамицин и хлорамфеникол) при индукции 1 мМ ИПТГ в течении 3–4 ч.

Очистка белков. Рекombинантный эндолизин LysSi3 был получен, как описано ранее [13]. Очистку модифицированных белков проводили с помощью двухстадийной хроматографии лизата клеток-продуцентов с использованием катионообменного сорбента SP-sepharose (“GE Healthcare”, США) и гель-эксклюзионного сорбента Superdex 75pg (“GE Healthcare”, США), проводя элюцию в фосфатно-солевом буфере PBS, pH 7.4 (“VWR”, США). Конечную концентрацию белков определяли путем измерения OD₂₈₀ (Implen NanoPhotometer, “IMPLEN”, Германия) с учетом теоретических коэффициентов поглощения. Чистоту полученных препаратов подтверждали с помощью денатурирующего ПААГ-электрофореза. Все белки лиофилизировали и хранили при –80°C до проведения экспериментов.

Определение противомикробной активности эндолизинов. Для оценки активности белков против бактерий в экспоненциальной фазе роста культуру *A. baumannii* разбавляли в свежей питательной среде и подращивали при 37°C, 250 об/мин до оптической плотности OD₆₀₀ = 0.6. Для анализа активности ферментов в отношении бактерий в стационарной фазе использовали культуру выращенную в течение 18–20 ч, без подращивания. Далее 1 мл культуры осаждали центрифугированием в течение 5 минут (6000 g) и ресуспендировали осадок в PBS, pH 7.4 до мутности полученной суспензии, соответствующей стандарту мутности МакФарланда 0.5. Бактериальную суспензию разбавляли в 100 раз в буфере 20 мМ Трис-НCl pH 7.5.

Ферменты разводили в 20 мМ Трис-НCl pH 7.5 до концентраций 0.2 мкг/мл, 2.0 мкг/мл или

20.0 мкг/мл. В лунки планшета вносили по 100 мкл суспензии и 100 мкл подготовленных растворов эндолизинов и инкубировали 60 мин при 200 об/мин, 37°C. В качестве отрицательного контроля использовали раствор 20 мМ Трис-НCl, pH 7.5, и 100 мкл суспензии бактерии. Далее, суспензию разводили в 10 раз PBS и наносили по 100 мкл на чашки Петри. Результат оценивали, подсчитывая колониеобразующие единицы (**КОЕ**) после ночной инкубации в термостате при 37°C. Все эксперименты были проведены в трехкратной повторности.

Определение скорости действия эндолизинов. Для измерения скорости действия анализ проводили, как описано выше при конечной концентрации ферментов 1.0 мкг/мл и времени инкубации с бактериальной культурой 0 (без инкубации), 5, 10, 30, 60 мин.

Противобактериальная активность. Штамм *A. baumannii*, образующий биопленки, культивировали в течение ночи в среде TSB (BD Tryptic Soy Broth). Затем культуры разводили 1 : 50 свежим TSB, вносили по 100 мкл в лунки 96-луночных стерильных полистироловых планшетов для культивирования суспензионных культур (“Eppendorf”, Германия) и инкубировали в течение 48 ч при 37°C, 250 об./мин, чтобы обеспечить формирование биопленки. После инкубации содержимое лунок с планктонными клетками стряхивали, планшет трижды промывали PBS pH 7.4, и сушили на воздухе в течение примерно 10 мин. Затем в лунки добавляли растворы эндолизинов до конечной концентрации 100 мкг/мл или 20 мМ Трис-НCl pH 7.5, в качестве отрицательного контроля и инкубировали при 37°C, 250 об./мин в течение 2 ч. После инкубации лунки дважды промывали 200 мкл PBS pH 7.4, и сушили на воздухе. Промытые биопленки

окрашивали 0.1% водным раствором кристаллического фиолетового (“PanReas AppliChem”, Испания) в течение 20 мин при комнатной температуре с последующим трехкратным промыванием бидистиллированной водой, подсушивали на воздухе и растворяли в 33%-ной уксусной кислоте. Оптическую плотность полученных растворов измеряли при 590 нм (OD_{590}) с помощью прибора для измерения поглощения SPECTROstar NANO (“BMG LABTECH”, Германия). Все эксперименты проводились в трех повторностях.

Цитотоксическое действие. Клетки линий НЕК293 и HaCaT (American Type Culture Collection) засеивали в 96-луночный планшет (“Erpendorf”, Германия) из расчета 20000 кл./лунку в 100 мкл среды DMEM (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамин (“ПанЭко”, Россия) и смеси антибиотиков пенициллина (50 Ед./мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) до конfluence монослоя 80–90% в течение 24 ч при 37°C, в увлажненной атмосфере с содержанием 5% CO_2 . Далее из лунок удаляли среду и вносили 100 мкл растворов эндолизин в концентрациях от 1000 мкг/мл до 15.6 мкг/мл (2-кратные разведения белков в стерильной базовой среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 2 мМ глутамин). В качестве контроля выживаемости в лунки вносили 100 мкл базовой среды DMEM. При анализе данных значения в этих лунках принимали за 100% (Y_{max}). В качестве положительного контроля использовали значения в лунках, содержащих 100 мкл 0.1% Тритон X-100 (“Хеликон”, Россия), при анализе данных их принимали за 0% (Y_{min}). Каждую концентрацию анализировали в трех повторностях.

Планшеты инкубировали в термостате при 37°C в атмосфере с содержанием 5% CO_2 в течение 24 ч, затем вносили по 100 мкл тетразолиевого красителя МТТ (“Диаэм”, Россия) до итоговой концентрации 0.5 мг/мл. Смеси инкубировали в течение еще 4 ч при 37°C в 5%-ном CO_2 . После инкубации из лунок планшета удаляли всю жидкость, вносили по 100 мкл DMSO и измеряли оптическую плотность при длине волны 570 нм (OD_{570}). Долю живых клеток в каждой лунке для каждой концентрации препарата вычисляли, используя следующую формулу:

$$ЖС = (Y_{об} - Y_{мин}) / (Y_{макс} - Y_{мин}) \times 100\%,$$

где ЖС – жизнеспособность, % живых клеток;

$Y_{об}$ – значение OD_{570} для образца в определенной концентрации;

$Y_{макс}$ – среднее значение OD_{570} в лунках с контролем живых клеток (среда DMEM);

$Y_{мин}$ – среднее значение OD_{570} в лунках с 0.1% Тритон X-100, контроль мертвых клеток.

Статистическая обработка данных. Результаты были проанализированы и проиллюстрированы с использованием программного обеспечения

GraphPad Prism 10.0. Сравнение проведено с использованием однофакторного дисперсионного анализа с учетом критерия множественных сравнений Тьюки. Данные представлены как средние значения трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение, SD.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Инженерия и получение модифицированных эндолизин. В качестве фермента для модификации был выбран фаговый эндолизин LysSi3, который ранее был охарактеризован [13] как гликозидгидролаза 24 семейства (мурамидаза, GH24) с выраженной антимикробной активностью в отношении бактерий видов *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli*. При этом, LysSi3 обладал невысокой скоростью противомикробного действия по сравнению с другими эндолизинами, элиминируя 99.9% КОЕ контрольного штамма более, чем за 99 мин. Кроме того, LysSi3 избирательно активен в отношении изолятов *K. pneumoniae*, *Salmonella* sp. и *Enterobacter* sp. [14], а его активность практически полностью ингибируется в присутствии физиологических концентраций соли. Таким образом, не смотря на высокий потенциал действия этого фермента, у него есть ряд недостатков, не позволяющих его рассматривать в качестве действующего вещества противомикробных препаратов.

Модификация нативных эндолизин введением дополнительных последовательностей, обладающих противомикробной активностью, например, за счет дестабилизации и пермеабилзации внешней мембраны грамотрицательных бактерий, широко применяется для получения кандидатных средств терапии против инфекций, вызываемых такими патогенами. Использование АМП является универсальной стратегией и основано на их физико-химических свойствах. В основном, для этих целей используют поликатионные, гидрофобные, амфипатические последовательности [11, 15]. Несмотря на то, что существуют высокопроизводительные платформы для создания и предсказания свойств таких генно-инженерных конструкций [16], этот подход к конструированию ферментов все равно остается достаточно трудоемким, и требует большого количества экспериментальной работы на этапах скрининга. С другой стороны, системный анализ влияния пептидов на свойства инженерных эндолизин отсутствует, а описанные исследования ограничены несколькими примерами гибридации.

Для получения химерных белков LysSi3-АМП выбирали противомикробные пептиды, относящиеся к различным группам по аминокислотному составу. Помимо этого, для пептидов должно быть показано способность проникать через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий, и отсутствие значимого цитотоксического действия на клетки эукариот. По этим критериям,

для исследования были выбраны три пептида Цекропин А (1–8) (DBAASPS_9963), Гистатин 5 (DBAASPR_15) и синтетический пептид GG3 (DBAASPS_8820). Их гибридовали на С-конце последовательности LysSi3, в результате получая модифицированные ферменты: LysSi3-CeA, LysSi3-HIS5 и LysSi3-GG3.

Цекропин А (CeA) — один из наиболее широко изученных антимикробных пептидов, продуцируемый насекомыми в качестве компонента защитной системы от бактериальных инфекций. В зависимости от соотношения в среде пептид/липид, CeA формирует либо ионные каналы (при низких соотношениях), либо поры, достаточные, чтобы могли проходить различные молекулы (при более высоких соотношениях) [17]. Цекропины и их производные пептиды широко используют для модификации эндолизиннов с целью получения ферментов, активных в отношении грамотрицательных бактерий, таких видов как *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli* и *Enterobacter cloacae* [18–20].

Гистатины представляют собой семейство небольших катионных пептидов, в составе которых присутствует большое количество основных аминокислот, таких как аргинин, лизин и, главным образом, гистидин [21]. Аминокислотная последовательность гистатина 5 (HIS-5) характеризуется случайной вторичной структурой, представляющей α-спираль с амфипатическими свойствами [22]. Несмотря на то, что гистатин в первую очередь рассматривался как пептид, активный в отношении *C. albicans*, его фрагмент, включающий аминокислотные остатки с 4 по 16, также проявляет антибактериальную активность в отношении

P. aeruginosa, *E. coli* и *S. aureus* [23–25]. И хотя механизм действия HIS5 до конца не выяснен, известно, что пептид поглощается клеткой и индуцирует продукцию активных форм кислорода [26].

Глицин-богатый центросимметричный пептид GG3 — синтетически синтезированный пептид, сконструированный таким образом, чтобы обойти естественную иммунную защиту хозяина [27]. Он включает гидрофобные, положительно-заряженные аминокислоты, а также остатки Gly. При этом, GG3 показал селективность в отношении грамотрицательных бактерий, отсутствие серьезной гемолитической активности, а механизм его действия, по всей видимости, включает, помимо увеличения проницаемости бактериальной мембраны за счет формирования пор, также связывание с бактериальной ДНК.

Таким образом, все три пептида, используемые для модификации LysSi3 различались между собой как по физико-химическим свойствам и структуре, так и по механизму взаимодействия с внешними мембранами грамотрицательных бактерий.

Все белки были получены в экспрессионной системе *E. coli*. Индукцию проводили при OD₆₀₀ 0.5–0.7 оптических ед. При этом, по сравнению с LysSi3, для модифицированных противомикробными пептидами белков наблюдалось замедление роста и накопления биомассы. А у штаммов, продуцирующих LysSi3-GG3 и LysSi3-CeA, спустя 3 ч индукции начинался лизис культуры и снижение оптической плотности (рис. 1а), вероятно, из-за накопления высокой концентрации эндолизиннов в клетках продуцента и их токсичности.

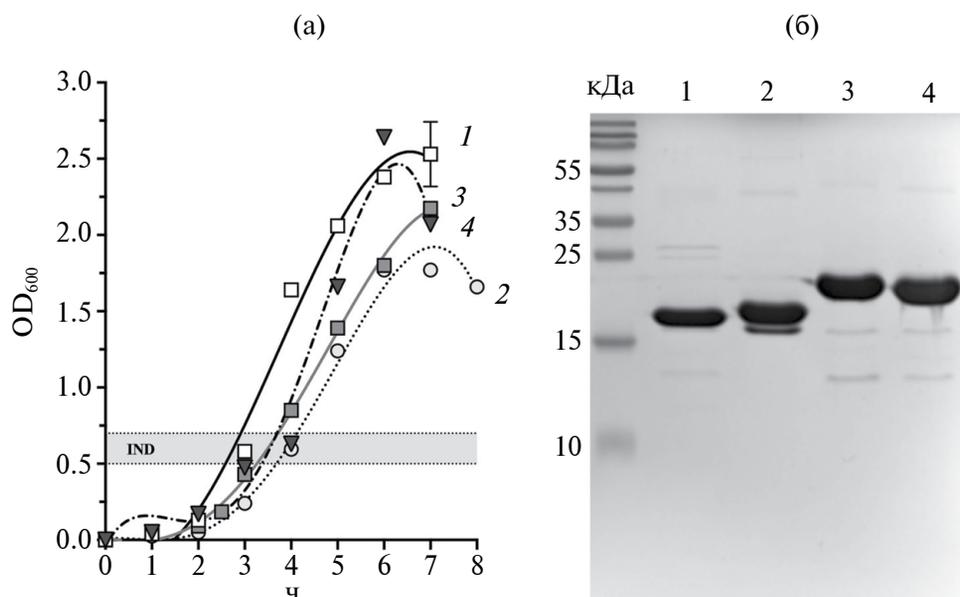


Рис. 1. Кривые роста и накопления биомассы (а) и электрофорез в ПААГ очищенных белков (б): 1 – LysSi3, 2 – LysSi3-CeA, 3 – LysSi3-HIS5, 4 – LysSi3-GG3. IND – диапазон оптической плотности культуры, при которой вносили ИПТГ для индукции экспрессии белков.

Несмотря на это, выход белков после двухстадийной хроматографической очистки растворимой фракции составил 10.0; 3.18; 1.34 мг/г биомассы для LysSi3-CeA, LysSi3-HIS5 и LysSi3-GG3 соответственно, а препараты достигали высокой степени очистки (рис. 1б).

Таким образом, возможность получения белков в выбранной системе экспрессии подтверждено экспериментально, а получаемые количества достаточны для определения основных свойств.

Влияние модификаций на противомикробные свойства LysSi3. В ходе работы нами были оценены такие параметры антимикробной активности полученных ферментов, как эффективные концентрации эндолизинов, скорость действия в отношении модельного штамма *A. baumannii*, активность в отношении

бактерий, находящихся в стационарной фазе роста, а также в составе биопленок.

В сравнении с нативным LysSi3 все модифицированные ферменты были более активными и в минимальной измеренной концентрации 0.1 мкг/мл активность составила 55.6, 88.8 и 98.3% для LysSi3-CeA, LysSi3-HIS5 и LysSi3-GG3 соответственно (рис. 2а). Активность LysSi3 в этой концентрации не превышала 20%. Также значительно возросла скорость действия эндолизинов, содержащих дополнительные пептиды, и при концентрации 1.0 мкг/мл LysSi3-CeA, LysSi3-HIS5 и LysSi3-GG3 потребовалось 11.8, 4.6 и 4.5 мин на элиминацию 90% бактерий, в то время как для LysSi3 это время составило 51 мин (рис. 2в). Помимо этого, эндолизины были активнее в отношении бактериальных

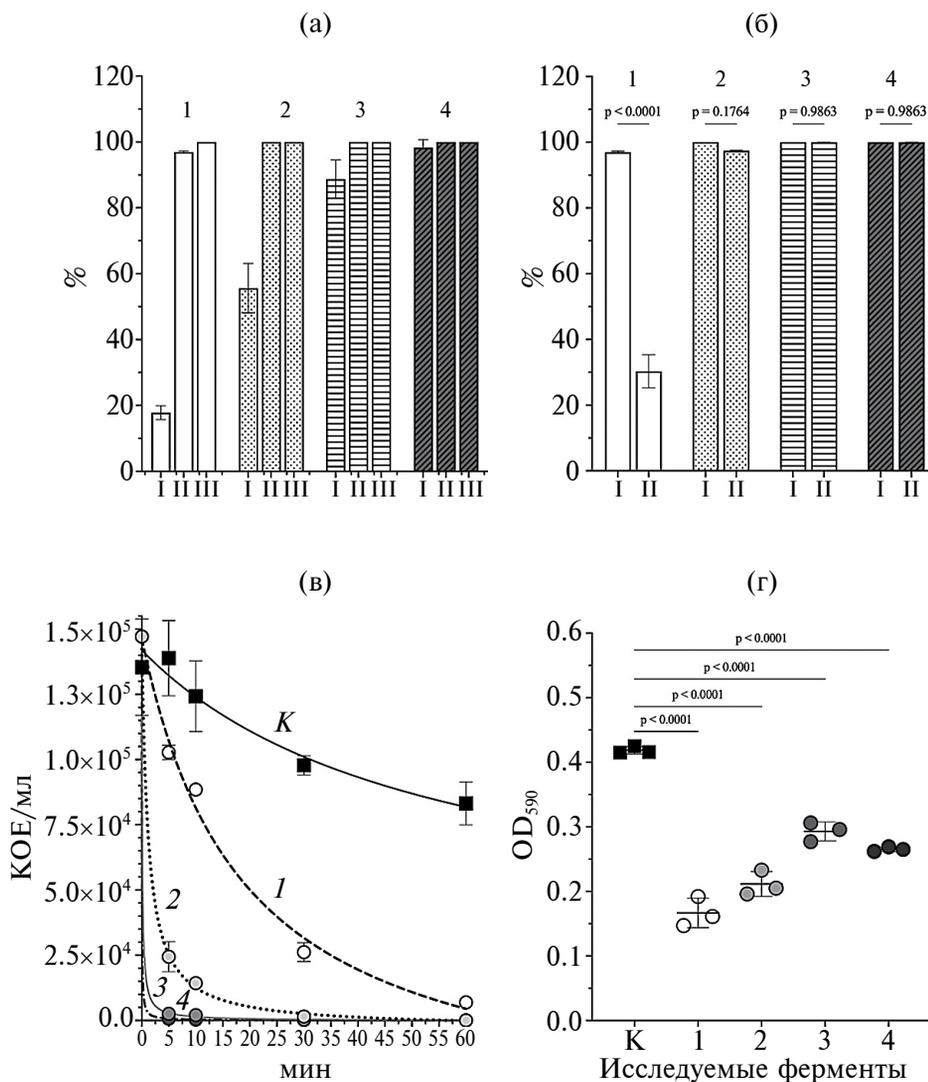


Рис. 2. Зависимость противомикробной активности (а) от концентрации LysSi3 и его модифицированных вариантов (I – 0.1 мкг/мл, II – 1.0 мкг/мл, III – 10.0 мкг/мл), активность в отношении бактерий в экспоненциальной (I) и стационарной (II) фазах роста штамма *A. baumannii* в концентрации 1.0 мкг/мл (б), скорость противомикробного действия (в), окрашивание массы сформированной бактериальной пленки *A. baumannii* кристаллическим фиолетовым после инкубации с ферментами (г), показаны значения оптической плотности для трех технических повторов. Для а–г: 1 – LysSi3, 2 – LysSi3-CeA, 3 – LysSi3-HIS5, 4 – LysSi3-GG3, К – контроль роста.

клеток в стационарной фазе роста, причем LysSi3-HIS5 и LysSi3-GG3 полностью элиминировали бактерии в образцах (рис. 26). Известно, что лизины обычно менее активны в отношении бактерий, находящихся в стационарной фазе и характеризующихся более устойчивой к внешним воздействиям клеточной стенкой по сравнению с экспоненциально растущими бактериальными клетками [28], что может ограничивать их применение в реальных условиях. В связи с этим, модификации, позволяющие добиться противомикробной активности, независимо от метаболического статуса клетки является большим преимуществом.

При оценке противобиопленочных свойств модифицированных белков оказалось, что нативный фермент, напротив, был наиболее активен, снижая массу бактериальной пленки в 2.5 раза относительно контроля (рис. 2г). Для модифицированных белков снижение составило 2.0; 1.4; 1.6 раз.

Эти результаты могут быть, в частности, связаны с агрегацией молекул модифицированных белков за счет заряженных частей глобулы, и их взаимодействия с матриксом бактериальных пленок или полистирольной поверхностью планшета, что затрудняло действие ферментов в отношении сформированных бактериальных пленок. Так, например, при исследовании противобиопленочной активности бактериоцина лизостафина, в среду добавляют инертный белок (БСА), поскольку он предотвращает такое “налипание” [29]. Действительно способность модифицированных ферментов разрушать сформированные биопленки соотносится с общим зарядом исследованных модифицированных белков (табл. 2), тем не менее, природа снижения активности модифицированных ферментов в отношении биопленок требует дополнительных исследований.

Таблица 2. Характеристики модифицированных лизинов и пептидов, использованных в работе

Фермент	LysSi3	LysSi3-CeA	LysSi3-HIS5	LysSi3-GG3
Пептид для модификации	—	Cecropin A (1–8)	Histatin 5	GG3
Последовательность АМП	—	KWKLFKKI	DSNAKRHHGYKRKF HEKHHSHRGY	GKLWLKGGKLWL KGGKLWLKG
ID в базе dbaasp	—	DBAASPS_9963	DBAASPR_15	DBAASPS_8820
Источник АМП	—	<i>Hyalophora cecropia</i>	<i>Homo sapiens</i>	Синтетический
Заряд белка*, рН 7.5	4.4	7.7	9.3	9.7
Молмасса белка*, кДа	18.5	18.5	20.5	19.8
pI белка*	9.05	9.47	9.51	9.59
Кэфф. экстинкции при 280 нм*, (мг/мл) ⁻¹ см ⁻¹	1.0289	1.3379	1.0575	1.827
Характеристика АМП	—	Lys-насыщенный, альфа-спираль	Histatins, His- насыщенный, альфа-спираль	Gly-насыщенный, центросимметричный пептид
Предполагаемый механизм действия	Гидролиз пептидогликана (ПГ) по β-1,4-гликозидной связи	Гидролиз ПГ + ОМР (ковровая модель, ионные каналы)	Гидролиз ПГ + ОМР (пептид-фосфолипидные взаимодействия)	Гидролиз ПГ + ОМР (модель тороидальной поры), связывание с ДНК
Мишень	ПГ	ПГ, липидный бислой	ПГ, липидный бислой	ПГ, липидный бислой, ДНК/РНК
Ссылки	[13]	[18]	[25, 32]	[27]

* Расчетное значение (<https://protcalc.sourceforge.net/>);

** ОМР – пермеабилзация внешней мембраны.

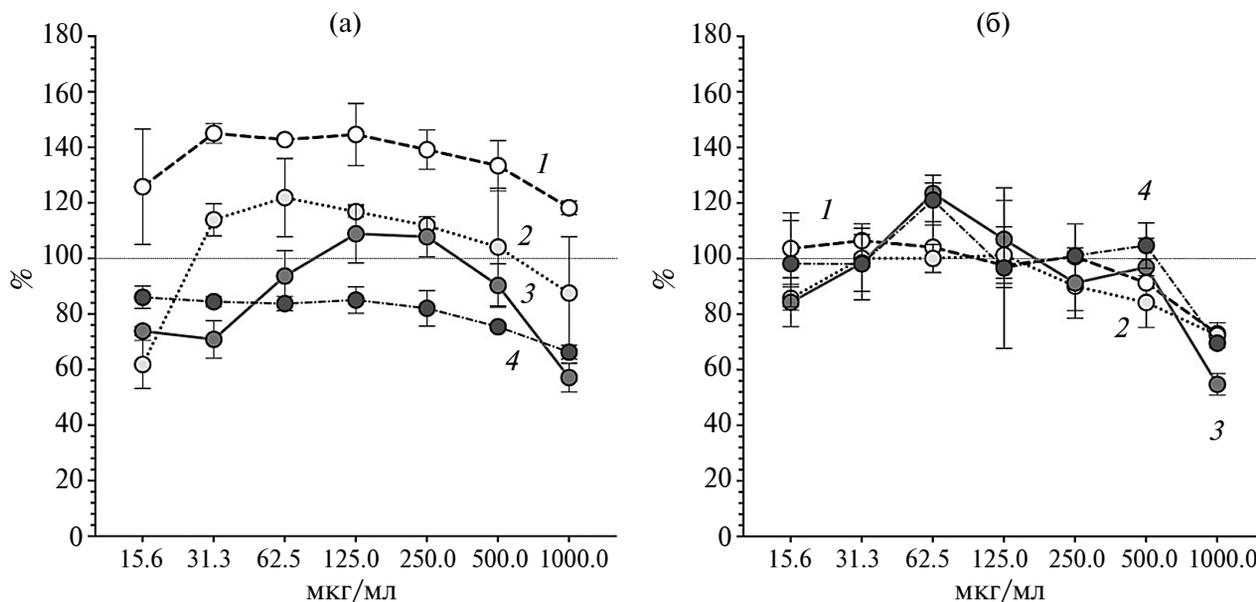


Рис. 3. Влияние различных концентраций модифицированных ферментов на жизнеспособность клеток почки эмбриона человека HEK293 (а) и кератиноцитов HaCaT (б): 1 – LysSi3, 2 – LysSi3-CeA, 3 – LysSi3-HIS5, 4 – LysSi3-GG3.

Таким образом, все генно-инженерные белки, полученные в ходе исследования, характеризовались более высокой противомикробной активностью, по сравнению с нативной мураמידазой LysSi3, и обладали более высокой скоростью действия на планктонные клетки. При этом, повышение противомикробной активности происходит в ряду LysSi3 < LysSi3-CeA < LysSi3-HIS5 < LysSi3-GG3 и коррелирует с расчётным общим зарядом белка, который при pH 7.5 составляет 4.4; 7.7; 9.3 и 9.7 соответственно.

Цитотоксические свойства модифицированных ферментов. Несмотря на хорошие противомикробные свойства, дальнейшее применение литических ферментов, проявляющих высокую цитотоксическую активность, может быть ограничено. Это же относится и к противомикробным пептидам, активность которых часто является неспецифичной, в результате чего они способны поражать и эукариотические клетки [30, 31].

Чтобы исследовать цитотоксические свойства полученных белков, мы оценили выживаемость клеток почки эмбриона человека HEK293 (рис. 3а) и кератиноцитов HaCaT (рис. 3б) *in vitro* при концентрациях белков от 15.6 до 1000 мкг/мл.

В концентрациях до 500 мкг/мл включительно значимого снижения выживаемости обеих линий не наблюдалось, выживаемость составляла не менее 75–80%. При увеличении концентрации эндолизина до 1000 мкг/мл отмечено снижение количества жизнеспособных клеток, однако, степень влияния белков зависела от клеточной линии. При исследовании кератиноцитов было показано, что их

цитотоксические свойства близки для всех исследуемых белков и выживаемость клеток для всех препаратов составляла ~ 70% (за исключением LysSi3-HIS5, где выживаемость HaCaT была 55%). В случае линии HEK293 эндолизин по-разному влияли на клетки. Так, в присутствии немодифицированного LysSi3, жизнеспособность клеток относительно контроля составляла 130–150% со снижением до 120% при 1000 мкг/мл, в то время как в присутствии модифицированных белков этот показатель составлял 80–120%, а ниже всего выживаемость была в присутствии LysSi3-GG3 (65–85% во всем диапазоне концентраций белка).

In vitro тесты показали, что значительного снижения выживаемости клеток эукариот в присутствии эндолизинов (как нативного, так и модифицированных) не происходило, а, следовательно, ферменты обладали специфическим и избирательным действием в отношении клеточных мембран бактерий. Такие ферменты могут рассматриваться в качестве объектов дальнейшей разработки противомикробных препаратов.

Как нативные лизины, так и противомикробные пептиды, несмотря на свою высокую активность, обладают рядом недостатков, которые возможно преодолеть при их гибридизации в единую молекулу. Добавление к лизину АМП повышало активность ферментов в отношении грамотрицательных бактерий за счет дополнительной пермеабиллизации мембраны бактериальной клетки. При этом, гибридная молекула становилась более устойчивой к действию протеолитических ферментов, по сравнению с АМП, которые подвержены

значительной протеолитической деградации, что сокращает период их полувыведения *in vivo*. Также, гибридизация повышает селективность действия пептидов, снижая их цитотоксическую и гемолитическую активность. Таким образом, анализ различных комбинаций эндолизин-АМП позволяет не только получать эффективные и стабильные молекулы с заданными свойствами, но и выявлять закономерности модификации, что может послужить для направленного получения молекул с заданными свойствами под конкретные задачи.

Исследования показали, что эффективные концентрации и скорость действия LysSi3 повышалась после введения дополнительных функциональных последовательностей, при этом, отмечалась корреляция с увеличением общего заряда белка. Кроме того, это приводит к повышению его активности в отношении бактерий в стационарной фазе роста, которые менее чувствительны к действию эндолизинов [28]. С другой стороны, снижение противобиопленочной активности модифицированных ферментов, несмотря на повышение скорости и эффективности действия на планктонные клетки, показало, что выбор модификации фермента должен быть основан не только на оценке противомикробной активности, но и подразумевает необходимость комплексного анализа с использованием нескольких параметров.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-74-10027, <https://rscf.ru/project/23-74-10027/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАР-ТОВ. Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Murray E., Draper L.A., Ross R.P., Hill C. // *Viruses*. 2021. V. 13. № 4. P. 680. <https://doi.org/10.3390/v13040680>
- Oliveira H., Thiagarajan V., Walmagh M., Sillankorva S., Lavigne R., Neves-Petersen M.T. et al. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 10. P. e108376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108376>
- Heselpoth R.D., Euler C.W., Schuch R., Fischetti V.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019. V. 63. № 6. <https://doi.org/10.1128/AAC.00342-19>
- Yan G., Liu J., Ma Q., Zhu R., Guo Z., Gao C. et al. // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2017. V. 110. № 12. P. 1627–1635. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0912-9>
- Gutiérrez D., Briers Y. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2021. V. 68. P. 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.08.014>
- Ma Q., Guo Z., Gao C., Zhu R., Wang S., Yu L. et al. // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2017. V. 110. № 3. P. 347–355. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0806-2>
- Gerstmans H., Criel B., Briers Y. // *Biotechnol. Adv.* 2018. V. 36. № 3. P. 624–640. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.009>
- Antonova N.P., Vasina D.V., Rubalsky E.O., Fursov M.V., Savinova A.S., Grigoriev I.V., Usachev E.V. et al. // *Biomolecules*. 2020. V. 10. № 3. P. 440. <https://doi.org/10.3390/biom10030440>
- Yang H., Wang M., Yu J., Wei H. // *Front. Microbiol.* 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01471>
- Briers Y., Walmagh M., Van Puyenbroeck V., Cornelissen A., Cenens W., Aertsen A. // *mBio*. 2014. V. 5. № 4. <https://doi.org/10.1128/mBio.01379-14>
- Yan G., Yang R., Fan K., Dong H., Gao C., Wang S. et al. // *AMB Express*. 2019. V. 9. № 1. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0838-x>
- Pirtskhalava M., Armstrong A.A., Grigolava M., Chubinidze M., Alimbarashvili E., Vishnepolsky B. et al. // *Nucleic Acids Res.* 2021. V. 49. № D1. P. D288–D297. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa991>
- Vasina D.V., Antonova N.P., Grigoriev I.V., Yakimakha V.S., Lendel A.M., Nikiforova M.A., Pochtovyi A.A. et al. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. P. 3033. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.748718>
- Vasina D.V., Antonova N.P., Shidlovskaya E.V., Kuznetsova N.A., Grishin A.V., Akoulina E.A. et al. // *Gels*. 2024. V. 10. № 1. <https://doi.org/10.3390/gels10010060>
- Ma Q., Guo Z., Gao C., Zhu R., Wang S., Yu L. et al. // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2017. V. 110. № 3. P. 347–355. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0806-2>
- Gerstmans H., Grimon D., Gutiérrez D., Lood C., Rodríguez A., van Noort V. et al. // *Sci. Adv.* 2020. V. 6. № 23. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz1136>
- Silvestro L., Weiser J.N., Axelsen P.H. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. V. 44. № 3. P. 602. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.602-607.2000>
- Chen X., Liu M., Zhang P., Leung S.S.Y., Xia J. // *ACS Infect. Dis.* 2021. V. 7. № 8. P. 2192–2204. <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.1c00222>
- Islam M.M., Kim D., Kim K., Park S.J., Akter S., Kim J. et al. // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. P. 988522. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.988522>
- Lim J., Hong J., Jung Y., Ha J., Kim H., Myung H. et al. // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2022. V. 32. № 6. P. 816–823. <https://doi.org/10.4014/jmb.2205.05009>

21. Zolin G.V.S., Fonseca F.H.D., Zambom C.R., Garrido S.S. // *Biomolecules*. 2021. V. 11. № 8. P. 1209. <https://doi.org/10.3390/biom11081209>
22. Helmerhorst E.J., van't Hof W., Breeuwer P., Veerman E.C., Abee T., Troxler R.F. et al. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 8. P. 5643–5649. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008229200>
23. Kavanagh K., Dowd S., Kavanagh K. // *J. Pharm. Pharmacol.* 2010. V. 56. № 3. P. 285–289. <https://doi.org/10.1211/0022357022971>
24. Puri S., Edgerton M. // *Eukaryot. Cell*. 2014. V. 13. № 8. P. 958–964. <https://doi.org/10.1128/EC.00095-14>
25. Sajjan U.S., Tran L.T., Sole N., Rovaldi C., Akiyama A., Friden P.M. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. V. 45. № 12. P. 3437–3444. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3437-3444.2001>
26. De Smet K., Contreras R. // *Biotechnol. Lett.* 2005. V. 27. № 18. P. 1337–1347. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-0936-5>
27. Wang J., Chou S., Xu L., Zhu X., Dong N., Shan A., et al. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. № 1. P. 1–19. <https://doi.org/10.1038/srep15963>
28. Oliveira H., São-José C., Azeredo J. // *Viruses*. 2018. V. 10. № 6. <https://doi.org/10.3390/v10060292>
29. Kudinova A., Grishin A., Grunina T., Poponova M., Bulygina I., Gromova M. et al. // *Pathogens*. 2023. V. 12. № 2. P. 177. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020177>
30. de Pontes J.T.C., Toledo Borges A.B., Roque-Borda C.A., Pavan F.R. // *Pharmaceutics*. 2022. V. 14. № 3. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030642>
31. Huan Y., Kong Q., Mou H., Yi H. // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
32. Welling M.M., Brouwer C.P., van't Hof W., Veerman E.C., Amerongen A.V. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. V. 51. № 9. P. 3416–3419. <https://doi.org/10.1128/AAC.00196-07>

Engineering of Recombinant Endolysin LysSi3 to Increase Its Antibacterial Properties

**N. P. Antonova^a, I. V. Grigoriev^a, A. M. Lendel^a, O. V. Usacheva^a, A. A. Klimova^a,
E. V. Usachev^{a, b}, and D. V. Vasina^{a, *}**

^a*N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia*

^b*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

^{*}*e-mail: d.v.vasina@gmail.com*

The potential of new genetically modified recombinant endolysins as antimicrobial agents against Gram-negative bacteria was investigated. A series of enzymes based on LysSi3 lysozyme-like muramidase were obtained by modifying its sequence with antimicrobial peptides of different families and recombinant expression in *E. coli* was demonstrated. Modification of LysSi3 resulted in increased bacteriolytic activity against the model isolate of *A. baumannii* and higher kinetics rate compared to the native enzyme. The cytotoxic properties of new engineered lysins were investigated with the HEK293 and HaCaT cell lines and it was shown that modification of LysSi3 with antimicrobial peptides does not significantly increase the toxic properties in vitro.

Keywords: modified endolysins, antimicrobial peptides, recombinant expression, Gram-negative bacteria, biofilms, cytotoxicity

УДК 577.121:577.112.3

АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАРНОЗИНА И КАРНОЗИНОВЫХ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА В УСЛОВИЯХ, МОДЕЛИРУЮЩИХ ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ БИМОЛЕКУЛ

© 2024 г. Э. И. Насыбуллина¹, О. В. Космачевская¹, К. Б. Шумаев¹,
А. Ф. Топунов^{1, *}

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

*e-mail: aftorunov@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.04.2024 г.

После доработки 15.04.2024 г.

Принята к публикации 26.04.2024 г.

Проведено исследование общей антиоксидантной активности карнозина и карнозиновых динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ). В качестве экспериментальной модели использовали систему, содержащую метмиоглобин (metMb) или гемин в сочетании с гидропероксидом *трет*-бутила (*t*-ВООН). С помощью метода люминол-зависимой хемилюминесценции было показано, что карнозин и карнозиновые ДНКЖ эффективно снижали уровень прооксидантов, образующихся при взаимодействии гемовых групп с *t*-ВООН. Кроме того, карнозин и карнозиновые ДНКЖ ингибировали образование диеновых конъюгатов, возникающих в ходе окисления арахидоновой кислоты в системе metMb—*t*-ВООН. В используемых реакционных системах антиоксидантное действие карнозиновых ДНКЖ было выше, чем у карнозина. Антиоксидантный эффект карнозина также зависел от присутствия ионов двухвалентного железа, добавленных в концентрации, эквивалентной их содержанию в ДНКЖ. Полученные результаты показали, что включение карнозина в качестве лигандов в нитрозильные комплексы железа усиливало его антиоксидантные свойства.

Ключевые слова: карнозин, динитрозильные комплексы железа, перекисное окисление, миоглобин, гидропероксид *трет*-бутила, арахидоновая кислота, окислительная модификация

DOI: 10.31857/S0555109924050044 EDN: QTVCXS

Карнозин (β-аланил-L-гистидин) — наиболее хорошо изученный гистидиновый дипептид (имидазолсодержащий дипептид), который синтезируется у многих позвоночных организмов. Гистидиновые дипептиды продуцируются в различных органах и тканях, причем их концентрация и состав варьируют в широких пределах [1]. Так, в высоких концентрациях карнозин содержится в сердечных и скелетных мышцах [2]. Также он обнаружен в мозге, в тканях пищеварительной системы и в почках. Для этого дипептида описано множество физиологических функций [1, 3]. Он поддерживает рН в скелетных мышцах, продуцирующих высокие уровни молочной кислоты во время анаэробного гликолиза [4]. В нейронах обонятельных рецепторов карнозин может играть роль нейромодулятора [5, 6]. Также известно, что карнозин регулирует ферменты энергетического обмена: фруктозо-1,6-бисфосфатазу (КФ 3.1.3.11) и фосфорилазы *a* и *b* (две формы гликогенфосфорилазы, КФ 2.4.1.1) [7]. В дополнение к этим функциям

карнозин известен как потенциальный антиоксидант и антигликирующий агент [1, 3, 8, 9].

Карнозин является хорошим хелатором ионов железа, меди и цинка, удаляет активные формы кислорода и азота, образует аддукты с токсичными электрофильными α,β-ненасыщенными альдегидами [8, 10, 11]. Благодаря этим свойствам карнозин может защищать клетки от окислительного повреждения и замедлять их старение [12, 13]. В настоящее время на основе карнозина производят терапевтические средства (биологически активные добавки) для повышения работоспособности при физических нагрузках, замедления старения, иммуномодуляции, для профилактики и лечения диабета, а также неврологических расстройств [6, 13].

Карнозин является потенциальным терапевтическим средством при сердечно-сосудистых и онкологических заболеваниях, сахарном диабете второго типа, нейродегенеративных расстройствах [3, 12, 14, 15]. Имеются доказательства защиты карнозином нейронов при ишемии/реперфузии [6, 16].

Считается, что основной механизм такого действия карнозина связан с металлохелатирующей способностью, поскольку именно ионы металлов являются частой причиной нейродегенеративных процессов [12, 17]. Кроме этого, было продемонстрировано антифиброзное действие этого дипептида [18]. Много работ посвящено изучению противоопухолевой активности карнозина. По данным доклинических исследований, карнозин уменьшает размер раковых клеток и их жизнеспособность [19].

Для повышения устойчивости карнозина к действию гидролизующего фермента карнозиназы (аминоацил-гистидиндипептидаза, КФ 3.4.13.3) его различными способами модифицируют, например, получают ОН- или NH-связанные конъюгаты с циклодекстрином и гиалуроновой кислотой [20, 21]. Комплексы карнозина, конъюгированного гиалуроновой кислотой, с ионами Cu^{2+} имитировали действие Cu, Zn-супероксиддисмутазы (SOD1, КФ 1.15.1.1) [21].

Ведутся исследования по созданию на основе карнозина соединений с терапевтическим потенциалом, которые совмещают полезную функцию пептида и конъюгирующего фрагмента. К таким соединениям относят аналоги карнозина, способные выступать в качестве доноров оксида азота (NO^{\cdot}) [22]. Карнозины, содержащие NO-донорные группы, интересны как терапевтическое средство для лечения широкого спектра хронических сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, при которых биодоступность NO^{\cdot} снижена. Эти соединения защищают от ишемии/реперфузии *in vivo*, обладают антиоксидантной активностью *in vitro*, а также вазодилаторным действием на фрагментах аорты крысы [22].

Кроме того, к NO-донорным физиологическим производным карнозина можно отнести динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), в которых карнозин является лигандом. “Карнозиновые” ДНКЖ были получены ранее в работе [23]. На модельной системе, содержащей гидропероксид *трет*-бутила, были получены данные о наличии у этих комплексов антиоксидантных и антирадикальных свойств [24].

Цель настоящей работы – более детально изучить антиоксидантное и антирадикальное действие карнозиновых ДНКЖ в условиях, моделирующих перекисное окисление в живых системах.

МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реактивы: гемин, метмиоглобин из скелетных мышц кашалота, *L*-карнозин (в дальнейшем будем называть его просто “карнозин”), 5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-галазиндион (люминол), гидропероксид *трет*-бутила (*t*-ВООН), арахидоновая кислота,

HEPES, NaNO_2 , FeSO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 – все реактивы “Sigma-Aldrich” (США).

ДНКЖ с фосфатными лигандами (ДНКЖ- PO_4^-) синтезировали, как описано в работе [25], пропуская в сосуде Тунберга газообразный NO^{\cdot} через раствор FeSO_4 (5 мМ) в 100 мМ фосфатном буфере (pH 7.0). В результате возникали ДНКЖ, включавшие в себя все введенное железо, NO и анионы фосфата в качестве лигандов. ДНКЖ, связанные с карнозином, получали, добавляя ДНКЖ- PO_4^- к раствору карнозина в молярном соотношении 1 : 2. Образование этих комплексов контролировали с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). На рис. 1 приведены характерные спектры ЭПР фосфатных и карнозиновых ДНКЖ.

Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса. Спектры ЭПР регистрировали при комнатной температуре (25°C) на спектрометре E109E фирмы “Varian” (США). Объем образца, который помещали в резонатор спектрометра – 80 мкл. Образцы перед измерением помещали в газопроницаемые тефлоновые капилляры PTFE 22 (“Zeus Industrial Products”, США). Условия регистрации: СВЧ мощность 10 мВт, СВ частота 9.15 ГГц, амплитуда высокочастотной модуляции 0.1 мГл. Спектры карнозиновых ДНКЖ записывали через 8 мин после смешивания фосфатных ДНКЖ и карнозина в конечной концентрации 4 и 8 мМ соответственно.

Измерение диеновых конъюгатов арахидоновой кислоты. Диеновые конъюгаты – первичные продукты окисления арахидоновой кислоты, индуцированного реакцией metMb с *t*-ВООН, измеряли по величине оптического поглощения при 234 нм. Реакционная смесь содержала 3.3 мМ арахидоновой кислоты, 0.02 мМ миоглобина, 0.06 мМ *t*-ВООН, *L*-карнозин или карнозиновые ДНКЖ в 60 мМ К-фосфатном буфере (pH 7.4). Конечная концентрация как свободного, так и связанного в комплексах карнозина была 0.1 или 1.0 мМ в разных вариантах опытов, ДНКЖ, соответственно, в два раза меньше – 0.05 и 0.5 мМ. FeSO_4 во всех экспериментах добавляли до концентрации, эквивалентной содержанию железа в ДНКЖ. Кинетику образования диеновых конъюгатов регистрировали в течение 80 мин при 37°C.

Люминол-зависимая хемилюминесценция. Образование прооксидантов в реакции metMb или гемина с *t*-ВООН оценивали методом хемилюминесценции, используя в качестве активатора люминол. Регистрацию хемилюминесценции осуществляли на хемилюминесцентном анализаторе Lum-5773 (“DISoft”, Россия). Время от смешения всех компонентов реакционной смеси до регистрации хемилюминесценции не превышало 3 с. Регистрацию кинетики продолжали при постоянном перемешивании и термостатировании при 37°C. Для количественной оценки хемилюминесценции

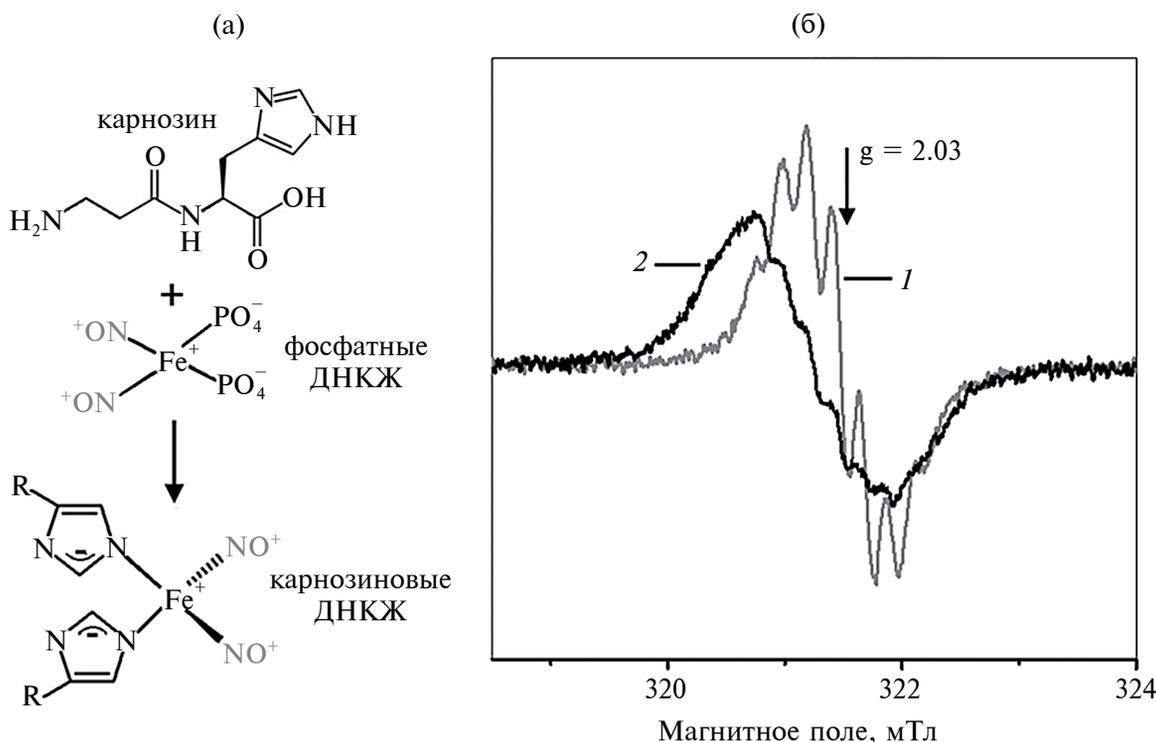
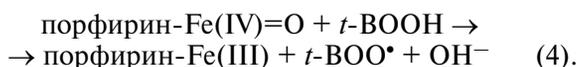
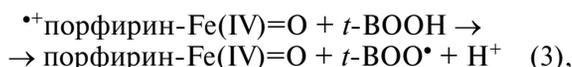
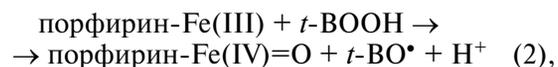
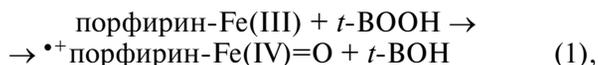


Рис. 1. Превращение ДНКЖ с фосфатными лигандами в карнозиновые ДНКЖ: а – схема образования карнозиновых ДНКЖ при замещении фосфатных лигандов комплексов карнозином; б – спектры ЭПР фосфатных (1) и карнозиновых (2) ДНКЖ.

использовали ее светосумму в течение 2500 с. Светосумму рассчитывали по площади под кинетической кривой. Состав реакционной среды был следующий: 0.02 мМ metMb в 60 мМ фосфатном буфере (рН 7.4), 2 мМ люминола, 0.06 мМ *t*-BOOH. Карнозин, в том числе в составе ДНКЖ, добавляли до конечных концентраций 0.1 или 1 мМ. Концентрация самих ДНКЖ и FeSO₄ составляла 0.05 и 0.5 мМ соответственно, поскольку в комплексе железо координировано с двумя карнозиновыми лигандами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие карнозина и карнозиновых ДНКЖ с прооксидантами, образующимися в реакциях между гемом и гидропероксидом *трет*-бутила. Известно, что взаимодействие гемовых групп с различными гидропероксидами играет важную роль в развитии окислительного стресса [26–28]. В мышечной ткани в таких реакциях может участвовать миоглобин, что может приводить к развитию рабдомиолиза. Антиоксидантное действие карнозина и карнозиновых ДНКЖ изучали в модельной системе, содержащей метмиоглобин и гидропероксид *трет*-бутила (metMb—*t*-BOOH). Считается, что в этих условиях протекают следующие реакции [24, 26]:



В этих реакциях продуцируются такие прооксиданты, как свободные радикалы – производные *t*-BOOH (*t*-BO•, *t*-BOO•), а также перферрильная (•⁺порфирин-Fe(IV)=O) и оксоферрильная (порфирин-Fe(IV)=O) формы гемовой группы.

В наших экспериментах продукцию свободных радикалов и других прооксидантов регистрировали методом люминол-зависимой хемилюминесценции. Конечная концентрация как свободного, так и связанного с ДНКЖ карнозина составляла 0.1 (рис. 2а, 2в) или 1 мМ (рис. 2б, 2г), концентрация самих ДНКЖ и FeSO₄ в образцах была 0.05 или 0.5 мМ соответственно. Представленные на рис. 2 данные показывают, что карнозин и карнозиновые ДНКЖ в значительной степени снижали уровень прооксидантов в исследуемой системе (рис. 2а и 2б, кривые 3 и 5), причем антиоксидантный эффект

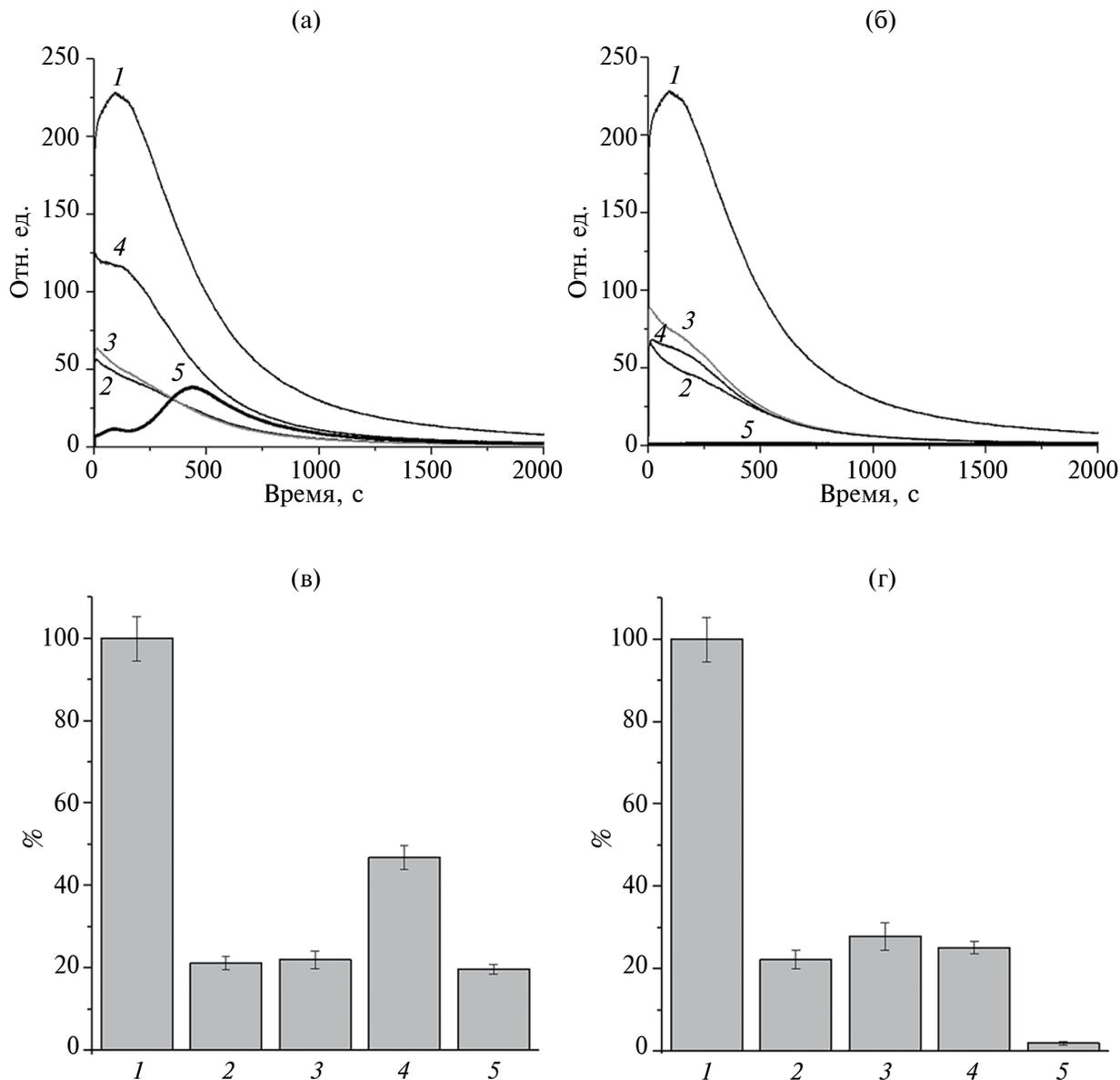


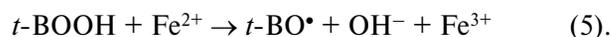
Рис. 2. Влияние карнозина, карнозиновых ДНКЖ и Fe^{2+} на кинетику (а, б) и светосумму (в, г) люминол-зависимой хемилюминесценции (%). За 100% принята светосумма в контрольном образце. Контроль – реакционная смесь без добавок (1), с добавлением: FeSO_4 (2), карнозина (3), карнозина + FeSO_4 (4), карнозиновых ДНКЖ (5).

ДНКЖ превосходил таковой карнозина. Это видно как по снижению максимума выхода хемилюминесценции в присутствии комплексов, так и по смещению кривой вправо (рис. 2а и 2б, кривая 5), то есть появлению выраженной лаг-фазы на этой кривой. При концентрации 1 мМ карнозиновые ДНКЖ полностью подавляли хемилюминесценцию (рис. 2б, кривая 5).

Полученные результаты также представлены в виде светосуммы хемилюминесценции (рис. 2в и 2г). Добавление 0.1 мМ карнозина совместно с ионами Fe^{2+} приводило к уменьшению светосуммы хемилюминесценции на 55% в отличие от 80%-ного снижения при добавлении карнозина и карнозиновых

ДНКЖ (рис. 2в). Карнозиновые ДНКЖ в концентрации 0.5 мМ (1 мМ по карнозину) уменьшают светосумму на 96% (рис. 2г, столбец 5).

Ионы Fe^{2+} добавляли для индукции реакции Фентоновского типа, в которой также продуцируются алкоксильные радикалы:



Нужно отметить, что в реакционной смеси с ДНКЖ ионы железа могут высвобождаются в ходе распада этих комплексов. Однако в экспериментах ионы Fe^{2+} ингибировали люминол-зависимую хемилюминесценцию в реакционной системе

metMb—*t*-VOOH (рис. 2). Действительно, имеются исследования, в которых показано, что Fe²⁺ может восстанавливать радикалы *t*-VO• [29] и в определенных концентрациях действовать как антиоксидант [30].

Данные, представленные на рис. 3, показывают, что при замене metMb гемом карнозин и карнозиновые ДНКЖ также ингибируют хемилюминесценцию, что указывает на их способность перехватывать прооксиданты, образующиеся в реакциях 1–4 при участии свободного гема. Карнозиновые ДНКЖ, как и в системе metMb—*t*-VOOH, были эффективнее свободного карнозина (рис. 3а и 3б, кривые 3 и 5). Следует отметить, что в большинстве экспериментов интенсивность хемилюминесценции в системе metMb — *t*-VOOH была заметно выше, чем в системе с гемом. Вместе с тем, в отличие от системы с metMb, добавление ионов Fe²⁺ к системе гемин — *t*-VOOH приводило к росту интенсивности хемилюминесценции (рис. 3а и 3б, кривые 2). Как и в экспериментах с metMb, конечная концентрация как свободного, так и связанного с ДНКЖ карнозина составляла 0.1 (рис. 3а) или 1 мМ (рис. 3б); концентрация ДНКЖ и FeSO₄ в образцах была 0.05 или 0.5 мМ соответственно.

Наряду с реакциями 1–4 в системе metMb—*t*-VOOH происходит одноэлектронное окисление аминокислотных остатков метмиоглобина перферрильной и оксоферрильной формами гема [27, 28]. В этих условиях образуются ассоциированные с белковой цепью свободные радикалы, которые, по-видимому, вносят существенный вклад в люминол-зависимую хемилюминесценцию. Можно предположить, что Fe²⁺ восстанавливает такие свободные

радикалы, с чем и связано его антиоксидантное действие в системе metMb—*t*-VOOH. С другой стороны, в системе с гемом свободные ионы Fe²⁺ проявляют прооксидантные свойства. С высказанным предположением согласуется тот факт, что карнозин как хелатор ионов железа, влияет на эти процессы. Так, введение в систему гемин—*t*-VOOH совместно с Fe²⁺ карнозина ингибировало хемилюминесценцию (рис. 3а и 3б, кривые 4), тогда как в аналогичном эксперименте в системе metMb — *t*-VOOH, напротив, происходит ее усиление (рис. 2а, 2в). Существенно, что эти эффекты наблюдались при концентрациях карнозина и Fe²⁺ 0.1 и 0.05 мМ соответственно. В присутствии высоких концентраций карнозина и Fe²⁺ в обоих реакционных системах ингибирование хемилюминесценции было почти таким же, как и при действии одного карнозина.

Влияние карнозина и карнозиновых ДНКЖ на перекисное окисление арахидоновой кислоты. Способность карнозина ингибировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) была показана в различных модельных системах [11, 31]. В предыдущих работах было показано, что глутатионовые ДНКЖ также ингибируют ПОЛ [32]. Основываясь на этих фактах, было проведено сравнительное изучение действия карнозина и карнозиновых ДНКЖ на окисление арахидоновой кислоты (омега-6-ненасыщенная жирная кислота), индуцированное прооксидантами, образующимися в реакции metMb с *t*-VOOH. В литературе описаны сходные модельные системы ПОЛ, содержавшие арахидоновую кислоту, metMb и пероксид водорода [28]. На рис. 4 представлена схема цепных реакций перекисного окисления арахидоновой кислоты.

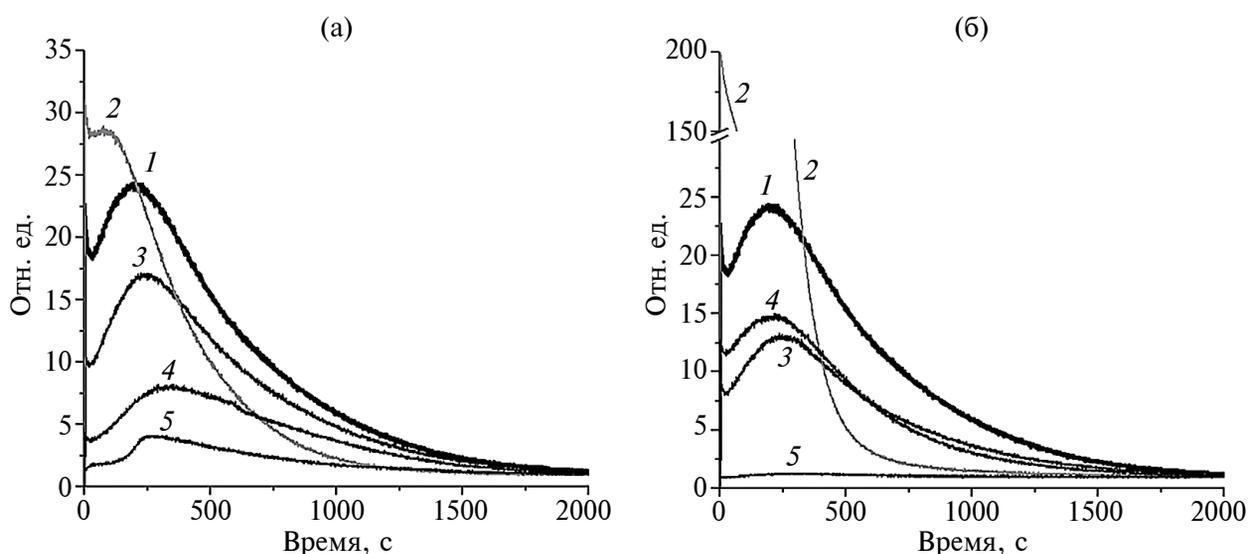


Рис. 3. Влияние карнозина, карнозиновых ДНКЖ и ионов Fe²⁺ на кинетику люминол-зависимой хемилюминесценции (отн. ед.) в системе гемин — *t*-VOOH при различных концентрациях связанного в комплексах карнозина 0.1 (а) или 1 мМ (б). 1 — контроль, реакционная смесь без добавок; 2 — (1) + FeSO₄; 3 — (1) + карнозин; 4 — (1) + карнозин + FeSO₄; 5 — (1) + карнозиновые ДНКЖ.

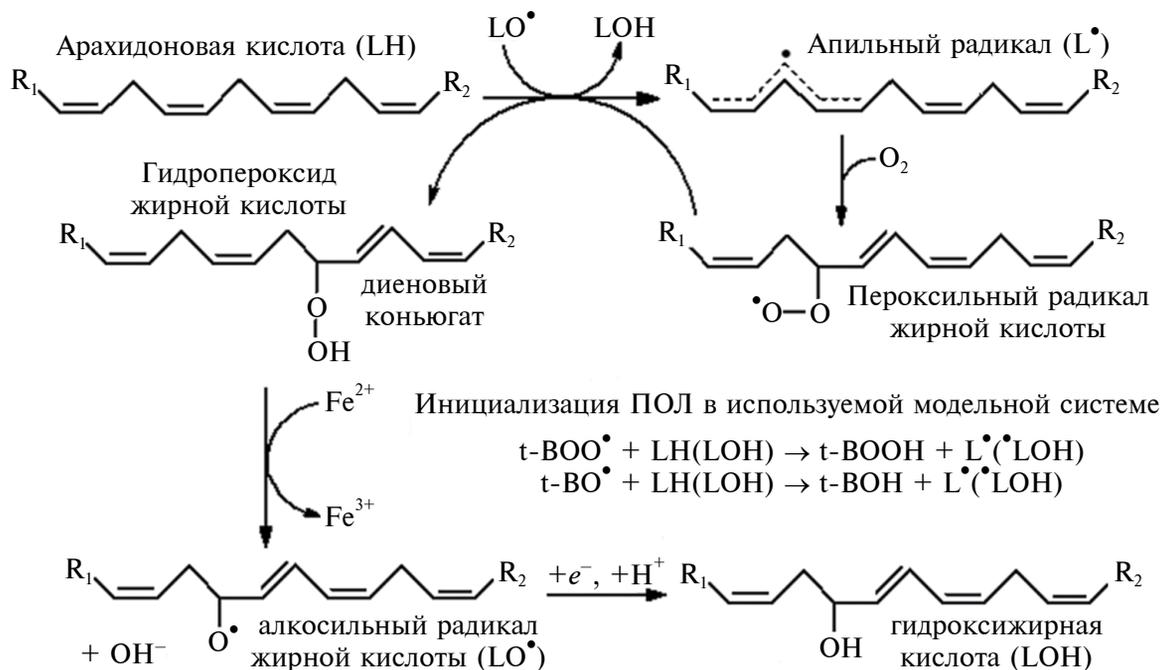


Рис. 4. Схема реакций свободнорадикального перекисного окисления арахидоновой кислоты в системе metMb—*t*-BOOH.

Регистрировали первичные продукты ПОЛ — диеновые конъюгаты, которые являются гидропероксидами липидов с сопряженными двойными связями. Как уже отмечалось, карнозиновые ДНКЖ могут быть источниками ионов Fe^{2+} , которые участвуют в реакциях разветвления цепи ПОЛ (рис. 4). Эта реакция аналогична реакции 5 и приводит к образованию алкоксильного радикала жирной кислоты (LO^\bullet). В связи с этим, были поставлены эксперименты с карнозином и ионами Fe^{2+} , добавленными в концентрации, эквивалентной содержанию железа в ДНКЖ.

Вначале было исследовано действие различных концентраций карнозина и карнозиновых ДНКЖ. Комплексы, добавленные в концентрации 0.1 мМ, практически полностью (на 95%) подавляли образование первичных продуктов ПОЛ (рис. 5а). В то же время ингибирующий эффект карнозина составлял 65%, а в сочетании с ионами железа — 55%. При концентрации карнозина и карнозиновых лигандов ДНКЖ, равной 1 мМ (концентрация ДНКЖ 0.5 мМ), образование диеновых конъюгатов снижалось примерно на 80 % (рис. 5а). На рис. 5б приведены кинетики накопления диеновых конъюгатов в реакционной смеси. Видно, что в присутствии исследуемых соединений уровень первичных продуктов окисления полиненасыщенных жирных кислот перестал расти через 15 мин, в контрольном образце их накопление продолжалось около 80 мин.

На рис. 6 представлены данные о начальной скорости образования диеновых конъюгатов.

Наименьшая скорость была в образцах, содержащих карнозиновые ДНКЖ (примерно в 10 раз меньше, чем в контроле). Карнозин также достаточно эффективно снижал начальную скорость формирования первичных продуктов ПОЛ (рис. 6, 3), тогда как при сочетании карнозина с Fe^{2+} скорость была такая же, как и в контроле (рис. 6, 4). Эти данные коррелируют с уровнем диеновых конъюгатов, образованных к 80 мин реакции. Добавка Fe^{2+} к контрольному образцу увеличивала скорость реакции окисления арахидоновой кислоты на 30% (рис. 6, 2), что подтвердило участие ионов железа в качестве инициаторов ПОЛ в исследуемой системе (рис. 4). Как видно из представленных данных, проокислительный эффект Fe^{2+} снижается как при сочетании его с карнозином, так и при включении в состав ДНКЖ.

Исследование антиоксидантной функции гистиновых дипептидов началось еще в 1980 гг. XX века. За время этих исследований было показано, что гистиновые дипептиды перехватывают супероксидные анион-радикалы ($\text{O}_2^{\bullet -}$) [10], гидроксильный радикал (HO^\bullet) [33], пероксильные радикалы [11, 31], активные производные оксида азота [34], в том числе пероксинитрит (ONOO^-) [35] и хлорноватистую кислоту (HClO) [36]. Однако по антиоксидантной активности гистиновые дипептиды уступают таким эндогенным водорастворимым антиоксидантам, как глутатион и аскорбат [8].

Интересные результаты были получены при изучении окисленного производного карнозина — 2-оксо-карнозина. По антиоксидантной

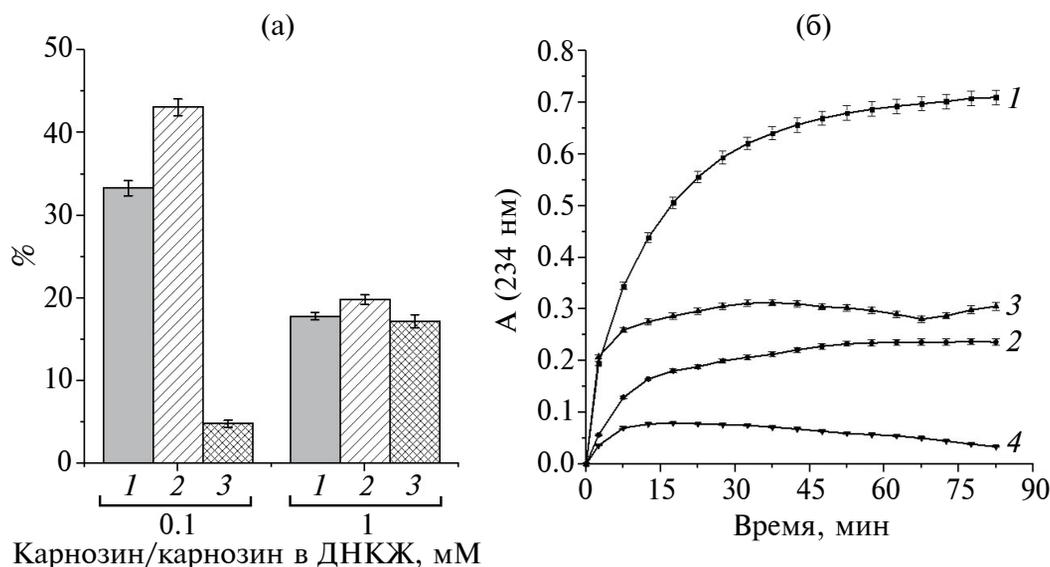


Рис. 5. Образование диеновых конъюгатов в ходе окисления арахидоновой кислоты (3.3 мМ) в системе metMb—*t*-ВООН: а — влияние различных концентраций карнозина (1), карнозина + Fe²⁺ (2) и карнозиновых ДНКЖ (3) на уровень диеновых конъюгатов, образовавшихся за 80 мин реакции (за 100 % принимали уровень в контроле); б — кинетики накопления диеновых конъюгатов в смеси с карнозином, карнозиновыми ДНКЖ и Fe²⁺; контроль, смесь без добавок (1), с добавлением: карнозина (2), FeSO₄ (3), карнозиновых ДНКЖ (4).

активности 2-оксо-карнозин оказался значительно эффективнее глутатиона, аскорбата и самого карнозина [2, 37]. Аналогичная модификация других гистидиновых дипептидов (гомокарнозина и ансерина) также усиливала их антиоксидантные свойства.

Антиоксидантные свойства гистидиновых дипептидов, помимо улавливания свободных радикалов, также могут быть обусловлены способностью имидазольного кольца дипептида связывать ионы редокс-активных металлов [10, 11]. Однако механизмы антиоксидантного действия гистидиновых дипептидов до конца не выяснены. В связи с этим особый интерес представляют ДНКЖ, в лигандную сферу которых входит карнозин [23]. Проведенное ранее изучение антиоксидантной активности карнозиновых ДНКЖ выявило, что эти комплексы перехватывают свободные радикалы, возникающие при распаде *t*-ВООН, и супероксидный анион-радикал, образующийся в ферментативной системе ксантин-ксантиноксидаза [24]. Также показано, что они восстанавливают оксоферрильную форму гемовой группы миоглобина.

Одним из возможных объяснений антиоксидантных свойств ДНКЖ в реакционных системах, содержащих гидропероксид *трет*-бутила, metMb или гемин, может быть взаимодействие этих комплексов с оксоферрильной и перферрильной формами гема.

Для тестирования антиоксидантного действия карнозина и карнозиновых ДНКЖ мы использовали систему перекисного окисления

арахидоновой кислоты, индуцируемую продуктами реакции миоглобина с органической гидроперекисью. Это было обусловлено как физиологической важностью, так и высоким содержанием арахидоновой кислоты (в скелетных мышцах она составляет 15–17% от всех жирных кислот). Кроме того, она входит в состав фосфолипидов плазматических мембран, а нитроарахидоновая

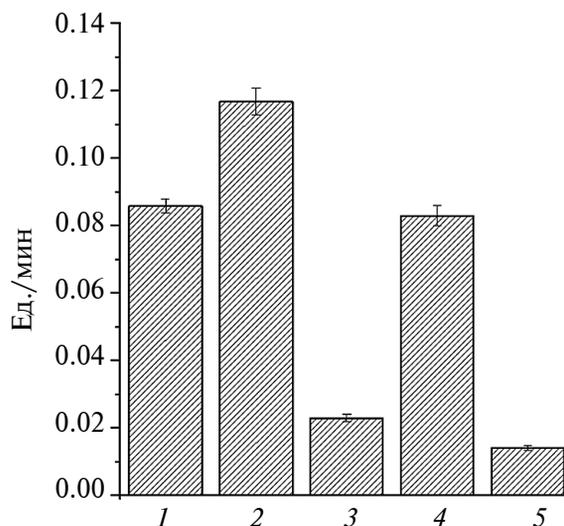


Рис. 6. Начальная скорость образования диеновых конъюгатов (ед./мин) в ходе окисления арахидоновой кислоты в системе metMb — *t*-ВООН. Контроль, реакционная смесь без добавок (1), с добавлением: FeSO₄ (2), карнозина (3), карнозина + FeSO₄ (4), карнозиновых ДНКЖ (5).

кислота, образующаяся в реакции алкилперекисного радикала с оксидом азота (см. реакцию 9), обладает сигнальным действием. Карнозин и миоглобин также содержатся в мышцах в большом количестве.

Было показано антиоксидантное действие как карнозина, так и карнозиновых ДНКЖ в данной системе, причем карнозиновые ДНКЖ оказались более эффективными антиоксидантами, чем карнозин. Также была установлена зависимость антиоксидантного эффекта (подавление образования диеновых конъюгатов) от концентрации исследуемых соединений (рис. 5а). С увеличением концентрации, антиоксидантное действие карнозина возрастало, а у комплексов, наоборот, снижалось. Это может быть связано с высвобождением при распаде ДНКЖ ионов Fe^{2+} , участвующих в генерации свободных радикалов (реакция 5 и реакция разветвления цепи ПОЛ на рис. 4). Хорошо известно, что в системах, моделирующих ПОЛ, ионы Fe^{2+} в низких концентрациях (менее 50 мкМ) проявляют прооксидантные свойства, а при более высоких концентрациях — ингибируют процессы свободно-радикального окисления [30], что согласовывалось с полученными нами данными.

Обнаруженное в присутствии Fe^{2+} в реакционной смеси подавление люминол-зависимой хемилюминесценции карнозином (рис. 3а, 3б) согласовывалось с результатами работы [38], в которой было показано, что карнозин обладал значительной антиоксидантной активностью, особенно в присутствии ионов переходных металлов.

Антиоксидантные свойства карнозиновых ДНКЖ могут быть обусловлены комплексным действием трех составляющих: 1) карнозиновыми лигандами, 2) оксидом азота, 3) ионами Fe^{2+} . Антиоксидантное действие карнозина было неоднократно показано [9–11, 15, 31, 36]. Есть данные, что активным элементом дипептида является имидазольное кольцо гистидина [39]. Также существенный вклад вносит способность карнозина хелатировать Fe^{2+} и Cu^{2+} [10, 11]. Антиоксидантное действие $NO\cdot$ в реакциях ПОЛ показано в различных системах *in vitro* и *in vivo* [29, 40, 41]. Ранее также неоднократно были описаны возможные механизмы антиоксидантного и антирадикального действия ДНКЖ с различными природными лигандами [25, 32, 42]. Так, свободный $NO\cdot$ и NO -лиганды ДНКЖ могут обрывать цепные реакции ПОЛ. Нельзя исключить, что карнозиновые ДНКЖ являются донорами нитроксила (HNO), который также является эффективным антиоксидантом [43, 44]. Известно, что ДНКЖ с азотсодержащим гетероциклическим лигандом 3-метилпиразолом спонтанно высвобождают HNO [45]. Способность $NO\cdot$ и HNO ингибировать ПОЛ можно описать следующими реакциями:



где $LO\cdot$ — алкоксильный радикал липида, $LOO\cdot$ — пероксильный радикал липида, $LONO$ и $LONO_2$ — нитролипиды, $LOONO$ — органический пероксинитрит.

Наконец, в случае карнозиновых ДНКЖ можно предположить еще один дополнительный механизм, связанный с окислением гистидина реакционно-активными интермедиатами, возникающими внутри комплексов при взаимодействии NO -лигандов с кислородом и некоторыми свободными радикалами [32, 46]. Как уже отмечалось выше, в ходе окисления имидазольного кольца карнозина образуется 2-оксогистидин, обладающий высокой антиоксидантной активностью [47].

Высокая концентрация карнозина в тканях с активным окислительным метаболизмом (мышцы и мозг) позволяет предположить, что одна из функций этого дипептида связана с ингибированием свободнорадикальных реакций [10, 12]. Так, показано, что карнозин, гомокарнозин и анзерин замедляют дегенеративные процессы, запускаемые свободными радикалами.

В заключение следует отметить, что наличие антиоксидантной функции у гистидиновых дипептидов послужило предпосылкой для их использования в лечении и профилактики различных заболеваний, связанных с окислительным и карбонильным стрессом (нейродегенеративные и онкологические заболевания, диабет, катаракта) [1, 3, 6, 8, 12]. Полученные в данной работе результаты могут быть полезны для понимания биохимической роли гистидиновых дипептидов. Так, обнаруженное антиоксидантное действие карнозиновых ДНКЖ предполагает существование новых механизмов, посредством которых этот дипептид влияет на окислительную модификацию и свободно-радикальное окисление биомолекул в живых системах. В данном случае можно говорить о том, что имидазол карнозина и NO -лиганд ДНКЖ взаимно усиливают антиоксидантное действие комплекса.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (Russian Science Foundation) № 24-24-00210.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАР-ТОВ. Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Boldyrev A.A., Aldini G., Derave W.* // *Physiol. Rev.* 2013. V. 93. P. 1803–1845.
2. *Ihara H., Kakihana Y., Yamakage A., Kai K., Shibata T., Nishida M., Yamada K.I., Uchida K.* // *J. Biol. Chem.* 2019. V. 294. P. 1279–1289.
3. *Caruso G., Pietro L.D., Cardaci V., Maugeri S., Caraci F.* // *Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov.* 2023. V. 4. e100153.
<https://doi.org/10.1016/j.crphar.2023.100153>
4. *Abe H.* // *Biochemistry (Moscow)*. 2000. V. 65. № 7. P. 757–765.
5. *De Marchis S., Modena C., Peretto P., Migheli A., Margolis F.L., Fasolo A.* // *Biochemistry (Moscow)*. 2000. V. 65. № 7. P. 824–833.
6. *Berezhnoy D.S., Stvolinsky S.L., Lopachev A.V., Devyatov A.A., Lopacheva O.M., Kulikova O.I. et al.* // *Amino Acids*. 2019. V. 51. № 1. P. 139–150.
7. *Ikeda T., Kimura K., Hama T., Tamaki N.* // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 87. P. 179–185.
8. *Abdelkader H., Longman M., Alany R.G., Pierscionek B.* // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. V. 2016. e3240261.
<https://doi.org/10.1155/2016/3240261>
9. *Malathy D., Anusha D., Karthika K., Punnaigai K.* // *J. Clin. Diagn. Res.* 2023. V. 17. № 7. P. FC01–FC05.
10. *Klebanov G.I., Teselkin Yu.O., Babenkova I.V., Lyubitsky O.B., Rebrova O.Yu., Boldyrev A.A., Vladimirov Yu.A.* // *Membr. Cell Biol.* 1998. V. 12. № 1. P. 89–99.
11. *Decker E.A., Livisay S.A., Zhou S.* // *Biochemistry (Moscow)*. 2000. V. 65. № 7. P. 766–770.
12. *Banerjee S., Poddar M.K.* // *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 2020. V. 91. e104239.
<https://doi.org/10.1016/j.archger.2020.104239>
13. *Babizhayev M.A., Yegorov Y.E.* // *Recent. Pat. Drug. Deliv. Formul.* 2015. V. 9. № 1. P. 1–64.
14. *Menini S., Iacobini C., Fantauzzi C.B., Pugliese G.* // *Curr. Med. Chem.* 2020. V. 27. № 11. P. 1744–1763.
15. *Solana-Manrique C., Sanz F.J., Martínez-Carrión G., Paricio N.* // *Antioxidants*. 2022. V. 11. № 5. e848.
<https://doi.org/10.3390/antiox11050848>
16. *Tabakman R., Lazarovici P., Kohen R.* // *J. Neurosci. Res.* 2002. V. 68. P. 463–469.
17. *Kosmachevskaya O.V., Novikova N.N., Yakunin S.N., Topunov A.F.* // *Biochemistry (Moscow)*. 2024. V. 89. Suppl. 1. P. S180–S204.
18. *Berdaweel I.A., Monroe T.B., Alowaisi A.A., Mahoney J.C., Liang I.-C., Berns K.A., et al.* // *Front. Pharmacol.* 2024. V. 14. e1275388.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1275388>
19. *Maugeri S., Sibbitts J., Privitera A., Cardaci V., Di Pietro L., Leggio L. et al.* // *Cells*. 2023. V. 12. № 22. e2592.
<https://doi.org/10.3390/cells12222592>
20. *Bellia F., Amorini A.M., La Mendola D., Vecchio G., Tavazzi B., Giardina B., et al.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2008. V. 43. № 2. P. 373–380.
21. *Bellia F., Lanza V., Naletova I., Tomasello B., Ciuffaglione V., Greco V. et al.* // *Antioxidants*. 2023. V. 12. № 8. e1632.
<https://doi.org/10.3390/antiox12081632>
22. *Bertinaria M., Rolando B., Giorgis M., Montanaro G., Marini E., Collino M., Benetti E., Daniele P.G., Fruttero R., Gasco A.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2012. V. 54. P. 103–112.
23. *Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Gromov S.V., Novikov A.A., Topunov A.F.* // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2017. V. 22. № 1. P. 153–160.
24. *Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Ruuge E.K., Kalenikova E.I., Topunov A.F.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 24. e17236.
<https://doi.org/10.3390/ijms242417236>
25. *Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Timoshin A.A., Vanin A.F., Topunov A.F.* // *Methods Enzymol.* 2008. V. 436. P. 445–461.
26. *Kagan V.E., Kozlov A.V., Tyurina Y.Y., Shvedova A.A., Yalowich J.C.* // *Antioxid. Redox Signal.* 2001. V. 3. № 2. P. 189–202.
27. *Reeder B.J., Svistunenko D.A., Cooper C.E., Wilson M.T.* // *Antioxid. Redox Signal.* 2004. V. 6. № 6. P. 954–966.
28. *Wilson M.T., Reeder B.J.* // *Molecular Aspects of Medicine*. 2022. V. 84. e101045.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.101045>
29. *Mihaljević B., Ražem D.* // *Radiation Physics and Chemistry*. 2003. V. 67. № 3–4. P. 269–274.
30. *Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В.* // *Успехи биологической химии*. 2009. Т. 49. С. 341–388.
31. *Kang J.H., Kim K.S., Choi S.Y., Kwon H.Y., Won M.H., Kang T.C.* // *Mol. Cells*. 2002. V. 13. № 3. P. 498–502.
32. *Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Grachev D.I., Timoshin A.A., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K.* // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2021. V. 15. № 4. P. 313–319.
33. *Tamba M., Torreggiani A.* // *Int. J. Radiat. Biol.* 1999. V. 75. P. 1177–1188.
34. *Nicoletti V.G., Santoro A.M., Grasso G., Vagliasindi L.I., Giuffrida M.L., Cuppari C., et al.* // *J. Neurosci. Res.* 2007. V. 85. № 10. P. 2239–2245.
35. *Fontana M., Pinnen F., Lucente G., Pecci L.* // *Cell. Mol. Life Sci.* 2002. V. 59. № 3. P. 546–551.
36. *Pattison D.I., Davies M.J.* // *Biochemistry*. 2006. V. 45. № 26. P. 8152–8162.
37. *Kasamatsu S., Komae S., Matsukura K., Kakihana Y., Uchida K., Ihara H.* // *Antioxidants*. 2021. V. 10. № 9. e1434.
<https://doi.org/10.3390/antiox10091434>
38. *Mozdzan M., Szemraj J., Rysz J., Nowak D.* // *Basic Clin. Pharmacol Toxicol.* 2005. T. 96. № 5. P. 352–360.

39. Peiretti G., Medana C., Visentin S., Giancotti V., Zunino V., Meineri G. // *Food Chemistry*. 2011. V. 126. № 4. P. 1939–1947.
40. Gorbunov N.V., Tyurina Y.Y., Salama G., Day B.W., Claycamp H.G., Argyros G., Elsayed N.M., Kagan V.E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 244. № 3. P. 647–651.
41. Hummel S.G., Fischer A.J., Martin S.M., Schafer F.Q., Buettner G.R. // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. V. 40. № 3. P. 501–506.
42. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Novikova N.N., Topunov A.F. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 24. e13649. <https://doi.org/10.3390/ijms222413649>
43. Shoman M.E., Aly O.M. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. V. 2016. e4018417. <https://doi.org/10.1155/2016/4018417>
44. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Pugachenko I.S., Novikova N.N., Topunov A.F. // *Antioxidants*. 2022. V. 11. № 10. e2007. <https://doi.org/10.3390/antiox11102007>
45. Tseng Y.-T., Chen C.-H., Lin J.-Y., Li B.-H., Lu Y.-H., Lin C.-H., et al. // *Chem. Eur. J.* 2015. V. 21. P. 17570–17573.
46. Lu S., Chiou T.-W., Li W.-L., Wang C.-C., Wang Y.-M. et al. // *Inorg. Chem.* 2020. V. 59. № 12 P. 8308–8319.
47. Uchida K. // *Amino Acids*. 2003. V. 25. P. 249–257.

Antioxidant Effect of Carnosine and Carnosine Dinitrosyl Iron Complexes at the Conditions Modeling Peroxidation of Biomolecules

E. I. Nasybullina^a, O. V. Kosmachevskaya^a, K. B. Shumaev^a, and A. F. Topunov^{a, *}

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

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

The antioxidant activity of carnosine and of carnosine dinitrosyl iron complexes (DNICs) was studied. A system with metmyoglobin (metMb) or gemin in combination with *tert*-butyl hydroperoxide (t-BOOH) was used as experimental model. Using luminol-dependent chemiluminescence method, it was shown that carnosine and carnosine DNICs effectively diminished the level of prooxidants formed by the interaction of heme groups with t-BOOH. In addition, carnosine and carnosine DNICs inhibited formation of diene conjugates arising during the oxidation of arachidonic acid in metMb—t-BOOH system. In used reaction systems, antioxidant effect of carnosine DNICs was higher than that of carnosine. Antioxidant effect of carnosine also depended on the presence of bivalent iron ions added at the concentration equivalent to their content in DNICs. These results show that the insertion of carnosine as a ligand to nitrosyl iron complexes enhances its antioxidant properties.

Keywords: carnosine, dinitrosyl iron complexes, peroxidation, myoglobin, *tert*-butyl hydroperoxide, arachidonic acid, oxidative modification

УДК 579.61

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ САХАРОЗЫ НА БИОСИНТЕЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА И АЛЬГИНАТА БАКТЕРИАЛЬНЫМ ШТАММОМ *Azotobacter vinelandii* 12 ПРИ РАЗНЫХ УРОВНЯХ АЭРАЦИИ

© 2024 г. А. А. Дудун^{1, 3, *}, Т. К. Махина¹, А. П. Бонарцев², Г. А. Бонарцева¹

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

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

³НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи (ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России), Москва, 123098 Россия

*e-mail: dudunandrey@mail.ru

Поступила в редакцию 13.04.2024 г.

После доработки 23.04.2024 г.

Принята к печати 28.04.2024 г.

В работе показана возможность регуляции синтеза альгинатов (АЛГ) и поли-3-оксибутирата (ПОБ) культурой *Azotobacter vinelandii* 12 в зависимости от увеличения концентрации сахарозы в среде при разных условиях аэрации. При высоком уровне аэрации и при высокой концентрации сахарозы в среде (50 г/л) был достигнут максимальный выход свободного (1.08 г/л) и капсулярного АЛГ (2.26 г/л) в среде. В условиях низкой аэрации синтез свободного АЛГ полностью ингибировался. Максимальное значение синтеза ПОБ отмечено при среднем уровне аэрации и высокой концентрации сахарозы (50 г/л) в среде. Максимальная молекулярная масса (ММ) АЛГ составляла 477 кДа, а максимальная ММ ПОБ была значительно выше и достигала 1479 кДа. При малых концентрациях сахарозы в среде (от 5 до 20 г/л) синтезировался преимущественно капсулярный АЛГ (до 100% от суммы всех полимеров) при всех уровнях аэрации. При увеличении концентрации сахарозы в условиях низкой аэрации синтезировался преимущественно ПОБ (68%), в условиях средней аэрации наблюдалось равное соотношение синтеза ПОБ и капсулярного АЛГ, в условиях высокой аэрации активно синтезировался свободный АЛГ. Показана возможность достижения избирательного синтеза АЛГ или ПОБ культурой *A. vinelandii* 12 за счет изменения условий ее культивирования. Полученные результаты могут быть использованы для разработки направленного биосинтеза целевых продуктов (ПОБ и АЛГ) в биотехнологии.

Ключевые слова: бактерии, биополимеры, *Azotobacter vinelandii* 12, альгинат (АЛГ), поли-3-оксибутират (ПОБ), сахароза, аэрация, молекулярная масса (ММ)

DOI: 10.31857/S0555109924050053 EDN: QTNPМ

Использование биополимеров бактериального происхождения привлекает все больше внимания исследователей в области биотехнологии и медицины. Одними из таких полимеров являются бактериальные биополимеры – поли-3-оксибутират (ПОБ) и альгинат (АЛГ). ПОБ – является представителем семейства полиоксиканоатов (ПОА), которые синтезируются различными бактериями с целью запасаения углерода и энергии [1]. По химической структуре ПОБ представляет собой полукристаллический гидрофобный полиэфир 3-гидроксимасляной кислоты [2]. ПОБ является биоразлагаемым и биосовместимым полимером

и может быть использован в медицине, фармакологии и промышленности [3, 4]. АЛГ представляют собой линейные полисахариды, состоящие из (1-4)-β-D-маннуроносовой кислоты и ее эпимера, α-L-гулууроносовой кислоты [5]. АЛГ широко используется в косметике, пищевой промышленности, медицине и фармацевтике [6]. В настоящее время коммерческие АЛГ получают из морских бурых водорослей [7–9]. Ключевой характеристикой АЛГ является его желирующие свойства, которые тесно связаны с наличием гулууроновых кислот в альгинатной цепи полимера [10]. Принцип гелеобразования альгинатов состоит в ионотропном

связывании гулуруновых мономеров с ионами кальция (Ca^{2+}), что позволяет формировать плотные гидрогели, которые могут использоваться в качестве загустителей, стабилизаторов, эмульгаторов и гелеобразователей или пленкообразователей [11, 12]. Альгинаты, содержащие длинные G-блоки, образуют прочные гели в присутствии Ca^{2+} и имеют более высокую вязкость, неэластичны, в то время как альгинаты, не содержащие G-блоков, образуют менее прочные, эластичные гели в присутствии Ca^{2+} и имеют более низкую вязкость [5]. Однако прочность геля определяется не только простым соотношением M/G в полимерной цепи, но и наличием частоты встречаемости G и M-блоков [13].

В отличие от традиционного АЛГ водорослей особенностью АЛГ бактериального происхождения является не только возможность регуляции его синтеза в условиях ферментации, что дает возможность получать полимер с заданными физико-химическими и биологическими свойствами, но и присутствие в бактериальных АЛГ ацетильных групп в O-2 и O-3 положениях у маннуроновых остатков [14]. Известно, что степень ацетилирования АЛГ влияет на вязкость полимера, взаимодействие с ионами кальция и на активность маннуронат эпимираз и лиаз, что дает дополнительную возможность для более тонкой регуляции физико-химических свойств этого полимера [15, 16]. Между тем физико-химические свойства альгината из водорослей зависят только от условий окружающей среды. Таким образом, можно сказать, что бактериальный АЛГ является более перспективным объектом для практического использования, по сравнению с АЛГ выделенным из водорослей, применяемым в настоящее время в пищевой и фармацевтической промышленности [14]. Микробиологический синтез ПОБ и АЛГ с использованием бактерий рода *Azotobacter* sp. вполне может быть использован для получения этих полимеров, однако без оптимизации самого процесса синтеза выход биополимеров, как правило, не высок [17]. По данным Квальяно с соавт. до оптимизации процесса максимальный выход АЛГ и ПОБ при ферментации *Azotobacter chroococcum* 6В был в пределах от десятых долей грамма до 2 г/л [18]. Большое количество работ было посвящено исследованию регуляции бактериального синтеза ПОБ и АЛГ бактериями рода *Azotobacter* sp. [19–23]. В некоторых была показана роль различных компонентов ростовой среды бактерий, таких как источник углерода и концентрация кальция и фосфата в среде для синтеза этих биополимеров [21–23]. Отдельно следует отметить изучение влияния молекулярного кислорода на синтез АЛГ и ПОБ. К примеру, в работе по культивированию *Azotobacter* sp. показано, что увеличение концентрации молекулярного кислорода способствовало синтезу АЛГ и, наоборот, ингибировало синтез ПОБ [10], что неудивительно, поскольку при увеличении концентрации

кислорода в среде бактериальные клетки синтезируют АЛГ для образования капсулы, защищающей нитрогеназу от инактивации кислородом [24–26]. С другой стороны, в ряде работ по синтезу ПОБ описано, что в условиях лимитации кислорода и избытка источника углерода, а также при повышении уровня НАДФН и ингибировании двух ферментов цитратсинтазы и изоцитратдегидрогеназы, входящих в цикл трикарбоновых кислот, повышается уровень ацетил-КоА, что инициирует синтез ПОБ [27–29].

В предыдущей работе была проведена оценка способности к синтезу альгинатов у бактерий рода *Azotobacter* sp. из коллекции ФИЦ Биотехнологии РАН [30]. По результатам этой оценки было показано, что бактериальный штамм *Azotobacter vinelandii* 12 имел наивысшую продуктивность в отношении синтеза альгинатов по сравнению с другими штаммами из этой коллекции. Оптимизация синтеза АЛГ и ПОБ этим штаммом при использовании полного факторного эксперимента позволило найти ключевые факторы, влияющие на процесс синтеза этих полимеров [31]. При изучении влияния концентраций трех факторов в ростовой среде, а именно: уровня кислорода (интенсивности аэрации), концентрации сахарозы и концентрации фосфатов было определено, что только два фактора: концентрация сахарозы в среде и уровень аэрации оказывали максимальное влияние на биосинтез исследуемых биополимеров.

Целью настоящей работы – определить наилучшее соотношение концентрации сахарозы и уровня аэрации для биосинтеза как АЛГ, так и ПОБ штаммом-продуцентом *Azotobacter vinelandii* 12.

МЕТОДИКА

Материалы. В работе использовали следующие реагенты: ЭДТА, NaOH, компоненты культуральной среды: $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaCO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, цитрат натрия, CaCl_2 , KH_2PO_4 , сахароза, агар-агар, натрий-фосфатный буфер (PBS), альгинат натрия из бурых водорослей. Все реагенты были приобретены в фирме “Sigma Aldrich” (Германия).

Объект исследования. Для биосинтеза АЛГ и ПОБ были использованы бактериальный штамм *A. vinelandii* 12. Штамм был выделен из дерново-подзолистых почв Московской области (Россия) и любезно предоставлен сотрудниками кафедры микробиологии РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. Штамм *A. vinelandii* 12 хранится в Научном центре биотехнологии РАН (Москва, Россия) и используется в исследовании синтеза АЛГ и ПОБ [2, 30]. Основной фенотипической особенностью штамма является то, что при созревании бактериальные клетки приобретают темно-оранжевую окраску, а сами колонии образуют слизь. Бактерии

являются аэробами, грамотрицательны и обладают плеоморфностью [32]. Оптимум роста 20–30°C. Бактерии рода *Azotobacter* sp. выращивали на безазотных средах (твердая среда Эшби и жидкая среда Берка), поскольку бактерии являются diaзотрофами и способны фиксировать молекулярный азот воздуха.

16S анализ. Для подтверждения принадлежности бактериального штамма к виду *Azotobacter vinelandii* был секвенирован ген 16S рРНК. Для этого были выбраны праймеры fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') с помощью инструмента primer-blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, по состоянию на 15 января 2020 г.). Для амплификации гена 16S использовали стандартный набор реагентов для постановки реакции ПЦР; все реагенты были приобретены у компании “Евроген” (Россия). После амплификации на термоциклере T100 (“Bio-Rad, Hercules”, CA, США) ПЦР продукт очищали с использованием набора Cleanup Standard (“Евроген”, Россия). Полученный ампликон 16S секвенировали на оборудовании 3730xl (“ThermoFisher Scientific”, Waltham, MA, США). После секвенирования прочтенные последовательности проверяли на наличие химер и собирали с использованием программного обеспечения DNA Baser Assembler 5.15.0. Для идентификации вида собранный контиг сравнивали с другими генами 16S в базе данных NCBI Genbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, по состоянию на 23 января 2020 г.) с использованием инструмента BLASTN.

Приготовление инокулята. Для поддержания культуры бактерий *A. vinelandii* 12 использовали твердую питательную среду Эшби следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 0.2, $MgSO_4$ – 0.2, NaCl – 0.2, Na_2MoO_4 – 0.006, $CaCO_3$ – 5.0, сахароза – 20, агар-агар – 20. Инокулят *A. vinelandii* 12 выращивали на жидкой среде Берка в качалочных колбах объемом 750 мл (200 мл среды) при 250 об./мин (Innova 43, New Brunswick, США); исходный pH среды: 7.2; температура культивирования 28°C; время культивирования 24 ч, объем вносимого инокулята – 4%.

Биосинтез АЛГ и ПОБ *A. vinelandii* 12 при различных концентрациях сахарозы в среде и разных уровнях аэрации. Для оценки влияния условий культивирования *A. vinelandii* 12 при разных концентрациях сахарозы и уровне аэрации для синтеза АЛГ и ПОБ, использовали жидкую среду Берка. Состав этой среды был ранее описан в работах [30–32]. Для культивирования бактерии *A. vinelandii* 12 pH среды поддерживали в диапазоне 7.0–7.4; температуру культивирования – 28°C, объем вносимого посевного материала – 4%. Культивирование проводили в качалочных колбах емкостью 750 мл, с объемом среды 200 мл. В данной конкретной

работе для аэробной культуры *A. vinelandii* 12 был выбран диапазон изменения аэрации в пределах от 150 до 250 об/мин [10] и при различных концентрациях сахарозы в среде с интервалом 5 г/л от 5 до 50 г/л. Рост бактерий в культуральной среде определяли нефелометрически при 520 нм. Морфологию бактериального штамма исследовали методом световой микроскопии с использованием микроскопа Биомед-1 (“Биомед”, Россия) с цифровой фотокамерой. Для визуализации клеток и альгината окрашивание препаратов проводили 1%-ным фуксином.

Выделение и очистка синтезированных АЛГ и ПОБ. После окончания ферментации биомассу отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 11000 g в течение 30 мин. Выделение АЛГ проводили из культуральной жидкости (свободный АЛГ) и клеточной биомассы (капсулярный АЛГ). Для выделения свободного АЛГ к 1 об. культуральной жидкости добавляли 3 об. охлажденного до –20°C этанола. Полученный осадок собирали и высушивали методом лиофилизации (лиофильная сушка Martin Christ Alpha 1–2 LD plus, Германия). Для выделения капсулярного АЛГ к биомассе после центрифугирования добавляли 45 мл 1 М NaCl с 5 мл 100 мМ ЭДТА, смесь инкубировали в течение 1 ч при 60°C с перемешиванием на орбитальном шейкере (PSU-20i, “Biosan”, Латвия) для полной гомогенизации смеси. Супернатант получали центрифугированием при 11000 g в течение 30 мин. Далее к супернатанту добавляли 3 об. охлажденного этанола, осадок собирали и лиофильно высушивали. На конечной стадии сухие осадки свободного и капсулярного АЛГ снова растворяли в 1 М NaCl, раствор диализовали против 1 л 0.1 М NaCl в течение 30 ч. Для получения свободного и капсулярного АЛГ диализованный раствор снова осаждали 3 об. ледающего этанола и лиофилизировали.

Выделение ПОБ из клеточной биомассы осуществляли экстракцией хлороформом в течение 12 ч при 37°C. Полученный экстракт отделяли от клеточных остатков фильтрацией, затем ПОБ выделяли из хлороформного экстракта осаждением изопропиловым спиртом. Стадию растворения в хлороформе и осаждения ПОБ изопропиловым спиртом повторяли не менее 3 раз, осадок сушили при 60°C.

Определение молекулярных масс (ММ) АЛГ и ПОБ. ММ биополимеров определяли методом вискозиметрии: альгината в водном растворе, ПОБ – в растворе хлороформа. Удельную вязкость рассчитывали по формуле:

$$\eta_{sp} = (t - t_0)/t_0,$$

где t_0 – время истечения растворителя, а t – время истечения раствора полимера. ММ рассчитывали по уравнению Марка–Хоувинка: $[\eta] = K(M)^a$ с коэффициентами для АЛГ [33]:

$$K = 7.3 \times 10^{-5}; a = 0.92;$$

$$[\eta] = 7.3 \times 10^{-5} \times (M)^{0.92}.$$

Для ПОБ [34]:

$$K = 7.7 \times 10^{-5}; a = 0.82;$$

$$[\eta] = 7.7 \times 10^{-5} \times (M)^{0.82},$$

где M – молекулярная масса, $[\eta]$ – вязкость, K и a – константы, величина которых зависит от природы полимера (АЛГ и ПОБ).

Статистический анализ и визуализация. Для статистической оценки данных был реализован непараметрический тест Краскела-Уоллиса с использованием пакета tidyverse в среде R (версия 3.6.3, Lucent Technologies, Murray Hill, США, под кодовым названием “Holding the Windsock”). Полученные данные представляли как среднее ($n = 6$) \pm SD (стандартная ошибка среднего).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

16S Анализ. На основании проведения секвенирования гена 16S рибосомальной РНК была подтверждена принадлежность организма из коллекции лаборатории к бактериальному виду *Azotobacter vinelandii* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/MN977323.1>, по состоянию на 25 февраля 2021 г.).

Рост культуры *A. vinelandii* 12. Культивирование бактериального штамма *A. vinelandii* 12 проводили при трех разных уровнях аэрации и различных концентрациях сахарозы в среде (шаг – 5 г/л) от 5 г/л до 50 г/л. По истечении 72 ч – ферментации, суммарный выход клеточной биомассы во всех опытах значительно различался (рис. 1).

Как видно из рис. 1, во всех вариантах опытов, поставленных при высоком уровне аэрации (250 об/мин), выход биомассы в г/л значительно превосходил эту величину при низких (150 об/мин) и средних уровнях (200 об/мин) аэрации. Бактерии рода *Azotobacter* sp. в первую очередь являются облигатными аэробами [35] и поэтому активно растут при более высоких концентрациях кислорода в среде. Стоит заметить, что максимальный выход биомассы достигал 7 г/л в опытах при высокой аэрации, а затем выходил на плато при значениях сахарозы в среде – 35 г/л. Дальнейшее увеличение концентрации сахарозы в среде не влияло на прирост клеточной биомассы. Снижение уровня аэрации в среде приводило к подавлению роста культуры. Данный факт объяснялся сниженной дыхательной активностью бактериальных клеток в условиях недостатка кислорода и отмечен при всех испытанных концентрациях сахарозы в среде. Таким образом, лимитирование культуры по кислороду приводило к снижению потребности клеток к источнику углерода [36].

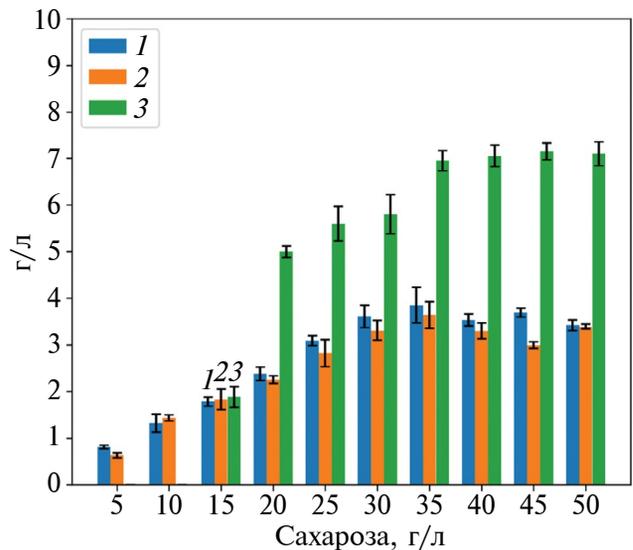


Рис. 1. Рост бактериального штамма *A. vinelandii* 12 при разных уровнях аэрации и концентрации сахарозы в среде от 5 г/л до 50 г/л (время ферментации – 72 ч: 1 – 150 об./мин; 2 – 200 об./мин; 3 – 250 об./мин. Множественное сравнение по Краскелу-Уоллису между всеми группами имеет уровень достоверности $p < 0.05$).

Биосинтез АЛГ. *A. vinelandii* 12 синтезируют АЛГ двух типов – свободные и капсулярные, отличные по функциям и физико-химическим свойствам [31, 32]. Свободный АЛГ синтезируется бактериями и выделяется в среду. Как правило, он имеет низкую молекулярную массу (ММ). Его функция состоит в снижении концентрации кислорода и препятствии диффузии его в культуральной среде [32]. Капсулярный АЛГ выполняет защитную функцию, покрывая клеточную стенку бактерий плотным полисахаридным слоем с образованием капсулы. Этот полимер имел высокую ММ и служил материалом для образования клетками капсулы, необходимых для защиты от неблагоприятных условий, в первую очередь, от действия кислорода на нитрогеназный комплекс бактерий [23].

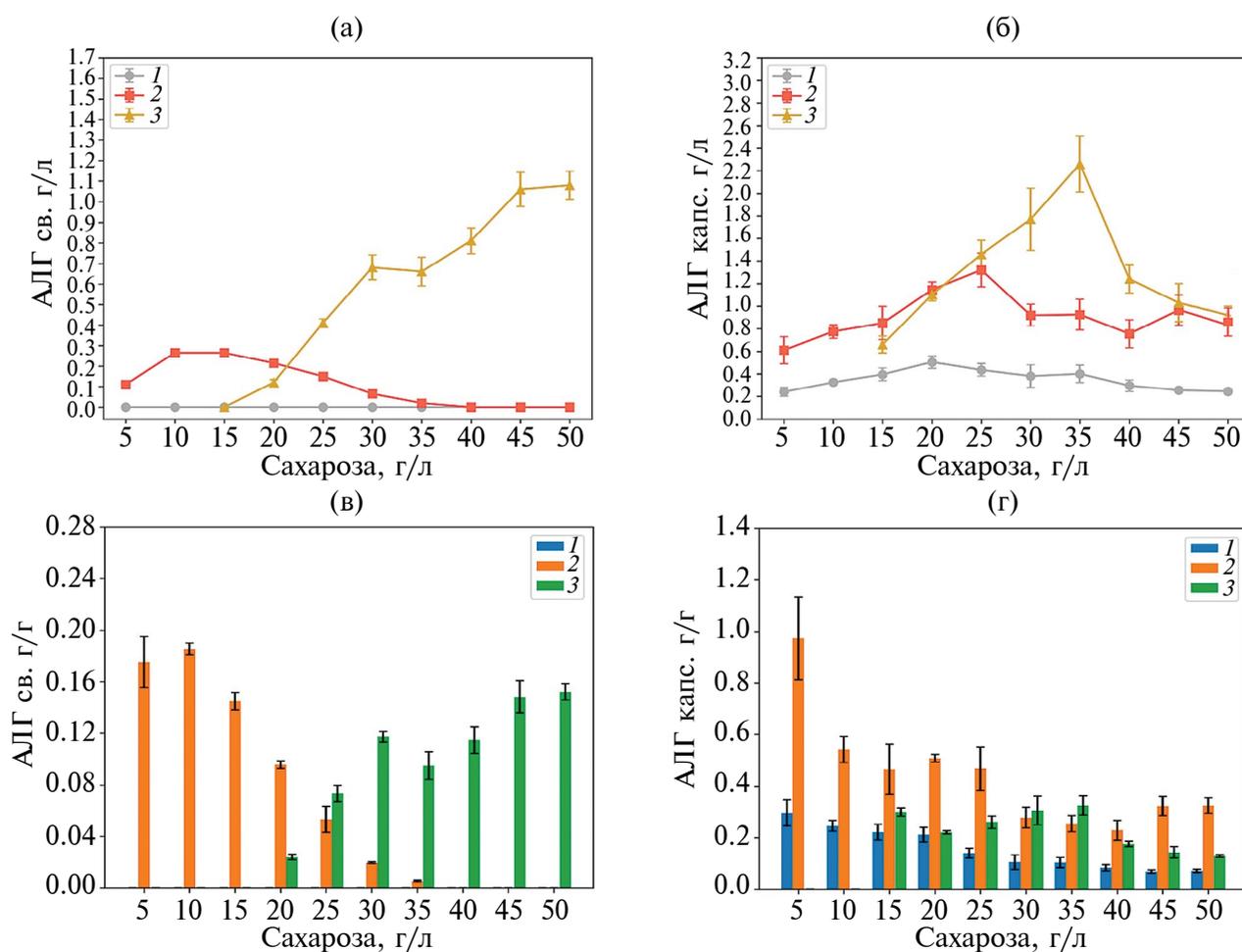
Результаты биосинтеза свободных и капсулярных АЛГ показали, что при увеличенных скоростях перемешивания бактериальных культур, а именно в вариантах, поставленных при высоком уровне аэрации увеличивалась концентрация как свободных, так и капсулярных АЛГ (табл. 1 и рис. 2).

Из результатов, представленных в табл. 1 и на рис. 2а и 2б, можно видеть, что максимальный синтез свободного альгината (1.08 г/л) был получен при высоком уровне аэрации и при максимальной концентрации сахарозы 50 г/л в среде. Вероятно, высокая концентрация кислорода при высоком содержании сахарозы в среде приводила к активному синтезу свободного АЛГ для защиты бактериальных клеток от кислорода [23]. Максимальный синтез свободного альгината именно в данном варианте

Таблица 1. Биосинтез свободных и капсулярных АЛГ бактериями *Azotobacter vinelandii* 12 при разных условиях аэрации

Сахароза, г/л	Свободный АЛГ (низкая аэрация), г/л	Свободный АЛГ (средняя аэрация), г/л	Свободный АЛГ (высокая аэрация), г/л	Капсулярный АЛГ (низкая аэрация), г/л	Капсулярный АЛГ (средняя аэрация), г/л	Капсулярный АЛГ (высокая аэрация), г/л
5	0	0.11	—	0.24	0.61	—
10	0	0.265	—	0.325	0.775	—
15	0	0.265	0	0.395	0.85	0.66
20	0	0.215	0.12	0.505	1.145	1.1
25	0	0.15	0.41	0.435	1,32	1.46
30	0	0.065	0.68	0.38	0.92	1.77
35	0	0.02	0.66	0.4	0.925	2.26
40	0	0	0.81	0.295	0.755	1.24
45	0	0	1.06	0.255	0.965	1.03
50	0	0	1.08	0.245	1.1	0.92

Примечание: — не определено.

**Рис. 2.** Биосинтез свободных (а, г/л) и капсулярных (б, г/л) АЛГ, продуктивность синтеза *Azotobacter vinelandii* 12 свободных (в) и капсулярных (г) АЛГ: 1 – 150 об./мин; 2 – 200 об./мин; 3 – 250 об./мин. Множественное сравнение по Краскелу-Уоллису между всеми группами имеет уровень достоверности $p < 0.05$.

связан с тем, что повышенная концентрация растворенного кислорода увеличивала скорость потребления сахарозы бактериями *Azotobacter* sp. и позволяла более эффективно использовать ее для синтеза свободного АЛГ. По данным Диас-Барреры с соавтр. [37], за счет повышенной дыхательной активности бактерий экспрессия альгинат-лиаз, таких как algL, alyA1, alyA2, alyA3 и algE7 увеличивается. Таким образом, за счет повышенного количества внеклеточных ферментов альгинат-лиаз в среде, способных гидролизовать альгинатные цепи, образуется большое количество низкомолекулярного АЛГ, выделяемого в ферментационную среду [38]. Синтез свободного АЛГ при среднем уровне аэрации достигался лишь при низких концентрациях сахарозы (10 и 15 г/л), что, вероятно, связано с недостатком аэрации и при этом большая часть потребляемой сахарозы уходит на синтез капсулярного АЛГ. С увеличением содержания сахарозы в среде активизируется синтез ПОБ, который, как известно, активно накапливал в клетках как запасное вещество при высоких концентрациях сахарозы в среде и низком уровне аэрации [39]. Бактерии, выращенные при низком уровне аэрации, ни в одном из вариантов не синтезировали низкомолекулярные свободные АЛГ. Данное наблюдение указывает на необходимость присутствия растворенного молекулярного кислорода в среде для биосинтеза свободных АЛГ. Этот факт согласуется с работой чилийских ученых. Так, в работе Диас-Барреры с соавтр. [40] было показано, что увеличение концентрации кислорода в среде увеличивало (примерно в восемь раз) относительную экспрессию гена algL в культуре *Azotobacter vinelandii* ATCC-9046, что свидетельствовало об увеличении активности альгинат-лиазы. При низкой концентрации кислорода в среде, метаболизм бактерий *A. vinelandii* 12 замедлялся, что влияло на способность бактериальных клеток синтезировать в достаточном количестве АЛГ и индуцировать экспрессию генов альгинат-лиаз, ответственных за расщепление длинных полимерных цепей и создание свободных АЛГ. Максимальная продуктивность синтеза свободных альгинатов 0.19 г/г биомассы (рис. 26) отмечена в вариантах с низкими концентрациями сахарозы в среде (от 5–15 г/л) в условиях средней аэрации. В условиях высокой аэрации, напротив, высокая продуктивность (0.15 г свободного АЛГ на 1 г биомассы) отмечалась в вариантах с повышенной концентрацией сахарозы в среде (45–50 г/л).

Результаты синтеза высокомолекулярных капсулярных АЛГ (рис. 26 и 2г) показали, что максимальный синтез, равный 2.26 г/л, был достигнут при высоком уровне аэрации и 35 г/л сахарозы в среде. Синтез капсулярных АЛГ при низких и средних уровнях аэрации был значительно ниже и достигал максимума 0.5 г/л при 20 г/л сахарозы и 1.32 г/л при 25 г/л сахарозы соответственно. Эти результаты показали, что капсулярный АЛГ в первую очередь

играет роль защитного барьера от воздействия кислорода [31] и именно аэрация является ключевым фактором для усиленного синтеза капсулярного АЛГ. В целом, с увеличением концентрации сахарозы в среде, увеличивался и синтез капсулярных АЛГ при всех уровнях аэрации, но пик его максимальный синтез был различен: для низкой аэрации – при концентрации сахарозы 20 г/л, для средней аэрации – при 25 г/л и для высокой – при 35 г/л). Из-за сниженной дыхательной активности бактериальных клеток при низких и средних уровнях аэрации максимальный синтез капсулярного АЛГ начинался раньше, чем в вариантах с высокой аэрацией [25]. Авторы работы [24] также наблюдали, что при низкой концентрации кислорода клеткам *Azotobacter vinelandii* ATCC 9046 не требуется синтезировать большое количество высокомолекулярного капсулярного АЛГ для защиты бактериальных клеток от кислорода. Продуктивность капсулярного АЛГ в культуре *A. vinelandii* 12, рассчитанная на г биомассы (рис. 2г) имела близкие величины с продуктивностью свободных АЛГ, в зависимости от условий аэрации, ее максимум (0.97 г/г биомассы) также отмечен в условиях средней аэрации и низкой концентрации сахарозы в среде (5 г/л).

Биосинтез ПОБ. В опубликованной ранее работе [31] было показано, что именно концентрация сахарозы в среде и уровень аэрации являются ключевыми факторами биосинтеза ПОБ бактериями *A. vinelandii* 12.

Из результатов, представленных на рис. 3а, можно видеть, что максимальное значение синтеза ПОБ (0.99 г/л) отмечено в варианте при среднем уровне аэрации и наибольшей концентрации сахарозы (50 г/л) в среде. При высоком уровне аэрации синтез ПОБ ниже и достигал максимума (0.64 г/л) при 35 г/л сахарозы в среде. Дальнейшее повышение содержания сахарозы в среде (до 50 г/л) значительно снижало общий выход ПОБ. Синтез ПОБ при минимальной аэрации достигал максимума при 30 г/л сахарозы в среде (0.55 г/л) и оставался на этом уровне практически без изменения во всех вариантах эксперимента до 50 г/л сахарозы. Наибольшая продуктивность синтеза ПОБ культурой *A. vinelandii* 12 (рис. 2б) также отмечена при среднем уровне аэрации и с максимумом при концентрации сахарозы в среде 45 г/л (0.30 г/г биомассы). При низком уровне аэрации продуктивность синтеза ПОБ была в два раза ниже, чем при среднем (0.15 г/г биомассы), но ее максимум наблюдался уже при 30 г/л сахарозы в среде и оставался неизменным при 50 г/л сахарозы. Варианты опытов с высокой аэрацией, как и следовало ожидать, показали наименьшую продуктивность синтеза ПОБ по сравнению со средней и низкой аэрацией в 3 и в полтора раза соответственно, а ее максимальный уровень достигал максимума при 35 г/л сахарозы (0.09 г/г биомассы).

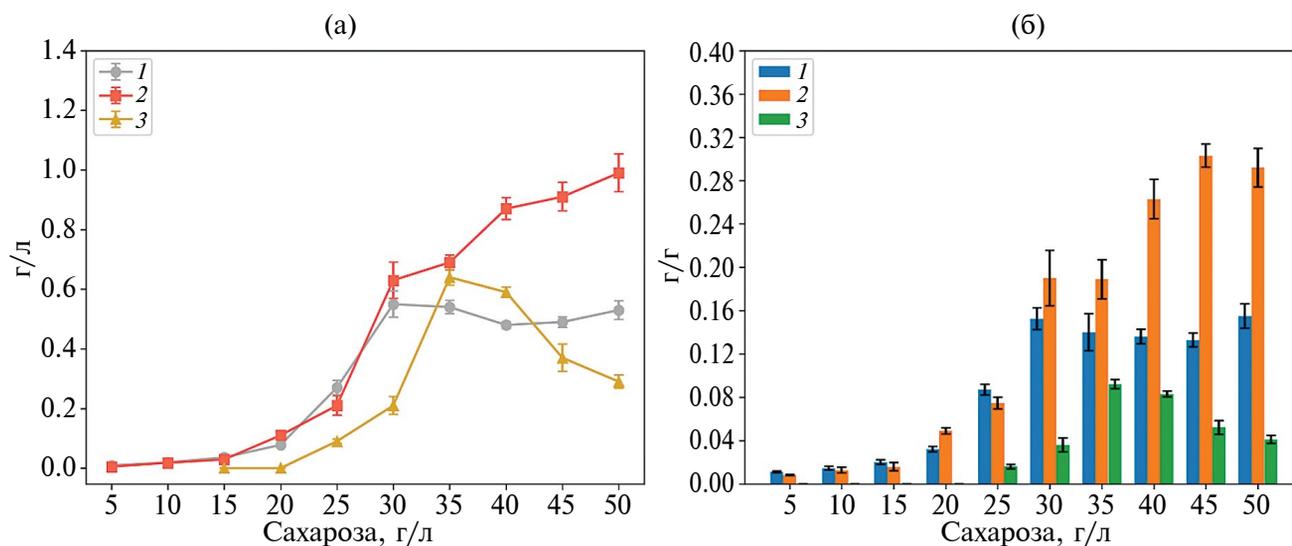


Рис. 3. Биосинтез (а, г/л) и продуктивность (б, г/г) ПОБ бактериальным штаммом *A. vinelandii* 12: 1 – 150 об./мин; 2 – 200 об./мин; 3 – 250 об./мин. Множественное сравнение по Краскелу-Уоллису между всеми группами имеет уровень достоверности $p < 0.05$.

Таким образом, при высоких концентрациях сахарозы и невысоком уровне аэрации (низкий и средний уровень аэрации в данном эксперименте) можно достигать максимальных значений синтеза ПОБ. Полученные результаты синтеза ПОБ позволяют утверждать, что высокое содержание источника углерода в среде является ключевым фактором в накоплении ПОБ бактериями *A. vinelandii* 12 [41]. Аналогичные результаты были получены во многих работах, где добавление в ростовую среду различных источников углерода способствовало накоплению ПОБ, а высокая концентрация растворенного кислорода в среде, наоборот, ингибировала его синтез [29, 42].

Молекулярные массы АЛГ и ПОБ. Методом вискозиметрии были определены молекулярные массы (ММ) полученных биополимеров после ферментации. Все АЛГ (свободные и капсулярные) за исключением капсулярных АЛГ, синтезированных при высокой аэрации, имели низкую ММ в диапазоне от 20 до 80 кДа. Только капсулярные АЛГ, синтезированные при высоком уровне аэрации, при котором и возможно образование плотных капсул, имели ММ свыше 100 кДа (максимум – 477 кДа при 25 г/л сахарозы в среде, рис. 4) [23].

На рис. 4 можно отметить тенденцию снижения ММ капсулярных АЛГ при увеличении концентрации сахарозы в среде. Можно предположить, что клетки бактерий при избытке сахарозы начинают синтезировать ферменты гликозид-гидролазы и лиазы в широком диапазоне, в частности альгинат-лиазы, которые ответственны за расщепление АЛГ [31].

ММ ПОБ, начиная от 30 г/л сахарозы в ростовой среде почти при всех уровнях аэрации была свыше 800 кДа (табл. 2), а максимальный уровень ее отмечен в варианте при высокой аэрации и

30 г/л сахарозы в среде (1479 кДа). Полученные результаты можно объяснить тем, что с увеличением концентрации сахарозы в среде бактерии продолжают находиться в фазе экспоненциального роста [43]. Известно, что во время фазы экспоненциального роста ММ ПОБ увеличивается за счет высокой активности ПОБ-синтазы (*PhbC* ген) и низкой активности ПОБ-деполимеразы (*PhbZ* ген). С наступлением стационарной фазы происходит кратное увеличение активности ПОБ-деполимеразы,

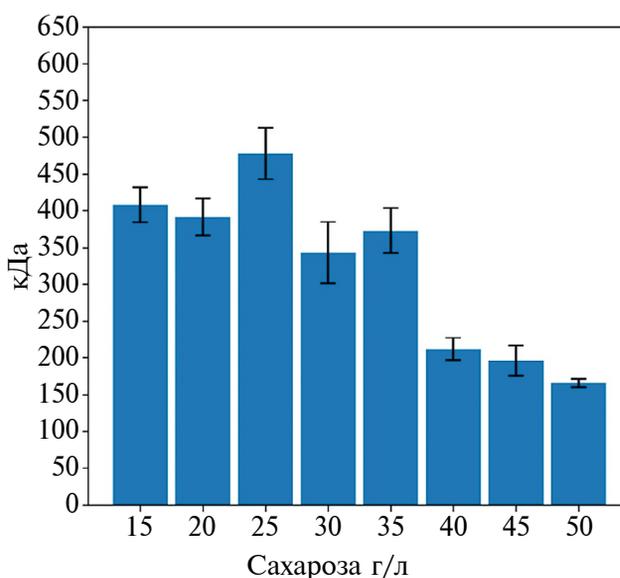


Рис. 4. ММ капсулярных АЛГ, синтезированных при высоком уровне аэрации бактериями *Azotobacter vinelandii* 12 и различных концентрациях сахарозы. Множественное сравнение по Краскелу-Уоллису между всеми группами имеет уровень достоверности $p < 0.05$.

Таблица 2. ММ ПОБ, синтезированных при разных уровнях аэрации бактериями *Azotobacter vinelandii* 12

Концентрация сахарозы, г/л	ММ ПОБ (низкая аэрация), кДа	ММ ПОБ (средняя аэрация), кДа	ММ ПОБ (высокая аэрация), кДа
5	—	26	*
10	718	890	*
15	782	757	—
20	320	1064	—
25	529	1115	534
30	882	828	1479
35	862	968	1104
40	880	808	933
45	897	732	1024
50	955	1081	971

Примечание: — не синтезировался; * не определено

что отражается на снижении ММ ПОБ [44]. Вероятно, клетки *A. vinelandii* 12 при росте на низких концентрациях сахарозы при недостатке источника углерода быстро достигали стационарной фазы роста и использовали накопленный ПОБ как резервный материал, расщепляя его до низкомолекулярных фрагментов, что отражалось на снижении ММ ПОБ. Особенно снижение ММ синтезированного ПОБ характерно для вариантов при высокой аэрации, где удельная скорость потребления сахарозы выше в сравнении с вариантами при низкой и средней аэрации [45].

Исходя из полученных результатов можно заключить, что ключевым параметром, влияющим на изменение ММ АЛГ и ПОБ, является концентрация сахарозы в ростовой среде, а уровень аэрации не был определяющим. При увеличении концентрации сахарозы в среде выше 30 г/л ММ АЛГ снижался из-за увеличения активности альгинат-лиаз в культуральной среде [31]. Напротив, при увеличении концентрации сахарозы в среде ММ ПОБ увеличивается в связи с тем, что в этих условиях отмечалась высокая активность ПОБ-синтазы и продолжался синтез высокомолекулярного ПОБ [44].

Изменение состава синтезированных биополимеров (свободных и капсулярных АЛГ и ПОБ) клетками *A. vinelandii* 12 в условиях изменения концентрации сахарозы в среде при разных уровнях аэрации. Основываясь на результатах по биосинтезу свободных и капсулярных АЛГ (рис. 2) и ПОБ (содержание полимеров в ферментационном объеме среды) (рис. 3) можно оценить процент каждого полимера от их общей суммы (круговые диаграммы, рис. 5). Результаты по составу синтезированных биополимеров клетками *A. vinelandii* 12 при низкой аэрации показали полное отсутствие синтеза низкомолекулярного свободного АЛГ при всех концентрациях сахарозы в ростовой среде (рис. 5а).

При низкой аэрации помимо полного отсутствия свободного АЛГ с увеличением концентрации

сахарозы в среде, наблюдалось снижение синтеза капсулярного АЛГ и увеличение синтеза ПОБ. Преобладание капсулярного АЛГ в составе бактериальных клеток можно наблюдать при концентрациях сахарозы в среде в пределах от 5 до 25 г/л, но начиная от 30 г/л и до максимальных значений концентраций сахарозы (50 г/л) уже преобладали в составе клеток ПОБ. При низких концентрациях сахарозы бактерии синтезировали в основном только капсулярный АЛГ (при 5 г/л сахарозы — 96% АЛГ и 4% ПОБ), но, учитывая слабый рост культуры в этих условиях, данные по выходу этого полимера в г/л значительно ниже, чем в вариантах при средней и высокой аэрации. При увеличении концентрации сахарозы в среде, смещались метаболические пути синтеза в сторону ПОБ (32% АЛГ и 68% ПОБ). Известно, что при избытке источника углерода бактерии *Azotobacter* sp. активно накапливают ПОБ и происходит это в основном только в условиях дефицита молекулярного кислорода [46].

При средней аэрации, в отличие от низкой, бактериальные клетки способны синтезировать свободный АЛГ (рис. 5б), но только в диапазоне от 5 до 35 г/л сахарозы. Максимальный синтез свободного АЛГ (в % от состава биополимеров) клетки был получен в варианте при 10 г/л, и достигал 25% от всех синтезируемых полимеров.

В условиях средней аэрации с увеличением концентрации сахарозы в среде также как и при низкой аэрации наблюдалось снижение синтеза капсулярного АЛГ и увеличение синтеза ПОБ и при этом различие в синтезе полимеров не столь значительно. По составу синтезированных полимеров максимальное содержание капсулярного АЛГ отмечалось при минимальных концентрациях сахарозы, достигая 84%. Максимальное накопление ПОБ в клетках наблюдалось при 40 г/л сахарозы (54%). Результаты позволяют предположить, что с увеличением уровня аэрации происходило смещение синтеза в сторону АЛГ. Только в диапазоне от 40 до 50 г/л сахарозы

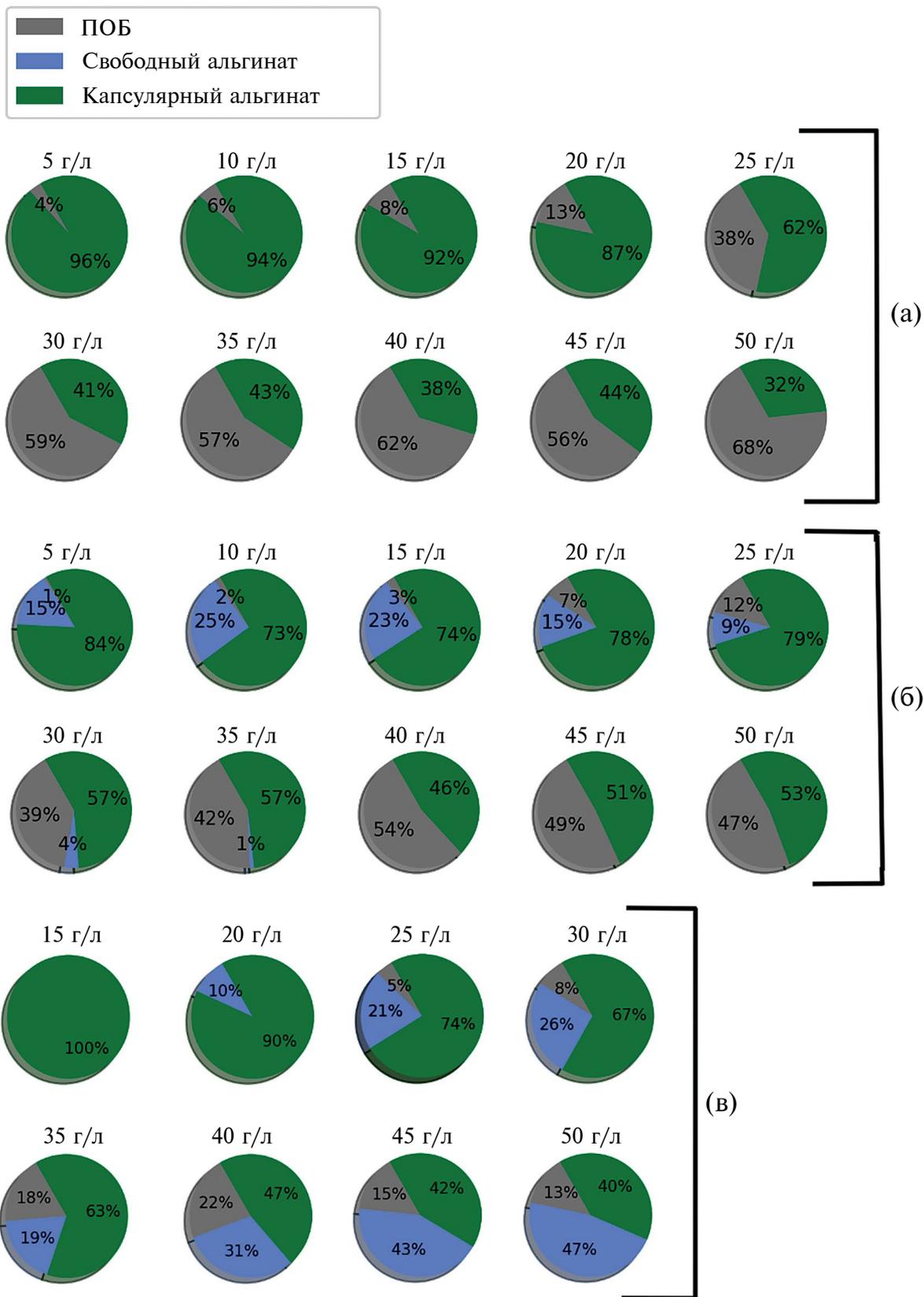


Рис. 5. Состав синтезированных биополимеров (ПОБ и АЛГ) клетками *Azotobacter vinelandii* 12 при различных концентрациях сахарозы в среде и различной аэрации: а – 150 об./мин; б – 200 об./мин; в – 250 об./мин.

в среде бактерии синтезируют капсулярный АЛГ и ПОБ приблизительно в равном соотношении 1 : 1. Вероятно, при низкой аэрации идет синтез только капсулярного АЛГ, а с увеличением доступности источника углерода в среде начинает преобладать синтез ПОБ. При средней аэрации к синтезу капсулярного добавляется синтез низкомолекулярного свободного АЛГ, а преобладания синтеза ПОБ клетками *A. vinelandii* 12 в вариантах с большей концентрацией сахарозы в среде не наблюдалось. Известно, что АЛГ выполняет функцию защиты бактериальных клеток от воздействия избыточной содержания кислорода и с увеличением аэрации в среде вне зависимости от добавления сахарозы в ростовую среду его доля от суммы всех синтезируемых биополимеров увеличивалась [5].

Результаты оценки состава синтезированных бактериальным штаммом *A. vinelandii* 12 биополимеров при высокой аэрации значительно отличались от тех, которые наблюдали в условиях низкой и средней аэрации (рис. 5В).

При концентрации сахарозы 15 г/л бактерии синтезировали только капсулярный АЛГ, при 20 г/л сахарозы – свободный и капсулярный АЛГ без ПОБ. При 25 г/л сахарозы бактерии начинали накапливать небольшое количество ПОБ в клетках и максимальное его количество в общем составе всех биополимеров достигалось в варианте при 40 г/л сахарозы в ростовой среде (22% от всех биополимеров). Как можно видеть из данных, представленных на рис. 5б, увеличение концентрации кислорода в среде в целом критично сказывается на синтезе ПОБ [29]. Это согласуется с данными работы Диас-Барреры с соавтр., где показано, что при увеличении скорости перемешивания ростовой среды с 300 до 600 об./мин при ферментации штамма дикого типа *A. vinelandii* ATCC 9046 увеличивалась скорость переноса кислорода (с 2.5 до 9.5 ммоль/л⁻¹/ч⁻¹, что напрямую отражалось на снижении общей продукции ПОБ этим штаммом [47]. В работе Гарсии с соавтр. [48] также отмечено, что увеличение скорости переноса кислорода приводило к уменьшению восстанавливающей способности соотношения НАДФН/НАДФ⁺ и вследствие этого снижалась продукция ПОБ (рис. 6). Из рис. 5б видно, что содержание свободных и капсулярных АЛГ при высокой аэрации изменялось от преобладания капсулярного АЛГ (от 100% до 47%) в диапазоне от 15 до 40 г/л сахарозы и смещалось в сторону свободного АЛГ при максимальных концентрациях сахарозы 45 и 50 г/л, 43 и 47% соответственно). Это можно объяснить тем, что при высокой аэрации именно капсулярный АЛГ ввиду своей высокой ММ является жизненно необходимым для образования капсулы и выполняет основную функцию защиты бактериальных клеток от избыточного молекулярного кислорода [23]. В условиях высокой аэрации при высокой скорости

потребления сахарозы бактериями (в вариантах от 15 до 30 г/л) синтеза ПОБ практически не отмечалось, что объяснялось дефицитом источника углерода для его синтеза [31].

Таким образом, в работе показана возможность регуляции синтеза биополимеров (альгината и ПОБ) культурой *A. vinelandii* 12 в зависимости от условий культивирования. Показаны изменения в качественном и количественном составе бактериальных полимеров в клетках в зависимости от использования различных концентраций сахарозы в среде при разных условиях аэрации. При содержании в среде сахарозы свыше 35 г/л в условиях высокой аэрации отмечен максимальный рост культуры *A. vinelandii* 12 (7 г/л). Также при высоком уровне аэрации и концентрации сахарозы 50 г/л достигнут максимальный синтез свободного АЛГ (1.08 г/л). При снижении концентрации кислорода в среде синтез свободного альгината снижался и полностью ингибировался в условиях низкой аэрации. Максимальный синтез капсулярного АЛГ (2.26 г/л) также получен в условиях высокой аэрации при 35 г/л сахарозы в среде. Синтез капсулярных АЛГ при низких и средних уровнях аэрации был значительно ниже. Максимальное значение синтеза ПОБ (0.99 г/л) отмечено при среднем уровне аэрации и концентрации сахарозы 50 г/л в среде. Данные по ММ полимеров показали, что только капсулярные АЛГ, синтезированные при высоком уровне аэрации, имели высокую ММ (477 кДа при 25 г/л сахарозы в среде). Снижение уровня аэрации приводило к снижению ММ АЛГ. В отличие от АЛГ ММ ПОБ при всех уровнях аэрации был свыше 800 кДа и максимальный ее уровень отмечен в варианте при высокой аэрации и 30 г/л сахарозы в среде (1479 кДа). Общая оценка изменения качественного состава полимеров (свободный АЛГ + капсулярный АЛГ + ПОБ), синтезируемых бактериями, показала, что при малых концентрациях сахарозы в среде (5–20 г/л) синтезируется преимущественно капсулярный АЛГ при всех уровнях аэрации от 84 до 100% от всех полимеров. В условиях низкой аэрации при увеличении концентрации сахарозы в среде наблюдался преимущественный синтез ПОБ (до 68%). В условиях средней аэрации при увеличении концентрации сахарозы в среде наблюдался синтез ПОБ и капсулярного АЛГ в равных соотношениях, а в условиях высокой аэрации при 45 г/л сахарозы и выше в среде преобладал синтез свободного АЛГ (до 47%). Оценка общего выхода полимеров показала, что с помощью изменения концентрации источника углерода, а именно сахарозы и изменения уровня аэрации можно регулировать биосинтез альгинатов и ПОБ бактериями *A. vinelandii* 12 для достижения избирательного синтеза определенного полимера при полном подавлении синтеза другого. Полученные результаты могут быть использованы для разработки

направленного биосинтеза целевых продуктов (ПОБ и Альгинатов) в промышленности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации ФИЦ Биотехнологии РАН (в части изучения ПОБ и АЛГ биосинтеза), а также была поддержана Российским научным фондом, проект № 23-74-10027 (в части изучения физико-химических свойств синтезированных ПОБ и АЛГ).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАР-ТОВ. Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aldor I.S., Keasling J.D. // *Current Opinion in Biotechnology*. 2003. V. 14. № 5. P. 475–483.
2. Bonartsev A.P., Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Voinova V.V., Mahina T.K., Zharkova I.I. et al // *Acta Naturae*. 2016. T. 8. № 3. С. 77–87.
3. Chen G.-Q., Jiang X.-R. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018. V. 53. P. 20–25.
4. Wang J., Yu J. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2001. V. 26. № 3. P. 121–126.
5. Urtuvia V., Maturana N., Acevedo F., Pena C., Diaz-Barrera A. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 33. № 11. P. 198.
<https://doi.org/10.1007/s11274-017-2363-x>
6. Gacesa P. // *Microbiology*. 1998. V. 144. № 5. P. 1133–1143.
7. Brownlee I.A., Allen A., Pearson J.P., Dettmar P.W., Havler M.E., Atherton M.R., Onsoyen E. // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005. V. 45. № 6. P. 497–510.
8. Remminghorst U., Rehm B.H.A. // *Biotechnology Letters*. 2006. V. 28. № 21. P. 1701–1712.
9. Galindo E., Peña C., Núñez C., Segura D., Espin G. // *Microbial Cell Factories*. 2007. V. 6. № 1. P. 7.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-7>
10. Díaz-Barrera A., Sanchez-Rosales F., Padilla-Córdova C., Andler R., Pena C. // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2021. V. 44. № 6. P. 1275–1287.
11. Rehm B.H.A. // *Alginates: Biology and Applications: Microbiology Monographs*. / Ed. B.H.A. Rehm. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. V. 13. P. 55–71.
12. Rehm B.H.A., Valla S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997. V. 48. № 3. P. 281–288.
13. Gaytán I., Peña C., Núñez C., Córdova M.S., Espín G., Galindo E. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 28. № 8. P. 2731–2740.
14. Flores C., Díaz-Barrera A., Martínez F., Galindo E., Pena C. // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2015. V. 90. № 3. P. 356–365.
15. Franklin M.J., Chitnis C.E., Gacesa P., Sonesson A., White D.C., Ohman D.E. // *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. № 7. P. 1821–1830.
16. Schiller N.L., Monday S.R., Boyd C.M., Keen N.T., Ohman D.E. // *J. Bacteriol.* 1993. V. 175. № 15. P. 4780–4789.
17. Peña C., Campos N., Galindo E. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1997. V. 48. № 4. P. 510–515.
18. Quagliano J.C., Miyazaki S.S. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1999. V. 82. № 3. P. 199–208.
19. Castillo T., García A., Padilla-Córdova C., Díaz-Barrera A., Pena C. // *Electron. J. Biotechnol.* 2020. V. 48. P. 36–45.
20. Parshad J., Suneja S., Kukreja K., Lakshminarayana K. // *Folia Microbiologica*. 2001. V. 46. № 4. P. 315–320.
21. Pozo C., Martínez-Toledo M.V., Rodelas B., González-López J. // *J. Biotechnol.* 2002. V. 97. № 2. P. 125–131.
22. Page W.J., Sadoff H.L. // *J. Bacteriol.* 1975. V. 122. № 1. P. 145–151.
23. Sabra W., Zeng A.P., Deckwer W.D. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. V. 56. № 3–4. P. 315–325.
24. Díaz-Barrera A., Maturana N., Pacheco-Leyva I., Martínez I., Altamirano C. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 44. № 7. P. 1041–1051.
25. Díaz-Barrera A., Gutierrez J., Martínez F., Altamirano C. // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2014. V. 37. № 6. P. 1133–1140.
26. Trujillo-Roldan M.A., Moreno S., Espin G., Galindo E. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004. V. 63. № 6. P. 742–747.
27. Peralta-Gil M., Segura D., Guzmán J., Servín-González L., Espin G. // *Journal of Bacteriology*. 2002. V. 184. № 20. P. 5672–5677.
28. Segura D., Guzman J., Espin G. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. V. 63. № 2. P. 159–163.
29. Díaz-Barrera A., Urtuvia V., Padilla-Córdova C., Peña C. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 46. № 1. P. 13–19.
30. Bonartseva G.A., Akulina E.A., Myshkina V.L., Makhina T.K., Bonartsev A.P. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2017. V. 53. № 1. P. 52–59.
31. Dudun A.A., Akoulina E.A., Zhuikov V.A., Makhina T.K., Voinova V.V., Belishev N.V. et al. // *Polymers*. 2021. V. 14. № 1. P. 131.
<https://doi.org/10.3390/polym14010131>
32. Dudun A.A., Akoulina E.A., Voinova V.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Zhuikov V.A., et al. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. V. 55. № 6. P. 654–659.
33. Martinsen A., Skjåk-Bræk G., Smidsrød O., Zanetti F., Paoletti S. // *Carbohydrate Polymers*. 1991. V. 15. № 2. P. 171–193.
34. Akita S., Einaga Y., Miyaki Y., Fujita H. // *Macromolecules*. 1976. V. 9. № 5. P. 774–780.
35. Nivens D.E., Ohman D.E., Williams J., Franklin M.J. // *Journal of Bacteriology*. 2001. V. 183. № 3. P. 1047–1057.
36. Castillo T., López I., Flores C., Segura D., García A., Galindo E. et al. // *J. Appl. Microbiol.* 2018. V. 125. № 1. P. 181–189.

37. *Díaz-Barrera A., Silva P., Berrios J., Acevedo F.* // Bioresource Technology. 2010. V. 101. № 23. P. 9405–9408.
38. *Flores C., Moreno S., Espín G., Pena C., Galindo E.* // Enzyme and Microbial Technology. 2013. V. 53. № 2. P. 85–91.
39. *Mejia M.A., Segura D., Espin G., Galindo E., Pena C.* // J. Appl. Microbiol. 2010. V. 108. № 1. P. 55–61.
40. *Díaz-Barrera A., Aguirre A., Berrios J., Acevedo F.* // Process Biochemistry. 2011. V. 46. № 9. P. 1879–1883.
41. *Tec-Campos D., Zuñiga C., Passi A., Del Toro J., Tibocho-Bonilla J.D., Zepeda A. et al.* // Metab. Eng. Commun. 2020. V. 11. P. e00132. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2020.e00132>
42. *Page W.J., Knosp O.* // Appl. Environ. Microbiol. 1989. V. 55. № 6. P. 1334–1339.
43. *Millán M., Salazar M., Segura D., Castillo T., Díaz-Barrera A., Peña C.* // Journal of Biotechnology. 2017. V. 259. P. 50–55.
44. *Millán M., Segura D., Galindo E., Peña C.* // Process Biochemistry. 2016. V. 51. № 8. P. 950–958.
45. *Díaz-Barrera A., Martínez F., Guevara Pezoa F., Acevedo F.* // PLoS ONE. 2014. V. 9. № 8. P. e105993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105993>
46. *Castillo T., Heinzle E., Peifer S., Schneider K., Pena C.* // Process Biochemistry. 2013. V. 48. № 7. P. 995–1003.
47. *Díaz-Barrera A., Andler R., Martínez I., Peña C.* // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2016. V. 91. № 4. P. 1063–1071.
48. *García A., Ferrer P., Albiol J., Castillo T., Segura D., Pena C.* // Microbial Cell Factories. 2018. V. 17. № 1. P. 10. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0860-8>

Effect of Different Sucrose Concentrations on the Biosynthesis of Poly-3-Hydroxybutyrate and Alginate by the Bacterial Strain *Azotobacter vinelandii* 12 Under Different Aeration Conditions

A. A. Dudun^{a, c, *}, T. K. Makhina^a, A. P. Bonartsev^b, and G. A. Bonartseva^a

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

^b*Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

^c*Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia*

*e-mail: dudunandrey@mail.ru

Bacteria of the genus *Azotobacter* sp. produce two classes of biologically important biocompatible and biodegradable polymers – polyoxyalkanoates, which are the bacterial reserve, and alginates (ALG), which perform the function of protecting nitrogenase from oxygen. Both polymers are becoming increasingly important for use in bioengineering, pharmaceuticals and medicine, so studies of their biosynthesis and properties are currently highly relevant. The present work shows the possibility of regulating alginate and poly-3-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *A. vinelandii* 12 culture depending on the increase of sucrose concentration in the medium under different aeration conditions. At high aeration and high sucrose concentration in the medium (50 g/L), the maximum yield of free (1.08 g/L) and capsular ALG (2.26 g/L) in the medium was obtained. Under low aeration conditions, the synthesis of free ALG was completely inhibited. The maximum value of PHB synthesis was observed at medium aeration and high concentration of sucrose (50 g/l) in the medium. The maximum molecular weight (MW) of ALG was 477 kDa, while the maximum MW of PHB was much higher, reaching 1479 kDa. At low sucrose concentrations in the medium (5 to 20 g/l), capsular ALG is predominantly synthesized (up to 100% of the sum of all polymers) at all aeration levels. With increasing sucrose concentration, PHB is predominantly synthesized (68%) under low aeration conditions, an equal ratio of PHB and capsular ALG synthesis is observed under medium aeration conditions, and free ALG is actively synthesized under high aeration conditions. This work demonstrates the possibility of obtaining a selective synthesis of ALG or PHB by *A. vinelandii* 12 by modifying its cultivation conditions. The results obtained can be used for the development of directed biosynthesis of target products (PHB and ALG) in biotechnology.

Keywords: bacteria, biopolymers, *Azotobacter vinelandii* 12, alginate (ALG), poly-3-hydroxybutyrate (PHB), sucrose, aeration, molecular weight (MW)

УДК 579.61;579.66;579.67;581.1

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ НА СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ ЗЕЛеноЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Scenedesmus quadricauda*

© 2024 г. Цао Боян¹, О. Б. Чивкунова², А. Е. Соловченко²,
Е. С. Лобакова², А. В. Олескин², *

¹Университет МГУ—Пекинский политехнический институт, Шэньчжэнь, Китай

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

*e-mail: oleskiny@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.03.2024 г.

После доработки 15.04.2024 г.

Принята к печати 26.04.2024 г.

В статье представлены новые данные о влиянии таких нейротрансмиттеров, как серотонин, норадреналин, дофамин, гистамин и ацетилхолин на жирнокислотный и пигментный состав зеленой микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. K-1149. Было установлено, что ацетилхолин и, в меньшей степени, гистамин увеличивали общее содержание жирных кислот в клетках *S. quadricauda*, тогда как серотонин и дофамин снижали их содержание. Ацетилхолин, гистамин и норадреналин увеличивали процентное содержание полиненасыщенных жирных кислот; напротив, серотонин и дофамин увеличивали долю насыщенных жирных кислот. Ацетилхолин и, в меньшей степени, норадреналин увеличивали общее содержание хлорофилла на 1 г сухого веса у *S. quadricauda*, в то время как гистамин снижал содержание хлорофилла. Гистамин также увеличил соотношения хлорофилл *a* : хлорофилл *b* и каротиноиды/хлорофилл, которые снижались под влиянием дофамина. Влияние нейротрансмиттеров на состав жирных кислот микроводорослей и пигменты фотосинтетического аппарата можно рассматривать с точки зрения продолжающегося химического взаимодействия между микроводорослями и другими компонентами водной экосистемы, которые, как известно, продуцируют нейротрансмиттеры.

Ключевые слова: нейромедиаторы, ацетилхолин, гистамин, норадреналин, дофамин, серотонин, жирные кислоты, ПНЖК, хлорофилл, микроводоросли

DOI: 10.31857/S0555109924050064 EDN: QTJSYO

Нейротрансмиттеры — сигнальные молекулы, вырабатываемые нервными клетками, которые воздействуют на другие нервные клетки, отделенные от них синаптическими щелями. Настоящая работа посвящена одной из важнейших подгрупп нейротрансмиттеров — биогенным аминам, в том числе катехоламинам (дофамину и норадреналину), серотонину (5-гидрокситриптамину), гистамину, а также ацетилхолину. По данным литературы, многие нейротрансмиттеры выполняют коммуникативные и регуляторные функции у различных видов животных, растений, грибов и простейших [1, 2] в естественных средах обитания, в том числе в водоемах. Водные экосистемы также содержат фитопланктон, включая зеленые микроводоросли. Поскольку микроводоросли находились в контакте с организмами, продуцирующими нейротрансмиттеры (растениями, микроорганизмами и др.),

в течение многих миллионов лет биологической эволюции, представляется вероятным, что микроводоросли адаптировались к нейротрансмиттерам и демонстрируют специфические реакции на них. Проверка этого предположения послужила основанием для проведения настоящей работы, направленной на изучение воздействия нейротрансмиттеров на широко распространенный и биотехнологически перспективный вид микроводорослей *Scenedesmus quadricauda*.

По данным литературы, ацетилхолин стимулировал рост зеленых микроводорослей *Chlorella* spp. [3, 4]. Он также способствовал накоплению моносахаридов и водорастворимых белков у *C. vulgaris* [4] и синтезу липидов у *C. sorokiniana* [3].

Ранее в работах авторов [5, 6] было установлено, что серотонин способствовал накоплению биомассы в культуре *C. vulgaris* в концентрации 10 мкМ,

но не 1 и не 100 мкМ. Концентрации дофамина 1 и 10 мкМ способствовали росту *S. vulgaris*, в то время как стимуляция не происходила при 100 мкМ дофамина. Норадrenalин незначительно стимулировал рост *S. vulgaris*, а гистамин (1 и 10 мкМ) оказывал значительное стимулирующее действие. Низкие концентрации тестируемых нейротрансмиттеров также способствовали накоплению биомассы *Scenedesmus quadricauda* [5, 6].

Цель настоящей работы — исследование влияния нейротрансмиттеров на состав жирных кислот и компоненты фотосистем пресноводной зеленой одноклеточной водоросли *S. quadricauda* штамм К-1149. Кроме того, представлены данные о воздействии ацетилхолина на динамику роста тестируемой микроводоросли (как указано выше, остальные нейротрансмиттеры были ранее изучены в авторских работах в плане ростовых эффектов).

МЕТОДИКА

Объект исследования и условия культивирования. Штамм *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. К-1149 (получен из коллекции микробиологических культур отдела микробиологии биологического факультета Московского государственного университета, доставлен из Scandinavian Culture Collection of Algae and Protozoa Копенгагенского университета, ССАР) асептически культивировали в 250 мл колбах при интенсивности освещения 65 мкмоль фотонов ФАР $\text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ с постоянной азацией атмосферным воздухом посредством барботера при 24°C в модифицированной среде Тамия [5, 6]. В качестве инокулята использовали культуру на логарифмической фазе роста, разбавленную средой до конечной плотности 0.30×10^6 кл. см^{-3} , что соответствовало оптической плотности (OD) 0.06 ± 0.1 при λ 750 нм. Культуру выращивали до достижения стационарной фазы (6 сут культивирования). Выбранные точки для оценки роста 1.5, 3, 4.5 и 6 сут соответствовали лаг-фазе, ранней экспоненциальной фазе, поздней экспоненциальной фазе и стационарной фазе соответственно.

В экспериментальные системы, в которых водоросли росли в присутствии нейротрансмиттеров вносили 1, 10 или 100 мкМ гидрохлоридов ацетилхолина, дофамина, гистамина, норадrenalина и серотонина, которые добавлялись при инокуляции в виде свежеприготовленных водных растворов (ранее было показано, что дополнительное добавление нейротрансмиттеров в процессе роста культуры не вызывает дополнительных эффектов [7]); в контроль добавляли равный объем воды при инокуляции. Все нейротрансмиттеры были аналитического качества (“Sigma”, США).

Клетки микроводорослей подсчитывали в камере Горяева (в пересчете на 1 мл объема культуры). В некоторых экспериментах использовали

калибровочную кривую для оценки количества клеток в культурах на основе значений оптической плотности при 750 нм. Значения оптической плотности измеряли с помощью спектрофотометра СФ-56 (АО “ЛОМО”, Россия). Каждый эксперимент по регистрации влияния нейромедиаторов на рост культуры, жирнокислотный состав липидов и состав фотопигментов в контроле и при добавлении нейротрансмиттеров повторялся от четырех до пяти раз, на графиках и в таблицах представлены средние значения и стандартные квадратичные отклонения.

Анализ жирнокислотного состава липидов и компонентов фотосистемы *S. quadricauda*. В работе был использован метод, описанный в работе [8]. Культуры в стационарной фазе (6-сут культивирования) роста центрифугировали, осадок гомогенизировали в смеси хлороформ–метанол 2 : 1 об./об. (10 мл) и экстрагировали липидную фракцию, содержащую также пигменты. Хлорофиллы *a* и *b* определяли спектрофотометрически с использованием коэффициентов поглощения в хлороформе [9]. Анализ липидов и определение жирных кислот проводили методом газовой хроматографии [10]. Метилловые эфиры жирных кислот были разделены и идентифицированы по временам удерживания стандартных соединений (“Supelco”, США) и по характерным масс-спектрам, полученным с помощью газового хроматографа “Agilent 7890”, оснащенного 30-метровой капиллярной колонкой “HP5MS UI”, соединенной с масс-селективным детектором “Agilent 5970” (“Agilent”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние ацетилхолина на рост *S. quadricauda*. Поскольку в ранее опубликованных статьях не были представлены результаты влияния ацетилхолина на накопление биомассы, они включены в настоящую работу (рис. 1). При концентрации 10 мкМ ацетилхолин приводил к умеренному, но статистически достоверному увеличению выхода биомассы *S. quadricauda*, согласно данным о количестве клеток в культуре водорослей к концу периода роста культуры (6 сут). Стимуляция была незначительной как при 1 мкМ, так и при 100 мкМ ацетилхолина.

Влияние нейротрансмиттеров на жирнокислотный состав липидов *S. quadricauda*. Многие микроводоросли, включая *Scenedesmus* spp., *Nannochloropsis* spp., *Chlorella vulgaris*, *Nitzschia* spp., характеризуются высоким содержанием липидов, и эти липиды представляют потенциальный биотехнологический интерес, так как включают триацилглицериды [11–13]. Их метанолиз или этанолиз приводит к образованию смеси сложных эфиров жирных кислот, составляющих биодизельное топливо. Кроме того, структурные липиды микроводорослей богаты

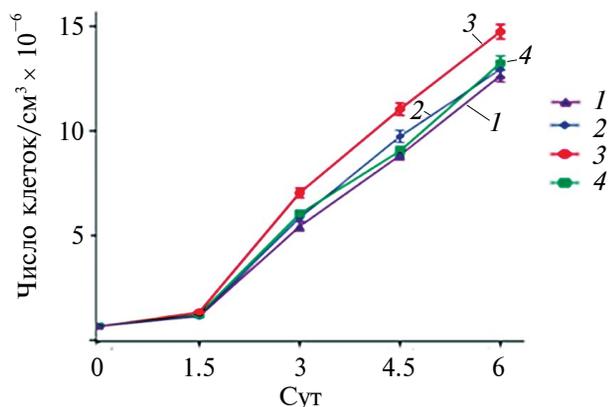


Рис. 1. Динамика роста культуры *S. quadricauda* в присутствии ацетилхолина (АХ) и без него. 1 — контроль; 2 — 1 мкМ АХ; 3 — 10 мкМ АХ; 4 — 100 мкМ АХ.

полиненасыщенными жирными кислотами, применяемыми в фармацевтической и косметической индустрии. Исследование синтеза липидов в микроводорослях и поиск химических агентов, которые могут стимулировать синтез жирных кислот и оптимизировать их состав, имеют биотехнологическое значение. Выявление нейротрансмиттеров, которые активны при низких концентрациях,

позволило бы экономичным образом оптимизировать состав жирных кислот в биотехнологически полезных водорослях, учитывая незначительную цену используемых микромолярных количеств нейротрансмиттеров.

Ацетилхолин. В табл. 1 приведены концентрации различных жирных кислот в пересчете на 1 г сухого веса в контрольных образцах и образцах культуры *S. quadricauda*, выращенной с ацетилхолином. Из табл. 1 можно сделать следующие выводы.

— Ацетилхолин в концентрациях 10 и 100 мкМ увеличивал содержание жирных кислот в клетках на 65 и 58% соответственно, что согласовывалось с данными литературы о других микроводорослях, относящихся к роду *Chlorella* [3, 4].

— Ацетилхолин увеличивал процентное содержание таких полиненасыщенных жирных кислот, как линолевая и α -линоленовая кислоты на 56 и 27% соответственно.

— Ацетилхолин уменьшал процентное содержание всех насыщенных (миристиновой, стеариновой и пальмитиновой кислот) и некоторых мононенасыщенных (миристолеиновой и пальмитолеиновой) жирных кислот.

Гистамин. Из результатов, представленных в табл. 2 можно заключить, что

Таблица 1. Содержание жирных кислот в культурах *S. quadricauda*, культивируемых с ацетилхолином (АХ) или без него

Жирная кислота	Содержание, %			
	Контроль	АХ, 1 мкМ	АХ, 10 мкМ	АХ, 100 мкМ
Миристиновая к-та 14:0	0.54 ± 0.05	0.39 ± 0.04	0.27 ± 0.04	0.25 ± 0.03
Миристолеиновая к-та 14:1	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01
Пентадекановая к-та 15:0	1.61 ± 0.09	1.37 ± 0.08	1.22 ± 0.08	1.27 ± 0.09
15:1	2.46 ± 0.14	2.16 ± 0.13	2.22 ± 0.14	2.37 ± 0.13
Пальмитиновая к-та 16:0	18.68 ± 0.23	16.96 ± 0.20	14.46 ± 0.19	12.94 ± 0.20
Пальмитолеиновая к-та 16:1	6.25 ± 0.08	5.67 ± 0.08	4.83 ± 0.06	4.09 ± 0.07
16:2	2.64 ± 0.02	3.78 ± 0.03	2.90 ± 0.02	2.25 ± 0.02
16:3	8.21 ± 0.39	9.10 ± 0.40	11.31 ± 0.39	9.61 ± 0.40
16:4	8.00 ± 0.09	7.31 ± 0.08	7.06 ± 0.08	9.34 ± 0.09
Стеариновая к-та 18:0	0.90 ± 0.07	0.64 ± 0.07	0.37 ± 0.04	0.32 ± 0.04
Олеиновая к-та 18:1	10.35 ± 0.09	11.27 ± 0.10	9.42 ± 0.08	10.59 ± 0.09
Линолевая к-та 18:2	10.67 ± 0.08	13.64 ± 0.07	17.08 ± 0.10	12.13 ± 0.10
α -Линоленовая к-та 18:3	26.50 ± 1.0	27.56 ± 1.1	28.75 ± 1.1	34.09 ± 1.0
Суммарное содержание жирных кислот, мг/г сухого веса (на 6 сут)	75.10 ± 4.8	78.56 ± 4.9	123.69 ± 5.1	118.70 ± 5.0

Примечание: в таблицу не были включены данные о некоторых минорных жирных кислотах, например, о процентном содержании вакценовой (18:2), γ -линоленовой (18:3) и 20:1 кислот.

— гистамин в концентрациях 1 и 10 мкМ незначительно (максимум на 13% при 1 мкМ) увеличивал суммарное содержание жирных кислот в клетках;

— гистамин во всех тестированных концентрациях несколько увеличивал процентное содержание некоторых полиненасыщенных жирных кислот (16:2, 16:3, 16:4 и α -линоленовой кислоты);

— гистамин несколько уменьшал процентное содержание всех мононенасыщенных и особенно насыщенных кислот; например, процентное содержание стеариновой и миристиновой кислот было снижено на 45 и 42% соответственно при концентрации гистамина 1 мкМ.

Серотонин. Серотонин отличался по своему действию от ацетилхолина и гистамина (табл. 3).

— Серотонин в концентрациях 10 и 100 мкМ снижал (на 16 и 12% соответственно) общее содержание жирных кислот в клетках *S. quadricauda*.

— Концентрация серотонина 10–100 мкМ незначительно снижала процентное содержание линолевой и α -линоленовой кислот при таком же незначительном увеличении процентного содержания мононенасыщенных жирных кислот.

— Серотонин (1–10 мкМ) заметно увеличивал процентное содержание насыщенных жирных кислот. Например, содержание миристиновой и

стеариновой кислот было повышено на 52 и 86% соответственно при концентрации серотонина 1 мкМ.

Дофамин.

— Дофамин в концентрациях 10 и особенно 100 мкМ резко снижал общую концентрацию жирных кислот в клетках *S. quadricauda* (табл. 4).

— Среди полиненасыщенных жирных кислот, дофамин уменьшал процентное содержание α -линоленовой и увеличивал таковое линолевой кислоты; содержание 16:3 и 16:4 было снижено;

— Те же концентрации дофамина существенно увеличивали процентное содержание мононенасыщенных и особенно насыщенных жирных кислот; например, содержание стеариновой и пальмитиновой кислот увеличивалось на 81 и 54% при 10 мкМ дофамина, по сравнению с контролем.

Норадrenalин. Как и дофамин, норадrenalин относится к катехоламинам; только одна гидроксигруппа в боковой цепи отличает норадrenalин от дофамина. Тем не менее, норадrenalин отличался от дофамина влиянием на зеленые микроводоросли. Ранее было установлено, что, по сравнению с дофамином, норадrenalин оказывал значительно более слабое стимулирующее действие на рост *S. quadricauda* [6], а также *Chlorella vulgaris* [5, 6]. По результатам настоящей работы (табл. 5):

Таблица 2. Содержание жирных кислот в культурах *S. quadricauda*, культивируемых с гистамином (Гис) или без него

Жирная кислота	Содержание, %			
	Контроль	Гис, 1 мкМ	Гис, 10 мкМ	Гис, 100 мкМ
Миристиновая к-та 14:0	0.60 ± 0.04	0.39 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.45 ± 0.04
Миристолеиновая к-та 14:1	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.07 ± 0.01
Пентадекановая к-та 15:0	1.62 ± 0.11	1.47 ± 0.12	1.51 ± 0.11	1.41 ± 0.11
15:1	1.63 ± 0.12	1.17 ± 0.10	1.30 ± 0.10	1.62 ± 0.11
Пальмитиновая к-та 16:0	18.45 ± 0.59	14.97 ± 0.55	15.42 ± 0.54	16.42 ± 0.56
Пальмитолеиновая к-та 16:1	3.55 ± 0.03	3.11 ± 0.02	3.00 ± 0.02	3.18 ± 0.03
16:2	1.22 ± 0.08	1.50 ± 0.09	1.46 ± 0.08	1.52 ± 0.07
16:3	5.70 ± 0.31	4.69 ± 0.28	6.62 ± 0.30	6.25 ± 0.31
16:4	13.80 ± 0.40	17.07 ± 0.45	16.04 ± 0.41	15.35 ± 0.40
Стеариновая к-та 18:0	1.10 ± 0.07	0.60 ± 0.04	0.61 ± 0.04	0.71 ± 0.05
Олеиновая к-та 18:1	9.32 ± 0.48	7.26 ± 0.49	7.25 ± 0.45	7.77 ± 0.48
Линолевая к-та 18:2	9.23 ± 0.39	9.48 ± 0.44	9.44 ± 0.43	9.94 ± 0.45
α -Линоленовая к-та 18:3	31.90 ± 1.6	36.59 ± 1.7	35.30 ± 1.5	33.74 ± 1.4
Суммарное содержание жирных кислот, мг/г сухого веса	76.90 ± 4.7	86.87 ± 5.0	85.95 ± 4.9	83.90 ± 4.7

Примечание: в эту таблицу не включены данные о некоторых минорных жирных кислотах, например, о процентном содержании вакценовой (18:2), γ -линоленовой (18:3) и 20:1 кислот.

Таблица 3. Содержание жирных кислот в культуре *S. quadricauda*, выращиваемой с серотонином (5-НТ) или без него

Жирная кислота	Содержание, %			
	Контроль	5-НТ, 1 мкМ	5-НТ, 10 мкМ	5-НТ, 100 мкМ
Миристиновая к-та 14:0	0.48 ± 0.04	0.73 ± 0.06	0.63 ± 0.05	0.48 ± 0.05
Миристолеиновая к-та 14:1	0.15 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.15 ± 0.01
Пентадекановая к-та 15:0	1.30 ± 0.08	1.38 ± 0.08	1.16 ± 0.10	1.30 ± 0.08
15:1	2.22 ± 0.13	1.99 ± 0.11	1.74 ± 0.12	2.22 ± 0.13
Пальмитиновая к-та 16:0	20.68 ± 0.29	22.78 ± 0.24	22.47 ± 0.26	22.68 ± 0.28
Пальмитолеиновая к-та 16:1	4.39 ± 0.08	5.00 ± 0.09	5.46 ± 0.09	4.39 ± 0.08
16:2	1.54 ± 0.02	1.58 ± 0.03	1.71 ± 0.03	1.54 ± 0.02
16:3	5.71 ± 0.41	4.56 ± 0.39	5.75 ± 0.40	5.71 ± 0.39
16:4	11.90 ± 0.10	10.57 ± 0.09	13.47 ± 0.10	11.90 ± 0.11
Стеариновая к-та 18:0	1.15 ± 0.08	2.14 ± 0.09	1.89 ± 0.08	1.15 ± 0.07
Олеиновая к-та 18:1	8.28 ± 0.10	9.92 ± 0.11	9.93 ± 0.12	8.28 ± 0.10
Линолевая к-та 18:2	9.90 ± 0.09	9.20 ± 0.08	8.71 ± 0.08	7.87 ± 0.09
α-Линоленовая к-та 18:3	27.44 ± 1.1	29.53 ± 1.2	25.41 ± 1.0	25.12 ± 1.0
Суммарное содержание жирных кислот, мг/г сухого веса	79.91 ± 4.9	73.11 ± 4.6	66.98 ± 4.4	70.05 ± 4.4

Примечание: в таблицу не были включены данные о некоторых минорных жирных кислотах, например, о процентном содержании вакценовой (18:2), γ-линоленовой (18:3) и 20:1 кислот.

Таблица 4. Содержание жирных кислот в культурах *S. quadricauda*, культивируемых с дофамином (ДА) или без него

Жирная кислота	Содержание, %			
	Контроль	ДА, 1 мкМ	ДА, 10 мкМ	ДА, 100 мкМ
Миристиновая к-та 14:0	0.47 ± 0.04	0.37 ± 0.03	0.80 ± 0.04	0.63 ± 0.03
Миристолеиновая к-та 14:1	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.24 ± 0.03
Пентадекановая к-та 15:0	1.23 ± 0.11	0.95 ± 0.10	1.61 ± 0.10	1.61 ± 0.12
15:1	2.13 ± 0.13	1.59 ± 0.12	2.43 ± 0.13	2.57 ± 0.12
Пальмитиновая к-та 16:0	17.24 ± 0.60	18.10 ± 0.61	26.55 ± 0.66	22.88 ± 0.65
Пальмитолеиновая к-та 16:1	4.47 ± 0.05	4.33 ± 0.04	5.28 ± 0.05	4.47 ± 0.04
16:2	2.80 ± 0.09	3.73 ± 0.10	3.75 ± 0.10	3.29 ± 0.10
16:3	9.48 ± 0.61	8.46 ± 0.62	3.76 ± 0.58	4.28 ± 0.59
16:4	9.74 ± 0.55	9.41 ± 0.57	5.74 ± 0.48	7.62 ± 0.49
Стеариновая к-та 18:0	0.85 ± 0.08	0.82 ± 0.06	1.54 ± 0.07	1.54 ± 0.09
Олеиновая к-та 18:1	8.72 ± 0.50	9.84 ± 0.48	14.17 ± 0.59	14.59 ± 0.60
Линолевая к-та 18:2	12.60 ± 0.44	14.34 ± 0.48	17.02 ± 0.49	15.53 ± 0.50
α-Линоленовая к-та 18:3	26.57 ± 1.7	24.73 ± 1.6	13.80 ± 1.7	17.66 ± 1.5
Суммарное содержание жирных кислот, мг/г сухого веса	79.74 ± 4.5	76.51 ± 5.0	41.92 ± 3.9	21.49 ± 3.8

Примечание: в эту таблицу не включены данные о некоторых минорных жирных кислотах, например, о процентном содержании вакценовой (18:2), γ-линоленовой (18:3) и 20:1 кислот.

— норадреналин не вызывал существенных изменений в общем содержании жирных кислот;

— среди полиненасыщенных жирных кислот, норадреналин при концентрации 10 мкМ увеличивал процентное содержание наиболее ненасыщенной жирной кислоты (16:4), а при концентрации 1 мкМ он несколько повышал содержание α -линоленовой кислоты и снижал содержание некоторых насыщенных жирных кислот (миристиновой и стеариновой кислот);

— низкие (1 мкМ) концентрации норадреналина увеличивали, а более высокие (10 и 100 мкМ) снижали процентное содержание насыщенных жирных кислот.

Таким образом, нейротрансмиттеры, тестированные в этой работе, можно разделить на две группы: 1) ацетилхолин и гистамин, которые увеличивали содержание жирных кислот, а также соотношение между полиненасыщенными и более насыщенными жирными кислотами; 2) серотонин и дофамин, которые, наоборот, уменьшали общее содержание жирных кислот и увеличивали вклад насыщенных (и, в некоторых случаях, мононенасыщенных) жирных кислот. Будучи химически сходным с дофамином, норадреналин тем не менее увеличивал процентное содержание некоторых полиненасыщенных

жирных кислот за счет более насыщенных жирных кислот, подобно ацетилхолину и гистамину.

Влияние нейротрансмиттеров на фотосинтетические пигменты *S. quadricauda*. Оксигенные фототрофы, включая микроводоросли, являются высокоэффективными преобразователями солнечной энергии в биомассу [14]. Это одна из причин, по которой изучение параметров, связанных с эффективностью фотосинтеза, является биотехнологически актуальным. Ниже приведены результаты работы о изменении состава и содержании фотосинтетических пигментов в клетках *S. quadricauda* в присутствии нейротрансмиттеров и без них.

Ацетилхолин увеличивал общее содержание суммы хлорофиллов максимально на 65% (при 10 мкМ ацетилхолина), не изменяя их соотношения или соотношения между содержанием хлорофилла и каротиноидов (табл. 6). Вероятно, это ведет к повышению продуктивности фотосинтеза водорослей, и это может объяснить приведенные выше данные о стимулирующем воздействии ацетилхолина на накопление биомассы и особенно на выработку жирных кислот у *S. quadricauda*.

Гистамин. В отличие от ацетилхолина, гистамин почти не влиял на общее содержание хлорофилла, в то время как содержание каротиноидов было незначительно увеличено. Соотношение хлорофиллов

Таблица 5. Содержание жирных кислот в культурах *S. quadricauda*, культивируемых с норадреналином (НА) или без него

Жирная кислота	Содержание, %			
	Контроль	НА, 1 мкМ	НА, 10 мкМ	НА, 100 мкМ
Миристиновая к-та 14:0	0.53 ± 0.05	0.60 ± 0.06	0.42 ± 0.05	0.39 ± 0.04
Миристолеиновая к-та 14:1	0.17 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.15 ± 0.02
Пентадекановая к-та 15:0	1.48 ± 0.12	1.32 ± 0.12	1.19 ± 0.11	1.13 ± 0.11
15:1	2.47 ± 0.15	2.16 ± 0.14	1.77 ± 0.14	1.72 ± 0.12
Пальмитиновая к-та 16:0	19.43 ± 0.65	19.62 ± 0.66	19.33 ± 0.66	19.77 ± 0.65
Пальмитолеиновая к-та 16:1	3.87 ± 0.06	3.68 ± 0.05	3.41 ± 0.04	3.61 ± 0.04
16:2	1.15 ± 0.08	1.06 ± 0.07	0.98 ± 0.06	1.39 ± 0.07
16:3	5.07 ± 0.51	5.04 ± 0.50	5.10 ± 0.50	5.74 ± 0.54
16:4	12.97 ± 0.60	13.56 ± 0.59	14.30 ± 0.63	13.19 ± 0.58
Стеариновая к-та 18:0	1.29 ± 0.09	1.42 ± 0.10	1.04 ± 0.09	1.05 ± 0.08
Олеиновая к-та 18:1	9.98 ± 0.60	10.12 ± 0.64	8.89 ± 0.61	9.83 ± 0.59
Линолевая к-та 18:2	9.33 ± 0.48	8.81 ± 0.46	8.78 ± 0.45	10.30 ± 0.49
α -Линоленовая к-та 18:3	29.15 ± 1.9	29.38 ± 1.8	31.57 ± 2.0	28.75 ± 1.5
Суммарное содержание жирных кислот, мг/г сухого веса	79.70 ± 4.5	84.83 ± 4.8	74.35 ± 4.6	76.12 ± 4.8

Примечание: в эту таблицу не включены данные о некоторых минорных жирных кислотах, например, о процентном содержании вакценовой (18:2), γ -линоленовой (18:3) и 20:1 кислот.

a/b было несколько смещено в пользу хлорофилла *a*, а соотношение хлорофилл : каротиноиды — в пользу каротиноидов (табл. 7). Эти изменения могут указывать на измененный режим работы фотосистем микроводорослей и отражать реакцию на добавление гистамина, которая, вероятно, также проявлялась в увеличении процентного содержания полиненасыщенных жирных кислот в липидной фракции (см. выше).

Серотонин. Как показано в табл. 8, серотонин не оказал какого-либо существенного влияния на состав пигментов. Максимальная концентрация серотонина привела к увеличению соотношения хлорофилл : каротиноиды, что, по-видимому,

объяснялось снижением количества каротиноидов в составе фотосинтетического аппарата.

Дофамин вызывал пропорциональное снижение концентраций хлорофиллов *a* и *b*, а также каротиноидов (табл. 9), что указывало на снижение числа фотосинтетических единиц в расчете на клетку. Вероятно, при этом наблюдалось снижение фотосинтетической активности, что являлось дополнительным аспектом его ингибирующего действия, которое проявлялось также в снижении содержания жирных кислот (см. выше).

Норадреналин. В отличие от дофамина, норадреналин в концентрации 1 мкМ (но не в более высоких тестируемых концентрациях) приводил к небольшому увеличению концентраций хлорофиллов

Таблица 6. Влияние ацетилхолина (АХ) на биосинтез пигментов клеток *S. quadricauda*

Компонент фотосистемы	Содержание, мг/г высушенной биомассы (на 6 сут)			
	Контроль	АХ, 1 мкМ	АХ, 10 мкМ	АХ, 100 мкМ
Хлорофилл <i>a</i>	13.38 ± 0.60	14.31 ± 0.58	21.05 ± 0.70	21.12 ± 0.68
Хлорофилл <i>b</i>	6.76 ± 0.45	7.30 ± 0.47	12.10 ± 0.50	11.23 ± 0.50
Каротиноиды	4.88 ± 0.30	5.17 ± 0.29	8.32 ± 0.34	7.92 ± 0.33
Хлорофилл <i>a + b</i>	20.14 ± 1.05	21.61 ± 1.05	33.16 ± 1.20	32.35 ± 1.18
Хлорофилл <i>a</i> : Хлорофилл <i>b</i>	1.98	1.96	1.74	1.88
Хлорофилл : Каротиноиды	4.13	4.18	3.98	4.08

Таблица 7. Влияние гистамина (Гис) на биосинтез пигментов клетками *S. quadricauda*

Компонент фотосистемы	Содержание, мг/г высушенной биомассы (на 6 сут)			
	Контроль	Гис, 1 мкМ	Гис, 10 мкМ	Гис, 100 мкМ
Хлорофилл <i>a</i>	14.59 ± 0.66	13.70 ± 0.62	14.55 ± 0.64	15.18 ± 0.63
Хлорофилл <i>b</i>	7.99 ± 0.40	8.62 ± 0.44	8.95 ± 0.43	8.77 ± 0.45
Каротиноиды	5.23 ± 0.29	5.53 ± 0.28	5.69 ± 0.30	5.69 ± 0.29
Хлорофилл <i>a + b</i>	22.58 ± 1.06	22.32 ± 1.06	23.49 ± 1.07	23.96 ± 1.08
Хлорофилл <i>a</i> : Хлорофилл <i>b</i>	1.83	1.59	1.63	1.73
Хлорофилл : Каротиноиды	4.32	4.04	4.13	4.21

Таблица 8. Влияние серотонина (5-НТ) на биосинтез пигментов клетками *S. quadricauda*

Компонент фотосистемы	Содержание, мг/г высушенной биомассы (на 6 сут)			
	Контроль	5-НТ, 1 мкМ	5-НТ, 10 мкМ	5-НТ, 100 мкМ
Хлорофилл <i>a</i>	13.68 ± 0.60	11.70 ± 0.59	13.56 ± 0.61	14.58 ± 0.61
Хлорофилл <i>b</i>	7.56 ± 0.41	7.02 ± 0.44	8.04 ± 0.43	8.46 ± 0.44
Каротиноиды	6.96 ± 0.33	6.30 ± 0.33	5.76 ± 0.30	5.34 ± 0.31
Хлорофилл <i>a + b</i>	21.24 ± 1.01	18.72 ± 1.03	21.60 ± 1.04	23.04 ± 1.05
Хлорофилл <i>a</i> : Хлорофилл <i>b</i>	1.81	1.67	1.69	1.72
Хлорофилл : Каротиноиды	3.03	2.96	3.80	4.49

Таблица 9. Влияние дофамина (ДА) на биосинтез пигментов клетками *S. quadricauda*

Компонент фотосистемы	Содержание, мг/г высушенной биомассы (на 6 сут)			
	Контроль	ДА, 1 мкМ	ДА, 10 мкМ	ДА, 100 мкМ
Хлорофилл <i>a</i>	14.04 ± 0.61	11.46 ± 0.59	9.62 ± 0.58	4.39 ± 0.56
Хлорофилл <i>b</i>	7.72 ± 0.40	6.54 ± 0.41	5.14 ± 0.42	2.45 ± 0.39
Каротиноиды	5.53 ± 0.30	4.69 ± 0.29	3.52 ± 0.30	1.52 ± 0.24
Хлорофилл <i>a</i> + <i>b</i>	21.76 ± 1.01	18.00 ± 1.00	14.76 ± 1.00	6.84 ± 1.05
Хлорофилл <i>a</i> : Хлорофилл <i>b</i>	1.82	1.75	1.87	1.80
Хлорофилл : Каротиноиды	3.94	3.84	4.19	4.51

Таблица 10. Влияние норадреналина (НА) на биосинтез пигментов клетками *S. quadricauda*

Компонент фотосистемы	Содержание, мг/г сухой биомассы (на 6 сут)			
	Контроль	НА, 1 мкМ	НА, 10 мкМ	НА, 100 мкМ
Хлорофилл <i>a</i>	13.68 ± 0.61	15.25 ± 0.65	14.00 ± 0.63	13.90 ± 0.61
Хлорофилл <i>b</i>	7.03 ± 0.39	7.80 ± 0.41	6.91 ± 0.40	6.90 ± 0.39
Каротиноиды	4.81 ± 0.34	5.38 ± 0.35	4.79 ± 0.32	4.76 ± 0.31
Хлорофилл <i>a</i> + <i>b</i>	20.71 ± 1.00	23.05 ± 1.06	20.91 ± 1.03	20.79 ± 1.00
Хлорофилл <i>a</i> : Хлорофилл <i>b</i>	2.18	2.20	2.26	2.25
Хлорофилл : Каротиноиды	4.86	4.87	4.97	5.04

a и *b*, а также каротиноидов (табл. 10), что свидетельствовало об общем увеличении числа фотосинтетических единиц на клетку и, вероятно, об интенсификации фотосинтетических процессов.

Таким образом, тестированные нейротрансмиттеры различались с точки зрения их воздействия *S. quadricauda* на фотосинтетические пигменты. Ацетилхолин и, в меньшей степени, норадреналин увеличивали общее содержание хлорофилла и каротиноидов, которые были снижены в случае дофамина. Серотонин и гистамин не влияли на общее содержание компонентов фотосистемы, но гистамин вызывал изменения в соотношении пигментов, что наводит на мысль о влиянии этого нейротрансмиттера в качестве стрессора.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как упоминалось во введении, ранее было обнаружено, что такие нейротрансмиттеры, как гистамин, серотонин, дофамин и норадреналин, стимулируют накопление биомассы у *S. quadricauda* в микромолярных концентрациях, причем гистамин является самым сильным (65% стимуляции роста), а норадреналин – самым слабым (20% стимуляции роста) агентом, стимулирующим рост [6]. Аналогичные стимулирующие рост эффекты вышеупомянутые вещества оказывали и на *Chlorella vulgaris* [5, 6]. В начале раздела “Результаты” приведены

данные о том, что ацетилхолин стимулировал рост *S. quadricauda* на 15–20% (стимулирующее действие на *C. vulgaris* более существенно, по данным литературы [4]). Насколько известно авторам, в доступной литературе не сообщалось о каких-либо исследованиях стимулирующего действия нейротрансмиттеров на зеленые микроводоросли, за исключением данных о влиянии ацетилхолина, а также таурина на синтез некоторых метаболитов у видов хлореллы [3, 4], которые цитировались во введении.

Однако определенный интерес в данном контексте представляют исследования воздействия растительных гормонов ауксинов на *C. vulgaris*. Было продемонстрировано, что ауксины индол-3-уксусная кислота, индол-3-масляная кислота и фенилуксусная кислота, а также их синтетический аналог 1-нафталинуксусная кислота стимулировали рост *C. vulgaris* в концентрациях 0.1–1.0 мкМ. Они также увеличивали выработку фотосинтетических пигментов, моносахаридов и растворимых белков [15]. Наблюдаемые эффекты были объяснены активацией антиоксидантных систем этими гормонами, поскольку было обнаружено, что они повышали активность аскорбатпероксидазы, каталазы и супероксиддисмутазы и снижали перекисное окисление липидов и накопление H₂O₂ [15]. Нейротрансмиттеры, используемые в этой работе, химически сходны с ауксинами, особенно это

касается серотонина, окисление которого приводит к образованию 5-гидроксииндол-3-уксусной кислоты – замещенного ауксина.

Влияние нейротрансмиттеров на жирнокислотный состав липидов: биотехнологическое значение. Несмотря на качественно сходные стимулирующие эффекты всех протестированных нейротрансмиттеров на рост микроводорослей, их можно разделить на две разные подгруппы.

1. Ацетилхолин и в меньшей степени гистамин повышали общее количество жирных кислот на 1 г сухой биомассы, что сопровождалось увеличением процентного содержания полиненасыщенных и снижением доли насыщенных жирных кислот. Увеличение процентного содержания некоторых ненасыщенных жирных кислот также наблюдали в присутствии норадреналина, хотя он не оказывал значимого влияния на общее содержание жирных кислот.

2. Дофамин и в меньшей степени серотонин снижали общее содержание жирных кислот в биомассе; одновременно они также снижали процентное содержание полиненасыщенных и значительно увеличивают долю насыщенных жирных кислот.

С точки зрения биотехнологии, первая подгруппа нейротрансмиттеров потенциально перспективна в отношении производства препаратов, богатых полиненасыщенными жирными кислотами, для терапевтических или косметических целей.

Потенциальная конкурентоспособность стратегии повышения эффективности микроводорослей как продуцентов ценных соединений обусловлена тем фактом, что нейротрансмиттеры относительно недороги при применении в низких концентрациях. Для того чтобы дополнить культуру водорослей в пилотном фотобиореакторе объемом 1 м³ 10 мкМ ацетилхолина, требуется всего 1.82 г ацетилхолина хлорида, в то время как 5 г ацетилхолина хлорида (“Acros Organics”, номер по каталогу 159170050) стоят ~ 31 \$ США (по состоянию на 1 мая 2024 г.), то есть расходы составляют всего 11.3 \$. В этих условиях статистически достоверное увеличение выхода биомассы (рис. 1) с повышением процентного содержания полиненасыщенных жирных кислот (табл. 1), позволяет добиться высокой дополнительной прибыли, превышающей дополнительные расходы на несколько порядков (технико-экономический анализ см., например, в [16, 17]).

Вторая подгруппа нейротрансмиттеров, казалось бы, менее применима в биотехнологии, поскольку эти нейротрансмиттеры уменьшали общее количество жирных кислот. Однако они существенно увеличивали долю насыщенных жирных кислот. По крайней мере, при использовании серотонина относительно незначительное снижение общего количества жирных кислот компенсировалось более существенным увеличением процентного содержания насыщенных жирных кислот.

Это позволяет надеяться на применимость серотонина в практических разработках, направленных на производство биотоплива, так как насыщенные триацилглицериды перспективны с точки зрения производства биодизеля [18].

В ранее опубликованной работе [8] продемонстрировано, что общее содержание жирных кислот в клетках зеленой микроводоросли *Desmodesmus* sp. снижалось при культивировании. Однако это снижение можно было отсрочить на несколько дней, если концентрацию CO₂ в воздухе увеличить до 20%. На 6 день культивирования культура с высоким содержанием CO₂ имела примерно на 30% более высокое общее содержание жирных кислот, чем контрольная культура микроводорослей, согласно рис. 1б из цитированной работы [8]. Предположительно, эффекты нейротрансмиттеров первой подгруппы (ацетилхолин, гистамин и, в меньшей степени, норадреналин) феноменологически аналогичны эффектам высоких концентраций CO₂. Это согласуется с данными о том, что ацетилхолин, гистамин и норадреналин увеличивали процентное содержание полиненасыщенных жирных кислот (которые входят в состав мембранных липидов) за счет насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот, характерных для резервных липидов, таких как триацилглицериды. Влияние этих нейротрансмиттеров на жирнокислотный состав, по-видимому, аналогично влиянию высокой концентрации CO₂ в воздухе для продувания культуры [8].

Известно, что периодические культуры, подобные использованным в настоящей работе, проходят несколько стадий развития, включая лаг-фазу, экспоненциальную фазу, фазу замедления и остановки роста. Представляется вероятным, что ацетилхолин, гистамин и, в ограниченной степени, норадреналин подобны CO₂ при высоких концентрациях в том, что они продлевают ее ранние стадии культивирования, характеризующиеся быстрым делением клеток и расширением мембран хлоропластов, содержащих липиды, богатые ценными полиненасыщенными жирными кислотами.

Предположительно, одноклеточные фотосинтезирующие эукариоты, исследованные в настоящей работе, экспрессируют рецепторы для нейротрансмиттеров. Для сравнения, рецепторы H₁ млекопитающих к гистамину соединяются с G_q, который регулирует мобилизацию Ca²⁺, рецепторы H₂ соединяются с G_s для стимуляции синтеза циклического АМР, а рецепторы H₃ и H₄ соединяются с G_{i/o} для ингибирования накопления циклического АМР [19] (С. 1).

Тот факт, что химически сходные дофамин и норадреналин оказывают разные эффекты в отношении содержания жирных кислот (табл. 4 и 5) и концентраций пигментов (табл. 9 и 10), по-видимому, согласуется с предположением относительно рецептор-зависимого механизма действия

нейротрансмиттеров на микроводоросли. В клетках млекопитающих дофамин и норадреналин оказывают разные эффекты и связываются с различными типами рецепторов (рецепторами D_{1-5} и α - и β -адренорецепторами соответственно).

Гипотетический рецепторный механизм действия этих нейротрансмиттеров не исключает их стимулирующих антиоксидантную систему эффектов, которые были продемонстрированы для серотонина и его производного мелатонина, например, у диатомовой водоросли *Ulnaria ulna* [20], а также предложены для химически родственных ауксинов в литературе [15]. Более того, именно посредством связывания с рецепторами могут активироваться антиоксидантные ферментативные (основанные на пероксидазах, каталазах и супероксиддисмутазах) и неферментативные системы.

Другой способ действия, по-видимому, характерен для второй подгруппы нейротрансмиттеров, включающей серотонин и дофамин, которые имеют тенденцию снижать общее содержание жирных кислот, а также уменьшать процентное содержание полиненасыщенных жирных кислот. Если клетки микроводорослей содержат соответствующие рецепторы, подобные млекопитающим (или их аналоги), они могут подавлять синтез десатураз и/или ингибировать их активность, что может вести к ускоренному достижению поздних стадий роста культур водорослей, характеризующихся повышенной долей насыщенных жирных кислот.

Влияние нейротрансмиттеров на фотосинтетические пигменты. Приведенная выше классификация нейротрансмиттеров по их действию на микроводоросли, по-видимому, согласуется с данными об их влиянии на пигменты микроводорослей. Помимо увеличения содержания жирных кислот и повышения процентного вклада полиненасыщенных жирных кислот (см. выше), ацетилхолин приводит к увеличению общего содержания хлорофиллов и каротиноидов, отражающего количество фотосинтетических единиц. В отличие от ацетилхолина, гистамин не увеличивал содержание пигментов, а повышение соотношений хлорофилл *a*/хлорофилл *b* и хлорофилл/каротиноиды, по-видимому, объясняется реакцией на стресс, вызванный гистамином. Норадреналин увеличивал общее содержание хлорофилла и каротиноидов только при самых низких тестируемых концентрациях (1 мкМ); предположительно, ингибирующий (токсический) эффект, вызываемый более высокими концентрациями норадреналина, может перекрывать стимулирующее влияние на синтез пигментов.

Дофамин снижал содержание пигментов в культуре, что согласовывалось с предположением о том, что он ускорял достижение поздних ростовых стадий культуры, снижая как синтез липидов, так и фотосинтетическую активность. Необходимо отметить возможный вклад в наблюдаемое действие

также и токсичных продуктов окисления дофамина, в частности, дофаминхрома (дофахрома). Напротив, серотонин практически не влиял на пигменты водорослей.

Экологическое значение. В более ранней работе [5] было установлено, что у *S. quadricauda* отсутствуют детектируемые количества эндогенных серотонина, дофамина и норадреналина. Однако в естественных водных экосистемах они продуцируются другими компонентами водных экосистем, примером которых являются бактерии [2], макроводоросли и высшие растения [1]. Водные животные, включая беспозвоночных и рыб, также образуют нейротрансмиттеры и могут выделять их в окружающую среду, особенно при травмах. Дофамин был обнаружен методом высокоэффективной жидкостной хроматографии у ракообразного *Daphnia magna*, питающегося микроводорослями (неопубликованные данные). Следовательно, влияние нейротрансмиттеров на микроводоросли, включая состав их жирных кислот и компоненты фотосистемы, можно рассматривать с точки зрения их постоянного химического взаимодействия с другими компонентами водной экосистемы. Поскольку многие компоненты водной экосистемы могут вырабатывать нейротрансмиттеры и (или) реагировать на них, нейротрансмиттеры можно рассматривать как сигналы на уровне экосистемы, или экомоны [21].

Можно рекомендовать проведение оценки концентраций нейротрансмиттеров в естественных и искусственных водоемах и их воздействия на первичных продуцентов, таких как микроводоросли. В экологическом контексте следует также отметить значительное воздействие, оказываемое человеком на концентрацию нейротрансмиттеров в водных экосистемах.

* * *

Настоящая работа является частью исследовательского проекта, направленного на выяснение механизма действия нейротрансмиттеров на микроводоросли. Было изучено влияние некоторых нейротрансмиттеров на такие физиологически и биохимически важные параметры, как содержание жирных кислот и состав фотосинтетических пигментов микроводоросли *S. quadricauda*. Ацетилхолин и гистамин привели к увеличению общего содержания жирных кислот и процентного вклада полиненасыщенных кислот. Это можно интерпретировать таким образом, что эти нейротрансмиттеры, предположительно, продлевают фазу экспоненциального роста. Данное предположение согласуется с тем фактом, что ацетилхолин и, в меньшей мере, норадреналин повышали содержание пигментов микроводорослей (хлорофиллов и каротиноидов), вероятно, увеличивая скорость фотосинтеза. Что касается других протестированных нейротрансмиттеров (серотонина и дофамина), то

они ускоряли достижение поздних стадий культуры микроводорослей, при этом содержание жирных кислот снижалось, а процент насыщенных кислот увеличивался. В то время как серотонин практически не оказывал влияния на содержание компонентов фотосистемы, дофамин вызывал снижение концентраций хлорофиллов *a* и *b*, а также каротиноидов. Это указывает на уменьшение количества фотосистем в пересчете на клетку.

С точки зрения биотехнологии, могут представлять интерес как продление, так и сокращение темпа прохождения стадий развития культуры водорослей, в зависимости от того, является ли целью производство препаратов, обогащенных полиненасыщенными жирными кислотами, для медицинских или косметических целей, или разработка биотоплива на основе насыщенных жирных кислот.

С экологической точки зрения воздействие нейротрансмиттеров на состав жирных кислот микроводорослей и компоненты фотосистемы может рассматриваться в рамках химического взаимодействия между микроводорослями и другими компонентами водной экосистемы, которые продуцируют нейротрансмиттеры и выделяют их в среду.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Настоящее исследование финансировано Программой развития междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова под названием “Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды”, а также муниципальным правительством Шэньчжэня и университетом МГУ-ППИ в Шэньчжэне. Анализ жирных кислот липидов выполнен при поддержке Российского научного фонда (грант 23-74-00037).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Roshchina V.V.* // *Microbial Endocrinology: Interkingdom Signaling in Infectious Disease and Health.* /Ed. M. Lyte. N.Y.: Springer Cham, 2016. V. 874. P. 25–77.
2. *Oleskin A.V., Shenderov B.A.* *Microbial Communication and Microbiota–Host Interactivity: Neurophysiological, Biotechnological, and Biopolitical Implications.* N.Y.: Nova Science Publishers, 2020. 248 p.
3. *Parsaeimehr A., Sun Z., Dou X., Chen Y.F.* // *Biotechnol. Biofuels.* 2015. V. 8. (1) P. 11. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0196-0>
4. *Czepak R., Bajguz A., Jewiec P., Muszynska-Garstka M.* // *Ecohydrol. Hydrobiol.* 2003. V. 3 (2). P. 223–229.
5. *Oleskin A.V., Postnov A.L., Boyang Cao* // *J. Pharm. Nutr. Sci.* 2021. V. 11. P. 49–53. <https://doi.org/10.29169/1927-5951.2021.11.07>
6. *Oleskin A.V., Postnov A.L., Boyang Cao* // *J. Pharm. Nutr. Sci.* 2021. V. 11. P. 144–150. <https://doi.org/10.29169/1927-5951.2021.11.17>
7. *Oleskin A.V., Kirovskaya T.A., Botvinko I.V., Lysak L.V.* // *Microbiology (Moscow).* 1998. V. 67. № 3. P. 305–312.
8. *Solovchenko A., Gorelova O., Selyakh I., Pogosyan S., Baulina O., Semenova L. et al.* // *Algal Res.* 2015. V. 11. P. 399–410. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.011>.
9. *Wellburn A.* // *J. Plant. Physiol.* 1994. V. 144. P. 307–313.
10. *Kates M.* *Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis, and Identification of Lipids,* 2nd Ed. Amsterdam: Elsevier, 1986. 464 p.
11. *Balasubramaniam V., Gunasegavan R.D., Mustar S., Lee J.C., Mohd Noh M.F.* // *Molecules.* 2021. V. 26. P. 943. <https://doi.org/10.3390/molecules26040943>
12. *Dasan Y.K., Lam M.K., Yusup S., Lim J.W., Lee K.T.* // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 688. P. 112–128. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.181>
13. *Hu J., Meng W., Su Y., Qian C., Fu W.* // *Front. Mar. Sci.* 2023. V. 10. P. 1260709. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1260709>
14. *Masojídek J., Torzillo G., Koblížek M.* // *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biorechnology.* / Eds. A. Richmond, Q. Hu. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons, 2013. P. 21–36.
15. *Piotrowska-Niczyporuk A., Bajguz A.* // *Plant Growth Regul.* 2014. V. 73. P. 57–66. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9867-7>
16. *Tredici M.R., Rodolfi L., Biondi N., Bassi N., Sampietro G.* // *Algal Res.* 2016. V. 19. P. 251–263. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.005>
17. *Fabris M., Abbriano R.M., Pernice M., Sutherland D.L., Commault A.S., Hall C.C. et al.* // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 279. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00279>
18. *Oleskin A.V., Boyan Cao* // *Lomonosov Biol. J.* 2023. V. 78. № 3. P.146–159. <https://doi.org/10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-10>
19. *Powell K.* // *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference.* / Eds. S.G. Enna, D.B. Bylind. Amsterdam: Elsevier, 2007. P. 1–2.
20. *Roshchina V.V., Yashin V.A., Podunai Y.A.* // *Austin Environ. Sci.* 2022. V. 7. № 3. P. 107–110.
21. *Oleskin A.V., Postnov A.L.* *Neurotransmitters as Communicative Agents in Aquatic Ecosystems.* // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022. V. 77 № 1. P. 6–12. <https://doi.org/10.3103/S0096392522010035>

Impact of Neurotransmitters on the Fatty Acid Composition and Photosynthetic Pigments of the Green Microalga *Scenedesmus quadricauda*

Cao Boyang^a, O. B. Chivkunova^b, A. E. Solovchenko^b,
E. S. Lobakova^b, and A. V. Oleskin^{b, *}

^aShenzhen MSU-BIT University, 1 International University Park Road, Dayun New Town China, Longgang District, Shenzhen, 518172, Guangdong Province, China

^bDepartment of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: oleskiny@yandex.ru

Apart from their functions in the nervous system of animals, neurotransmitters operate as regulatory agents and signals in diverse kingdoms of life. Some neurotransmitters at low concentrations have recently been revealed to exert specific effects on microalgae, predominantly functioning as algal growth stimulators. This article presents new data on the effects of such neurotransmitters as serotonin, norepinephrine, dopamine, histamine, and acetylcholine on the fatty acid and pigment composition of the green microalga *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. K-1149. It was established that acetylcholine and, to a lesser extent, histamine increased the total fatty acid content of *S. quadricauda* cells, whereas serotonin and dopamine decreased the fatty acid content. Acetylcholine, histamine, and norepinephrine elevated the percentage of polyunsaturated fatty acids; in contrast, serotonin and dopamine augmented the share of saturated fatty acids. Acetylcholine and, to a lesser extent, norepinephrine increased the total chlorophyll content per 1 g of dry weight in *S. quadricauda* while histamine decreased the chlorophyll content. Histamine also increased the chlorophyll *a*/chlorophyll *b* and carotenoid/chlorophyll ratios, which were decreased by dopamine. The data obtained apparently are of biotechnological and ecological interest. The stimulation of fatty acid accumulation and the increase in polyunsaturated species percentage was caused by the neurotransmitters acetylcholine and histamine at low (1-10 μM) concentrations, which potentially enables facilitating the biotechnological production of health-promoting preparations for therapeutic and cosmetic purposes. However, other tested neurotransmitters (dopamine and serotonin) increased the relative content of saturated fatty acids; therefore, they apparently can be used to stimulate biofuel production, since saturated fatty acid-rich lipids are advantageous raw materials for biodiesel production. The impact of neurotransmitters on microalgal fatty acid composition and photosystem components may be considered in terms of ongoing chemical interaction between microalgae and other aquatic ecosystem components that are known to produce neurotransmitters.

Keywords: neurotransmitters; acetylcholine; histamine; norepinephrine; dopamine; serotonin (5-hydroxytryptamine); fatty acids; PUFAs; chlorophyll; microalgae

УДК 579.61:579.65

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК *Escherichia coli* С БАКТЕРИОФАГОМ T7

© 2024 г. Н. Н. Сыкилинда^{1,*}, А. А. Лукьянова¹, В. В. Лаврикова², И. В. Кутник³,
Н. В. Панин⁴, Н. А. Старицын², К. А. Мирошников¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

²ОАО «БИОХИММАШ», Москва, 127299 Россия

³Научно-исследовательский испытательный центр подготовки космонавтов им. Ю.А. Гагарина,
Звездный городок, Московская область, 141160 Россия

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского, Москва, 119991 Россия

*e-mail: sykilinda@mail.ru

Поступила в редакцию 03.04.2024

После доработки 17.04.2024 г.

Принята к печати 28.04.2024 г.

Впервые получены данные по влиянию факторов космического полета на взаимодействие бактериофага с бактерией – хозяином. Исследования проведены на российском сегменте МКС с использованием модельной системы *Escherichia coli* – бактериофаг T7. Установлено, что лизис клеток бактериофагом в космических экспериментах, которые были проведены в первые 2 сут воздействия микрогравитации на микроорганизмы, проходил в 1.5 раза быстрее, чем в наземных. При более длительном воздействии микрогравитации на клетки *E. coli* они приобретали устойчивость к бактериофагу T7, которая сохранялась в течение 2 сут после возвращения на Землю. Чувствительность к бактериофагу полностью восстанавливалась на 4–5 сут после возвращения клеток с МКС.

Ключевые слова: клетки *E. coli*, бактериофаг T7, лизис, факторы космического полета

DOI: 10.31857/S0555109924050075 EDN: QTICAK

Освоение ближнего и дальнего космоса, освоение Луны в обозримом будущем предполагает длительное пребывание астронавтов в ограниченном пространстве в условиях действия факторов космического пространства (ФКП). Известно, что на орбитальных космических станциях обитают разнообразнейшие популяции бактерий и грибов, которые могут включать условно-патогенные микроорганизмы и угрожать здоровью космонавтов и надежности оборудования [1–5]. Доминирующие организмы связаны с микробиомом космонавтов. Длительное пребывание в космосе негативно влияет на иммунную функцию, в частности на клеточный иммунитет космонавтов, что приводит к возрастающей роли микроорганизмов в развитии инфекций [6, 7]. На Международной космической станции (МКС), а ранее на орбитальных станциях “Салют” и “Мир” отмечены случаи микробных инфекций, включая конъюнктивиты, острые респираторные и стоматологические инфекции. Взаимодействия между

микроорганизмами и макрохозяином могут существенно измениться в условиях космического полета, поэтому для прогнозирования такого поведения и оценки мер предосторожности во время космического полета необходимо изучение роста и активности микроорганизмов. С.А. Никерсон с соавт. [8], Г. Сенатор с соавт. [9], Б. Хуан и соавт. [10] обобщили в своих обзорах современные знания об изменениях роста и вторичного метаболизма микроорганизмов в ответ на космический полет и его аналогии, обсудили разнообразные и противоречивые результаты. В настоящее время известно, что бактерии, выращенные в космосе, проявляют ряд отличий от клеток, культивируемых в земных условиях. Для суспензионных культур неподвижных микроорганизмов, в частности, сообщается о сокращении лаг-фазы и увеличении конечной плотности популяции [11]. В других экспериментах выявлены такие изменения, как ускоренное образование биопленок [11–14], более высокая удельная продуктивность

вторичных метаболитов [15]. В то же время имеются данные об отсутствии изменений у микроорганизмов и их повышенной чувствительности к антибиотикам в условиях микрогравитации [16–18]. Другие исследователи, наоборот, сообщают об увеличении вирулентности и устойчивости микроорганизмов к антибиотикам в космических экспериментах, что вызывает особую озабоченность [19–23], так как в сочетании с ослабленным иммунным ответом у космонавтов существует повышенный риск оппортунистических бактериальных инфекций [24].

В настоящее время во всем мире идет поиск альтернативных подходов к терапии инфекционных заболеваний. Одним из перспективных направлений в борьбе с инфекциями является применение бактериофагов (вирусов бактерий) и их компонентов. Фаговая терапия небезуспешно применялась для борьбы с инфекционными заболеваниями практически сразу после открытия этих вирусов. С наступлением эры антибиотиков большинство западных ученых отказались от использования бактериофагов из-за плохой воспроизводимости результатов. В то же время в СССР, а потом в России, Грузии и Польше использование бактериофагов в медицине не прекращалось и после открытия антибиотиков [25]. С углублением наших знаний о взаимодействии вирус-бактерия, полученных с помощью современных молекулярно-генетических методов анализа, интерес к бактериофагам как альтернативе в борьбе с устойчивыми к антибиотикам бактериальными инфекциями во всем мире резко возрос. Антибактериальный эффект обусловлен внедрением генома фага в бактериальную клетку с последующим его размножением и лизисом инфицированной клетки. Вышедшие во внешнюю среду в результате лизиса клеток бактериофаги повторно инфицируют и лизируют новые бактериальные клетки, действуя до полного уничтожения патогенных бактерий в очаге воспаления. Бактериофаги способны убивать устойчивые к антибиотикам бактерии, проявляют высокую специфичность, не нарушая нормальную микрофлору, и низкую токсичность. Продемонстрирована эффективность фагов в борьбе с инфекционными заболеваниями у животных и людей, в том числе вызванных антибиотико-устойчивыми бактериями [25–30]. Бактериофаги легко выращивать; можно использовать в небольших дозах, потому что они являются “живыми лекарствами”, размножаясь среди целевой бактериальной популяции. Эти вирусы могут размножаться только в бактериях, не повреждая клетки человека. С уничтожением целевого патогена количество бактериофага быстро сокращается.

Исследования, проведенные в рамках реализации космического эксперимента (КЭ) “Бактериофаг” на МКС с различными штаммами бактериофагов, показали возможность использования их в качестве перспективных лекарственных средств

для антибактериальной терапии космонавтов. Лечебные фаги и готовые лекарственные формы, приготовленные на их основе, могут транспортироваться и сохраняться на МКС в условиях космического полета не менее полутора лет без утраты своих биологических свойств, строения и потери специфической активности [31]. Однако данных по влиянию ФКП на взаимодействие бактериофагов с бактериальной клеткой, фактически, не имеется.

Начиная с 2016 г., на МКС проводился космический эксперимент “Микровир”, целью которого было изучение влияния факторов космического полета на взаимодействие бактерий с бактериофагами, в том числе на скорость литического (разрушающего) действия бактериофагов на бактерии.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В качестве биологических объектов для изучения взаимодействия вирусов с клеткой-хозяином использовали лабораторный штамм непатогенных бактерий *Escherichia coli* K12 и бактериофаг T7 *E. coli*.

Питательные среды. В качестве питательной среды для выращивания клеток *E. coli* и бактериофага T7 использовали жидкую питательную среду NZCYM (“Difco”, США) следующего состава (г/л): казеиновый пептон (расщепленный ферментами поджелудочной железы) – 10; казаминовые кислоты – 1; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 5; MgSO₄ – 0,98; феноловый красный – 0,000002. Значение pH среды после стерилизации – 7,0.

Для определения концентрации клеток и бактериофага использовали агаризованную среду LB следующего состава (г/л): триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 10; агар-агар – 15. Значение pH среды после стерилизации – 7,0.

В качестве дополнительного компонента питательной среды для активации роста клеток использовали 20%-ный раствор глюкозы в солевом буфере (г/л): глюкоза – 200; MgSO₄ – 1,1; трис – 1,2, pH 7,5.

Для регистрации изменений pH среды в результате роста микроорганизмов использовали индикатор pH феноловый красный.

Получение суспензии клеток для заправки научной аппаратуры. В работе использовали чистую культуру бактериальных клеток *E. coli* K12, выращенную из отдельной колонии в среде LB без аэрации при 37°C в течение ночи. Ночную культуру клеток вносили в пробирки со средой NZCYM в соотношении 1 : 100 и выращивали в пробирках при 37°C в течение 18 ч. Концентрации клеток, выращенных в таких условиях, составляла 6–8 × 10⁸ КОЕ/мл.

Получение препарата бактериофага T7. Для наращивания бактериофага T7 ночную культуру клеток *E. coli* K12 вносили в среду LB в соотношении

1 : 100, выращивали при аэрации при 37°C до ОП₆₀₀ 0.4–0.5 и добавляли бактериофаг Т7 в расчете 1–2 фаговых частиц на клетку. После полного лизиса клеток добавляли хлороформ до концентрации 0.5% и оставляли при 4°C на 4 ч, после чего центрифугировали при 8000 об./мин в течение 30 мин для освобождения от клеточного дебриса. Надосадочную жидкость отбирали и фильтровали через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0.22 мкм (“Merck” Германия). Перед экспериментом препарат бактериофага проверяли на стерильность высевом в чашки Петри с питательным агаром и на активность – титрованием.

Определение концентрации бактериальных клеток. Концентрацию бактериальных клеток определяли: 1) измерением оптической плотности суспензии клеток при 600 нм (ОП₆₀₀) с последующим определением концентрации клеток по калибровочной кривой, предварительно построенной для клеток *E. coli* экспериментально; 2) в соответствии с общепринятой методикой определения жизнеспособных клеток посредством посева соответствующих десятикратных серийных разведений исследуемых суспензий бактерий на агаризованную питательную среду в чашки Петри с последующим выращиванием при оптимальной для используемых бактерий температуре в течение 24 ч и подсчетом выросших колоний. Результаты выражали в КОЕ/мл, где КОЕ – колониеобразующие единицы.

Определение концентрации бактериофага. Определение концентрации бактериофага проводилось общепринятым методом титрования с использованием двойных агаровых слоев по Грациа.

Схема проведения эксперимента. Эксперимент проводили в научной аппаратуре (НА) “Микровир”, разработанной и изготовленной НПП

“БиоТехСис” (Россия). Укладка “Микровир” состояла из четырех кассет (рис. 1а). Внешний вид кассеты представлен на рис. 1б. Каждая кассета содержала три экспериментальные ячейки, соединенные между собой в единую сборку. Экспериментальная ячейка представляла конструкцию, состоящую из двух емкостей объемом 5 мл, между которыми сформирован канал для переадавливания содержимого верхней ячейки в нижнюю. Канал в нерабочем состоянии перекрывался клапаном.

После стерилизации НА заправляли для проведения космического и параллельного наземного экспериментов. В верхние емкости ячеек вносили 4.7 мл суспензии клеток *E. coli*. Для активации роста клеток во все нижние емкости ячеек вносили по 0.2 мл 20%-ного раствора глюкозы в солевом буфере. В нижние емкости опытных ячеек дополнительно вносили 0.1 мл бактериофага Т7. Заправленную укладку “Микровир” до начала эксперимента хранили при температуре 4°C, за исключением времени доставки со стартовой площадки космодрома Байконур на МКС. На МКС эксперименты выполняли в 2 этапа. Первый этап с двумя кассетами проводили на следующий день после доставки НА на МКС. Второй этап с двумя другими кассетами проводили на следующие сутки после первого. Время проведения каждого этапа составило 8–24 ч. При проведении экспериментов космонавты извлекали кассеты из укладки, находившейся в термостате при 4°C, размещали их на панели российского сегмента МКС на 1 ч для выравнивания температуры, после чего проводили переадавливание содержимого верхних ячеек в нижние. Эксперимент выполняли при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$. На всем протяжении эксперимента космонавты проводили фотосъемку содержимого

(a)

(б)

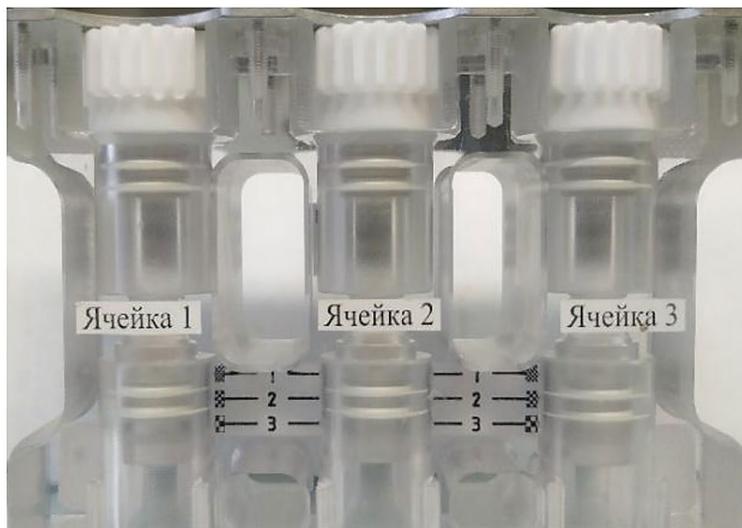


Рис. 1. Укладка НА “Микровир” в открытом виде с установленными кассетами (а), внешний вид кассеты “Микровир” (б).

кассет в ручном и автоматическом режимах согласно циклограмме. О взаимодействии бактериофага с клетками судили по проявлению индикаторных полосок на обратной стороне ячеек. При размножении бактериофага клетки разрушались, в результате чего мутность содержимого опытных ячеек снижалась и индикаторные полоски становились видимыми. После завершения эксперимента кассеты возвращали в укладку и содержали при 4°C до перемещения в спускаемый аппарат.

Определение чувствительности клеток к бактериофагу. Для определения чувствительности клеток *E. coli* к бактериофагу Т7 после завершения космического и наземного экспериментов отбирали по 1 мл содержимого ячеек НА в 1.5-мл пробирки, клетки осаждали при 10000 об./мин в течение 5 мин в настольной центрифуге (“Eppendorf”, Германия). Осадок клеток суспендировали в 1 мл свежей питательной среды, 200 мкл суспензии после замены среды помещали в ячейки 96-луночного планшета с низкой сорбцией (Costar 96 Well Plate Ultra-Low Attachment Surface, “Corning”, США), в которые предварительно было добавлено по 15 мкл бактериофага Т7 с глюкозой. Инкубацию проводили при температуре 23–25°C с периодическим встряхиванием и определением ОП₆₀₀ через каждые 10 мин в течение не менее 4 ч в планшетном анализаторе “Wallac 1420” (“PerkinElmer”, Финляндия).

Определение рН. Определение значений рН содержимого ячеек НА проводили с помощью микроэлектродов “Biotrode” (“Metrohm”, Швейцария), подключенного к рН-метру “Эксперт-001” (“Эко-никс-Эксперт”, Россия). Изучение рН проводили непосредственно в микропробирках (1.5 мл) после уравнивания испытуемых образцов при комнатной температуре ($n = 3$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние факторов космического полета на скорость лизиса клеток *E. coli* бактериофагом Т7. Был проведен анализ фотоснимков кассет, сделанных космонавтами при проведении экспериментов на МКС, в сравнении с результатами параллельных наземных экспериментов (НЭ). Из-за большого количества мелких пузырьков в ячейках научной аппаратуры в КЭ определение начальных точек лизиса было затруднено. Под скоростью лизиса клеток подразумевали время, в течение которого произошло разрушение клеток бактериофагом, мутность содержимого ячеек снижалась, и четко проявлялись индикаторные полоски на задних стенках ячеек. На рис. 2 представлены фотографии кассет, сделанные в момент заражения и после лизиса клеток вирусом.

Результаты анализа по определению лизиса клеток *E. coli* бактериофагом Т7 представлены в табл. 1. Как видно из данных таблицы, лизис

Таблица 1. Скорость лизиса клеток *E. coli* бактериофагом Т7

БОЕ/клетку	Время лизиса клеток, мин		<i>p</i>
	КЭ	НЭ	
1–10	290 ± 35 ($n = 17$)	342 ± 45 ($n = 11$)	<0.05
0.2–0.5	293 ± 27 ($n = 7$)	426 ± 40 ($n = 10$)	<0.001

клеток бактериофагом в КЭ проходил быстрее, чем в НЭ. В экспериментах, в которых множественность заражения – количество вирусных частиц на одну клетку – (БОЕ/клетку) была больше 1 (от 1 до 10), клетки лизировались бактериофагом в КЭ на 40 мин раньше, чем в НЭ. Для повышения степени достоверности результатов при проведении КЭ и НЭ была снижена концентрация бактериофага, используемая для инфицирования клеток. При уменьшении множественности заражения для достижения полного лизиса должно пройти несколько циклов размножения вирусных частиц, поэтому при различии в скорости разница должна возрасти кратно количеству циклов. Анализ результатов показал, что при снижении множественности инфицирования до 0.2–0.5 БОЕ/клетку лизис *E. coli* бактериофагом Т7 на МКС наступал на 2 ч раньше, чем в НЭ. В условиях действия ФКП клетки лизировались в 1.5 раза быстрее, чем в наземных условиях. Использование множественности заражения <0.2 БОЕ/клетку оказалось невозможным из-за трудности выявления точек лизиса.

Влияние ФКП на рост клеток *E. coli*. После завершения эксперимента измеряли ОП₆₀₀ содержимого каждой ячейки, а также определяли концентрацию жизнеспособных клеток общепринятым методом титрования. В табл. 2 представлены результаты таких измерений для контрольных ячеек в параллельных космических и наземных экспериментах, продолжительность которых была одинаковой.

Из табл. 2 видно, что скорость размножения клеток на МКС была выше: ОП₆₀₀ была в 1.2 ± 0.1 раза, а концентрация клеток *E. coli* в 1.5 ± 0.3 раза больше в КЭ по сравнению с параллельными наземными. При измерении рН среды в контрольных ячейках также выявлена разница. Значение рН было на 0.2–0.3 единицы ниже в контрольных ячейках КЭ и составляло 4.7 и 5.0. В контрольных ячейках параллельных НЭ значение рН было 4.9 и 5.3 соответственно. Более низкий уровень рН в КЭ, вероятно, был обусловлен более высокой интенсивностью метаболизма глюкозы клетками. Совокупность этих данных может свидетельствовать о более высокой скорости размножения клеток в условиях микрогравитации. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей об

Таблица 2. ОП₆₀₀ и концентрация клеток *E. coli* в контрольных ячейках после завершения экспериментов “Микровир”

№ п/п	ОП ₆₀₀		Концентрации клеток, ×10 ⁸ КОЕ/мл	
	КЭ	НЭ	КЭ	НЭ
1	0.408	0.377	4.2	2.6
2	0.404	0.366	4.2	3.3
3	0.572	–	9.3	–
4	0.532	0.397	6.8	2.0
5	0.818	0.680	9.3	4.5
6	0.874	0.700	8.5	6.1
7	0.560	0.458	11	7.7
8	0.571	0.442	10	6.7
Средние значения	0.59 ± 0.17	0.49 ± 0.14	7.9 ± 2.6	4.7 ± 2.2

увеличении скорости роста бактерий в результате воздействия ФКП [10, 11, 19]. Кроме того, в литературе имеются данные о том, что при увеличении скорости размножения бактерии-хозяина скорость размножения бактериофага возрастает [32], что, в свою очередь, согласуется с нашими данными по увеличению скорости размножения бактериофага в условиях МКС.

Снижение чувствительности клеток *E. coli* к бактериофагу T7 в результате адаптации к факторам космического полета. При сравнении фотоснимков, сделанных космонавтами на борту МКС, было замечено, что во всех случаях лизис клеток бактериофагом во второй день эксперимента был значительно меньше, наблюдалось только незначительное снижение мутности в опытных ячейках по сравнению с

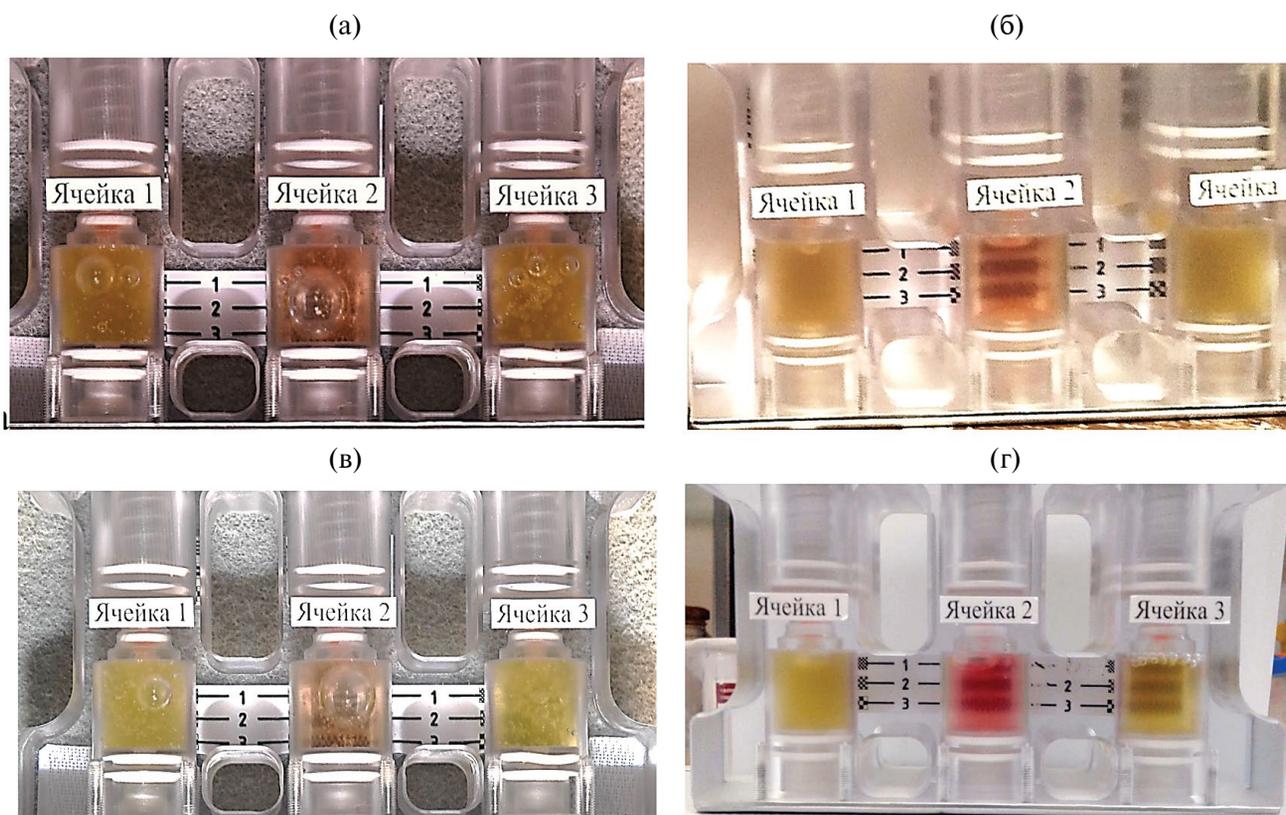


Рис. 2. Фотографии кассет НА “Микровир” сразу после перемещения содержимого верхних ячеек в нижние в КЭ (а) и НЭ (б). Фотографии кассет НА “Микровир” после завершения лизиса клеток в КЭ (в) и НЭ (г).

контрольными, после чего мутность начинала увеличиваться. При этом фоновая мутность была выше в экспериментах, в которых клетки находились в невесомости более 48 ч. В НЭ такой зависимости не было обнаружено. Определение ОП₆₀₀ и концентрации жизнеспособных клеток во всех случаях выявляло снижение этих параметров в ячейках с бактериофагом по сравнению с контрольными ячейками. При этом концентрация клеток в опытных ячейках параллельных НЭ была более, чем в 10 раз ниже концентрации клеток в КЭ. Тем не менее, сравнение этих концентраций не представляется достаточно корректным. Известно, что при инфицировании клеток бактериофагом в небольшом количестве образуются устойчивые к нему клетки, которые начинают размножаться. При анализе фотоснимков отмечено, что после лизиса мутность в ячейках со временем начинала увеличиваться. НЭ останавливали через 8–9 ч инфицирования, когда вторичный рост клеток еще не начинался, в то время как эксперименты на МКС проводили в соответствии с циклограммой. К окончанию КЭ наблюдался значительный рост устойчивых к бактериофагу клеток.

Результаты определения концентрации бактериофага после возвращения научной аппаратуры с МКС также не позволили выявить достоверную разницу в накоплении вируса в первые и вторые сут КЭ, а также при сравнении этих данных с наземными. Во всех опытных ячейках наблюдалось увеличение титра фага по сравнению с исходным. Концентрация бактериофага во всех опытных образцах находилась в пределах 10^9 – 10^{10} БОЕ/мл. Однако адсорбция фаговых частиц на поверхности ячеек, значительное снижение рН среды в КЭ (4,7–5,1) в процессе роста клеток – факторы, вызывающие снижение титра бактериофага Т7, находившегося в неблагоприятных условиях не менее 14 сут, которые не позволили оценить реальное накопление вируса.

Были проведены дополнительные исследования по изучению чувствительности клеток к бактериофагу после завершения экспериментов. Клетки как в КЭ, так и НЭ, отобранные из контрольных ячеек после завершения экспериментов, не взаимодействовали с бактериофагом даже после добавления глюкозы. Для того чтобы исключить влияние продуктов метаболизма на результаты взаимодействия клеток с вирусом, из каждой ячейки отбирали по 1 мл образца в стерильные пробирки и проводили замену питательной среды. После этого оценивали чувствительность клеток к бактериофагу по изменению ОП₆₀₀ в планшетном анализаторе, как описано в Методике. Чувствительность клеток к вирусу проверяли, начиная с первых суток после возвращения аппаратуры с МКС, а также в последующие 5 сут. До начала каждого исследования суспензии клеток, отобранные из ячеек научной аппаратуры, хранили в отдельных полностью заполненных пробирках при 4°C. Замену среды проводили в день эксперимента.

На рис. 3 представлены результаты определения чувствительности контрольных клеток *E. coli* к бактериофагу Т7 после завершения экспериментов. Как видно из рис. 3а, первые двое суток после возвращения с МКС контрольные клетки КЭ не взаимодействовали с бактериофагом, не наблюдалось снижения ОП₆₀₀ после добавления клеток к вирусу (линии 1 и 2). Чувствительность к бактериофагу клеток КЭ начинала восстанавливаться на 3 сут после возвращения на Землю (линии 3 и 4), и к 5 сут она была сравнима с исходной (линии 5 и 6). Нужно отметить, что чувствительность клеток из второго этапа КЭ восстанавливалась медленнее (линии 4 и 6). В то же время, клетки из НЭ сохраняли чувствительность к бактериофагу (рис. 3б).

Таким образом, чувствительность клеток *E. coli* к бактериофагу Т7 в жидкой среде при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$ и в условиях дефицита кислорода снижалась

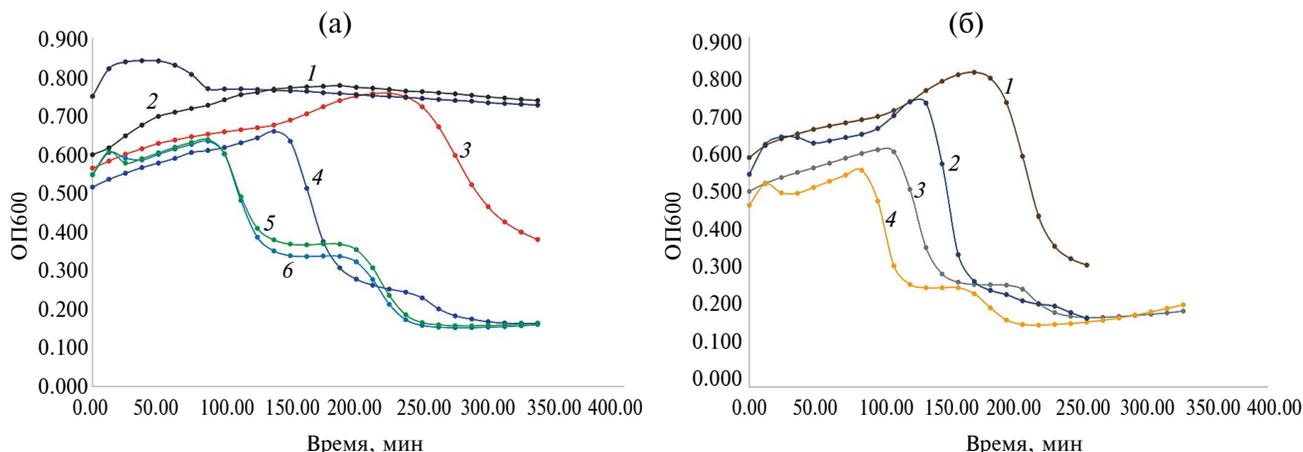


Рис. 3. Чувствительность контрольных клеток *E. coli* из КЭ к бактериофагу Т7 после возвращения НА “Микровир” с МКС (а): 1 – 1 сут, 2 – 2 сут, 3 – 3 сут (эксперимент второго дня), 4 – 3 сут (эксперимент первого дня), 5 – 5 сут (эксперимент второго дня), 6 – 5 сут (эксперимент первого дня). Чувствительность контрольных клеток *E. coli* из НЭ к бактериофагу Т7 после завершения эксперимента (б): 1 – 1 сут, 2 – 1 сут, 3 – 3 сут, 4 – 5 сут.

в процессе их адаптации к факторам космического полета. В условиях космоса бактерии в организме человека также могут адаптироваться к микрогравитации и приобретать устойчивость к бактериофагу. В таком случае возможность использования бактериофагов в качестве готовых лекарственных препаратов в условиях космоса становится ограниченной. Тем не менее, нельзя автоматически переносить результаты влияния ФКП на взаимодействие бактериофага T7 с клетками *E. coli* на другие системы бактерия-вирус из-за различий размножения бактериофагов в своей клетке-хозяине. Считается также, что причиной изменения кинетики роста неподвижных бактерий во время космического полета являются нарушения внеклеточного транспорта питательных веществ и побочных продуктов. Различия в диффузии и других химических изменениях клеточного микроокружения могут играть значительную роль в изменении микробных метаболических реакций в условиях микрогравитации, однако для подвижных микроорганизмов эти различия нивелируются [24]. В ряде работ сообщается, что повышенная устойчивость к антибиотикам, наблюдаемая у микробов во время космического полета, не сохранялась после возвращения на Землю. В работе У. Уилсон с соавт. [23] удалось показать изменения в экспрессии бактериальных генов и вирулентности *Salmonella typhimurium* при исследовании образцов через 2.5 ч после приземления. В настоящей работе показано, что результаты экспериментов зависели от сроков проведения исследований после доставки научной аппаратуры на МКС и после возвращения на Землю. Клетки *E. coli* сохраняли приобретенную в процессе адаптации к факторам космического полета устойчивость к бактериофагу T7 двое суток после возвращения на Землю. В последующие сутки чувствительность клеток к бактериофагу восстанавливалась. Известно, что биологические эксперименты в космосе требуют больших затрат и специальной аппаратуры, должны вписываться в график работы космонавтов. Способность бактерий сохранять приобретенные в космическом полете свойства первые сутки после возвращения на Землю может оказаться полезной для проведения предварительных исследований по поиску антимикробных препаратов.

Таким образом, впервые исследовано взаимодействие бактерий с бактериофагом на модельной системе клетки *E. coli* – бактериофаг T7 в условиях космического полета. Результаты взаимодействия зависели от продолжительности воздействия на систему ФКП. Скорость размножения вируса на МКС была выше по сравнению с наземными условиями в первые 2 сут воздействия микрогравитации. В дальнейшем происходила адаптация клеток к условиям космического полета, и они приобретали устойчивость к бактериофагу, которая сохранялась в течение 2 сут после возвращения на Землю. В течение последующих 3 сут чувствительность клеток *E. coli* к бактериофагу T7 восстанавливалась до исходного уровня.

Авторы благодарят Валентина Ивановича Евстигнеева, исполнявшего обязанности председателя подсекции “Космическая биотехнология” КНТС Роскосмоса, первого заместителя генерального директора ОАО “Биопрепарат”, инициировавшего данное исследование, космонавтов А.И. Борисенко, А.А. Мисуркина, А.Н. Шкаплерова, С.В. Прокопьева, А.Н. Овчинина, И.В. Вагнера, О.Г. Артемьева, П.В. Дуброва и С.В. Кудь-Сверчкова, выполнявших эксперименты на МКС, сотрудника РКК “Энергия” А.В. Прохорову, принимавшую активное участие в подготовке эксперимента в лаборатории филиала “Байконур”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа поддержана Государственной корпорацией по космической деятельности “Роскосмос” в рамках Государственного контракта от 8.09.2016 г. № 851-8619/16/98, идентификатор государственного контракта – 4770238802716000051.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАР-ТОВ. Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Novikova N.D. // *Microb. Ecol.* 2004. V. 47. №. 2. P. 127–132.
2. Novikova N., De Boever P., Poddubko S., Deshevaya E., Polikarpov N., Rakova N. et al. // *Res. Microbiol.* 2006. V. 157. № 1. P. 5–12.
3. Zhang Y., Zhang L.T., Li Z.D., Xin C.X., Li X.Q., Wang X., Deng Y.L. // *Microb. Ecol.* 2019. V. 78. № 3. P. 631–650.
4. Checinska Sielaff A., Urbaniak C., Mohan G.B.M., Stepanov V.G., Tran Q., Wood J.M. et al. // *Microbiome.* 2019. V. 7(1): 50. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0666-x>
5. Ichijo T., Yamaguchi N., Tanigaki F., Shirakawa M., Nasu M. // *NPJ Microgravity.* 2016. V. 2. 16007. <https://doi.org/10.1038/npjmgrav.2016.7>
6. Crucian B., Babiak-Vazquez A., Johnston S., Pierson D.L., Ott C.M., Sams C. // *Int. J. Gen. Med.* 2016. № 9. P. 383–391.
7. Gray G.W., Sargsyan A.E., Davis J.R. // *Aviat. Space Environ. Med.* 2010. V. 81. №. 12. P. 1128–1132.
8. Nickerson C.A., Ott C.M., Wilson J.W., Ramamurthy R., Pierson D.L. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004. V. 68. № 2. P. 345–361.
9. Senatore G., Mastroleo F., Leys N., Mauriello G. // *Future Microbiol.* 2018. № 13. P. 831–847.
10. Huang B., Li D.G., Huang Y., Liu C.T. // *Mil. Med. Res.* 2018. V. 5. № 1 :18. <https://doi.org/10.1186/s40779-018-0162-9>
11. Horneck G., Klaus D.M., Mancinelli R.L. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010. V. 74. P. 121–156.

12. Kim W., Tengra F.K., Young Z., Shong J., Marchand N., Chan H.K., // PloS One. 2013. V. 8. № 4. e62437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062437>
13. McLean R.J., Cassanto J.M., Barnes M.B., Koo J.H. // FEMS Microbiol. Lett. 2001. V. 195. № 2. P. 115–119.
14. Рыбальченко О.В., Орлова О.Г., Вишневецкая О.Н., Капустина В.В., Потокин И.Л., Лаврикова В.В. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. Т. 93. № 6. С. 3–10.
15. Benoit M.R., Li W., Stodieck L.S., Lam K.S., Winther C.L., Roane T.M., Klaus D.M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V.70. №. 4. P. 403–411.
16. Morrison M.D., Fajardo-Cavazos P., Nicholson W.L. // Appl Environ Microbiol. 2017. V. 83. № 21. e01584-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01584-17>
17. Leys N.M., Hendrickx L., De Boever P., Baatout S., Mergeay M. // J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 2004. V. 18. № 2. P. 193–199.
18. Padgen M.R., Lera M.P., Parra M.P., Ricco A.J., Chin M., Chinn T.N. et al. // Life Sci. Space Res. (Amst). 2020. V. 18. № 24. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2019.10.00719>
19. Zea L., Prasad N., Levy S.E., Stodieck L., Jones A., Shrestha S., Klaus D. A. // PLoS One. 2016. №. 11: e0164359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164359>
20. Aunins T.R., Erickson K.E., Prasad N., Levy S.E., Jones A., Shrestha S. et al. // Front Microbiol. 2018. V. 9. №. 310. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00310>
21. Zea L., Larsen M., Estante F., Qvortrup K., Moeller R., Dias de Oliveira S., et al. // Front Microbiol. 2017. V. 8. 1598. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01598>
22. Urbaniak C., Sielaff A.C., Frey K.G., Allen J.E., Singh N., Jaing C., Wheeler K., Venkateswaran K. // Sci. Rep. 2018. №.8 (814). P. 1–23.
23. Wilson J.W., Ott C.M., Höner zu Bentrup K., Ramamurthy R., Quick L., Porwollik S. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2007. V. 104. № 41. P. 16299–16304.
24. Taylor P. // Infect Drug Resist. 2015. №. 8. P. 249–262.
25. Kutter E.M., Kuhl S.J., Abedon S.T. // Future Microbiology. 2015. V. 10. №. 5. P. 685–688.
26. Bourdin G., Navarro A., Sarker S.A., Pittet A.C., Qadri F., Sultana S. et al. // Microb Biotechnol. 2014. № 7(2). P. 165–176. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12113>
27. Kropinski A.M. // Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. 2006. V. 17. № 5. P. 297–306.
28. Donlan R.M. // Trends Microbiol. 2009. № 17. P. 66–72.
29. Latz S., Wahida A., Arif A., Hafner H., Hoss M., Ritter K., Horz H.P. // J. Basic Microbiol. 2016. V. 56. № 10. P. 1117–1123.
30. Крылов С.В., Кропински А.М., Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Буркальцева М.В., Мирошников К.А., Крылов В.Н. // Генетика. 2012. Т. 48. № 9. С. 1057–1067.
31. Aleshkin A., Rubalsky E., Popova F., Bogun A., Evstigneev V., Pchelintsev S. et al. // EMBO Conference on Viruses of Microbes. Цюрих, Швейцария, 2014.
32. Nabergoj D., Modic P., Podgornik A. // Microbiology Open. 2018. V. 7. № 2. e00558. <https://doi.org/10.1002/mbo3.558>

The Effect of Space Flight Factors on the Interaction of *Escherichia coli* with Bacteriophage T7

N. N. Sykilinda^{a,*}, A. A. Lukianova^a, V. V. Lavrikova^b, I. V. Kutnik^c, N. V. Panin^d,
N. A. Staritsyn^b, and K. A. Miroshnikov^a

^aShemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences,
Moscow, 117997 Russia

^bJSC “БИОХИММАШ”, Moscow, 127299 Russia

^cYu. A. Gagarin Research and Test Cosmonaut Training Center, Star City, Moscow region, 141160 Russia

^dLomonosov Moscow State University, Research Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology,
Moscow, 119991 Russia

*e-mail: sykilinda@mail.ru

For the first time, the interaction between bacteria and bacteriophage was studied under space conditions. The model system of *E. coli* and bacteriophage T7 was used. The results of the interaction depended on the duration of exposure of the system to space flight factors. During the first 2 days of microgravity exposure the virus replication rate in Space was higher than on Earth. The bacteria then have adapted to space conditions and acquired resistance to the bacteriophage, which persisted for 2 days after return to Earth. Over the next three days, the sensitivity of the *E. coli* to the T7 bacteriophage returned to its original level.

Keywords: *E. coli* cells, bacteriophage T7, lysis, space flight factors

УДК 579.64

АБК-ДЕГРАДИРУЮЩИЕ ШТАММЫ БАКТЕРИЙ РОДА *Pseudomonas* И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РОСТ ПШЕНИЦЫ

© 2024 г. А. С. Рябова¹, Л. Ю. Кузьмина¹, * Е. А. Гильванова¹, Н. Ф. Галимзянова¹, Е. В. Мартыненко¹, Л. Б. Высоцкая¹, Г. Р. Кудоярова¹

¹Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: lky_karova2020@mail.ru

Поступила в редакцию 06.04.2024 г.

После доработки 17.04.2024 г.

Принята к печати 28.04.2024 г.

Выявлены три новых представителя рода *Pseudomonas*, способные утилизировать абсцизовую кислоту (АБК) и положительно влиять на рост и развитие растений. Изучены их физиолого-биохимические свойства. По результатам анализа гена 16S рРНК они определены как *Pseudomonas veronii* IB K11-1 (уровень сходства 99.86%), *P. frederiksbergensis* IB Ta10m (100%), штамм ТаЕ2 отнесен к *Pseudomonas* sp. Обнаружено, что бактерии при выращивании на минерально-солевой среде с АБК снижали содержание гормона на 50–60% при увеличении плотности популяции на два порядка. В лабораторном опыте показано, что внесение в ризосферу растений пшеницы бактерий в количестве 10⁸ КОЕ/г субстрата через 10 сут после обработки приводило к снижению содержания АБК в корнях на 18–30% и к увеличению массы растений до 30%. Таким образом, выявлены и впервые охарактеризованы новые штаммы рост стимулирующих АБК-деградирующих бактерий, которые могут быть перспективными для создания биопрепаратов, повышающих устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессам.

Ключевые слова: АБК-метаболизирующие и рост стимулирующие бактерии, *Pseudomonas*, *P. veronii*, *P. frederiksbergensis*, *Triticum durum* Desf., абсцизовая кислота

DOI: 10.31857/S0555109924050088 EDN: QTGPPW

Бактерии, способные стимулировать рост растений, все шире применяются в растениеводстве для повышения урожайности. Для того чтобы повысить эффективность применения бактериальных препаратов, важно более глубоко изучить их влияние на растения [1]. Прежде всего, механизм стимулирующего рост действия бактерий связывают со способностью улучшать снабжение растений питательными веществами [2], повышать устойчивость к биотическим [3] и абиотическим факторам [4]. Еще одно важное свойство бактерий – их способность продуцировать фитогормоны стимулирующего типа действия и катаболизировать гормоны – ингибиторы. Продукция бактериями фитогормонов первого типа изучена гораздо глубже. Особенно много публикаций описывают синтез бактериями ауксинов, которые стимулируют рост растений, ветвление корней, [5] поглощение элементов минерального питания, а также фитогормонов цитокининов [6] и гиббереллинов [7].

Способность бактерий катаболизировать гормоны-ингибиторы в большей степени изучена на действии дезаминаз, катализирующих

распад предшественника этилена аминокциклопропан-1-карбоксилата (АЦК) [8, 9]. Изучению способности бактерий разрушать абсцизовую кислоту (АБК) уделялось очень мало внимания. Этот гормон определяет способность растений к адаптации к условиям окружающей среды путем регулирования газообмена, поддержания водного баланса, определяет переход растений в состояние покоя, созревания и прорастания семян [10], принимает участие в формировании защитных реакций растений против фитопатогенных микроорганизмов [11]. Тем не менее, избыточная продукция АБК в стрессовых условиях способствует ингибированию роста растений. Так, выступая в качестве антагониста ауксинов, АБК ингибирует ветвление корней [12]. Показано, что подавление роста растений в загущенных посевах объясняется повышенной продукцией этого гормона [13]. Абсцизовая кислота выделяется корнями растений в почву и как устойчивое соединение накапливается в ней до концентраций, оказывающих негативное влияние на сами растения. Обнаружено, что ее содержание

в почве может меняться и с помощью радиоактивной метки показано ее разрушение [14].

Имеются данные о снижении концентрации абсцизовой кислоты в растениях под влиянием ряда бактерий, являющимися продуцентами или ингибиторами других фитогормонов. Однако не всегда этот феномен объясняется метаболизмом АБК самими бактериями. Так, например, *Variovorax paradoxus* 5C-2, обладающая АЦК-дезаминазной активностью [15], или *Promicromonospora* sp. SE188, потребляющая 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат [7], снижали концентрацию АБК в растениях. В тоже время, обе бактерии в чистой культуре не использовали АБК в качестве единственного источника углерода. В этом случае влияние бактерий на уровень АБК в растениях, очевидно, был связан с их воздействием на метаболизм гормонов у растений [16].

До недавнего времени были известны лишь несколько штаммов микроорганизмов, разрушающих абсцизовую кислоту. Первым идентифицированным штаммом, использующим абсцизовую кислоту в качестве единственного источника углерода и энергии, был *Corynebacterium* sp. 433-3-2 [17]. Позднее были выявлены еще два штамма АБК-метаболизирующих бактерий *Novosphingobium* sp. P6W и *Rhodococcus* sp. P1Y [18]. Недавно как АБК-катаболизирующий был заявлен штамм *Pseudomonas plecoglossicida* 2.4-D [13]. Других сведений о представителях этого рода, утилизирующих фитогормон АБК, в литературе не удалось обнаружить, хотя бактерии этого рода довольно часто входят в состав уже применяемых биопрепаратов.

Метаболические пути превращения молекул АБК при потреблении бактериями остаются еще слабоизученными. Идентификация продуктов распада меченой дейтерием АБК позволила обнаружить, что циклогексеновая часть молекулы остается не затронутой, а также выявлено три продукта, полученные путем частичного или полного усечения ацильного фрагмента молекулы [19]. Исследованные продукты представляли собой дегидровимифолиол [20] и родококковую кислоту [21]. Исследователи сходятся во мнении, что метаболизм абсцизовой кислоты бактериальными штаммами может проходить разными путями, описание которых носит предположительный характер.

Несмотря на очень скудные сведения о бактериях АБК-деструкторах, они могут быть перспективными в качестве регуляторов содержания АБК в растениях и в почве, способствовать более мягкому прохождению растениями воздействия биотических и абиотических факторов. Создание и применение биопрепаратов, снижающих содержание АБК в растении и в почве, включает в себя поиск новых АБК-катаболизирующих бактерий с рост регулируемыми свойствами.

Цель настоящей работы – изучение свойств выделенных штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, способных утилизировать АБК, и оценка их влияния на рост и развитие растений пшеницы.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В качестве объектов исследования были использованы бактерии из коллекции Уфимского института биологии УФИЦ РАН. В результате предварительно проведенного скрининга из 112 представителей, относящихся к разным родам, среди которых *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Dietzia*, *Pedobacter*, *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, *Rugamonas*, *Serratia* [22], для исследования были отобраны АБК-потребляющие штаммы IB K11-1 (UIB-255), IB Ta10m (UIB-256) и IB TaE2 (UIB-257).

Штаммы IB Ta10m и IB TaE2 были выделены из пещеры Таврида (Россия) из ископаемых зоогенных отложений и минерального образования мондмилых соответственно. Штамм IB K11-1 был выделен из уплотненного грунта пещеры Киндерлинская (Южный Урал, Россия).

Физиолого-биохимические свойства бактерий изучали, руководствуясь методическими рекомендациями по идентификации микроорганизмов [23].

Выделение ДНК, амплификация и секвенирование гена 16S рРНК. Идентификацию чистых культур проводили методом анализа гена 16S рРНК. Выделение ДНК проводили с использованием набора FastDNA Spin Kit “MP Bio” (США). Амплификацию фрагментов бактериальных генов 16S рРНК проводили с использованием универсальных бактериальных праймеров 27F (5'-AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3') на приборе C1000 Touch™ Thermal Cycler “Bio-Rad Laboratories” (США). Определение нуклеотидных последовательностей проводили с применением набора реактивов GenSeq-100 “Синтол” (Россия) на автоматическом секвенаторе “Нанофор 05” (“Синтол”, Россия). Сборку и множественное выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программ Sequence Scanner v 2.0 и MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>). Поиск гомологичных последовательностей произведен при использовании ресурсов баз данных EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) и GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Получение бактериальной суспензии. Бактерии для инокуляции минеральной среды с АБК и обработки пшеницы выращивали на среде Кинг Б. Культивирование осуществляли в 50 мл питательной среды в колбах Эрленмейера на шейкере-инкубаторе “Innova 40R” (США) при 25°C и 160 об./мин в течение суток. Бактериальные клетки отделяли от

супернатанта на центрифугах “Eppendorf MiniSpin plus” (Германия) или “Sigma 2-16PK” (Германия) при 8000 g. Полученную микробную биомассу разбавляли в стерильной минерально-солевой среде (МСМ) [18] до оптической плотности 0.05–0.1 (титр вносимой суспензии 10^4 КОЕ/мл) при длине волны 600 нм на спектрофотометре СФ-56 “ЛЮМО-Спектр” (Россия). Для инокуляции минеральной среды с АБК использовали 20 мкл бактериальной суспензии. При обработке пшеницы суспензию разводили в стерильной водопроводной воде.

Культивирование бактерий на минеральной среде с АБК. Способность бактериальных штаммов использовать абсцизовую кислоту в качестве единственного источника углерода и энергии изучали при культивировании в жидкой среде МСМ. Абсцизовую кислоту “Servicebio” (Китай) добавляли в стерильную среду до конечной концентрации 0.25 мг/мл.

Инкубацию 5 мл питательной среды МСМ с АБК и соответствующим инокулятом проводили в пробирках в условиях аэрации на шейкере-инкубаторе Innova в течение 14 сут в условиях, описанных выше. Пробы культуральной жидкости отбирали в конце опыта для определения в них остаточного содержания АБК.

Определение АБК в культуральной жидкости. После центрифугирования культуральной жидкости АБК экстрагировали из супернатанта при помощи диэтилового эфира по модифицированной схеме с уменьшением объема [5]. Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили по протоколу, описанному ранее [24].

Вегетационные опыты. Растения твердой пшеницы *Triticum durum* Desf., сорта Башкирская 27 выращивали на светоплощадке с освещенностью $450 \text{ мкмоль/м}^2/\text{с}$ фотосинтетической активной радиации с 14-часовым световым периодом, влажностью воздуха 30–50% общего содержания воды. Семена пшеницы после стерилизации смесью этанола с перекисью водорода проращивали в стерильных чашках Петри. Двухсуточные проростки высаживали в вегетационные сосуды по 20 в один горшок с 0.7 кг стерильного песчаного субстрата, пропитанного 100%-ным питательным раствором Хогланда-Арнона (Х-А). Растения в течение эксперимента поливали 1 раз в сут, в качестве подкормки вносили равные объемы питательного раствора Х-А, после чего в каждый горшок по весу добавляли воду, в зависимости от транспирационных потерь, до влажности субстрата 80% от полной влагоемкости (ПВ). При таком режиме полива влажность песка в горшках изменялась в пределах от 80% (после полива) до 40% (перед поливом) от ПВ и не предполагала воздействия на растения водного дефицита. Инокуляцию растений бактериями проводили в день посадки проростков путем внесения в прикорневую зону суспензии отмытых бактериальных

клеток до конечной концентрации 10^8 КОЕ/г субстрата. Концентрация выбрана на основании анализа результатов влияния *P. plecoglossicida* 2.4-D на рост растений салата при плотной посадке [13]. Было показано, что при выращивании на пропитанном питательным раствором стерильном песке концентрация 10^8 была более эффективной, по сравнению с 10^6 КОЕ/г субстрата.

Статистический анализ. Для анализа полученных данных использовали программу Microsoft Excel 2010. Для определения достоверных различий между средними значениями ($P \leq 0.05$) применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с использованием критерия Дункана.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Физиолого-биохимические свойства штаммов.

Клетки бактерий представляли собой граммотрицательные подвижные палочки. Флуоресцирующий пигмент на среде Кинг Б выделял только штамм IB K11-1. Все штаммы оказались положительными по оксидазе, каталазе и уреазе, способными к денитрификации и гидролизу аргинина и отрицательными по гидролизу эскулина. Из 3 штаммов желатин не гидролизировал только IB Ta10m. Все штаммы использовали в качестве источника углерода глюкозу, d-маннит, L-арабинозу, сахарозу, целлобиозу, цитрат и ацетат, но не сукцинат. Не использовали раффинозу IB K11-1 и IB Ta10m, лактозу – IB Ta10m, пропионат – IB K11-1.

Температурный диапазон роста штаммов составлял 4–30°C. Рост всех культур происходил в диапазоне pH – 5.5–8.0, концентрации NaCl – 0–3% для штамма IB TaE2 и 0–5% для IB K11-1 и IB Ta10m.

Идентификация штаммов. Анализ гена 16S рРНК исследуемого штамма IB K11-1 выявил высокую степень гомологии таксономического маркера на уровне 99.86% с *Pseudomonas veronii* CFML 92-134^T (= DSM 11331^T = CIP 104663^T) (NR_028706). Таксономический статус штамма IB K11-1 также подтверждался общностью его физиолого-биохимических характеристик. Штамм IB K11-1 не потреблял пропионат и эритрит в отличие от типового штамма [25].

Уровень сходства последовательностей гена 16S рРНК типового *P. frederiksborgensis* JAJ28^T (= DSM 13022^T) (NR_117177) и штаммов IB Ta10m и IB TaE2 составлял 100 и 99.8% соответственно. Штамм IB Ta10m отличался от типового штамма *P. frederiksborgensis* JAJ28^T [26] лишь по двум признакам – наличием активности уреазы и отсутствием способности к гидролизу желатина. Штамм IB TaE2 утилизировал лактозу, раффинозу, но не пропионат, а также был способен к гидролизу мочевины. Совокупность отличий не позволили отнести его к виду *P. frederiksborgensis*.

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК исследованных культур *P. veronii* IB K11-1 длиной 1444 п.н., *P. frederiksbergensis* IB Ta10m (1429 п.н.) и *Pseudomonas* sp. IB TaE2 (1473 п.н.) депонированы в международной базе данных GenBank под номерами PP237770, PP316701 и PP316703 соответственно.

Рост бактерий на абсцизовой кислоте. Для исследований были отобраны штаммы бактерий, способные расти на среде, где АБК была единственным источником углерода [22]. Как видно из табл. 1 численность бактерий этих штаммов увеличивалась на два порядка. Представляет интерес то, что способность этих штаммов к деструкции АБК была неодинаковой: через 14 сут инкубации концентрация гормона в культуральной жидкости снижалась почти на 60% в случае *P. veronii* IB K11-1, на 50% – на среде с *P. frederiksbergensis* IB Ta10m, наименьший процент снижения уровня АБК был отмечен у *Pseudomonas* sp. IB TaE2. Таким образом, корреляции между способностью бактерий снижать уровень АБК и поддержанием роста штаммов бактерий на этой среде не была выявлена.

Известно, что в ходе метаболизма абсцизовой кислоты выделяются различные продукты [17, 19], которые микроорганизмы могут использовать с разной эффективностью. Можно предположить, что хотя бактерии *P. veronii* IB K11-1 обладали большей способностью к деструкции АБК, продукты этого процесса в меньшей степени способствовали поддержанию роста бактерий по сравнению с *Pseudomonas* sp. IB TaE2, которые разрушали в 2 раза меньше АБК.

Влияние бактерий на содержание АБК в растениях. Важно было проверить, как изученные бактерии влияли на содержание АБК в растениях пшеницы. Из результатов, представленных на рис. 1а, видно, что через 10 сут после посадки в горшки трехсуточных проростков и внесения в ризосферу суспензии бактериальных клеток (до 10^8 КОЕ/г почвы), инокуляция *Pseudomonas* sp. IB TaE2 не оказывала влияния на содержание АБК в корнях растений. В тоже время, присутствие в

ризосфере растений бактерий *P. frederiksbergensis* IB Ta10m снижало уровень АБК в корнях на 18%, а бактерий *P. veronii* IB K11-1 – почти на 30%. Легко заметить, что сравнение снижения уровня АБК в корнях и культуральной жидкости бактерий выявляет корреляцию между ними. Наибольшее снижение уровня АБК в корнях вызывали бактерии, обладающие наиболее выраженной способностью к деструкции АБК. По данным литературы, АБК, продуцируемая растениями, поступает в почву, где она может разрушаться, а ее содержание в корнях достигает равновесного состояния с концентрацией этого гормона в почве [13, 14]. Этим можно объяснить тот факт, что присутствие в ризосфере бактерий, способных наиболее эффективно разрушать АБК, сопровождалось наибольшим снижением уровня этого гормона в корнях.

Влияние на рост растений пшеницы. На следующем этапе было важно сравнить способность бактерий влиять на рост растений. Инокуляция как *P. frederiksbergensis* IB Ta10m, так и *P. veronii* IB K11-1 увеличивали массу растений пшеницы на 23–29%, в то время как тенденция стимулирующего роста действия штамма IB TaE2 была статистически недостоверной (рис. 1б).

Для объяснения стимулирующего роста влияния бактерий часто привлекают данные по оценке способности бактерий продуцировать ауксины. Все три изученных штамма продуцировали ауксины, и эти гормоны могли внести определенный вклад в стимулирование роста растений (рис. 2). Однако уровень продукции ауксинов бактериями мало отличался, в то время как они оказывали различное влияние на массу растений. Более достоверно проявлялась связь с ростом растений как способность бактерий катаболизировать АБК и снижать уровень этого гормона у инокулированных растений. Так, стимулирующее рост влияние бактерий наиболее заметно проявлялось при действии *P. frederiksbergensis* IB Ta10m и *P. veronii* IB K11-1, которые оказались способны достоверно снижать уровень АБК в корнях растений. Как упоминалось выше, АБК является антагонистом ауксинов

Таблица 1. Численность АБК-деградирующих бактерий рода *Pseudomonas* и потребление абсцизовой кислоты в качестве единственного источника углерода и энергии на 14 сут культивирования

Штамм	Концентрация АБК, мг/л	Численность бактерий, КОЕ/мл КЖ*	
		исходная	конечная
Неинокулированная среда ММС + АБК	250 ± 4*	0	0
<i>P. veronii</i> IB K11-1	105 ± 4	$4.7 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^3$	$1.1 \times 10^7 \pm 1.2 \times 10^6$
<i>P. frederiksbergensis</i> IB Ta10m	130 ± 5	$2.1 \times 10^4 \pm 2.6 \times 10^3$	$5.0 \times 10^6 \pm 2.3 \times 10^5$
<i>Pseudomonas</i> sp. IB TaE2	185 ± 15	$3.6 \times 10^4 \pm 9.9 \times 10^3$	$4.8 \times 10^6 \pm 1.8 \times 10^5$

* Среднее значение ± доверительный интервал по t-критерию Стьюдента при $P < 0.05$.

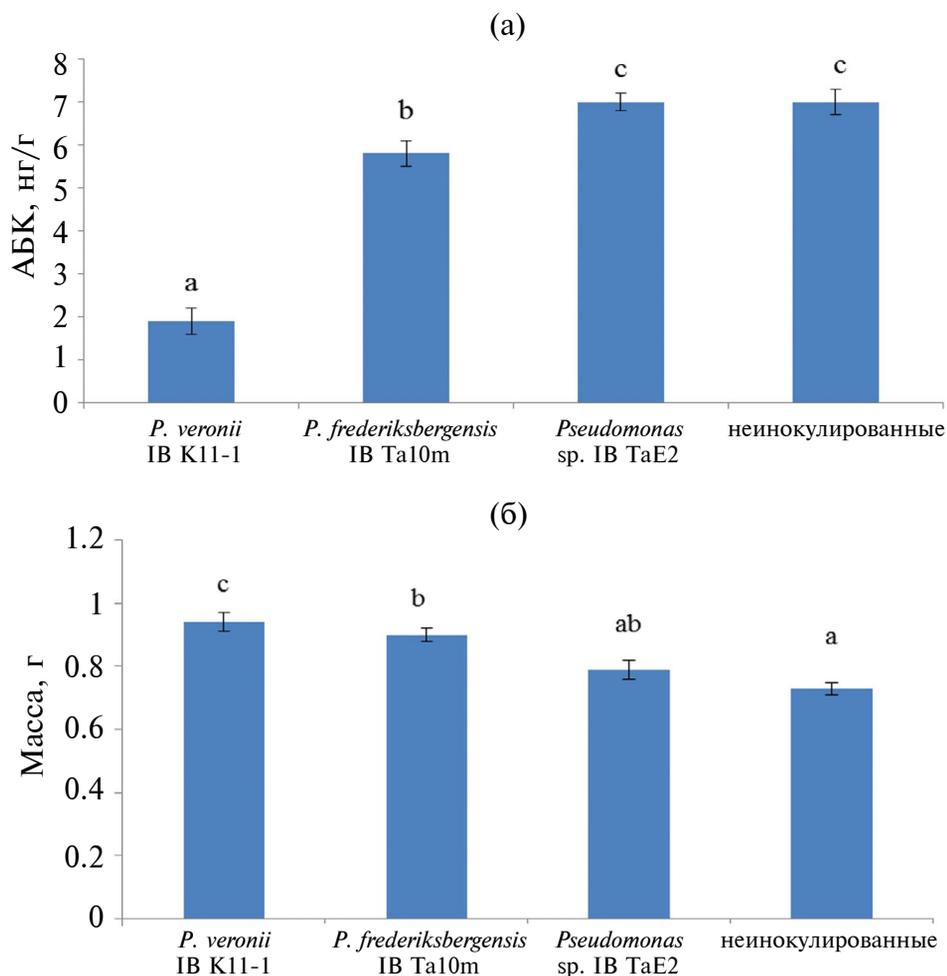


Рис. 1. Содержание АБК (нг/г сырой массы) в корнях (а) и масса растений пшеницы (б) через 10 сут после посадки трехсуточных проростков в горшки и внесения в ризосферу суспензии (до 10^8 КОЕ/г почвы) штаммов-деструкторов АБК *Pseudomonas veronii* IB K11-1, *P. frederiksbergensis* IB Ta10m и *Pseudomonas* sp. IB TaE2, контроль – неинокулированные растения. Представлены средние значения \pm стандартные ошибки. Разными буквами обозначены достоверно отличающиеся значения ($P \leq 0.05$, ANOVA, критерий Дункана).

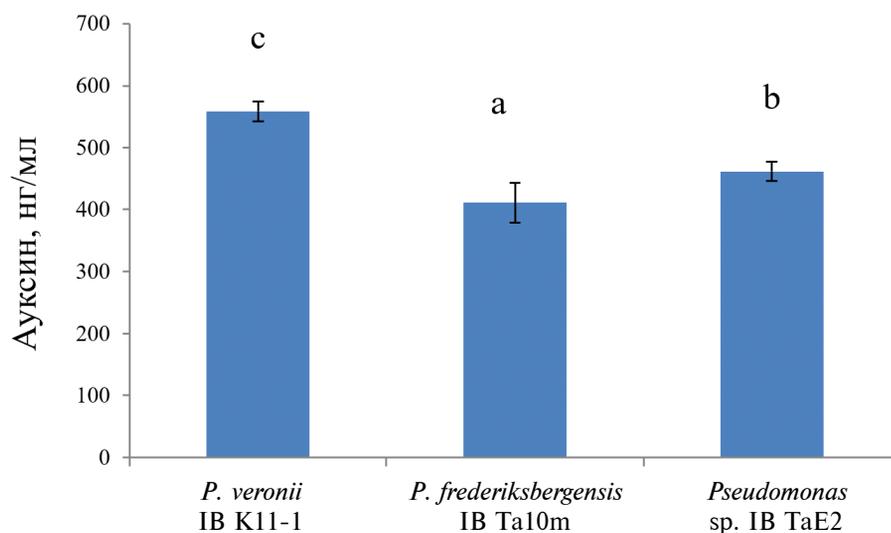


Рис. 2. Содержание ауксина (нг/мл) в культуральной жидкости штаммов *Pseudomonas veronii* IB K11-1, *P. frederiksbergensis* IB Ta10m и *Pseudomonas* sp. IB TaE2 на среде Кинг Б на 3 сут культивирования. Обозначения как на рис. 1.

и, следовательно, может подавлять ветвление корней [12], что должно отрицательно сказаться на способности корневой системы поглощать воду, элементы минерального питания и поддерживать рост растений. Эти свойства АБК позволяют объяснить, каким образом снижение ее уровня в корнях может оказывать положительное влияние на рост растения.

Таким образом, выявлены три новых представителя рода *Pseudomonas* – *P. frederiksbergensis* IB Та10m, *P. veronii* IB К11-1, *Pseudomonas* sp. IB ТаЕ2, способных утилизировать абсцизовую кислоту и положительно влиять на рост растений. Изучение механизмов влияния этих бактерий-деструкторов АБК на растения можно рассматривать как перспективное направление в создании биопрепаратов, повышающих устойчивость растений при неблагоприятных условиях среды.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 23-26-00104 “Влияние бактерий, способных катаболизировать абсцизовую кислоту, на рост растений в загущенных посевах”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Samain E., Ernenwein C., Aussenac T., Selim S. // Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2022. V. 119. P. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2022.101830>
2. *Chieb M., Gachomo E.W. // BMC Plant Biol.* 2023. V. 23. N. 407. P. 1–23. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04403-8>
3. *Burkhanova G.F., Veselova S.V., Sorokan A.V., Blagova D.K., Nuzhnaya T.V., Maksimov I.V. // Appl. Biochem. Microbiol.* 2017. V. 53. № 3. P. 346–352. <https://doi.org/10.1134/S0003683817030048>
4. *Kudoyarova G., Arkhipova T., Korshunova T., Bakaeva M., Loginov O., Dodd I.C. // Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. № 1368. P. 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01368>
5. *Kudoyarova G.R., Vysotskaya L.B., Arkhipova T.N., Kuzmina L.Yu., Galimsyanova N.F., Sidorova L.V. et al. // Acta Physiol. Plant.* 2017. V. 39. № 253. P. 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2556-9>
6. *Liu F., Xing S., Ma H., Du Z., Ma B. // Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 97. P. 9155–9164. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5193-2>
7. *Kang S.M., Khan A.L., Hamayun M., Hussain J., Joo G.J., You Y.H., Kim J.G., Lee I.J. // J. Microbiol.* 2012. V. 50. P. 902–909.
8. *Chen L., Dodd I.C., Theobald J.C., Davies W.J., Belimov A.A. // J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. № 69. P. 1565–1573. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert031>
9. *Glick B.R. // Microbiol. Res.* 2014. V. 169. № 1. P. 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
10. *Chen K., Li G.J., Bressan R.A., Song C., Song C.P., Zhu J.K., Zhao Y. // J. Integr. Plant. Biol.* 2020. V. 62. № 1. P. 25–54. <https://doi.org/10.1111/jipb.12899>
11. *Максимов И.В. // Физиология растений.* 2009. Т. 56. № 6. С. 824–835.
12. *Akhiyarova G., Veselov D., Ivanov R., Sharipova G., Ivanov I., Dodd I.C., Kudoyarova G. // Int. J. Plant Biol.* 2023. V. 14. № 1. P. 77–90. <https://doi.org/10.3390/ijpb14010007>
13. *Vysotskaya L., Martynenko E., Ryabova A., Kuzmina L., Starikov S., Chetverikov S. et al. // Biomolecules.* 2023. V. 13. № 1668. P. 1–14. <https://doi.org/10.3390/biom13111668>
14. *Hartung W., Sauter A., Turner N.C., Fillery I., Heilmeyer H. // Plant and Soil.* 1996. V. 184. № 1. P. 105–110. <https://doi.org/10.1007/BF00029279>
15. *Jiang F., Chen L., Belimov A.A., Shaposhnikov A.I., Gong F., Meng X. et al. // J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. № 18. P. 6421–6430. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers301>
16. *Akhiyarova Z., Martynenko E., Arkhipova T., Seldimirova O., Galin I., Belimov A. et al. // Microorganisms.* 2022. V. 11. № 5. P. 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051227>
17. *Hasegawa S., Poling S.M., Maier V.P., Bennett R.D. // Phytochemistry.* 1984. V. 23. № 12. P. 2769–2771.
18. *Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Dumova V.A., Shaposhnikov A.I., Ladatko A.G., Davies W.J. // Plant Physiol Biochem.* 2014. V. 74. P. 84–91. <https://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.10.032>
19. *Ермеккалиев Т.С., Гоголева Н.Е., Гоголев Ю.В., Коннова Т.А., Шевченко В.П., Нагаев И.Ю. и др. // Химико-фармацевтический журнал.* 2021. Т. 55. № 7. С. 60–64. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2021-55-7-60-64>
20. *Yuzikhin O.S., Gogoleva N.E., Shaposhnikov A.I., Konnova T.A., Osipova E.V., Syrova D.S. et al. // Biomolecules.* 2021. V. 11. № 3. P. 1–15. <https://doi.org/10.3390/biom11030345>
21. *Yuzikhin O.S., Shaposhnikov A.I., Konnova T.A., Syrova D.S., Нато Н., Ермеккалиев Т.С. et al. // Biomolecules.* 2022. V. 12. № 10. P. 1–20. <https://doi.org/10.3390/biom12101508>

22. Рябова А.С., Кузьмина Л.Ю., Мартыненко Е.В., Четвериков С.П., Мильман П.Ю., Высоцкая Л.Б. // Экобиотех. 2023. Т. 6. № 3. С. 190–199. <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2023-6-3-190-199>
23. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии. М.: Мир, 1984. Т. 3. 264 с.
24. Vysotskaya L.B., Korobova, A.V., Veselov S.Y., Dodd I.C., Kudoyarova G.R. // *Funct. Plant Biol.* 2009. V. 36. №. 1. P. 66–72. <https://doi.org/10.1071/FP08187>
25. Elomari M., Coroler L., Hoste B., Gillis M., Izard D., Leclerc H. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996. V. 46. №. 4. P. 1138–1144. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-1138>
26. Andersen S.M., Johnsen K., Sørensen J., Nielsen P., Jacobsen C.S. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000. V. 50. №. 6. P. 1957–1964. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-6-1957>

ABA-Degrading Strains of Bacteria of the Genus *Pseudomonas* and Their Influence on Wheat Growth

A. S. Ryabova^a, L. Yu. Kuzmina^a, *, E. A. Gilvanova^a, N. F. Galimsyanova^a, E. V. Martynenko^a, L. B. Vysotskaya^a, and G. R. Kudoyarova^a

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

*e-mail: alenarya@rambler.ru

Three new representatives of the genus *Pseudomonas* have been identified that are capable of utilizing abscisic acid and positively influencing the growth and development of plants. Their physiological and biochemical properties have been studied. Based on the analysis of the 16S rRNA gene, they were identified as *P. veronii* IB K11-1 (99.86% similarity), *P. frederiksborgensis* IB Ta10m (100%), strain TaE2 was assigned to *Pseudomonas* sp. It was found that bacteria, when growing on a mineral-salt medium with ABA, reduced the hormone content by 50-60% with an increase in population density by two orders of magnitude. In a laboratory experiment, it was shown that the introduction of bacterial biomass (108 CFU/g of substrate) into the rhizosphere of wheat plants 10 days after treatment led to a decrease in the abscisic acid content in the roots by 18–30% and an increase in plant weight by up to 30%. Thus, new strains of growth-stimulating ABA-degrading bacteria have been identified and characterized for the first time, which may be promising for the creation of biological products that increase plant resistance to biotic and abiotic stresses.

Keywords: ABA-metabolizing and growth-promoting bacteria, *Pseudomonas*, *P. veronii*, *P. frederiksborgensis*, *Triticum durum* Desf. abscisic acid

УДК 582.261/.27

ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА РОСТ КРАСНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Galdieria sulphuraria*

© 2024 г. Ю. В. Болычевцева¹, *, И. Н. Стадничук²

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

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук,
Москва, 127726 Россия
*e-mail: bolychev1@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.05.2024 г.

После доработки 21.06.2024 г.

Принята к публикации 05.07.2024 г.

Полиэкстремофильные красные микроводоросли рода *Galdieria*, обитая в необычных для эукариот условиях горячих серных источников, обладают способностью к гетеротрофии. Показано, что в темновых условиях у модельного вида *Galdieria sulphuraria* не наблюдали изменения роста в присутствии этанола. При этом на свету, несмотря на проявление известного для клеток стрессорного действия этанола, происходила активизация роста микроводорослей. Усиление клеточного дыхания, наблюдающееся как в темноте, так и на свету еще до активизации роста и фотосинтеза, может указывать на действие этанола как фактора окислительного стресса. Заметное ускорение роста культуры *G. sulphuraria*, вероятнее всего, происходило в результате стимуляции дыхания этанолом с образованием CO₂ и его использования хлоропластами в виде дополнительного углеродного субстрата при фотосинтезе. Рост культуры *G. sulphuraria* на свету в присутствии этанола заметно снижен по сравнению с наблюдаемым в присутствии классического органического субстрата глюкозы. Можно предположить, что при стрессе, вызванном этанолом, на свету индуцируется система двух последовательных ключевых ферментов в цепи метаболизма первичных спиртов – алкогольдегидрогеназы и ацетальдегиддегидрогеназы, что в результате полного окисления этанола приводило бы к ускорению роста *G. sulphuraria*, по сравнению с фотоавтотрофной культурой.

Ключевые слова: *G. sulphuraria*, этанол, глюкоза, фотогетеротрофия, фотосинтез, алкогольдегидрогеназа

DOI: 10.31857/S0555109924050091 EDN: QTGHRD

Суанидиалес являются рано обособившейся в ходе эволюции [1] филой красных водорослей, большинство представителей которой обитают в геотермальных серных источниках, содержащих ионы тяжелых металлов при pH 0.5–4.0 и температурах вплоть до 56°C. Эти микроводоросли сочетают особенности строения клеток-эукариот с эколого-биохимическими особенностями, присущими экстремофильным видам архей и бактерий. Виды, приспособленные к одному, или реже к двум [2, 3] экстремальным факторам, встречаются и среди других групп водорослей, но возможность обитания сразу при воздействии нескольких неблагоприятных факторов, то есть полиэкстремофилия, известна лишь у Суанидиалес. Благодаря исключительности свойств и минимальным для эукариот размерам генома, равного 12–18 Mb [4–6], Суанидиалес как представители архепластид стали одним из важнейших объектов исследований в

клеточной физиологии, биохимии, молекулярной биологии, филогеномике и эволюционной биологии. Они играют важную роль в изучении многих сторон окислительного фотосинтеза и вопросов его происхождения. Полиэкстремофилия и многие особенности метаболизма были унаследованы Суанидиалес от архей и бактерий, что указало на возможность горизонтального переноса генов от прокариот к эукариотам и стало новым этапом в понимании эукариотной организации клетки [1, 6].

В составе Суанидиалес виды рода *Galdieria* (всего четыре рода, включая также *Cyanidiococcus*, *Cyanidioschyzon* и *Cyanidium*, и чуть более 10 видов) [1, 6] характеризуются наибольшей устойчивостью к тяжелым металлам и к высоким концентрациям соли (вплоть до 1.5 M NaCl) [7]. Важной чертой, отличающей род *Galdieria*, является способность наряду с фотоавтотрофией к темновому гетеротрофному (хемогетеротрофному) росту, известному

для представителей ряда групп одноклеточных водорослей. Возможность светового гетеротрофного (миксотрофного) роста встречается чаще, хотя также является нетривиальным свойством [8, 9].

Высококислые серные источники с повышенной температурой крайне бедны микроорганизмами. Предполагаемым источником осмотически усваиваемых органических продуктов для видов рода *Galdieria* служат продукты жизнедеятельности длительно находящихся в той же среде нефотосинтезирующих прокариот или, возможно, собственных клеток, находящихся в составе прибрежных водорослевых матов [6–8], что подразумевает разнообразие образующихся органических субстратов. Выявлено 27 усвояемых углеводов и полиолов и с учетом сахарофосфатов, ряда аминокислот, интермедиатов цикла Кребса, до 50 органических экзогенных субстратов, которые могут использоваться видами рода *Galdieria*, что является своеобразным рекордом для микроводорослей [1, 9–12].

Световая гетеротрофия (фотогетеротрофия, или миксотрофия) и темновая гетеротрофия (хемотротрофия) служат адаптивной стратегией, позволяющей использовать растворенные органические вещества в тех случаях, когда в среде обитания они становятся наиболее выгодным источником энергии [8]. Таким образом, возможность фото- и хемотротрофного питания в разных биохимических вариантах является успешной эволюционной стратегией микроводорослей, увеличивающей их физиолого-биохимическую активность [8]. Взаимоотношение дыхательного и фотосинтетического процессов при фотогетеротрофии и возможности для усвоения органические субстраты пока полностью не выяснены, что подразумевает дальнейшие исследования *Galdieria* и других водорослей-миксотрофов [8, 10, 13, 14].

Экстремофильные организмы вызывают все больший интерес благодаря своим уникальным метаболическим способностям и большому биотехнологическому потенциалу. Биоремедиация бытовых и промышленных сточных вод, характеризующихся повышенной температурой и содержащих органические вещества, является наиболее перспективным направлением использования микроводорослей рода *Galdieria* в биотехнологии. Прибрежные водорослевые маты горячих природных источников, содержащие *G. sulphuraria*, указывают на возможность иммобилизации культуры в очистных сооружениях [15], поэтому использование микроводорослей рода *Galdieria* для извлечения органических веществ из отходов пищевых производств может быть перспективным [16, 17]. Список потребляемых *Galdieria* субстратов, несмотря на обширность, нельзя считать полным. Требуется дальнейшие исследования, чтобы установить полный круг потребляемых продуктов с учетом их возможной токсичности. Среди десятков известных

для *Galdieria* органических субстратов не значатся сведения об этаноле как возможном органическом источнике энергии, хотя этиловый спирт – энергетически выгодное соединение, конечными продуктами превращений которого в клетке являются CO_2 и H_2O . Цель настоящей работы – выяснение влияния этанола на рост микроводоросли *G. sulphuraria*.

МЕТОДИКА

Штамм и условия культивирования. В опытах использовали аксеничную культуру термоацидофильной красной микроводоросли *G. sulphuraria* (Galdieri) Merola, штамм IPPAS P513 из Коллекции микроводорослей и цианобактерий IPPAS ИФР РАН. Водоросли выращивали при 38°C на культуральной среде Аллен, доводя pH до 2.5 за счет микродобавки H_2SO_4 [6, 10]. Контрольную фотоавтотрофную культуру и фотогетеротрофные культуры, с 0.1% этанола или 0.1% глюкозы, выращивали при круглосуточном освещении на постоянном дневном 3500К свету 40 мкМ фотонов·м⁻²·с⁻¹ (лампы SL 20/32735, Китай). Наряду с этим, в варианте опыта с автотрофной культурой и культурой с добавкой этанола эксперимент проводили в полной темноте. Для выращивания использовали конические колбы объемом 100 мл, внося в каждую по 50 мл среды для культивирования (высота жидкости в колбе – 4 см). Клеточные суспензии ежедневно перемешивали механически в течение 5 мин, не используя барботирование или качание для уменьшения испарения этанола [18]. Отбор аликвот для определения ростовых характеристик в культурах клеток проводили 5 раз: на 1 (нулевая точка), 2, 4, 8 и 11 сут в трех биологических повторностях. Дальнейший рост прекращали из-за повышенного испарения спирта при температуре выше комнатной или израсходования добавляемой глюкозы. Подсчет клеток проводили в камере Горяева на бинокулярном микроскопе Биомед 6, (ООО “Биомед”, Китай–Россия). Начальная плотность составляла 1.2×10^6 кл./мл.

Спектры поглощения. Для регистрации спектров поглощения использовали аликвоты клеток объемом 1.5 мл. Спектры образцов измеряли в прямоугольных стандартных оптических кюветах на 1.0 см на спектрофотометре Beckman DU-650 (“Beckman Coulter Inc.”, США) в спектральном диапазоне 400–750 нм.

Значение минимального уровня светорассеяния клеточных образцов при 750 нм, не искажаемого поглощением хлорофилла, служило для сопоставления с результатами подсчета числа клеток и для определения их фотосинтетической и дыхательной активности [19–21].

Для получения спектров, корректно отражающих абсорбционные свойства фотосинтетического аппарата, спектр каждого образца регистрировали

трижды, усредняли, после чего вычитали вклад рассеянного света во всей видимой спектральной области регистрации, используя математическое обеспечение “Origin 6.1”.

Расходование этанола и глюкозы. Для отделения клеток культуральную жидкость в объеме 1.5 мл центрифугировали в течение 10 мин при 7000 g на центрифуге Eppendorf (“MiniSpin”, Германия). Содержание этанола в надосадочной жидкости определяли хроматографически по мере роста культуры одновременно с отбором проб для подсчета числа клеток. Использовали газовый хроматограф Кристалл 5000.2 (“Хроматэк”, Россия), оснащенный капиллярной колонкой ZB-WAXplus размером 30 м × 0.25 мм × 0.35 μм (“Phenomenex”, США) и ПИД-детектором. Разделение проводили в градиенте температуры. Газом-носителем служил азот марки ОСЧ. Для учета повышенного испарения спирта из культуральной среды [18] при 38°C в течение всего 11-дневного эксперимента использовали не содержащие клеток контрольные колбы с внесенным этанолом (спирт этиловый ректифицированный, “Люкс”, 96.3%, ГОСТ 5962-2013, ООО “Донской”, РФ). Расходование D-глюкозы (“Renewal”, РФ) в культуральной среде определяли спектрофотометрически при 504 нм глюкозооксидазным методом, используя набор “Агат-Мед” (Россия). Как и для подсчета числа клеток, уровень этанола и глюкозы измеряли в трех сериях экспериментов.

Определение клеточного дыхания и фотосинтеза. Поглощение кислорода в темноте и выделение кислорода на свету регистрировали непосредственно в суспензии клеток *G. sulphuraria* на потенциометре, снабженном электродом Кларка Охуграф (“Hansatech”, Германия), как описано в работах [20, 21] в термостатируемой кювете объемом 1 мл при 38°C. Фотосинтетическую активность определяли с естественным донором (H₂O) и акцептором (CO₂) электронов. Клетки предварительно концентрировали для достижения равных значений оптической плотности суспензии (OD₇₅₀) мягкой фильтрацией (фильтры “Nalgene”, USA, размер пор 0.45 μм). Изменение концентрации кислорода в среде выражали в нмоль O₂/(OD₇₅₀) мл/мин. Источником белого света служил осветитель ОИ-24 (“ЛОМО”, Россия), интенсивность освещения – 800 мкМ фотонов м⁻² с⁻¹. Непосредственно перед измерениями собранные клетки для адаптации к темновым условиям выдерживали 20 мин в темноте и для преадаптации к свету освещали в течение 20 мин белым светом лампы SL 20/32735, используемой для выращивания культуры.

Статистическая обработка. Для статистического анализа различий при построении гистограмм использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) в программе “Origin 7”. Значимыми считались различия с доверительной вероятностью 95% ($P < 0.05$). Столбцы гистограмм,

соответствующие сравниваемым средним величинам, обозначались латинскими буквами, которые при выявлении статистической достоверности различий снабжались знаком*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристики роста и дыхания клеток *G. sulphuraria* в темноте с этанолом. Микроорганизмы в своем большинстве не способны к росту и нейтрализации этанола, если его содержание превышает 4% [22, 23]. Концентрация спирта, которая вызывает окислительный стресс и клеточный токсикоз, тем не менее, индивидуальна. Концентрации этанола, используемые для гетеротрофного роста микроводорослей, обычно не превышают 0.5–1.0% [23, 24]. При большем содержании токсическое действие спирта усиливается настолько, что рост микроорганизмов сначала замедляется, а затем останавливается. Оптимальные концентрации этанола также видоспецифичны. Например, при наличии в среде 0.5% этанола биомасса зеленой водоросли *Dunaliella viridis* была меньше биомассы, нараставшей в среде с 0.3% этанола [24]. Лишь у *E. gracilis* этанол остается активным стимулятором гетеротрофного роста в концентрации, достигающей 1.5% [25]. В настоящей работе рассмотрена возможность роста *G. sulphuraria* в присутствии этанола на свету и в темноте. В световых условиях, то есть в режиме фотогетеротрофии, добавление в среду этанола в концентрации 0.5 или 1.0% не давало прибавки в росте (данные не показаны), по сравнению с концентрацией, равной 0.1%. В дальнейшем, во всех проведенных экспериментах использовалась концентрация, равная 0.1% (21.7 мМ, вес/об.), чтобы сделать менее вероятным токсическое действие спирта. Эта же концентрация этанола была использована и для темновых условий. На рис. 1 представлены две гистограммы, отражающие количество клеток в культуре *G. sulphuraria*, находящейся в темноте без добавки и с добавкой этанола. Статистическая обработка результатов показала отсутствие достоверных изменений роста у исходно фотоавтотрофной культуры, не содержащей этанол, что в этом случае естественно из-за блокировки фотосинтеза и отсутствия иных источников энергии (рис. 1а). В присутствии этанола статистически значимых изменений роста также не наблюдалось (рис. 1б). Количество клеток в обоих вариантах культуры оставалось на постоянном и одинаковом уровне (состояние переживания клеток).

Исследование дыхания у клеток *G. sulphuraria*, помещенных в темноту, показало низкую скорость поглощения O₂ контрольными клетками при истощении субстратов дыхания в отсутствие фотосинтеза, тогда как в присутствии этанола дыхание возрастало на второй день примерно в 2.5 раза, и в последующие дни падало до значений, сравнимых с таковыми у контрольных растений (рис. 2).

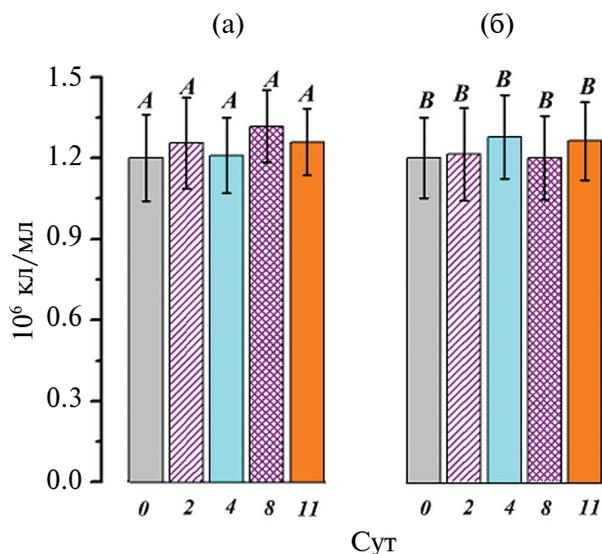


Рис. 1. Рост культуры *G. sulphuraria* в темноте без этанола (а) и при добавлении 0.1% этанола (б). Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3$). Совпадение буквенных обозначений над столбцами указывает на отсутствие статистически значимых изменений в сериях измерений. Доведительный интервал $P \leq 0.05$.

Так как культура практически не росла в присутствии этанола, а дыхание при этом значительно возрастало, можно видеть, что стимуляция роста этанолом в темновых условиях не реализовывалась. В таком случае можно предположить проявление токсического действия этанола (мягкого стресса), что существенно отличает его от известных для *G. sulphuraria* иных органических субстратов, поскольку в присутствии глюкозы или других гексоз и глицерина наблюдается темновой гетеротрофный рост *G. sulphuraria*, который значительно превосходит возможности фотоавтотрофии [10, 11, 26]. Последующее снижение скорости поглощения кислорода клетками *G. sulphuraria* в темноте в присутствии этанола даже в условиях стресса также можно объяснить истощением дыхательного субстрата в отсутствие фотосинтеза (рис. 2).

Характеристики роста клеток *G. sulphuraria* на свету в фотоавтотрофных или фотогетеротрофных (в присутствии этанола или глюкозы) условиях. В эксперименте на свету (рис. 3) у контрольной фотоавтотрофной культуры (столбцы *A*) в первые несколько дней сохранялось состояние лаг-фазы. Тенденция к росту числа клеток началась после 4 сут и становилась достоверной к 8 и 11 сут ($A^* \geq A$). Наблюдаемый здесь и в других работах [10, 27] медленный рост фотоавтотрофной культуры объясняется особенностями экологии *G. sulphuraria* [6]. В высококислых серных источниках с повышенной температурой, в которых обитает эта микроводоросль, буферное равновесие

$\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$ уже при $\text{pH} < 4$ полностью смещено в сторону CO_2 , а повышенная температура заметно снижает растворимость углекислого газа, что приводит к низкой фотосинтетической активности и замедленному фотоавтотрофному росту *Galdieria* [10, 13, 28]. Гетеротрофия с использованием возможно большего числа органических соединений становится жизненно важным свойством. Возможность метаболизма этанола, несмотря на его побочное отрицательное действие, по-видимому, в числе таких свойств.

В присутствии этанола лаг-фаза (столбцы *B*) занимала столько же времени, сколько при фотоавтотрофии. Достоверное опережение в росте по сравнению с фотоавтотрофной культурой ($B^* > A^*$) прослеживалось в последние дни опыта. К окончанию эксперимента, на 11 сут, численность “этанольных” клеток превышала накапливаемую при фотоавтотрофии в 1.7 раза, что могло указывать на усвоение этанола на свету. Необходимо отметить, что при использовании также 0.1%-ного этанола в среде для зеленой микроводоросли *Haematococcus pluvialis* было получено почти такое же увеличение биомассы: в среднем в два раза [29].

Длительность лаг-фазы в зависимости от органического субстрата у *G. sulphuraria* могла заметно различаться, например, составляя до 30 сут при использовании лимонной кислоты [28] и даже 40 сут при добавлении дульцитолола [10]. Для сопоставления с этанолом была использована фотогетеротрофная культура, содержащая 0.1% глюкозы, изменение роста которой начинались практически без лаг-фазы (рис. 3). На 2–4 сут эксперимента, к началу усиления роста на этаноле, численность клеток в культуре, содержащей глюкозу, уже удваивалась в

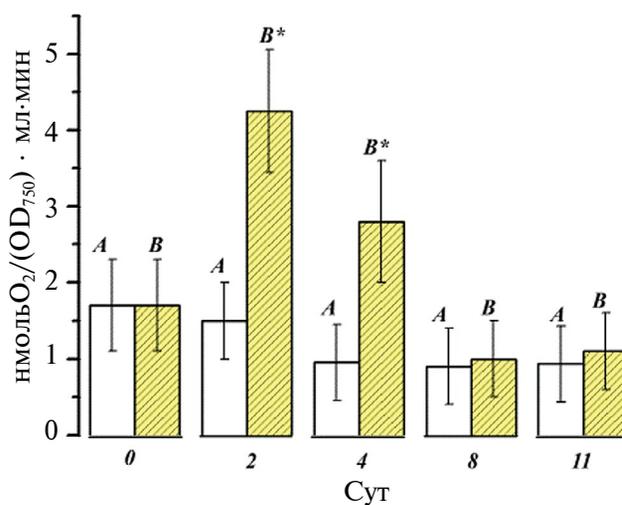


Рис. 2. Изменение скорости поглощения кислорода при темновом дыхании клеток *G. sulphuraria*, находящихся в темноте без добавления (*A*) и с добавлением 0.1% этанола (*B*). * Обозначены статистически значимые различия (см. Методы).

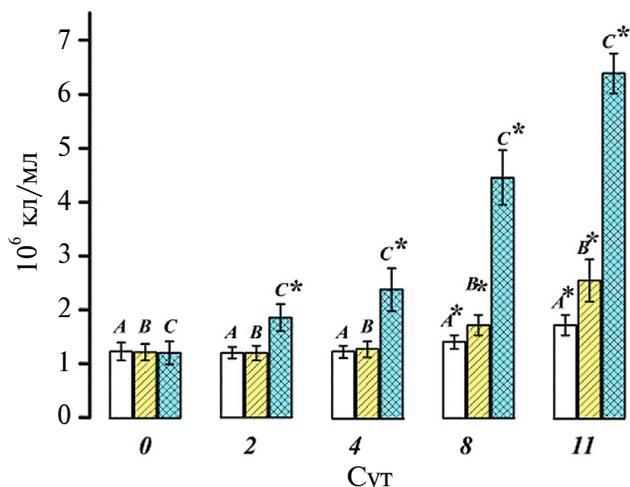


Рис. 3. Динамика роста культуры *G. sulphuraria* на свету в течение 11 сут без добавок (А, фотоавтотрофная культура), в присутствии 0.1% этанола (В) и в присутствии 0.1% глюкозы (С). Приведены средние значения и доверительные интервалы ($n = 3$). Совпадение буквенных обозначений в каждой серии означает отсутствие статистически значимых различий; * Обозначены статистически значимые различия.

экспоненциальной фазе роста и продолжала далее увеличиваться более быстрыми темпами. В итоге, на 11 сут количество клеток в присутствии глюкозы примерно в 4 раза превосходило их количество при выращивании на этаноле и почти в 7 раз – при фотоавтотрофном росте.

Для оценки роста микроводорослей наряду с подсчетом клеток использовалось измерение светорассеяния, величина которого пропорциональна

сухой биомассе в широком диапазоне концентраций [19, 20, 29]. Измерение светорассеяния связано с регистрацией спектров поглощения фотосинтетических пигментов непосредственно в клетке и позволяло сочетать данные о росте культуры с изменениями дыхания и фотосинтеза в пробах.

Спектры поглощения суспензии клеток *G. sulphuraria*. Показателем уровня светорассеяния на разных сроках выращивания исследуемой культуры микроводоросли *G. sulphuraria* служили данные об ординатах спектров поглощения при 750 нм. На рис. 4а ординаты измеренных спектральных кривых при 750 нм отражают уровень светорассеяния клеточных суспензий на 11 сут эксперимента (ординаты спектра 3 при 750 нм уменьшены вдвое). На рис. 4б представлены те же спектры, что и на рис. 4а, но после вычитания вклада, вносимого светорассеянием, и нормирования в максимуме поглощения хлорофилла.

Из рис. 4 видно, что к 11 сут светорассеяние вносило существенный вклад в амплитуду спектральных кривых (рис. 4а), но после вычитания вклада светорассеяния форма спектров (shape) во всей спектральной области измерений от 400 до 750 нм оставалась практически неизменной (рис. 4б).

Изменения в соотношении полос поглощения при 625 нм (фикобилисомы) и 678 нм (хлорофилл) были незначительными. Очевидно, что и спирт, и глюкоза в малых концентрациях, в отличие от 1% глюкозы [27], практически не влияли на относительное содержание пигментов, что указывало на отсутствие нарушений фотосинтетического аппарата.

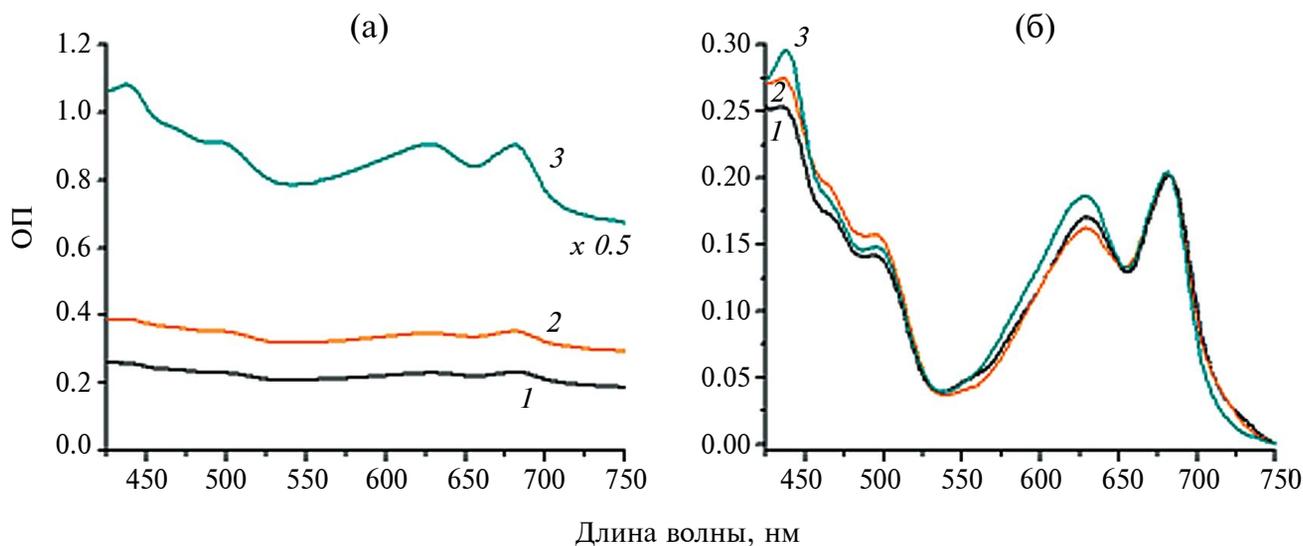


Рис. 4. Спектры поглощения культуры клеток *G. sulphuraria* на 11 сут роста на свету (а), и те же спектры после вычитания вклада, даваемого светорассеянием, и нормирования в максимуме поглощения хлорофилла (б): 1 – фотоавтотрофная культура; 2 – фотогетеротрофная культура, содержащая 0.1% этанола; 3 – фотогетеротрофная культура, содержащая 0.1% глюкозы (ординаты спектра 3 при 750 нм уменьшены вдвое).

Дыхание и фотосинтез клеток *G. sulphuraria* на свету в фотоавтотрофных или фотогетеротрофных условиях. Данные о росте *G. sulphuraria* были сопоставлены с результатами измерения дыхания и фотосинтеза (рис. 5).

Клеточное дыхание в фотоавтотрофном режиме оставалось низким, его некоторое увеличение в ходе эксперимента оставалось в пределах точности измерений (рис. 5а, столбцы А). В присутствии этанола потребление кислорода достоверно увеличивалось уже на 2 день ($B^* > B$), так же как и у клеток, помещенных в темноту (рис. 2). Наибольшее усиление дыхания наблюдалось при потреблении глюкозы ($C^* > B^* > A$). На 4 сут уровень дыхания культуры, содержащей этанол, сравнивался с уровнем, наблюдаемым в присутствии глюкозы. На 8 сут потребление кислорода сохранялось примерно одинаковым в обеих фотогетеротрофных культурах ($B^* \approx C^*$) и к окончанию эксперимента, на 11 сут, в обоих случаях начинало снижаться (рис. 5а), что можно объяснить истощением глюкозы и значительным уменьшением концентрации спирта в культуральной жидкости (см. рис. 6). Таким образом, в течение эксперимента, начиная со 2 сут, уровень дыхания при добавлении этанола и глюкозы достоверно превышал уровень фотоавтотрофной культуры (B^* и $C^* > A$). Следует отметить, что на фоне резко увеличившейся скорости дыхания в присутствии этанола на 2 сут эксперимента в темноте и на свету (рис. 2 и 5а) рост культуры микроводорослей не обнаруживался (рис. 1 и 3). В дальнейшем, в темноте в присутствии этанола не происходило увеличения количества клеток (рис. 1), а на свету рост активизировался по сравнению с

фотоавтотрофной культурой лишь в последние дни эксперимента на 8 и 11 сут (рис. 3). Совокупность этих данных указывает на то, что этанол вызывает стресс, который клетки микроводоросли преодолевают на свету, по-видимому, благодаря процессу фотосинтеза.

Определение скорости фотосинтетического выделения кислорода в фотоавтотрофной культуре показало, что, судя по средним значениям, происходило ее увеличение, но согласно доверительным интервалам, это увеличение нельзя считать достоверным. В сравнении с фотоавтотрофией усиление фотосинтеза при добавлении этанола и глюкозы (рис. 5б) было достоверным и весьма заметным (B^* и $C^* > A$). По всей вероятности, резкое возрастание скорости дыхания в начале лаг-фазы в присутствии этанола сопровождалось ускоренным образованием углекислого газа, который используется в качестве конечного акцептора фотосинтеза и ускоряет этот процесс.

Фотосинтетическая активность в присутствии глюкозы в среде уже на 2 сут увеличивалась вдвое. К этому дню в культуре с этанолом уровень фотосинтеза еще оставался прежним, что коррелировало в этом случае с наличием лаг-фазы. Однако на 4 сут фотосинтез в присутствии этанола обогнал фотосинтез при наличии глюкозы, достигая максимума на 8 сут, оставаясь выше и в последние 11 сут. На первый взгляд, данное увеличение фотосинтетической активности в сравнении не только с фотоавтотрофной, но и с фотогетеротрофной культурой с глюкозой выглядит парадоксально, так как увеличение числа клеток *G. sulphuraria* в присутствии глюкозы значительно опережает их

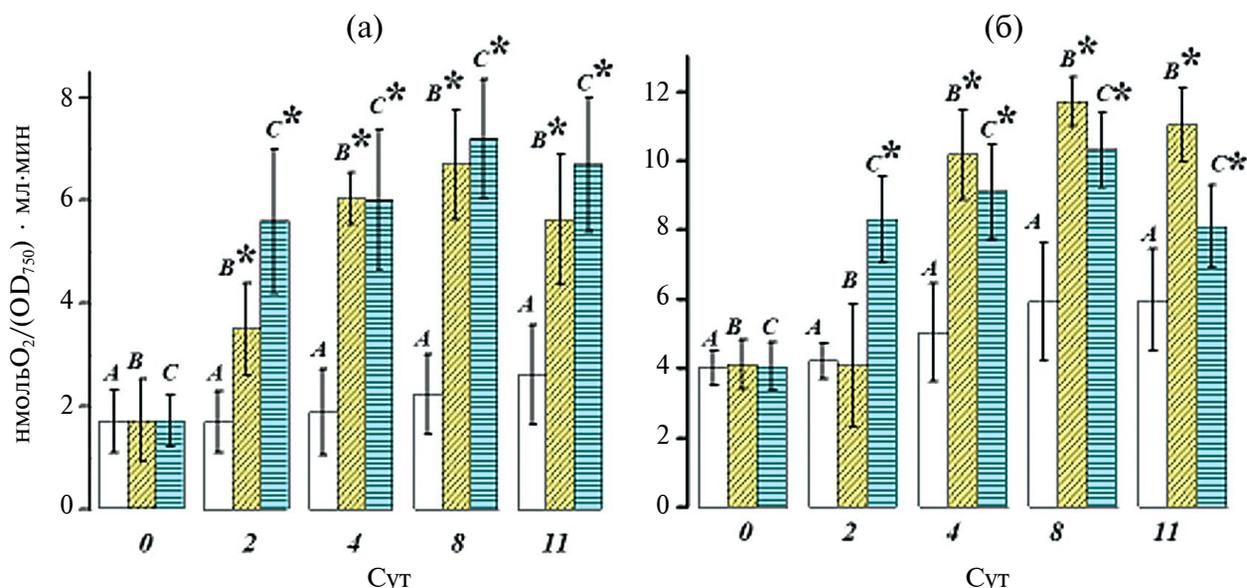


Рис. 5. Поглощение кислорода при темновом дыхании (а) и выделение кислорода при фотосинтезе с поправкой на затраты O_2 при дыхании (б) в культуре клеток *G. sulphuraria* при фотоавтотрофном росте (А), фотогетеротрофном в присутствии 0.1% этанола (В) или 0.1% глюкозы (С). * Отмечены статистически значимые различия.

прибавку в присутствии спирта. Однако, как отмечалось выше, ускорению фотосинтеза в культуре с этанолом способствовало усиление дыхания, в результате чего в клетках возрастала концентрация углекислого газа, который становился дополнительным субстратом-стимулятором фотосинтетического процесса. В то же время, именно благодаря продуцированию субстратов дыхания (глюкозы и восстановителей) в процессе фотосинтеза культура клеток в присутствии этанола (рис. 5б) на свету сохраняла высокую скорость дыхания, в отличие от темноты, когда субстраты дыхания исчерпывались (рис. 2). Следует добавить, что глюкоза является у фотосинтетиков конечным продуктом фотосинтетических реакций. При поступлении извне она может поэтому сразу же использоваться клеткой как строительный материал, что и приводит к более быстрому росту клеточной массы без значительной параллельной этому интенсификации фотосинтеза. Кроме того, известно, что одной из регуляторных функций глюкозы у различных фотосинтезирующих организмов является ингибирование фотосинтетической активности [6, 8, 10, 14].

Изменение концентрации этанола в культуре клеток в темноте или на свету. Изменение концентрации этанола на свету и отсутствие его потребления клетками *G. sulphuraria* в темноте подтверждаются хроматографическим определением спирта в культуральной среде (рис. 6). Этанол – легко испаряющаяся жидкость, потери которой при комнатной температуре и стационарном культивировании составляют не менее 20% [16]. При 38°C испарение протекает еще интенсивнее, составляя в условиях эксперимента 65% на 11 сут инкубации (рис. 6, кривая 1, контроль в отсутствие клеток). Кривая 2, полученная для культуры клеток, росших в темноте с этанолом, почти полностью совпадала с кривой 1 в пределах точности эксперимента за все время измерений (рис. 6), что подтвердило отсутствие потребления этанола клетками *G. sulphuraria* в темновых условиях (рис. 2). Хотя кривая, отражающая снижение концентрации этанола, измеренной для культуры клеток, росших с этанолом на свету (кривая 3), начиная с 4–5 сут расходится с кривой, отражающей испарение спирта (кривая 1), определенное достоверное потребление этанола клетками можно наблюдать только в конце периода культивирования согласно кривой 3 (рис. 6), полученной для клеток, находившихся на свету. Для сравнения приведено полное потребление за время эксперимента глюкозы и значительное сокращение периода лаг-фазы (рис. 6, кривая 4).

Необходимо отметить, что снижение концентрации этанола в ростовой среде по мере культивирования *G. sulphuraria* может быть связано не только с испарением, как показано на рис. 6 (кривая 1), а также с адаптацией клеток к присутствию этанола на свету к концу периода культивирования.

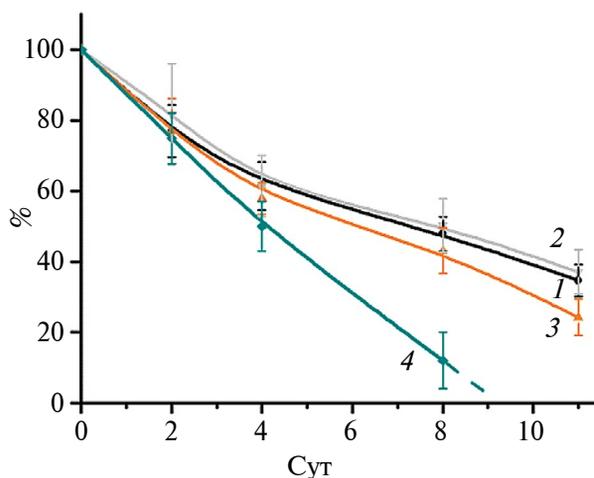


Рис. 6. Динамика расходования (%) этанола и глюкозы в среде клетками *G. sulphuraria*: 1 – контроль, среда с 0.1% этанола без клеток; 2 – среда с 0.1% этанола после выращивания *G. sulphuraria* в темноте; 3 – среда с 0.1% этанола после выращивания *G. sulphuraria* на свету; 4 – среда с 0.1% глюкозы при световом выращивании клеток. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 3$).

Известно, что многие микроводоросли метаболизируют этанол при помощи последовательно функционирующих ферментов алкогольдегидрогеназы (АДГ), окисляющей этанол до ацетальдегида, и ацетальдегиддегидрогеназы, преобразующей получаемый ацетальдегид в ацетат [30, 31]. В процессе адаптации к этанолу *G. sulphuraria* может индуцировать синтез этих ферментов, что в таком случае объясняет более быстрое исчерпание этанола в среде с клетками на свету (рис. 6, кривая 3), по сравнению с изменением его концентрации в среде с клетками в темноте (рис. 6, кривая 2). Тем более, что согласно геномным данным, *G. sulphuraria* способна к синтезу глицериндегидрогеназы/железосодержащей алкогольдегидрогеназы (FeADH, Gasu_57960), относящейся к типу III АДГ [32]. Кроме того, обнаружено также присутствие гена второго ключевого фермента превращений этанола, ацетальдегиддегидрогеназы [33]. Роль обоих ферментов не сводится лишь к окислению этанола, так как они рассматриваются как активные участники защиты клеток от окислительного стресса [34].

Таким образом, влияние этанола на рост культуры *G. sulphuraria* является комплексным, способствует увеличению плотности культуры благодаря, в конечном итоге, ускорению дыхания с выделением CO_2 , который усиливает фотосинтез как конечный акцептор. С одной стороны, дыхание ускоряется при стрессе, вызываемом этанолом, с другой стороны, после периода адаптации при возможном метаболизме этанола также может ускоряться выделение CO_2 . Баланс между дыханием, фотосинтезом и возможным усвоением этанола представлен на рис. 7. Образующийся в митохондриях в цикле

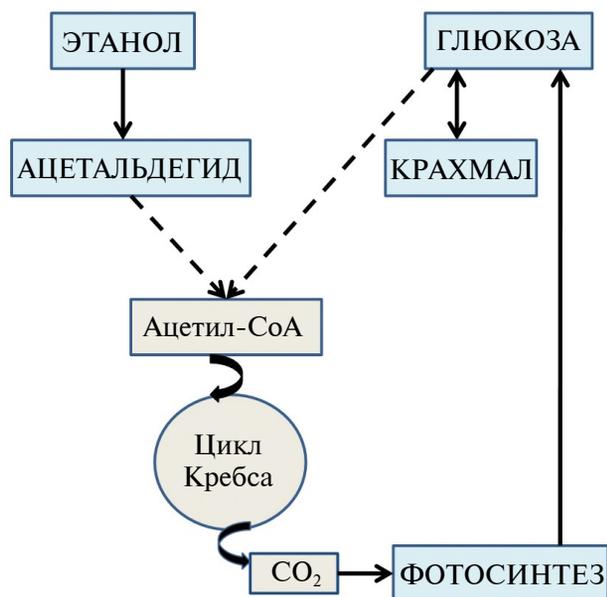


Рис. 7. Схема, отражающая баланс между дыханием и фотосинтезом (см. в текст).

Кребса CO_2 поступает в хлоропласты, интенсифицируя фотосинтез. Экзогенная глюкоза обладает большими метаболическими и энергетическими возможностями, образуя запасные углеводы и регулируя активность фотосинтетических ферментов. Сравнение с добавляемой глюкозой (рис. 7) позволяет интерпретировать ряд особенностей роста *G. sulphuraria*, несмотря на то, что два органических субстрата, этанол и глюкоза, различаются по многим параметрам. Глюкоза не обладает токсичностью, активно транспортируется внутрь клетки [35] и, в отличие от этанола, усваивается клетками *G. sulphuraria* в концентрации вплоть до 17% [12]. Возможности усвоения глюкозы при фотогетеротрофии, как показано в настоящей работе, в несколько раз превышают возможности потребления этанола (рис. 3). Быстрое расходование глюкозы как субстрата при концентрации 0.1% происходит еще до окончания срока эксперимента (рис. 6), так как одновременно с обеспечением роста клеток часть глюкозы запасается впрок в форме багрянкового крахмала [27].

Сопоставление данных по фотоавтотрофному, фотогетеротрофному и темновому гетеротрофному росту *G. sulphuraria* [36–38] показало, что ингибирование фотосинтетического аппарата глюкозой при выращивании *G. sulphuraria* в темноте в значительной мере снимается при фотогетеротрофии [37–39]. Образующийся при окислении глюкозы углекислый газ транспортируется из митохондрий в хлоропласты, где используется в фотосинтезе. В присутствии этанола интенсификация фотосинтеза, происходящая вслед за возрастанием клеточного дыхания, также может объясняться

дополнительным использованием клеткой в фотосинтетическом процессе углекислого газа, образующегося при дыхании.

Наиболее вероятной причиной возможного потребления этанола на свету после периода адаптации к вызванному им стрессу является световая активация АДГ и ацетальдегиддегидрогеназы как ферментов, отвечающих за усвоение этанола при поступлении в клетку. Потребление этанола, выгодное энергетически, одновременно приводит к снижению внутриклеточной концентрации и стрессового воздействия этанола.

* * *

ВКЛАД АВТОРОВ. Авторы принимали равное участие в экспериментах, написании и редактировании рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700044-6).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ. Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yoon H.S., Müller K.M., Sheath R.G., Ott F.D., Bhattacharya O. // J. Phycol. 2006. V. 42. P. 482–492. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00210.x>
2. Pollio A., Cennamo P., Ciniglia C., De Stefano M., Pinto G., Huss V.A.R. // Protist. 2005. V. 156. № 3. P. 287–302. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.04.004>
3. Liu C., Liu J., Hu S., Wang X., Wang X., Guan Q. // Peer J. 2019. 7:e7189. P. 1–10. <https://doi.org/10.7717/peerj.7189>
4. Muravenko O., Selyakh I., Kononenko N., Stadnichuk I. // Eur. J. Phycol. 2001. V. 36. P. 227–232.
5. Miyagishima S., Tanaka K. // Plant Cell Physiol. 2001. V. 62. P. 926–941. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab052>
6. Stadnichuk I.N., Tropin I.V. // Biochemistry (Moscow). 2022. V. 87. № 5. P. 472–487. <https://doi.org/10.31857/S0320972522050050>
7. Seckbach J. Overview of Cyanidial Biology. / Eds. J. Seckbach, D.J. Chapman. N.Y.: Springer, 2010. 345 p.
8. Selosse M.-A., Charpin M., Not F. // Ecol. Lett. 2017. V. 20. № 2. P. 246–263. <https://doi.org/10.1111/ele.12714>

9. *Přibyl P., Cepák V.* // J. Appl. Phycol. 2019. V. 31. P. 1555–1564.
<https://doi.org/10.1007/s10811-019-1738-9>
10. *Gross W., Schnarrenberger C.* // Plant Cell Physiol. 1995. V. 36. № 4. P. 633–648.
<https://doi.org/10.1007/s10811-019-1738-9>
11. *Oesterhelt C., Schnarrenberger C., Gross W.* // Eur. J. Phycol. 1999. V. 34. № 3. P. 271–277.
<https://doi.org/10.1080/09670269910001736322>
12. *Schmidt R.A., Wiebe M.G., Eriksen N.T.* // Biotechnol. Bioeng. 2005. V. 90. № 1. P. 77–84.
<https://doi.org/10.1002/bit.20417>
13. *Seckbach J., Baker F.A., Shugerman P.M.* // Nature. 1970. V. 227. P. 744–745.
14. *Tischendorf G., Oesterhelt C., Hoffmann S., Girmus J., Schnarrenberger C., Gross W.* // Eur. J. Phycol. 2007. V. 42. № 3. P. 243–251.
<https://doi.org/10.1080/09670260701437642>
15. *Lang I., Bashir S., Lorenz M., Rader S., Weber G.* // Appl. Phycol. 2022. V. 3. № 1. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1080/26388081.2020.1765702>
16. *Čížková M., Vítová M., Zachleder V.* Microalgae – From Physiology to Application. / Ed. M. Vitova. IntechOpen. 2019. P. 1–17.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.89810>
17. *Selvaratnam T., Pegallapati A.K., Montelya F., Rodriguez G., Nirmalakhandan N., Van Voorhies W., Lammers P.J.* // Bioresour. Technol. 2014. V. 156. P. 395–399.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.075>
18. *Duboc P., von Stockar U.* // Biotechnol. Bioeng. 1998. V. 58. № 4. P. 426–439.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980520\)58:4<428::AID-BIT10>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980520)58:4<428::AID-BIT10>3.0.CO;2-7)
19. *Sloth J.K., Wiebe M.G., Eriksen N.T.* // Enzyme Microbial. Technol. 2006. V. 38. № 1–2. P. 168–175.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.010>
20. *Schwern, P., Hübner H., Buchholz R.* // Eng. Life Sci. 2016. V. 17. № 2. P. 140–144.
<https://doi.org/10.1002/elsc.201600004>
21. *Voloshina O.V., Bolychevtseva Y.V., Kuzminov F.I., Gorbunov M.Y., Elanskaya I.V., Fadeev V.V.* // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. №. 8. P. 858–870.
22. *Saeki A., Taniguchi M., Matsushita K., Toyama H., Theeragool, G. Lotong, N., Adachi O.* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1997. V. 61. № 2. P. 317–323.
23. *Jiang Y., Xiao P., Shao Q., Qin H., Hu Z., Lei A., Wang J.* // Biotechnol. Biofuels. 2017. V. 10. № 239. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s13068-017-0931-9>
24. *Божков А.И., Мензянова Н.Г., Сысенко Е.И.* // Biotechnologia Acta. 2014. V. 7. № 1. P. 93–99.
25. *Rodriguez-Zavala J.S., Rodriguez-Zavala M.A., Ortiz-Cruz R., Moreno-Sanchez R.* // J. Eukaryot. Microbiol. 2006. V. 53. № 1. P. 36–42.
<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00070.x>
26. *Sloth J.K., Jensen H.C., Pleissner D., Eriksen N.T.* // Bioresource Technology. 2017. V. 238. P. 296–305.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.043>
27. *Stadnichuk I.N., Semenova L.R., Smirnova G.P., Usov A.I.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2007. V. 43. P. 88–93.
28. *Sentsova O.Yu.* // Botanichesky J. 1991. V. 76. № 1. P. 69–79.
29. *Averina N.G., Kozel N.V., Shcherbakov R.A., Radyuk M.S., Manankina E.E., Goncharik R.G., Shalygo N.V.* // Proceedings Nat. Acad. Sci. Belarus. Biol. Series. 2020. V. 65. P. 7–15.
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-1-7-15>
30. *Lowrey J., Brooks M.S., McGinn P.J.* // J. Appl. Phycol. 2015. V. 27. P. 1485–1498.
<https://doi.org/10.1007/s10811-014-0459-3>
31. *Perez-Garcia O., Escalante F.M.E., de Bashan L.E., Bashan Y.* // Water Res. 2011. V. 45. P. 11–36.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
32. *Saura P.P., Chabi M., Corato A., Cardol P., Remacle C.* // Front. Plant Sci. 2022. P. 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022>
33. *Rossoni A.W., Schönknecht G., Lee H.L., Rupp R.L., Flachbart S., Mettler-Altmann T. et al.* // Plant Cell Physiol. 2019. V. 60. № 3. P. 702–712.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcy240>
34. *Lin G.-H., Hsieh M.-C., Shu H.-Y.* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 9921.
<https://doi.org/10.3390/ijms22189921>
35. *Barbier G., Oesterhelt C., Larson M.D., Halgren R.G., Wilkerson C., Garavito R.M. et al.* // Plant Physiol. 2005. V. 137. № 2. P. 460–474.
<https://doi.org/10.1104/pp.104.051169>
36. *Curien G., Lyska D., Guglielmino E., Westhoff P., Janetzko J., Tardif M. et al.* // New Phytologist. 2021. V. 231. P. 326–338.
<https://doi.org/10.1111/nph.17359>
37. *Stadnichuk I.N., Rakhimberdieva M.G., Bolychevtseva Yu.V., Yurina N.P., Karapetyan N.V., Selyakh I.O.* // Plant Sci. 1998. V. 136. № 1. P. 11–23.
38. *Oesterhelt C., Schmälzlin E., Schmitt J.M., Lokstein H.* // Plant J. 2007. V. 51. P. 500–511.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03159.x>
39. *Roth M.S., Westcott D.J., Iwai M., Niyogi K.N.* // Commun. Biol. 2019. V. 2. P. 347.
<https://doi.org/10.1038/s42003-019-0577-1>

Effect of Ethanol on the Growth of the Red Microalga *Galdieria sulphuraria***Yu. V. Bolychevtseva^{a,*} and I. N. Stadnichuk^b**^a*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*^b*Timiryasev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127726 Russia*

*e-mail: bolychev1@yandex.ru

Polyextremophilic red microalgae of the genus *Galdieria*, which inhabit hot sulphur springs under conditions unusual for eukaryotes, are capable of heterotrophy. Among the dozens of exogenous organic substrates identified for *Galdieria*, ethanol is not mentioned as a possible energy source. As it turned out that ethanol did not alter the growth of the model species *Galdieria sulphuraria* when grown in the dark. In contrast, the growth of microalgae is activated in the light, despite the known cell stressor effect of ethanol. The effect of ethanol as an oxidative stress factor may be indicated by the increase in cellular respiration observed in the dark and also in the light even before the activation of photosynthesis. The marked acceleration of growth of *G. sulphuraria* culture in the light is most likely due to the stimulation of respiration by ethanol with generation of CO₂ and its use by chloroplasts as an additional carbon substrate during the photosynthetic process. Compared to the classical organic substrate glucose, the light-induced growth of *G. sulphuraria* cultures in the presence of ethanol is less intense. It can be speculated that ethanol stress in light induces the system of two consecutive key enzymes in the primary alcohol metabolism chain (alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase), which then leads to the eventual complete oxidation of ethanol, resulting in accelerated growth of *G. sulphuraria*.

Keywords: *Galdieria sulphuraria* , ethanol, glucose, photoheterotrophy, photosynthesis, alcohol dehydrogenase

УДК 674.038,630.863

СПОСОБЫ ПРЕДОБРАБОТКИ ТРОСТНИКА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ САХАРОВ

© 2024 г. М. В. Семенова¹, А. М. Рожкова^{1, *}, Д. О. Осипов¹,
В. Д. Телицин¹, Е. А. Рубцова¹, Е. Г. Кондратьева¹, И. С. Васильева¹,
О. В. Морозова¹, А. И. Ярополов¹, А. П. Сеницын¹

¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
РАН (ФИЦ Биотехнологии РАН), Москва, 119071 Россия

*e-mail: amrojkova@yahoo.com

Поступила в редакцию 04.04.2024 г.

После доработки 18.04.2024 г.

Принята к публикации 26.04.2024 г.

Исследованы способы предобработки тростника (измельчение, гидротермическая обработка, обработка растворами кислот или щелочи, органосольвом, глубокими эвтектическими растворителями) и их влияние на его последующий ферментативный гидролиз комплексами целлюлаз и гемицеллюлаз. Субстраты с наибольшей реакционной способностью были получены при воздействии на тростник слабощелочного глубокого эвтектического растворителя (ГЭР) и раствора щелочи. Глубина ферментативного гидролиза этих предобработанных субстратов составила 63 и 59%, а степень конверсии полисахаридов (целлюлозы и гемицеллюлозы) в моносахара с учетом выхода субстрата на стадии предобработки – 60 и 34% соответственно. После предобработки тростника кислотным ГЭР, водяным паром, водным или водно-органическим раствором серной кислоты глубина ферментативного гидролиза составила 45, 25, 20 и 11%, а степень конверсии полисахаридов с учетом выхода субстрата – 26, 18, 13 и 10% соответственно. Промышленный ферментный препарат Агроцелл Плюс с преимущественным содержанием целлюбогидролаз и эндоглюканаз был наиболее эффективен при гидролизе пылевой фракции тростника, а также тростника, предобработанного раствором серной кислоты или ГЭР (кислотного или слабощелочного). Препарат Агроксил Плюс, содержащий эндоксиланазу и целлюбогидролазы, был эффективнее при гидролизе тростника после гидротермической предобработки или обработки раствором щелочи. Результаты гидролиза тростника, предобработанного кислотным или слабощелочным ГЭР, под действием индивидуальных (гомогенных) целлюлаз, свидетельствовали, что в обоих случаях ключевым ферментом была целлюбогидролаза I.

Ключевые слова: тростник, предобработка, ГЭР, гидролиз, целлюлазы, *Penicillium verruculosum*

DOI: 10.31857/S0555109924050109 **EDN:** QSZFFG

Возобновляемая растительная биомасса, основными компонентами которой являются целлюлоза, гемицеллюлозы и лигнин, составляет основную часть органического материала на Земле и является практически неисчерпаемым источником сырья и энергии [1]. Использование быстрорастущих травянистых растений как источника природных полисахаров, несомненно, имеет преимущество перед использованием древесины. Тростник обыкновенный – почти космополит, встречается в России повсеместно. Он распространен на почвах с близкими грунтовыми водами, на болотах, зарастающих озерах, пойменных лугах; особенно многочислен он в низовьях рек, где часто образует обширные заросли. Тростник относится к злакам, содержание лигнина от 18 до 26% в разных частях растения.

Легкогидролизуемые полисахариды (преимущественно ксиланы) составляют 20–25%, трудногидролизуемые (целлюлоза) – до 37% [2]. Таким образом, тростник является источником С5 и С6 сахаров, которые могут быть конвертированы в коммерчески востребованные продукты (биоэтанол, этилен, бутены, этиленгликоль и другие соединения) [1, 3–5].

Ферментативный гидролиз растительной биомассы затруднен из-за ее низкой реакционной способности вследствие присутствия лигнина, который является физическим барьером, препятствующим воздействию ферментов на целлюлозу; кроме того, на лигнине происходит непродуктивная адсорбция ферментов. Для повышения реакционной способности необходима предварительная обработка субстрата, основными задачами которой являются удаление

лигнина, разрушение кристаллической структуры целлюлозных волокон, увеличение поверхности субстрата, доступной для ферментов [6–10].

Существуют различные методы предобработки, основанные на использовании разных принципов воздействия на растительную биомассу: механические, физические, химические, физико-химические, биологические [11, 12]. Каждый из них имеет ряд положительных (повышение реакционной способности субстрата за счет увеличения доступной площади, удаления лигнина, гемицеллюлозы и пр.) и отрицательных факторов таких как высокая стоимость, необходимость переработки реагентов, образование вредных побочных продуктов и др.). Измельчение (как сухое, так и влажное) является весьма эффективным методом предварительной обработки многих видов растительного сырья. Кроме того, это один из наиболее экологически чистых видов предобработки [13–15]. Факторами, ограничивающими его применение, являются высокие энергозатраты, относительно низкая производительность и необходимость интенсивного теплоотвода, особенно при глубоком измельчении массы.

При гидротермической предобработке лигнин плавится под действием горячей воды с последующим образованием его микрочастиц (псевдолигнина) с понижением температуры, а также происходит частичный гидролиз гемицеллюлоз. Такой метод предобработки сохраняет целлюлозу в волокнистом состоянии, при этом увеличивается ее доступность для ферментов [16, 17]. Предобработка горячей водой является одним из наиболее перспективных методов, поскольку не требует использования химических веществ и является “зеленой” технологией.

Предварительная обработка щелочами приводит к удалению (солюбилизации) лигнина за счет разрыва химических связей между гемицеллюлозами и лигнином, к некоторому снижению степени полимеризации целлюлозы и набуханию ее волокон с увеличением объема пор и площади внутренней поверхности, что повышает ее реакционную способность при ферментативном гидролизе [18–22]. Этот метод является спорным с экологической точки зрения, так как приводит к необходимости утилизации и обеззараживания сточных вод, при этом используемые химикаты безвозвратно теряются в виде солей.

Широко распространена предобработка водными растворами кислот. Это приводит к разрушению лигноцеллюлозной матрицы за счет разрыва гликозидных связей, солюбилизации гемицеллюлоз и частично лигнина [23–26]. Предобработку можно проводить как с использованием концентрированных, так и разбавленных растворов кислот. Однако, использование концентрированных кислот менее предпочтительно, так как требует соблюдения более строгих мер безопасности, применения оборудования с повышенной коррозионной стойкостью, регенерацию кислот, а также приводит к более интенсивному образованию

фурановых соединений – фурфурола из С5 сахаров и гидроксиметилфурфурола из С6 сахаров, способных к ингибированию микроорганизмов [27].

Предварительная органосольвная обработка направлена на сольватацию лигнина и гемицеллюлоз и проводится с использованием различных органических или водно-органических растворителей с добавлением катализаторов (или без них) при температуре 100–250°C [28–30]. Этанол получил широкое применение в качестве растворителя благодаря высокой эффективности предобработки растительной биомассы, а также простоте регенерации путем дистилляции. В качестве катализатора используют различные кислоты, чаще всего серную, соляную или уксусную. Органосольвная предобработка приводит к весьма значительному увеличению реакционной способности целлюлозы. К недостаткам можно отнести относительно высокую стоимость процесса и необходимость регенерации органических растворителей.

Делигнификация с использованием глубоких эвтектических растворителей (ГЭР, deep eutectic solvents) – класса растворителей, состоящих из двух компонентов, способных образовывать эвтектическую смесь с температурой плавления значительно более низкой, чем у каждого отдельного компонента – приводит к эффективной солюбилизации лигнина и гемицеллюлозы и повышает реакционную способность целлюлозы. Один из компонентов смесей выступает акцептором водородных связей (четвертичные соли аммония, например, холинхлорид), второй компонент – донором водородных связей (органические кислоты, многоосновные спирты, мочевины и другие соединения) [31–35]. Большим преимуществом метода является нетоксичность и биоразлагаемость используемых реагентов. Недостатком является относительно высокая стоимость процесса, высокая вязкость растворителей, а также необходимость рекуперации химических веществ, используемых в качестве компонентов растворителя.

При выборе способа предобработки растительной массы следует учитывать возможность гидролиза гемицеллюлоз, что создает технологический поток С5 сахаров, кроме того, могут образовываться токсичные для ферментов и микроорганизмов продукты. Учитывая это, вводят стадию разделения твердой и жидкой фракций после предобработки. Потоки С5 и С6 сахаров могут быть объединены после ферментативного гидролиза целлюлозы, или (пентозы или гексозы) могут быть использовать порознь [4, 5, 36]. В любом случае на каждой стадии следует контролировать образование С5 и С6 сахаров.

Цель настоящей работы – найти наиболее эффективный способ предобработки тростника для повышения его реакционной способности и подобрать оптимальный ферментный комплекс, обеспечивающий максимальный выход сахаров в ходе ферментативного гидролиза предобработанного тростника.

МЕТОДИКА

Ферментные препараты. В работе были использованы коммерческие препараты Агроцелл Плюс, Агроксил Премиум и Агроксил Плюс, произведенные на основе различных штаммов микроскопического гриба *Penicillium verruculosum* на предприятии ООО “Агрофермент”. Кроме того, были использованы лабораторные ферментные препараты (ФП), полученные с помощью штамма *P. verruculosum* B537 (продуцент целлюлазы) и штамма *P. verruculosum* F10 (продуцент целлюбиазы или β -глюкозидазы) [37, 38].

Штаммы *P. verruculosum* культивировали в качалочных колбах Эрленмейера емкостью 750 мл в 100 мл ферментационной среды следующего состава (%): KH_2PO_4 – 1.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.03, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.03, глюкоза – 1.0, дрожжевой экстракт – 1.0, пшеничные отруби – 1.0, микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) – 40.0. После культивирования в течение 144 ч на качалке при 220 об./мин и 30°C культуральную жидкость (КЖ) отделяли от мицелия центрифугированием в течение 10 мин при 10000 г. Препараты B537 и F10 были получены путем лиофильного высушивания КЖ, продуцируемой штаммами *P. verruculosum* B1-537 (Δ niaD) и *P. verruculosum* F10 на лиофильной сушке Benchtop 6K ES (SP Scientific/Virtis, США).

Реагенты. В работе использовали сухой тростник обыкновенный из Астраханской области (Россия) грубо дезинтегрированный и измельченный на ножевой мельнице и пылевую фракцию тростника, которая накапливается в фильтрах пылеуловителя ножевой мельницы. Дезинтегрированный тростник также подвергался обработке водяным паром, растворами гидроксида натрия или серной кислоты, органосольвом, ГЭР.

В качестве субстратов для определения активностей использовали Na-соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), ксилан бука, *n*-нитрофенил- β -глюкопиранозид (пНФГ) – производства “Sigma” (США) и микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ, ТУ 20.16.59-001-40693384-209, производства “Кристалл”, Россия). Для приготовления буферных смесей и солевых растворов использовали реактивы фирм “Bio-Rad Laboratories” (США), “Panreac” (Германия), “Helicon” и “Рехим” (Россия). Для получения ГЭР использовали холин хлорид (XXл) (“Molekula”, Англия), молочную кислоту (МК) (“Acros Organics”, Бельгия), моноэтаноламин (МЭА) (“Компонент-Реактив”, Россия).

Предобработка тростника. Предобработка проводилась в герметичных контейнерах из нержавеющей стали объемом 60 мл, помещенных в лабораторный аппарат для предобработки. Аппарат состоял из масляной бани, терморегулятора и двух термопар для контроля и управления температурой.

5 г дезинтегрированного тростника помещали в контейнер и добавляли 50 мл воды (обработка паром), раствора серной кислоты или гидроксида натрия нужной концентрации (0.25, 0.5, 1, 1.25% серной кислоты или 0.5, 1, 1.5, 2% гидроксида натрия) или смеси этанола с водой (40, 60, 80% этанола), содержащей 0.5% серной кислоты. Обработка велась в течение 1 ч при 120°C (кислотная или щелочная предобработка), 140°C (органосольвная) или 160°C (водяным паром).

После проведения предобработки тростник извлекали из контейнера и промывали 10 мл воды. Значение pH полученной суспензии тростника в воде доводили до 4.5–5.5 с помощью щелочи или кислоты соответственно. Затем суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 4000 г. Супернатант удаляли (отбирали пробу для проведения анализа состава сахаров с помощью ВЭЖХ), а к оставшемуся твердому остатку добавляли 50 мл воды, ресуспендировали и снова центрифугировали при тех же условиях. Супернатант удаляли. В осадке определяли содержание сухих веществ гравиметрическим методом. На всех стадиях определяли массы супернатанта и осадка.

Получение ГЭР. Оба вида ГЭР получали путем смешивания компонентов при постоянном перемешивании в течение 6 ч при 40°C (XXл и МК в молярном соотношении 1 : 5) или в течение 4 ч при 60°C (XXл и МЭА в молярном соотношении 1 : 6).

Предобработка тростника ГЭР. Для выбора оптимальных условий предобработки использовали ГЭР различного состава: кислый на основе XXл и МК, а также слабощелочной на основе XXл и МЭА. В типичном эксперименте к 500 мг дезинтегрированного тростника добавляли 9.5 г ГЭР (загрузка 5% по массе) и прогревали при перемешивании при 80°C в течение 24 ч. Полученные растворы охлаждали до комнатной температуры и добавляли по 10 мл 50%-ного водно-этанольного раствора. Смесь перемешивали, затем центрифугировали при 7000 г. Надосадочную жидкость, содержащую лигнин и компоненты ГЭР, отделяли, осадок многократно промывали водно-этанольной смесью, затем водой.

После предобработки тростник не подвергался дополнительной сушке, хранился при 4°C не более 2 недель.

Выход субстрата после предобработки определяли, как отношение массы предобработанного тростника после высушивания до постоянного веса к массе исходного тростника.

Определение активности и концентрации ферментов. За 1 ед. активности к специфическому субстрату принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль продукта за 1 мин при pH 5.0 и 50°C.

Активность по отношению к МКЦ, КМЦ и ксилану определяли по скорости накопления восстанавливающих сахаров (ВС), анализируемых методом Шомоди-Нельсона; активность по отношению к пНФГл – по скорости накопления *n*-нитрофенола [39].

Содержание белка в ФП определяли методом Лоури, используя БСА в качестве стандарта.

Ферментативный гидролиз предобработанного тростника. Гидролиз субстрата (100 г/л по сухой массе в реакционной смеси) проводили под действием ФП В537, Агроцелл Плюс, Агроксил Плюс или Агроксил Премиум (10 мг белка/г субстрата или 1 мг белка/мл реакционной смеси) с добавлением ФП F10 (1 мг белка/г субстрата или 0.1 мг белка/мл реакционной смеси) в пластиковых пробирках объемом 2 или 50 мл (объем реакционной смеси 1.5 или 20 мл соответственно) в термостатируемом шейкере. Процесс гидролиза вели в присутствии 0.1 г/л антибиотика ампициллина (“Белмедпрепараты”, Республика Беларусь) в 0.1 М Na-ацетатном буферном растворе pH 5.0 при 50°C в течение 48 ч.

Гидролиз субстратов, проявивших наибольшую реакционную способность, проводили также с помощью индивидуальных очищенных ферментов (целлобиогидролаз 1 и 2, эндоглюканаз 1 и 2, эндоксилаказы – все из *P. verruculosum*, β-глюкозидазы *Aspergillus niger*). Очистку ферментов проводили в соответствии с методиками, приведенными в работах [37, 38, 40]. Условия гидролиза: концентрация субстрата 40 г/л по сухой массе в реакционной смеси, концентрация фермента (целлобиогидролаз, эндоглюканаз или эндоксилаказы) 10 мг белка/г субстрата или 0.4 мг белка/мл реакционной смеси. Концентрация β-глюкозидазы 1 мг белка/г субстрата или 0.04 мг белка/мл реакционной смеси. Прочие условия гидролиза были аналогичны.

Из реакционной смеси отбирали аликвоты, в которых определяли концентрацию ВС методом Шомоди-Нельсона и состав низкомолекулярных продуктов с помощью ВЭЖХ-системы Agilent 1100 (“Agilent”, США) на колонке Диасфер-110-Амин (5 мкм, 4.0 × 250 мм); в качестве элюента использовали смесь ацетонитрил-вода 75 : 25 при скорости элюции 1 мл/мин, объем анализируемого образца 10×100 мкл. В качестве стандартов использовали ксилозу, арабинозу, глюкозу, ксилобиозу и целлобиозу.

Эксперимент проводился в трех повторностях.

Глубину ферментативного гидролиза (ГФГ) рассчитывали, как отношение концентрации ВС после 48 ч ферментативного гидролиза к исходной концентрации субстрата (100 г/л); выражали в процентах. Степень конверсии субстрата рассчитывали, умножив концентрацию продукта (ВС или глюкозы) после 48 ч ферментативного гидролиза на выход субстрата в процессе его предобработки (в долевого эквиваленте); выражали в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предобработка субстрата должна обеспечивать увеличение пористости поверхности субстрата, разрушению кристаллической структуры целлюлозных волокон, удалению лигнина и/или гемицеллюлозы. Изменение свойств предобработанного субстрата влечет за собой необходимость подбора и корректировки состава ферментного комплекса, используемого для гидролиза предобработанного субстрата.

В работе использовались ФП с различным содержанием ключевых гидролитических ферментов (целлобиогидролаз, эндоглюканаз, β-глюкозидазы и эндоксилаказы) (табл. 1), необходимых для разрушения основных полисахаров тростника – целлюлозы и ксилана. Так, ФП Агроцелл Плюс

Таблица 1. Содержание общего белка (мг/г), индивидуальных ферментов (% от общего белка) и удельная активность (ед./мг белка) по отношению к различным субстратам в ФП

ФП	Белок, мг/г	Фермент*				Активность			
		ЦБГ	ЭГ	ЭК	β-Г	МКЦ	КМЦ	ксилан	пНФГ
Агроцелл Плюс	71 ± 3	23 ± 2	50 ± 4	3.0 ± 0.3	1.4 ± 0.1	0.76 ± 0.07	48 ± 4	9.2 ± 0.8	0.73 ± 0.04
Агроксил Премиум	92 ± 4	22 ± 2	28 ± 2	32 ± 2	1.0 ± 0.1	0.53 ± 0.04	19 ± 2	34 ± 3	0.58 ± 0.03
Агроксил Плюс	90 ± 4	25 ± 2	2.0 ± 0.1	40 ± 4	1.5 ± 0.1	0.66 ± 0.06	5.2 ± 0.4	66 ± 6	0.76 ± 0.04
В537	950 ± 30	58 ± 5	2.6 ± 0.1	3.3 ± 0.3	3.1 ± 0.2	0.86 ± 0.08	13 ± 1	20 ± 2	1.8 ± 0.1
F10	660 ± 20	13 ± 1	2.2 ± 0.2	3.1 ± 0.3	75 ± 7	0.30 ± 0.03	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.2	61 ± 3

* ЦБГ – целлобиогидролаза, ЭГ – эндоглюканаза, ЭК – эндоксилаказа, β-Г – β-глюкозидаза.

характеризовался высоким содержанием эндоглюканаз (около 50% от всех белков) и, соответственно, высокой активностью по отношению к КМЦ (48 ед./мг белка). В ФП Агроксил Премиум одновременно было повышенное содержание эндоглюканаз (28%) и эндоксилаказы (32%) и активности по отношению к КМЦ и ксилану составляли 19 и 34 ед./мг белка соответственно. ФП Агроксил Плюс характеризовался высоким содержанием эндоксилаказы (40%) и высокой активностью по отношению к ксилану (66 ед./мг белка). В перечисленных трех ФП содержание целлюбиогидролаз составляло 22–25%, а в ФП 537 целлюбиогидролазы были основными ферментами (около 60%). ФП F10 содержал 75% β -глюкозидазы, которой было недостаточно в других ФП. Соответственно, результаты гидролиза разных видов предобработанного тростника под действием этих препаратов должны отображать изменение состояния целлюлозы и ксилана в субстрате в ходе предобработки.

Измельчение (рис. 1) тростника на ножевой мельнице не привело к улучшению результатов ферментативного гидролиза, в то время как глубина гидролиза более мелкой (пылевой) фракции, полученной при этом виде измельчения, увеличилась в 3 раза (табл. 2). В гидролизатах пылевой фракции концентрация ВС, ксилозы, арабинозы и глюкозы составила 18–20, 5–6, 0,2–0,3 и 13–14 г/л соответственно (табл. 3), что свидетельствовало о частичном гидролизе целлюлозы и гемицеллюлозы. Существенной разницы между действием на

измельченный тростник того или иного из использованных в работе ФП выявлено не было.

Накопление арабинозы в гидролизатах объясняется, по-видимому, присутствием в используемых ФП небольшого количества ферментов-гликозидаз, способных гидролизовать связи между арабинозой и ксилозой в гемицеллюлозе тростника. Так, в ферментном комплексе близкородственного гриба *P. canescens* были обнаружены арабинофуранозидаза, отщепляющая арабинозу от арабиноксилана пшеницы [41].

Следует отметить, что измельчение тростника до пылевой фракции привело к возможности проведения ферментативного гидролиза при концентрации субстрата значительно выше, чем в случае грубо измельченного тростника. Так, глубина гидролиза пылевой фракции под действием ФП Агроцелл Плюс не зависела от концентрации субстрата в диапазоне 100–250 г/л (дальнейшее увеличение концентрации субстрата приводило к проблемам с массопереносом), в то время как наибольшая концентрация грубо измельченного тростника, при которой достигалась максимальная глубина гидролиза, составляла 200 г/л (рис. 2). При увеличении концентрации грубо измельченного тростника до 250 г/л в реакционной смеси отсутствовала жидкая фаза.

Выход субстрата (нерастворимого осадка) после гидротермической предобработки тростника составил 70%, а в супернатанте была обнаружена ксилоза (2,5% от исходной массы тростника), то есть произошло частичное разрушение гемицеллюлозы и, вероятно, сольватация лигнина. Глубина гидролиза предобработанного субстрата увеличилась в 3,5 раза относительно исходного тростника (табл. 2). Наилучшие результаты при ферментативном гидролизе были получены с использованием



Рис. 1. Тростник с разной степенью измельчения на ножевой мельнице: 1 – пылевая фракция, 2 – грубая фракция, 3 – исходный тростник.

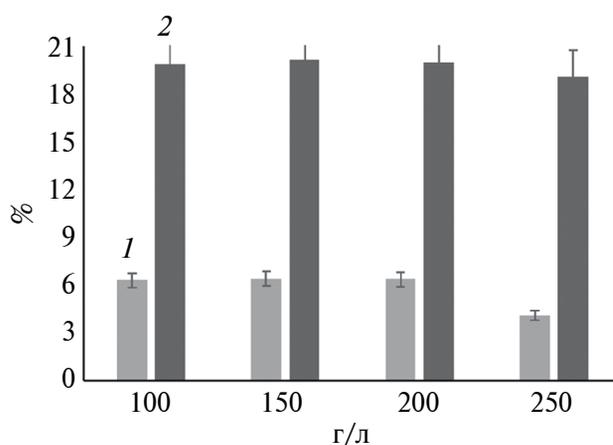


Рис. 2. Глубина гидролиза грубой (1) и пылевой фракций (2) измельченного тростника после 48 ч обработки ФП Агроцелл Плюс (10 мг белка/г субстрата) и F10 (1 мг белка/г субстрата) при 50°C, pH 5.0. На оси абсцисс указана концентрация субстрата.

Таблица 2. Выход субстрата* (%) после предобработки, глубина последующего ферментативного гидролиза** (ГФГ, %) под действием лучшего ФП и степень конверсии*** (%)

Способ и условия предобработки		Выход субстрата	ГФГ, %	Степень конверсии, %	
				полисахариды	целлюлоза
Без обработки		100	7 ± 1	7 ± 1	6 ± 1
Измельчение	Грубая фракция	100	7 ± 1	7 ± 1	6 ± 1
	Пылевая фракция	100	20 ± 2	20 ± 2	14 ± 2
Водяной пар		70	25 ± 2	18 ± 2	11 ± 2
Щелочь	0.5% NaOH	92	22 ± 2	20 ± 2	13 ± 2
	1% NaOH	64	40 ± 3	26 ± 3	19 ± 2
	1.5% NaOH	58	59 ± 4	34 ± 4	25 ± 3
	2% NaOH	57	48 ± 4	27 ± 2	22 ± 2
Кислота	0.25% H ₂ SO ₄	73	16 ± 2	12 ± 2	9 ± 1
	0.5% H ₂ SO ₄	69	17 ± 2	12 ± 2	9 ± 1
	1% H ₂ SO ₄	67	17 ± 2	11 ± 2	9 ± 1
	1.25% H ₂ SO ₄	65	20 ± 2	13 ± 2	10 ± 2
Органосольв (+0.5% H ₂ SO ₄)	40% EtOH	91	11 ± 2	10 ± 2	7 ± 1
	60% EtOH	89	11 ± 2	10 ± 2	7 ± 1
	80% EtOH	86	10 ± 2	9 ± 2	6 ± 1
ГЭР	XXл/МК	57	45 ± 3	26 ± 2	20 ± 2
	XXл/МЭА	96	63 ± 4	60 ± 4	40 ± 3

* Выход субстрата – отношение массы предобработанного тростника после высушивания до постоянного веса к массе исходного тростника, в %.

** Глубина ферментативного гидролиза – отношение концентрации ВС после 48 ч ферментативного гидролиза к исходной концентрации субстрата, в %.

*** Степень конверсии – произведение концентрации продукта (ВС или глюкозы) после 48 ч ферментативного гидролиза и выхода субстрата в процессе его предобработки (в доле эквиваленте).

ФП Агроксил Плюс (с увеличенным содержанием эндоксиланазы): концентрация ВС, ксилозы, ксилобиозы, арабинозы и глюкозы в реакционной среде составила 25, 4.8, 0.7, 0.3 и 16 г/л соответственно (табл. 3). Таким образом, гидротермическая предобработка тростника и последующий ферментативный гидролиз под действием ФП Агроксил Плюс позволяли извлечь 18% сахаров, в том числе 11% глюкозы (табл. 2).

Выход субстрата после предобработки тростника щелочью уменьшался с увеличением концентрации щелочи и составил 92% в случае 0.5%-ного NaOH и 57–58% в случае 1.5–2%-ного NaOH. В супернатантах низкомолекулярных сахаров со степенью полимеризации 1–4 методом ВЭЖХ обнаружено не было, то есть в ходе предобработки происходила солюбилизация лигнина без глубокого разрушения гемицеллюлоз. Глубина

гидролиза предобработанного субстрата увеличилась в 3–8 раз относительно исходного тростника, максимальное значение этого параметра 59% соответствовало предобработке 1.5%-ным раствором NaOH (табл. 2). При ферментативном гидролизе предобработанного субстрата лучшим был ФП Агроксил Плюс (с увеличенным содержанием эндоксиланазы): концентрация ВС, ксилозы, ксилобиозы, арабинозы и глюкозы в реакционной среде составила 59, 7.2, 0.7, 1.3 и 43 г/л соответственно (табл. 3). Таким образом, предобработка тростника щелочью (1.5% NaOH) и последующий ферментативный гидролиз под действием ФП Агроксил Плюс позволяли извлечь 34% сахаров, в том числе 25% глюкозы (табл. 2).

Выход субстрата после предобработки тростника кислотой незначительно уменьшался с увеличением ее концентрации и составил 73–65%.

Таблица 3. Концентрация сахаров (г/л) после 48 ч ферментативного гидролиза предобработанного тростника (100 г/л) при рН 5.0 и 50°С, концентрация ФП 10 мг белка/г субстрата

Субстрат	ФП*	Сахара, г/л				
		ВС	ксилоза	арабиноза	глюкоза	ксилобиоза
Исходный тростник	В537	5.2 ± 0.4	1.1 ± 0.1	0.18 ± 0.02	3.4 ± 0.2	0
	АЦ	7.0 ± 0.6	1.5 ± 0.2	0.23 ± 0.02	4.8 ± 0.3	0
	АкПр	6.5 ± 0.5	1.4 ± 0.1	0.14 ± 0.01	4.3 ± 0.3	0
	АкПл	6.9 ± 0.5	1.5 ± 0.1	0.19 ± 0.01	4.4 ± 0.3	0
Пылевая фракция	В537	19 ± 2	5.7 ± 0.4	0.23 ± 0.02	13 ± 2	0
	АЦ	20 ± 2	5.9 ± 0.4	0.25 ± 0.02	14 ± 2	0
	АкПр	18 ± 2	5.1 ± 0.4	0.24 ± 0.02	13 ± 2	0
	АкПл	19 ± 2	5.9 ± 0.4	0.25 ± 0.02	13 ± 2	0
Обработанный водяным паром	В537	21 ± 2	3.5 ± 0.2	0.26 ± 0.02	12 ± 1	0.51 ± 0.03
	АкПр	23 ± 2	4.3 ± 0.3	0.30 ± 0.02	14 ± 1	0.63 ± 0.04
	АкПл	25 ± 2	4.8 ± 0.3	0.28 ± 0.02	16 ± 2	0.72 ± 0.06
Обработанный раствором 1.5% NaOH	В537	46 ± 3	2.8 ± 0.2	0.76 ± 0.04	29 ± 2	0.56 ± 0.03
	АкПр	58 ± 4	7.8 ± 0.5	1.2 ± 0.1	40 ± 3	0.68 ± 0.04
	АкПл	59 ± 4	7.2 ± 0.5	1.3 ± 0.1	43 ± 3	0.73 ± 0.04
Обработанный раствором 1.25% H ₂ SO ₄	В537	20 ± 2	1.9 ± 0.2	0.18 ± 0.02	15 ± 2	0.63 ± 0.05
	АкПр	18 ± 2	2.4 ± 0.2	0.21 ± 0.02	11 ± 1	0.60 ± 0.04
	АкПл	19 ± 2	2.1 ± 0.2	0.19 ± 0.02	13 ± 2	0.61 ± 0.05
Обработанный 40% EtOH, 0.5% H ₂ SO ₄	В537	8.8 ± 0.9	1.2 ± 0.1	0.14 ± 0.01	6.5 ± 0.5	0.30 ± 0.02
	АкПр	10 ± 1	1.5 ± 0.1	0.16 ± 0.01	7.0 ± 0.6	0.31 ± 0.02
	АкПл	11 ± 2	1.6 ± 0.1	0.17 ± 0.02	7.7 ± 0.6	0.32 ± 0.02
Обработанный ГЭР (XXл/МК)	В537	40 ± 3	4.0 ± 0.3	0	32 ± 2	4.1 ± 0.3
	АЦ	45 ± 3	6.5 ± 0.5	0	35 ± 2	3.8 ± 0.3
	АкПр	38 ± 2	6.0 ± 0.5	0	29 ± 2	2.8 ± 0.2
	АкПл	39 ± 3	5.6 ± 0.4	0	30 ± 2	3.3 ± 0.3
Обработанный ГЭР (XXл/МЭА)	В537	47 ± 3	6.4 ± 0.4	0.9 ± 0.1	31 ± 2	8.7 ± 0.6
	АЦ	63 ± 4	12 ± 1	1.7 ± 0.2	42 ± 3	6.3 ± 0.4
	АкПр	56 ± 4	13 ± 1	1.8 ± 0.2	36 ± 3	5.2 ± 0.3
	АкПл	58 ± 4	10 ± 1	1.3 ± 0.1	40 ± 3	6.2 ± 0.3

* АЦ – Агроцелл Плюс, АкПр – Агроксил Премиум, АкПл – Агроксил Плюс.

В супернатантах были обнаружены сахара (в основном ксилоза и арабиноза), количество которыхкратно увеличивалось с повышением концентрации кислоты: 5.5, 9.5, 14 и 20% от исходной массы тростника в случае использования 0.25, 0.5, 1.0 или 1.25% H_2SO_4 . В ходе предобработки происходило разрушение гемицеллюлоз и солюбилизация лигнина. Глубина гидролиза предобработанного субстрата увеличилась в 2.5–3 раза относительно исходного тростника и наибольшее значение 20% соответствовало предобработке 1.25%-ным раствором H_2SO_4 (табл. 2). При ферментативном гидролизе этого субстрата небольшое преимущество имел ФП B537 с высоким содержанием целлюбогидролаз: концентрация ВС, ксилозы, ксилобиозы, арабинозы и глюкозы в реакционной среде составила 20, 1.9, 0.6, 0.2 и 15 г/л соответственно (табл. 3). Таким образом, предобработка тростника кислотой (1.25% H_2SO_4) и последующий ферментативный гидролиз под действием ФП B537 позволили извлечь 13% сахаров, в том числе 10% глюкозы (табл. 2).

Выход субстрата после органосольной предобработки тростника незначительно уменьшался с увеличением концентрации этанола и составил 91–86%. В супернатантах сахаров обнаружено не было. Глубина гидролиза предобработанного субстрата увеличилась в 1.5 раза относительно исходного тростника, практически не зависела от концентрации этанола в ходе предобработки и составила 10–11% (табл. 2). При ферментативном гидролизе субстрата лучшим был ФП Агротил Плюс (с увеличенным содержанием эндоглюканазы): концентрация ВС, ксилозы, ксилобиозы, арабинозы и глюкозы в реакционной среде составила 11, 1.6, 0.3, 0.2 и 7.7 г/л соответственно (табл. 3). Таким образом, предобработка тростника органосольвом (40% EtOH, 0.5% H_2SO_4) и последующий ферментативный гидролиз под действием ФП Агротил Плюс позволили извлечь 10% сахаров, в том числе 7% глюкозы (табл. 2).

Выход субстрата после предобработки тростника ГЭР зависел от состава ГЭР и составил 57 и 96% в случае использования ХХл с МК или МЭА соответственно. При воздействии ХХл с МК на тростник, вероятно, происходило разрушение гемицеллюлоз и солюбилизация лигнина, а при воздействии ХХл с МЭА этого не наблюдалось. Глубина гидролиза предобработанного субстрата увеличилась в 6 и 9 раз относительно исходного тростника и составила 45 и 63% для ХХл с МК или МЭА соответственно (табл. 2). В обоих случаях ферментативный гидролиз субстрата наиболее полно протекал при использовании ФП Агроцелл Плюс (с увеличенным содержанием эндоглюканазы): в случае предобработки ХХл с МК концентрация ВС, ксилозы, ксилобиозы, арабинозы и глюкозы в реакционной среде составила 45, 6.5, 3.8, 0 и 35 г/л, в случае ХХл с МЭА – 63, 12, 6.3, 1.7 и 42 г/л соответственно

(табл. 3). Таким образом, предобработка тростника кислотным ГЭР (ХХл с МК) и последующий ферментативный гидролиз под действием ФП Агроцелл Плюс позволили извлечь 26% сахаров, в том числе 20% глюкозы, а предобработка слабощелочным ГЭР (ХХл с МЭА) при прочих равных условиях – 63% сахаров и 40% глюкозы (табл. 2).

Процесс гидролиза тростника, предобработанного двумя типами ГЭР, был изучен более подробно. Для этого был проведен гидролиз субстратов очищенными индивидуальными ферментами целлюлозного комплекса (целлюбогидролазами 1 и 2, эндоглюканазами 1 и 2) и эндоглюканазой в присутствии дополнительной гомогенной β -глюкозидазы (10% от общей загрузки по белку). Среди индивидуальных ферментов наибольшую активность по отношению к обоим субстратам проявляла целлюбогидролаза 1 при начальной концентрации предобработанного ХХл с МК или МЭА субстрата 40 г/л было получено 16 и 20 г/л ВС соответственно (рис. 3). Глубина гидролиза при этом составила 40 и 50% только под действием целлюбогидролазы 1. Эндоглюканаза 1 проявляла высокую активность по отношению к тростнику, предобработанному ХХл с МЭА (концентрация ВС 16 г/л, глубина гидролиза 40%), и была намного менее активна к тростнику, предобработанному ХХл с МК (3.4 г/л ВС, глубина гидролиза 8.5%). Остальные ферменты (целлюбогидролаза 2, эндоглюканаза 2 и эндоглюканаза) проявляли меньшую активность по отношению к тростнику, предобработанному ХХл с МЭА (5–8 г/л ВС, 12–20% глубина гидролиза), и к тростнику, предобработанному ХХл с МК (2–3 г/л ВС, 4.5–7.5% глубина гидролиза).

При гидролизе предобработанного ГЭР тростника смесями очищенных ферментов наблюдался ярко выраженный синергетический эффект в

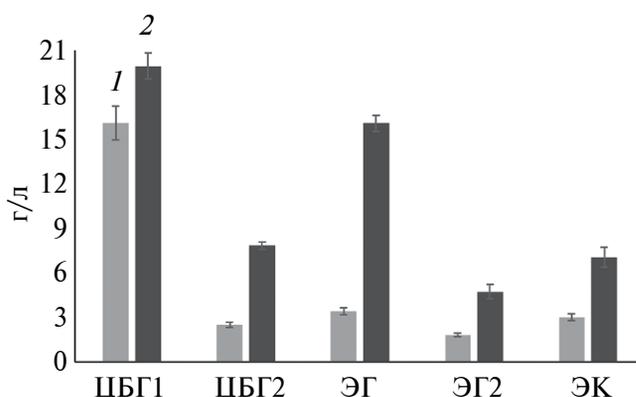


Рис. 3. Концентрация ВС после 48 ч гидролиза тростника (40 г/л), предобработанного ГЭР ХХл с МК (1) или МЭА (2), под действием очищенных ферментов (10 мг белка/г субстрата) с добавлением β -глюкозидазы (1 мг белка/г субстрата) при 50°C, pH 5.0: ЦБГ – целлюбогидролаза, ЭГ – эндоглюканаза, ЭК – эндоглюканаза.

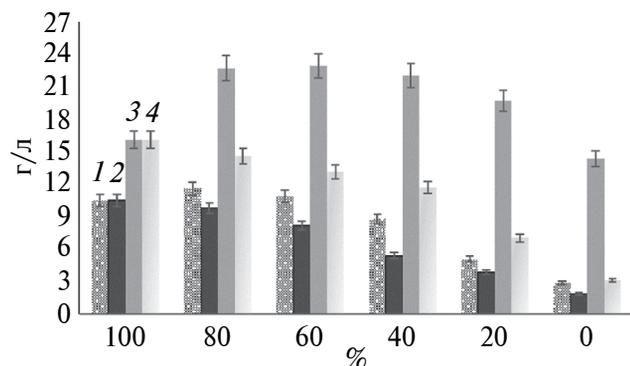


Рис. 4. Концентрация ВС после 48 ч гидролиза тростника (40 г/л), предобработанного ГЭР ХХл с МК (1, 2) или МЭА (3, 4), под действием смесей очищенных ферментов (4.5 мг общего белка/г субстрата) с добавлением β -глюкозидазы (0.45 мг белка/г субстрата) при 50°C, pH 5.0: 1 и 3 – смеси ЦБГ с ЭГ; 1, 2 и 4 – с ЭК. На оси абсцисс указано процентное содержание целлюбиогидролаз в смесях относительно общего содержания ферментов.

действию целлюбиогидролаз и эндоглюканазы 1 на субстрат, полученный обработкой ХХл с МЭА, и менее выраженный синергетический эффект при действии этой же смеси на субстрат, полученный обработкой ХХл с МК (рис. 4). Максимальные значения коэффициентов синергизма (1.5 и 1.4 для предобработанного ХХл с МЭА или МК соответственно) наблюдали для соотношения целлюбиогидролаза : эндоглюканаза 1 = 60 : 40. Синергетическое взаимодействие целлюбиогидролаз с эндоглюканазой было значительно менее выражено для обоих субстратов. Глубина гидролиза предобработанного субстрата (тростник, обработанный ХХл с МЭА) с высоким содержанием ксилана (до 20%) мало зависела от содержания в реакционной смеси эндоглюканазы, что, вероятно, объясняется наличием у целлюбиогидролазы 1 и эндоглюканазы 1 ксиланазной активности [33].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сырая растительная биомасса мало пригодна для ферментативной деструкции вследствие низкой реакционной способности. Целлюлоза устойчива к действию ферментов из-за своей нерастворимости и прочной структуры, обусловленной высокой кристалличностью. Лигнин является главным защитным средством для растения, препятствующим деструкции полисахаридов ферментами (он является физическим барьером и природным адсорбентом для многих ферментов). Гемичеселлюлозы в составе лигноуглеводного комплекса также вносят вклад в низкую реакционную способность растительной биомассы, экранируя целлюлозу. Глубина ферментативного гидролиза пшеничной соломы, овсяной шелухи, кукурузных стеблей, хвойных и лиственных опилок невелика и составляет 5–12%

от сухого вещества сырья [36]. В настоящей работе глубина гидролиза грубо дезинтегрированного тростника составила 7%. Таким образом, тростник можно отнести к сырью с низкой реакционной способностью.

Грубая фракция тростника, измельченного на ножевой мельнице, проявляла низкую реакционную способность при ферментативном гидролизе, в то время как его пылевая фракция обладала значительно лучшей гидролизуемостью – 20% сухого вещества конвертировалось в сахара. Учитывая, что стебли тростника содержат 37% целлюлозы и 21% гемичеселлюлозы [2], степень конверсии целлюлозы до глюкозы составила около 38% целлюлозы, гемичеселлюлоз до ксилозы и арабинозы – 29%. Важным преимуществом использования пылевой фракции оказалась возможность проведения ферментативного гидролиза субстрата высокой концентрации.

Измельчение, как способ увеличения реакционной способности субстрата, был эффективен при использовании планетарной мельницы-активатора АГО-2С [42]. Ферментативный гидролиз измельченных пшеничных отрубей привел к близкому к теоретическому выходу сахаров (62.4%) и практически полной конверсии углеводной составляющей. В работе [14] сравнивали выход сахаров в ходе ферментативного гидролиза рисовой соломы, подвергнутой мокрому дисковому помолу и шаровому помолу: выход глюкозы и ксилозы составил 78.5 и 41.5, 89.4 и 54.3% соответственно, т.е. конверсия целлюлозы в обоих случаях была выше конверсии ксилана. Измельчение пшеничной соломы в шаровой мельнице до частиц менее 100 мкм приводило к общему выходу углеводов 46%, глюкозы – 72% вследствие доказанного снижения кристалличности целлюлозы [15].

Гидротермическая предобработка была эффективной для рисовой соломы [14] и мискантуса – близкородственного тростнику злака [17]. В первом случае выход глюкозы и ксилозы после ферментативного гидролиза предобработанного при 180°C субстрата составил 70.3 и 88.6%, во втором случае обработка субстрата при 200°C обеспечивала практически полное удаление гемичеселлюлозы, а последующий ферментативный гидролиз приводил к высвобождению 48% редуцирующих сахаров. В настоящей работе гидротермическая обработка тростника при 160°C приводила к частичному разрушению гемичеселлюлоз (12% от общего содержания), а последующий ферментативный гидролиз обеспечивал конверсию 18% полисахаридов (из них 11% целлюлозы) в низкомолекулярные сахара.

Среди химических методов предобработки тростника наиболее эффективным оказалось использование слабощелочных растворов (по сравнению с растворами кислот). Так, обработка 1.5%-ным раствором NaOH или ГЭР ХХл с МЭА, в ходе

которой не наблюдалось глубокого разрушения гемицеллюлозы, и последующий ферментативный гидролиз приводили к конверсии 34% полисахаридов (из них 25% целлюлозы) в низкомолекулярные сахара (1.5% NaOH) или к конверсии 60% полисахаридов (40% целлюлозы) до моносахаров (ГЭР). В литературе отмечена эффективность предобработки древесины тополя в растворах NaOH, Ca(OH)₂ или аммиака [18], багассы (стеблей сахарного тростника) в растворе NaOH [36], кукурузной соломы в растворе NaOH и H₂O₂ (щелочно-окислительная обработка) [20] или в растворе Na₃PO₄ и Na₂S [21]. Все авторы отмечают высокую степень конверсии предобработанного субстрата в глюкозу и ксилозу – от 55 до 91%. Процессы делигнификации и их влияние на выход ферментативного гидролиза предобработанных с помощью щелочных ГЭР кукурузных початков были изучены в работе [43]. При использовании ХХл/мочевина выход продуктов гидролиза составил 59% при оптимальной температуре предобработки 115°C, а при использовании ХХл/имидазол в диапазоне температуры 80–150°C был еще выше (92–95%).

Во многих работах отмечается большая эффективность кислого ГЭР для предобработки растительной биомассы [31, 44–46]. В качестве донора водорода в таких смесях используются, как правило, органические кислоты. Ранее [46] сообщалось об эффективной предобработке тростника с помощью ГЭР на основе ХХл и молочной или щавелевой кислот. В оптимизированных условиях предобработки были получены субстраты, глубина ферментативного гидролиза которых составляла 80 и 86% соответственно. В настоящей работе показано, что щелочной ГЭР в отношении тростника не менее эффективен. Следует отметить, что вне зависимости от свойств ГЭР (кислый или щелочной), используемого на стадии предобработки тростника, ключевым ферментом в ходе гидролиза была целлюбогидролаза I, а ее синергетическое взаимодействие с эндоглюканазой I обеспечивало высокий выход не только глюкозы, но и ксилозы.

В настоящей работе наименьшее увеличение реакционной способности тростника наблюдалось при использовании водных и водно-органических растворов серной кислоты: максимальная глубина последующего ферментативного гидролиза составляла 20 и 10% соответственно. Кислотная обработка была эффективной для пшеничной соломы, аннской травы и багассы [23], скорлупы миндаля [26], соевых оболочек [47] – суммарный выход сахаров на стадиях предобработки и ферментативного гидролиза составил более 80%. В работе [48] было исследовано влияние предобработки древесных опилок водными и водно-органическими растворами кислот на ферментативное осахаривание. Наиболее эффективной была предобработка водным раствором 4.8% азотной кислоты, которая

увеличивала реакционную способность субстрата более чем в 5 раз, а использование органосольва (65% этанола или бутанола, 0.5% серной кислоты) приводило к повышению реакционной способности в 3–4 раза по сравнению с исходным сырьем.

Таким образом, для повышения реакционной способности тростника с целью его дальнейшего ферментативного гидролиза до моносахаров эффективны методы щелочной, в особенности щелочным ГЭР, гидротермической предобработки, измельчение до пылевых частиц. Наименее эффективным было использование кислотного органосольва. Для глубокого ферментативного гидролиза предобработанного тростника оптимальным является комплекс из целлюбогидролаз, эндоглюканаз и, в некоторых случаях, эндоксилаказы – ФП Агроцелл Плюс или Агроксил Плюс.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования (Соглашение № 075-15-2022-1226 от 17.10.2022).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАР-ТОВ. Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гусаков А.В., Синицын А.П. // Химия биомассы: биотоплива и биопластики. М.: Научный мир, 2017. 789 с. ISBN 978-5-91522-451-2
2. Количественный химический анализ растительного сырья. / Ред. В.И. Шарков, И.И. Куйбина, Ю.П. Соловьева, Т.А. Павлова. М.: Лесная промышленность, 1976. С. 63–64.
3. Dibyajyoti H., Kumar P. // Process Biochem. 2020. V. 89. P. 110–133. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.001>
4. Gusakov A.V. // Biofuels. 2013. V. 4. № 6. P. 567–569. <https://doi.org/10.4155/bfs.13.55>
5. Teter S.A., Brandon S.K., Emme B. Enzymatic Processes and Enzyme Development in Diorefining // Advances in Biorefineries. 2014. P. 199–233. <https://doi.org/10.1533/9780857097385.1.199>
6. Sun Q., Foston M., Meng X., Sawada D., Pingali S.V., O'Neill H. M., et al. // Biotechnol. Biofuels. 2014. V. 7. № 150. P. 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0150-6>
7. Yang B., Dai Z., Ding S.-Y., Wyman C.E. // Biofuels. 2011. V. 2. № 4. P. 421–449. <https://doi.org/10.4155/bfs.11.116>
8. Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J., Stroeve P. // Ind. Eng. Chem. Res. 2009. V. 48. P. 3713–3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>

9. Karimi K., Taherzadeh M.J. // *Bioresour. Technol.* 2016. V. 200. P. 1008–1018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.022>
10. Liguori R., Ventorino V., Pepe O., Faraco V. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. № 2. P. 597–611. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7125-9>
11. He Y.-C., Ma C.-L., Yang B. // *Fungal Cellulolytic Enzymes. Microbial production and application.* / Ed. Xu Fang, Yinbo Qu. Springer. 2018. P. 1–25. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0749-2_1
12. Alvira P., Tomáspejó E., Ballesteros M., Negro M.J. // *Bioresour. Technol.* 2010. V. 101. № 13. P. 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
13. Paudel S.R., Banjara S.P., Choi O.K., Park K.Y., Kim Y.M., Lee J.W. // *Bioresour. Technol.* 2017. V. 245. P. 1194–1205. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.182>
14. Hiden A., Inoue H., Tsukahara K., Fujimoto S., Minowa T., Inoue S., Endo T., Sawayama S. // *Bioresour. Technol.* 2009. V. 100. P. 2706–2711. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.057>
15. Ghizzi G., Silva D., Couturier M., Berrin J.-G., Buléon A., Rouau, X. // *Bioresour. Technol.* 2012. V. 103. P. 192–210. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.073>
16. Bobleter O., Concin R. // *Cellulose Chemistry and Technol.* 1979. V. 13. P. 583–593.
17. Павлов И.Н. // *Ползуновский вестник.* 2018. № 1. С. 148–152. <https://doi.org/10.25712/ASTU.2072-8921.2018.01.028>
18. Bali G., Meng X., Deneff J.I., Sun Q., Ragauskas A.J. // *ChemSusChem.* 2015. V. 8. P. 275–279. <https://doi.org/10.1002/cssc.201402752>
19. Prajapati B.P., Jana U.K., Suryawanshi R.K., Kango N. // *Renewable Energy.* 2020. V. 152. P. 653–663. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.01.063>
20. Liu I., Li Z. // *RSC Advances.* 2017. V. 7. P. 47456–47463. <https://doi.org/10.1039/C7RA08101D>
21. Qing Q., Zhou L.L., Guo Q., Huang M.Z., He Y.C., Wang L.Q., Zhang Y. // *Bioresour. Technol.* 2016. V. 218. P. 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.063>
22. Rabemanantsoa H., Saka S. // *Bioresour. Technol.* 2016. V. 199. P. 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.029>
23. Mishra A., Ghosh S. // *Fuel.* 2019. V. 236. P. 544–553. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.09.024>
24. Woiciechowski A. L., Dalmás Neto C.J., Vandenberghe L.P.S., Carvalho Neto D.P., Sydney A.C.N., Letti L.A.J. et al. // *Bioresour. Technol.* 2020. V. 304. 122848. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122848>
25. Yu Z., Du Y., Shang X., Zheng Y., Zhou J. // *Industrial Crops and Products.* 2018. V. 124. P. 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.029>
26. Nitsos C., Matsakas L., Triantafyllidis K., Rova U., Christakopoulos P. // *Biofuels.* 2018. V. 9. P. 545–558. <https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1378988>
27. Liu Q., Li W., Ma Q., An S., Li M., Jameel H., Chang H.M. // *Bioresour. Technol.* 2016. V. 211. P. 435–442. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.131>
28. Ostovareh S., Karimi K., Zamani A. // *Industrial Crops and Products.* 2015. V. 66. P. 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.023>
29. He Y.C., Liu F., Di J.H., Ding Y., Tao Z.C., Zhu Z.Z. et al. // *Industrial Crops and Products.* 2016. V. 81. P. 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.079>
30. Arato C., Kendall P., Gjennstad G. // *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 2005. V. 123. P. 871–882. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-991-2_74
31. Satlewal A., Agrawal R., Bhagia S., Sangoro J., Ragauskas A.J. // *Biotechnol. Adv.* 2018. V. 3. P. 2032–2050. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.08.009>
32. Zhao H., Baker G.A. // *J. Chemical Technol. and Biotechnol.* 2012. V. 88. P. 3–12. <https://doi.org/10.1002/jctb.3935>
33. New E.K., Wu T.Y., Lee C.B., Poon Z.Y., Loow Y.-L., Foo L.Y.W. et al. // *Process Safety and Environmental Protection.* 2019. V. 123. P. 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.11.015>
34. Chen Z., Jacoby W.A., Wan C. // *Bioresour. Technol.* 2019. V. 279. P. 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.126>
35. Chong G., Di J., Ma C., Wang D., Wang C., Wang L., Zhang P., Zhu J., He Y. // *Bioresour. Technol.* 2018. V. 261. P. 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.015>
36. Синуцын А.П., Синуцына О.А. // *Успехи биологической химии.* 2021. Т. 61. С. 347–414.
37. Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravilnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P. // *Biotechnol. J.* 2010. V. 5. № 8. P. 871–880. <https://doi.org/10.1002/biot.201000050>
38. Dotsenko G.S., Gusakov A.V., Rozhkova A.M., Korotkova O.G., Sinitsyn A.P. // *Process Biochem.* 2015. V. 50. P. 1258–1263. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.008>
39. Синуцын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В. *Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ, Биотехнология.* 1990. № 25. С. 148.
40. 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. <https://doi.org/10.1134/S0006297909050137>

41. Сеницына О.А., Бухтояров Ф.Е., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Беккаревич А.О. и др. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 11. С. 1494–1505.
42. Осипов Д.О., Булахов А.Г., Короткова О.Г., Рожкова А.М., Дулякин Е.О. и др. // Катализ в промышленности. 2016. Т. 16. С. 75–82. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2016-5-75-82>
43. Procentese A., Johnson E., Orr V., Garruto Campanile A., Wood J.A., Marzocchella A. et al. // Biores. Technol. 2015. V. 192. P. 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.053>
44. Zhang C.-W., Xia S.-Q., Ma P.-S. // Biores. Technol. 2016. V. 219. P. 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.026>
45. Wahlstrom R., Hiltunen J., Pitaluga De Souza Nascente Sirkka M., Vuoti S., Kruus K. // RSC Adv. 2016. V. 6. № 72. P. 68100–68110. <https://doi.org/10.1039/C6RA11719H>
46. Семенова М.В., Васильева И.С., Ярополов А.И., Сеницын А.П. // Прикл. биохимия микробиология. 2023. Т. 59. №3. С. 253–259. <https://doi.org/10.31857/S0555109923030169>
47. Сеницын А.П., Осипов Д.О., Цурикова Н.В., Великорецкая И.А., Шашков И.А., Зверев С.В. // Биотехнология. 2016. Т. 1. С. 27–36. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2016-1-27-36>
48. Доценко Г.С., Осипов Д.О., Зоров И.Н., Сеницын А.П. // Катализ в промышленности. 2015. Т. 15. С. 67–73. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2015-5-67-73>

Methods for Pre-Processing Cane to Obtain Enzymative Hydrolysates with High Sugar Content

M. V. Semenova^a, A. M. Rozhkova^a, *, D. O. Osipov^a, V. D. Telitsin^a,
E. A. Rubtsova^a, E. G. Kondrat'eva^a, I. S. Vasil'eva^a, O. V. Morozova^a,
A. I. Yaroplov^a, and A. P. Sinitsyn^a

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

*e-mail: amrojkova@yahoo.com

Methods of cane pretreatment (grinding, hydrothermal treatment, treatment with acid or alkali solutions, organosolv, deep eutectic solvents) and their effect on its subsequent enzymatic hydrolysis by cellulases and hemicellulases complexes have been studied. Substrates with the highest reactivity were obtained by exposing the cane to a weakly alkaline deep eutectic solvent (DES) and an alkali solution. The depth of enzymatic hydrolysis of these pretreated substrates was 63 and 59%, and the degree of conversion of polysaccharides (cellulose and hemicellulose) into monosaccharides taking into account the yield of the substrate at the pre-processing stage was 60 and 34%, respectively. After pre-treatment of the cane with acid DES, water steam, water or water/organic solution of sulfuric acid the depth of enzymatic hydrolysis was 45, 25, 20 and 11%, and the degree of polysaccharide conversion was 26, 18, 13 and 10%, respectively. The industrial enzyme preparation Agrocell Plus with a predominant content of cellobiohydrolases and endoglucanases was most effective in hydrolyzing the dust fraction of cane, as well as cane pretreated with a solution of sulfuric acid or DES (acidic or alkaline). The industrial enzyme preparation Agroxil Plus, containing endoxylanase and cellobiohydrolases, was more effective in hydrolyzing cane after hydrothermal pretreatment or alkali solution. The results of the hydrolysis of cane pretreated with acidic or weakly alkaline DES under the action of individual (homogeneous) cellulases indicate that in both cases the key enzyme was cellobiohydrolase 1.

Keywords: cane, pretreatment, deep eutectic solvents, hydrolysis, cellulases, *Penicillium verruculosum*

УДК 579.66+543.95

РАЗРАБОТКА БИОСЕЛЕКТИРУЮЩЕГО АГЕНТА НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ С АКТИВНОСТЬЮ АМИДАЗЫ ДЛЯ БИОДЕТЕКЦИИ АКРИЛАМИДА

© 2024 г. Е. М. Протасова¹, Ю. Г. Максимова^{1, 2, *}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614990 Россия

*e-mail: yul_max@mail.ru

Поступила в редакцию 07.03.2024 г.

После доработки 30.03.2024 г.

Принята к печати 28.04.2024 г.

Клетки актинобактерий *Rhodococcus erythropolis* 4-1, *Rhodococcus erythropolis* 11-2 и протеобактерий *Alcaligenes faecalis* 2, обладающих амидазной активностью, были иммобилизованы методом включения в структуру геля альгината бария и агарозы, а также при получении биопленок на терморасширенном графите (ТРГ). Определена операционная стабильность таких иммобилизованных биокатализаторов после хранения в замороженном и обезвоженном виде и разработан прототип кондуктометрического биосенсора на акриламид на основе такого биоселективирующего агента. Наиболее предпочтительными способами хранения иммобилизованных клеток было замораживание при температурах от –20 до –80°C, также возможно долговременное хранение во влажном состоянии при 4–25°C. Показано, что наиболее предпочтительными для биодетекции акриламида были клетки *A. faecalis* 2, иммобилизованные в структуре геля агарозы. Гель агарозы с иммобилизованными в его структуре бактериальными клетками обладал большей механической прочностью и устойчивостью при проведении последовательных циклов конверсии акриламида в акриловую кислоту по сравнению с гелем альгината бария. Механическая прочность геля альгината бария может быть усилена добавлением углеродных наноматериалов при иммобилизации клеток. Также перспективно выращивание биопленок на углеродных материалах, используемых для изготовления электродов. Биопленки *R. erythropolis* 11-2 на ТРГ способны конвертировать акриламид в акриловую кислоту более чем в 20 циклах реакции с сохранением не менее чем 50% амидазной активности.

Ключевые слова: биоселективирующий агент, биосенсор, акриламид, акриловая кислота, амидаза, актинобактерии, протеобактерии, иммобилизованные клетки, биопленки

DOI: 10.31857/S0555109924050115 EDN: QSURJQ

Акриламид (АА) – высокотоксичное вещество, широко используемое в промышленности, обладает высокой нейротоксичностью, тератогенностью, генотоксичностью и классифицируется Всемирной организацией здравоохранения как канцероген группы 2А (потенциальный канцероген). АА находит промышленное применение как мономер для производства акриловых полимеров и пластмасс, используемых в качестве связующего агента в цементных растворах и мембранах для очистки сточных вод в качестве флокулянта, загустителя в составах пестицидов, для предотвращения эрозии почвы, в переработке руды, нефтегазовой промышленности и производстве бумаги. Из-за высокой растворимости АА в воде (2150 г/л) он легко попадает в водные объекты и может накапливаться

в них в высоких концентрациях [1, 2]. Также АА образуется в результате реакции Майяра при термообработке (>120°C) богатой углеводами пищи, содержащей природную аминокислоту аспарагин и редуцирующие сахара. АА обнаруживается в стоках промышленных предприятий в концентрации выше 1 г/л [3]. Кроме того, одним из источников АА в водных объектах являются полиакриламидные флокулянты, которые используются при очистке природных и сточных вод от взвешенных частиц [4]. Содержание АА в воде нормируется, и оно не должно превышать 0.35 мг/л для водных объектов рыбохозяйственного значения и 0.0001 мг/л для питьевой воды. Определение АА в воде и пищевых продуктах может осуществляться различными способами, из которых наиболее распространенным

является хроматографический метод (ВЭЖХ и ГХ) с его модификациями (ГХ/МС, ГХ с электронозахватным детектором, ВЭЖХ/МС) [4–6]. Также предлагаются методы, основанные на измерении флуоресценции химически модифицированного АА [7]. Однако определение этого загрязняющего вещества высокоточными аналитическими методами требует специального оборудования, лабораторных условий, обученного персонала и затрат времени, тогда как в полевых условиях преимущество получают биосенсоры, обладающие высокой чувствительностью и способные к быстрому и специфичному ответу на присутствие токсиканта в среде.

Необходимость в быстром и селективном обнаружении АА, как в воде, так и в пищевых продуктах, послужила основой для проведения исследований в области биодетекции этого загрязняющего вещества. Был разработан ряд биосенсоров на АА. Такие биосенсоры основаны на различных принципах: на определении респираторной активности клеток *Brevibacterium* sp. [8], на снижении генерации тока при обратимой конверсии Fe(II)/Fe(III) иммобилизованным гемоглобином при образовании аддуктов этого белка с АА [9, 10], на взаимодействии с ДНК [11, 12], на конверсии АА в акриловую кислоту (АК) амидазой микроорганизмов [13, 14]. На основе интактных клеток бактерий, содержащих амидазу, был разработан потенциометрический биосенсор. Элементом биологического распознавания служили целые клетки *Pseudomonas aeruginosa*, внутриклеточная амидаза которых катализировала гидролиз АА с образованием ионов аммония (NH_4^+) и акриловой кислоты. Процесс преобразования сигнала осуществляли с помощью ионоселективного электрода аммония. Целые клетки иммобилизовали на дисках полимерных мембран из полиэфирсульфона, нейлона и поликарбоната и прикрепляли к поверхности селективного электрода [14].

Микробные биосенсоры – это аналитические устройства, в которых микроорганизмы, иммобилизованные на преобразователе сигнала, используются для обнаружения анализируемого вещества. Для закрепления микробных клеток на электродах могут быть применены различные методы иммобилизации, такие как адсорбция, ковалентная сшивка, инкапсуляция и включение в структуру гелей [15, 16]. Живые иммобилизованные клетки микроорганизмов являются перспективным биоселективным агентом, а способ иммобилизации микробных клеток в значительной степени определяет чувствительность и время жизни биосенсора [17, 18].

Микроорганизмы способны гидролизовать АА с помощью амидазы (КФ 3.5.1.4), которая наряду с нитрилгидратазой участвует в двухстадийной трансформации нитрилов [19]. Образующаяся в результате реакции АК изменяет электропроводность

раствора, что может быть определено кондуктометрически. Для разработки прототипа кондуктометрического биосенсора на АА необходимо выявить наиболее предпочтительный способ иммобилизации микробных клеток, обладающих амидазной активностью, который позволит долговременно и многократно проводить измерения, а также обеспечить сохранение активности при различных способах хранения биоселективирующего агента.

Цель работы – изучение операционной стабильности биокатализаторов на основе клеток актино- и протеобактерий, обладающих амидазной активностью, при различных способах иммобилизации клеток и долговременном хранении, а также определение электропроводности растворов акриламида с помощью биоселективирующего агента на основе иммобилизованных амидазосодержащих бактериальных клеток.

МЕТОДИКА

Объекты исследования и условия культивирования. Штаммы бактерий *Rhodococcus erythropolis* 4-1 и *R. erythropolis* 11-2 выделены из почвы и изучены в процессах гидролиза нитрилов [20]. *Alcaligenes faecalis* 2, обладающий амидазной активностью, выделен из активного ила биологических очистных сооружений г. Перми [21]. Бактериальные штаммы культивировали на минимальной солевой среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 3.7; NaCl – 0.5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.005; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, рН 7.2 ± 0.2 . В качестве источника углерода для родококков использовали глюкозу в концентрации 0.1%, источником азота служили ацетонитрил в концентрации 0.05%, 10 мМ хлористый аммоний и 2.5 мМ ацетамид. Для штамма *A. faecalis* 2 единственным источником углерода и азота был ацетамид в концентрации 0.1 М.

Культивирование проводили в течение 5–7 сут на шейкере со скоростью 120 об./мин при комнатной температуре. Биомассу концентрировали центрифугированием в течение 15 мин при 5000 g на центрифуге 5804 R (“Eppendorf”, Германия), отмывали однократно от среды культивирования стерильным 0.9%-ным хлоридом натрия, центрифугировали повторно, разводили в стерильном растворе хлорида натрия и использовали для иммобилизации.

Оптическую плотность (ОП) полученной клеточной суспензии измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-3 (АООТ “Загорский оптико-механический завод”, Россия) при $\lambda = 540$ нм в 0.5 см кюветах. Массу сухих клеток для каждого штамма определяли взвешиванием на аналитических весах предварительно высушенной биомассы из 1 мл суспензии.

Иммобилизация клеток в структуре агарозного геля. Раствор агарозы в концентрации 4% нагревали до температуры кипения. После охлаждения до 40°C смешивали раствор агарозы с суспензией клеток ($ОП_{540} = 1$) в соотношении 3 : 1 и 10 мл смеси помещали в чашку Петри. После застывания гель измельчали механически, размер гранул составлял 1–2 мм².

Иммобилизация бактериальных клеток в структуре геля альгината бария. Альгинат натрия растворяли в кипящей воде в концентрации 4% и автоклавировали при 121°C в течение 15 мин. После охлаждения до 40°C к раствору альгината натрия добавляли суспензию бактериальных клеток ($ОП_{540} = 1$) в соотношении 2 : 1 и тщательно перемешивали. Полученную смесь объемом 3 мл продавливали через шприц для подкожных инъекций в 10 мл холодного 0.1 М раствора $BaCl_2$. Гранулы диаметром 2 мм ресуспендировали в свежем $BaCl_2$ в течение 24 ч при температуре 4–6°C и отмывали дистиллированной водой.

Для приготовления геля альгината бария с углеродными нанотрубками альгинат натрия растворяли в кипящей воде до концентрации 4%, автоклавировали при 121°C в течение 15 мин. После охлаждения до 40°C 50 мл альгината натрия смешивали с 10 мг многостенных углеродных нанотрубок (Уральский научно-исследовательский институт композиционных материалов, г. Пермь, Россия), добавляли 25 мл бактериальной суспензии, иммобилизацию бактериальных клеток выполняли, как описано выше.

Иммобилизация клеток на терморасширенном графите (ТРГ). Иммобилизацию бактериальных клеток на ТРГ (ООО “Силур”, Россия) проводили двумя способами: адгезией из выращенной культуры и выращиванием биопленок на поверхности материала. Для адсорбции к 0.5 г порошкообразного носителя (фракция 1.3 мм) добавляли 10 мл клеточной суспензии, перемешивали в течение 1 ч на шейкере со скоростью 120 об./мин при комнатной температуре. Далее отфильтровывали несвязавшиеся клетки через бумажный фильтр (марки “белая лента” или “красная лента”) и промывали иммобилизованный биокатализатор 0.1 М калий-фосфатным буфером ($pH 7.2 \pm 0.2$). Для получения биопленок 0.5 г ТРГ автоклавировали в конических колбах объемом 200 мл в 100 мл минеральной среды 1 ч при 121°C, асептически добавляли 1.5 мл полученной биомассы ($ОП_{540} = 1$) в среду с графитом и соответствующие источники углерода и азота. Культивировали в течение 7 сут на шейкере со скоростью 120 об./мин при температуре 22–25°C. Выращенные биопленки отмывали однократно от среды культивирования 0.1 М калий-фосфатным буфером ($pH 7.2 \pm 0.2$) через бумажный фильтр (марки “белая лента” или “красная лента”).

Операционная стабильность иммобилизованного биокатализатора. Операционную стабильность биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 оценивали по количеству АК при последовательном проведении полной конверсии 100 мМ раствора АА, вносимого в каждом цикле в реакционную среду. Время полного цикла составляло 24 ч. Реакцию проводили в 20 мл 0.1 М калий-фосфатного буфера ($pH 7.2 \pm 0.2$) при температуре 22–25°C, останавливали, добавляя в 1 мл пробы 50 мкл концентрированной HCl, центрифугировали 10 мин при 14000 g и определяли концентрацию образовавшейся АК методом ВЭЖХ на хроматографе 1260 Infinity II (“Agilent”, Германия) с колонкой Synergi 4u Hydro–RP 80A (250 × 4.6 мм), элюент 25 мМ NaH_2PO_4 и 5% ацетонитрила ($pH 3.0$), скорость потока 0.500 мл/мин, 25°C, детекция при 210 нм. После проведения реакционного цикла биокатализаторы отфильтровывали через бумажный фильтр (марки “белая лента” или “красная лента”), отмывали 0.1 М калий-фосфатным буфером ($pH 7.2 \pm 0.2$) и использовали в следующем цикле.

Биокатализаторы на основе клеток *A. faecalis* 2, иммобилизованных в структуру геля альгината бария и агарозы, хранили 7 месяцев в разных условиях: 1) при комнатной температуре (22–25°C), гранулы предварительно высушены в термостате при 37°C; 2) при комнатной температуре (22–25°C) в буферном растворе; 3) в холодильной камере при 4–6°C в буферном растворе; 4) в морозильной камере при –20°C; 5) в морозильной камере при –80°C.

Операционную стабильность биокатализаторов после хранения оценивали по методу, приведенному выше.

Определение электропроводности раствора с иммобилизованными биокатализаторами. Электропроводность реакционной среды с биокатализаторами на основе иммобилизованных клеток *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2, включенных в структуру геля альгината бария и агарозы, оценивали по изменению проводимости раствора в результате трансформации 100 мМ АА в АК в 20 мл дистиллированной воды при 25°C. Измерение удельной электропроводности проводили на мультимониторе TDS/EC/Sal/Res SanXin SX650 (“SanXin Instrumentation”, Китай) сразу после добавления субстрата и через 10, 20, 30, 40, 50 и 60 мин.

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка результатов выполнена с помощью пакета программ Microsoft Excel 2013. Результаты представлены как среднее значение не менее чем трех независимых экспериментов \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m, n = 3$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение операционной стабильности иммобилизованного биокатализатора с амидазной активностью после длительного хранения в различных условиях. Биоселективирующим агентом биосенсора на загрязняющие вещества могут быть иммобилизованные клетки микроорганизмов, обладающие соответствующей ферментативной активностью. При этом важно, чтобы такой биоселективирующий агент функционировал достаточно долго, был способен к многократному использованию и длительно хранился без потери ферментативной активности.

В процессе разработки прототипа биосенсора на акриламид были протестированы такие способы иммобилизации бактериальных клеток, как включение в структуру гелей, адгезия и получение биопленок на нерастворимом носителе. Ранее была изучена иммобилизация клеток амидазосодержащих бактерий *A. faecalis* 2 и *R. erythropolis* 4-1 с использованием термотропных и ионотропных гелей [22]. Показано, что клетки *A. faecalis* 2, включенные в структуру гелей агарозы и альгината бария, сохраняли амидазную активность в процессах гидролиза АА с образованием АК. Ранее было установлено, что иммобилизованные на активированном и неактивированном хитозане клетки *R. erythropolis* 4-1 и *A. faecalis* 2 значительно теряли свою ферментативную активность по сравнению с нативными клетками [23]. На основании этого для проведения дальнейших экспериментов в качестве матрицы для иммобилизации бактериальных клеток были выбраны гели агарозы и альгината бария.

Исходная амидазная активность неиммобилизованных клеток *A. faecalis* 2 составила 0.6 мкмоль/мг/мин. Амидазная активность после иммобилизации клеток в альгинате бария и агарозе составила 0.59 и 0.14 мкмоль/мг/мин соответственно (сохранение 98 и 23% активности неиммобилизованных клеток).

Операционная стабильность биокатализатора на основе клеток *A. faecalis* 2, включенных в структуру гелей агарозы и альгината бария, была определена после 7 мес хранения в следующих условиях: при 22–25°C после высушивания при 37°C, при 22–25°C в буферном растворе, при 4–6°C в буферном растворе, при –20 и при –80°C. После хранения определили амидазную активность биокатализатора и оценили возможность многократного использования.

Амидазная активность высушенных биокатализаторов после хранения при комнатной температуре была ингибирована после второго цикла реакции. Установлено, что альгинатные гранулы после хранения при 22–25°C и 4–6°C со временем теряли механическую прочность и разрушались при проведении последовательных циклов реакции.

Агарозные гранулы с иммобилизованными клетками в этих условиях не подвергались разрушению. Было показано, что оптимальным способом хранения биокатализаторов является их замораживание. При этом способе хранения исходная активность биокатализатора не снижалась на протяжении 7 циклов реакции. Отмечено, что использование агарозы в качестве матрицы для иммобилизованных биокатализаторов было предпочтительным по сравнению с альгинатом бария (табл. 1).

Операционная стабильность биокатализатора на основе клеток *A. faecalis* 2 с амидазной активностью, включенных в структуру геля альгината бария с углеродными нанотрубками. Чтобы повысить механическую прочность альгината бария, используемого для иммобилизации клеток, предложено использовать углеродные нанотрубки для создания “каркаса” в структуре геля. Амидазная активность *A. faecalis* 2 после иммобилизации в структуре геля альгината бария с углеродными нанотрубками составила 0.218 мкмоль/мг/мин (68% от активности неиммобилизованных клеток). Установлено, что после 20 циклов сохранялось 64% активности биокатализатора от проявляемой в первом цикле (рис. 1). Эти показатели незначительно уступали таковым, полученным для биокатализатора на основе клеток того же штамма, иммобилизованных в структуре альгината бария без нанокремния [22]. Однако при длительной эксплуатации за счет увеличения механической прочности модифицированного носителя у такого биокатализатора (биоселективирующего агента) появлялись преимущества перед бактериальными клетками, иммобилизованными в структуре немодифицированного альгината бария.

Операционная стабильность амидазной активности биопленок *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 на ТРГ. ТРГ – это высокопористый материал, кристаллическая структура которого представляет собой термообработанный графит. Этот материал является перспективным для изготовления электродов, применяемых в различных целях, в том числе, в биосенсорах и микробных топливных элементах. Преимуществом ТРГ является пластичность и возможность формирования электродов различных размеров и форм, в том числе электродов толщиной не более 0.1 мм [24]. Клетки *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 были иммобилизованы на ТРГ двумя способами: адгезией из выращенной культуры и выращиванием биопленок на поверхности материала. Биокатализаторы, приготовленные на основе адгезированных клеток *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2, оказались менее стабильными по сравнению с биопленками. Амидазная активность адгезированных на ТРГ клеток бактерий сохранялась на протяжении 7-ми циклов (рис. 2). При этом наибольшее количество акриловой кислоты

Таблица 1. Количество АК (мг/мг сухих клеток), образованной иммобилизованными клетками *A. faecalis* 2 в процессе последовательных реакций трансформации 100 мМ АА после 7 мес хранения в различных условиях

Цикл	АК, мг/мг сухих клеток				
	22–25°C		4–6°C	–20°C	–80°C
	сухой	влажный			
Иммобилизованные клетки в структуре геля альгината бария					
1	0.32 ± 0.13	10.04 ± 1.38	12.55 ± 1.53	18.50 ± 0.001	18.23 ± 0.083
2	0.24 ± 0.07	8.63 ± 0.10	17.21 ± 0.28	19.80 ± 0.34	21.38 ± 0.91
3	0	8.76 ± 0.78	17.36 ± 0.013	18.0 ± 0.45	17.87 ± 0.34
4	0	6.91 ± 0.07	16.99 ± 1.76	14.96 ± 0.37	20.01 ± 0.40
5	0	5.43 ± 0.65	17.67 ± 0.78	16.42 ± 0.53	22.76 ± 1.003
6	0	5.64 ± 0.04	17.81 ± 1.31	16.40 ± 0.42	18.95 ± 0.87
7	0	6.88 ± 0.87	17.45 ± 0.35	13.99 ± 0.80	17.87 ± 0.15
Иммобилизованные клетки в структуре геля агарозы					
1	0	2.38 ± 0.37	7.66 ± 0.53	7.26 ± 0.11	11.20 ± 0.65
2	0.07 ± 0.014	2.14 ± 0.39	9.41 ± 0.86	7.41 ± 0.25	14.41 ± 1.39
3	0	1.93 ± 0.05	10.63 ± 0.77	10.14 ± 0.51	15.07 ± 1.73
4	0.07 ± 0.001	3.28 ± 0.036	8.65 ± 0.35	8.79 ± 0.30	10.91 ± 0.36
5	0	1.99 ± 0.12	6.88 ± 0.036	7.34 ± 0.48	10.13 ± 0.74
6	0.063 ± 0.003	1.94 ± 0.064	7.74 ± 0.45	7.93 ± 0.13	12.18 ± 1.16
7	0	2.27 ± 0.68	7.45 ± 0.30	6.12 ± 0.31	11.47 ± 0.84

Примечание: исходная амидазная активность неиммобилизованных клеток 0.6 мкмоль/мг/мин, амидазная активность сразу после иммобилизации в альгинате бария и агарозе 0.59 и 0.14 мкмоль/мг/мин соответственно. В одной пробе содержалось 3 мг клеток, иммобилизованных в структуре альгината бария, или 9 мг, иммобилизованных в агарозе.

синтезировали родококки – 4–7 мг на 0.5 г биокатализатора, наименьшее – *A. faecalis* 2 (1–2 мг). После проведения 7 циклов трансформации субстрата количество АК значительно снизилось, что может быть связано с десорбцией клеток и их вымыванием с носителя в результате многократного использования.

Определено количество АК, образующейся при проведении последовательных циклов трансформации АА биокатализаторами на основе биопленок *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2. Установлено, что амидазная активность биопленок *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 на ТРГ сохранялась на протяжении 30 проведенных циклов, а *R. erythropolis* 4-1 – 5 циклов. Показано, что наибольшее количество АК образовывалось при трансформации АА биокатализатором на основе биопленок *R. erythropolis* 11-2 на 0.5 г ТРГ – 100–120 мг (рис. 3), а биокатализатором на основе *A. faecalis* 2 – 80–100 мг (рис. 4). Наименьшее количество кислоты (1–3 мг) продуцировали биопленки *R. erythropolis* 4-1.

Таким образом, биопленки *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 на ТРГ могут применяться для различных биотехнологических целей, в том числе использоваться в качестве биоселектирующего агента биосенсора. Ранее был разработан гетерогенный биокатализатор, гидролизующий амиды до соответствующих карбоновых кислот, на основе адгезированных на углеродных адсорбентах клеток родококков, обладающих активностью амидазы [20]. Биопленки *A. faecalis* 2, выращенные на минеральных и углеродных волокнистых материалах, предложены для использования в биофильтрах для очистки сточных вод, содержащих высокие концентрации АА [25].

Адсорбция относится к простому и дешевому способу иммобилизации микробных клеток, однако для этого метода характерно постепенное вымывание клеток при многократном использовании. Адсорбция может быть применима тогда, когда нет необходимости в длительной эксплуатации иммобилизованного биокатализатора и слабого приклепления клеток к материалу носителя достаточно для проведения процесса. Адгезированные клетки

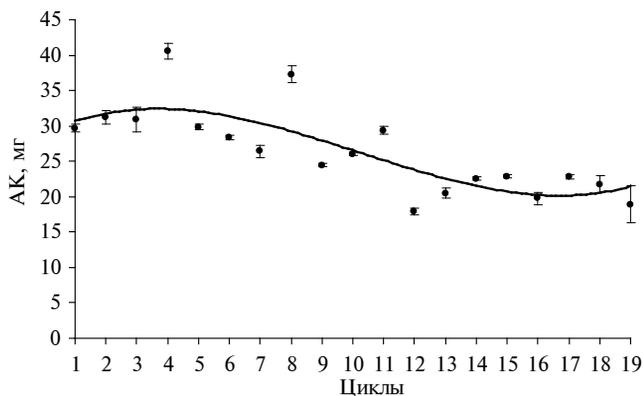


Рис. 1. Операционная стабильность биокатализатора на основе клеток *A. faecalis* 2, включенных в структуру геля альгината бария с углеродными нанотрубками.

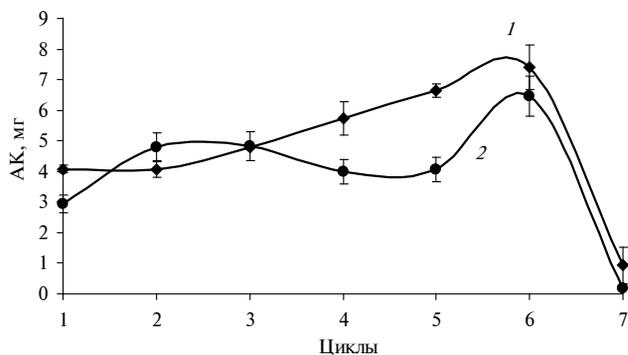


Рис. 2. Операционная стабильность биокатализаторов на основе клеток *R. erythropolis* 4-1 (1) и *R. erythropolis* 11-2 (2), адгезированных на ТРГ.

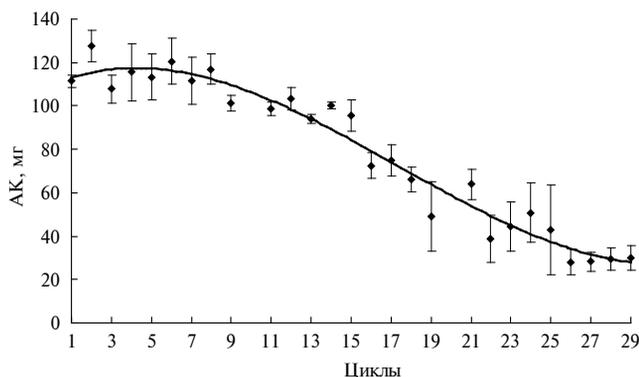


Рис. 3. Операционная стабильность биокатализатора на основе биопленок *R. erythropolis* 11-2, выращенных на ТРГ.

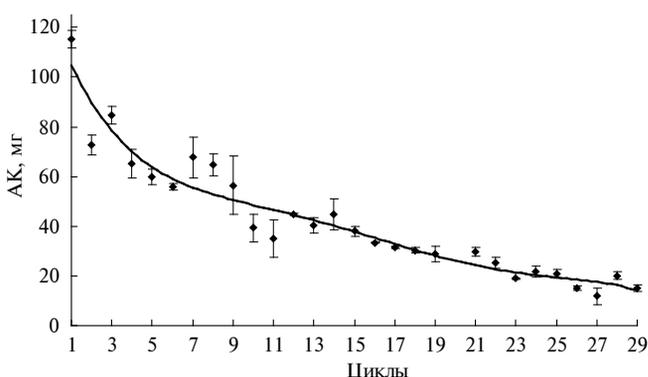


Рис. 4. Операционная стабильность биокатализатора на основе биопленок *A. faecalis* 2, выращенных на ТРГ.

прочнее закрепляются на поверхности носителя, чему способствуют внеклеточные полимерные вещества, выделяемые клеткой. Для биодетекции необходимо прочное прикрепление клеток к электроду, и в этом случае для получения биоселективного агента перспективно включение бактериальных клеток в структуру гелей или выращивание биопленок на материале электрода. Так, биосенсоры на основе бактериальных биопленок ранее были разработаны для определения биологического потребления кислорода [26, 27].

Разработка прототипа кондуктометрического биосенсора на акриламид. В работе предложен принцип биодетекции АА, основанный на определении электропроводности раствора при трансформации АА в АК иммобилизованными бактериальными клетками с амидазной активностью. Образующаяся в процессе биохимической реакции АК изменяла электропроводность раствора, тогда как АА не обладал таким свойством. Определенные показатели электропроводности растворов АК представлены на рис. 5. На основании аппроксимации экспериментальных точек с использованием программного

пакета Microsoft Excel 2010 получено уравнение (1), позволяющее определить концентрацию акриловой кислоты в растворе:

$$x = (y - 0.2743)/0.0068. \tag{1}$$

Определена удельная электропроводность водного раствора после трансформации АА в АК. Показано, что наибольшая разница в электропроводности раствора (410 мкСм/см за 1 ч) получена при трансформации АА клетками *A. faecalis* 2, иммобилизованными в структуре геля агарозы (табл. 2). Контролем являлись гранулы агарозы и альгината бария без бактериальных клеток с АА и иммобилизованные клетки без АА. Было установлено, что электропроводность раствора в последних двух вариантах не изменялась.

Изучена динамика изменения электропроводности при трансформации 5–100 мМ АА в АК биоселективным агентом на основе клеток *A. faecalis* 2, иммобилизованных в структуре геля агарозы. Установлено, что в течение 1 ч увеличение электропроводности для всех изученных

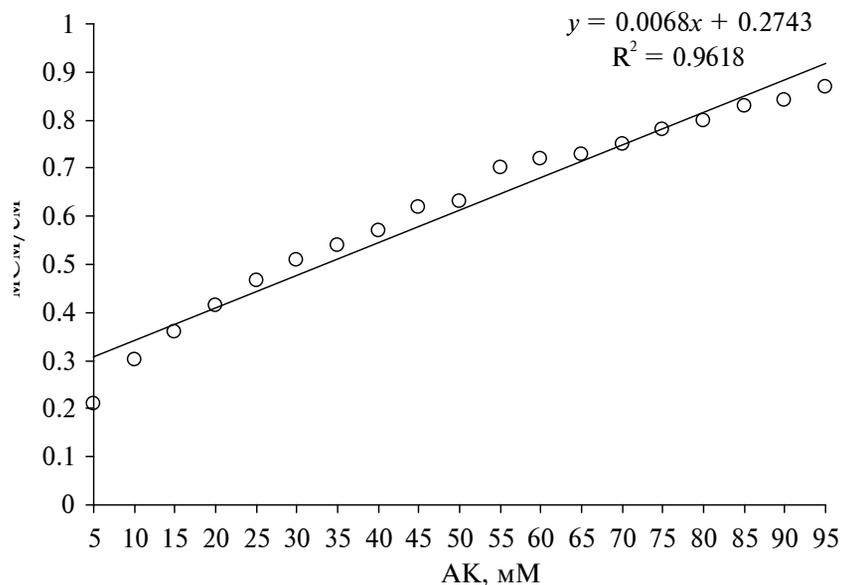


Рис. 5. Электропроводность растворов АК.

концентраций АА происходит линейно, предел определения составлял 10^{-3} М.

Иммобилизованные бактериальные клетки с амидазной активностью могут служить основой биоселектирующего агента при разработке прототипа кондуктометрического биосенсора. Такой анализатор, как кондуктометр, может быть использован для качественного определения АА в жидкостях. Он отличается простотой исполнения и незначительными затратами на изготовление и эксплуатацию. Биоселектирующим агентом могут являться бактериальные клетки с амидазной активностью, иммобилизованные в структуре гелей

немодифицированного или модифицированного углеродными нанотрубками альгината бария, агарозы, либо выращенные в виде биопленок на ТРГ. Наилучшими характеристиками (изменение электропроводности растворов АА при контакте с биоселектирующим агентом, высокая операционная стабильность, механическая прочность) обладали клетки *A. faecalis* 2, иммобилизованные в структуре геля агарозы. Биоселектирующий агент на их основе способен долговременно храниться как во влажном состоянии при температуре от 4 до 25°C, так и при замораживании от -20 до -80°C. Время полужизни такого биоселектирующего агента

Таблица 2. Удельная электропроводность (мкСм/см) водного раствора при трансформации АА иммобилизованными биокатализаторами

Время, мин	Удельная электропроводность, мкСм/см							
	<i>A. faecalis</i> 2, альгинат бария		<i>A. faecalis</i> 2, агароза		<i>R. erythropolis</i> 11-2, альгинат бария		<i>R. erythropolis</i> 4-1, альгинат бария	
	1	2	1	2	1	2	1	2
0	29	55	150	60	17	60	15	32
10	30.2	83	152	172	17.1	75	15.5	46
20	30.4	112	152	265	17.5	88	16,9	55
30	30	139	152	332	18	103	17.4	62
40	30.5	167	151	390	18	113	17.9	71
50	31	210	151	450	18.1	119	18	80
60	31.4	240	151	470	19	124	18	85

Примечание: 1 – контроль (иммобилизованные клетки без АА), 2 – иммобилизованные клетки с АА.

составляло не менее 500 ч. В отличие от описанного в работе Сильва с соавт. [14] способа иммобилизации, который заключался в нанесении и высушивании суспензии предварительно обработанных 5%-ным глутаровым альдегидом клеток *P. aeruginosa* на мембранных дисках из полиэфирсульфона, нейлона и поликарбоната, предложены такие способы иммобилизации, как включение в гель агарозы и альгината бария, а также выращивание биопленок на ТРГ, которые позволяют получить стабильный при эксплуатации и хранении биоселективирующий агент. Кроме того, предложено использовать более простого и дешевого портативного анализатора и бактерий, в отличие от *P. aeruginosa*, не проявляющих потенциальной патогенности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме “Биоразнообразие микроорганизмов в антропогенно-загрязненных экосистемах и функционально-генетические механизмы их адаптации к стрессовым условиям внешней среды”, регистрационный номер 124020500028-4.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bedade D.K., Dev M.J., Singhal R.S.* // *Biochem. Eng.* 2019. V. 149. 107245. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107245>
2. *Duda-Chodak A., Wajda Ł., Tarko T., Sroka P., Satora P.* // *Food Funct.* 2016. V. 7. № 3. P. 1282–1295. <https://doi.org/10.1039/c5fo01294e>
3. *Kusnin N., Syed M.A., Ahmad S.A.* // *JOBIMB.* 2015. V. 3. № 2. P. 6–12. <https://doi.org/10.54987/jobimb.v3i2.273>
4. *Лопушанская Е.М., Максакова И.Б., Крылов А.И.* // *Вода: Химия и Экология.* 2017. № 10. С. 3–10.
5. *Hu Q., Xu X., Fu Y., Li Y.* // *Food Control.* 2015. V. 56. P. 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.021>
6. *Куликовский А.В., Вострикова Н.Л., Кузнецова О.А., Семенова А.А., Иванкин А.Н.* // *Аналитика и контроль.* 2019. Т. 23. № 3. С. 393–400. <https://doi.org/10.15826/analitika.2019.23.3.002>
7. *Liu C., Luo F., Chen D., Qiu B., Tang X., Ke H., Chen X.* // *Talanta.* 2014. V. 123. P. 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.019>
8. *Ignatov O.V., Rogatcheva S.M., Kozulin S.V., Khorkina N.A.* // *Biosensors & Bioelectronics.* 1997. V. 12. № 2. P. 105–111.
9. *Batra B., Lata S., Sharma M., Pundir C.S.* // *Anal. Biochem.* 2013. V. 433. P. 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.026>
10. *Krajewska A., Radecki J., Radecka H.* // *Sensors.* 2008. V. 8. P. 5832–5844. <https://doi.org/10.3390/s8095832>
11. *Li D., Xu Y., Zhang L., Tong H.* // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2014. V. 9. P. 7217–7227. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)10961-8](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)10961-8)
12. *Huang S., Lu S., Huang C., Sheng J., Zhang L., Su W., Xiao Q.* // *Sensors and Actuators B.* 2016. V. 224. P. 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.10.008>
13. *Silva N., Gil D., Karmali A., Matos M.* // *BioCAT. Biotrans.* 2009. V. 27. № 2. P. 143–151. <https://doi.org/10.1080/10242420802604964>
14. *Silva N.A.F., Matos M.J., Karmali A., Rocha M.M.* // *Port. Electrochim. Acta.* 2011. V. 29. № 5. P. 361–373. <https://doi.org/10.4152/pea.201105361>
15. *Решетилев А.Н., Плеханова Ю.В.* Биосенсорные системы и топливные элементы на основе микробных клеток. В кн. *Иммобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы.* / Ред. Е.Н. Ефременко. М.: РИОР, 2018. 499 с.
16. *Плеханова Ю.В., Решетилев А.Н.* // *Журнал аналитической химии.* 2019. Т. 74. № 12. С. 883–901. <https://doi.org/10.1134/S0044450219120090>
17. *Michelini E., Roda A.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 402. P. 1785–1797. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5364-x>
18. *Решетилев А.Н.* // *Прикл. биохимия микробиология.* 2015. Т. 51. № 2. С. 268–274. <https://doi.org/10.7868/S055510991502018X>
19. *Sharma M., Sharma N.N., Bhalla T.C.* // *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2009. V. 8. P. 343–366. <https://doi.org/10.1007/s11157-009-9175-x>
20. *Максимова Ю.Г., Горбунова А.Н., Зорина А.С., Максимов А.Ю., Овечкина Г.В., Демаков В.А.* // *Прикл. биохимия микробиология.* 2015. Т. 51. № 1. С. 53–58. <https://doi.org/10.7868/S055510991406010519>
21. *Демаков В.А., Васильев Д.М., Максимова Ю.Г., Павлова Ю.А., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю.* // *Микробиология.* 2015. Т. 84. № 3. С. 369–378. <https://doi.org/10.7868/S0026365615030039>

22. Мочалова Е.М., Максимова Ю.Г. // Вестник Пермского университета. Серия биология. 2020. № 1. С. 26–32.
https://doi.org/10.17072/1994-9952-2020-1-26-32
23. Максимова Ю.Г., Якимова М.С., Максимов А.Ю. // Катализ в промышленности. 2019. Т. 19. № 1. С. 73–79.
https://doi.org/10.18412/1816-0387-2019-1-73-79
24. Китова А.Е., Колесов В.В., Решетилов А.Н. // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2018. № 1. С. 9–16.
25. Максимова Ю.Г., Васильев Д.М., Зорина А.С., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю. // Прикл. биохимия микробиология. 2018. Т. 54, № 2. С. 158–164.
https://doi.org/10.7868/S0555109918020058
26. Понаморева О.Н., Арлянов В.А., Алфёров В.А., Решетилов А.Н. // Прикл. биохимия микробиология. 2011. Т. 47. № 1. С. 5–15.
27. Перчиков Р.Н., Арлянов В.А. // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2023. № 1. С. 69–81.
https://doi.org/10.24412/2071-6176-2023-1-69-81

Development of a Bio-Selecting Agent Based on Immobilized Bacterial Cells with Amidase Activity for Bio-Detection of Acrylamide

E. M. Protasova^a and Yu. G. Maksimova^{a, b, *}

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

^b*Perm State National Research University, Perm, 614990 Russia*

*e-mail: yul_max@mail.ru

Actinobacteria cells *Rhodococcus erythropolis* 4-1 and *Rhodococcus erythropolis* 11-2 and Proteobacteria *Alcaligenes faecalis* 2, which have amidase activity, were immobilized by entrapping barium alginate and agarose into the gel structure, as well as by obtaining biofilms on thermally expanded graphite (TEG). The operational stability of such immobilized biocatalysts after storage in frozen and dehydrated form was determined, and a prototype of a conductometric acrylamide biosensor based on such a bioselective agent was developed. The most preferred method for storing immobilized cells was freezing at temperatures from –20 to –80°C; long-term storage is also possible wet at 4–25°C. It was shown that these cells were most preferable for the biodetection of acrylamide *A. faecalis* 2, immobilized in an agarose gel structure. An agarose gel with bacterial cells immobilized in its structure had greater mechanical strength and stability during successive cycles of conversion of acrylamide into acrylic acid compared to barium alginate gel. The mechanical strength of barium alginate gel can be enhanced by the addition of carbon nanomaterials during cell immobilization. Growing biofilms on carbon materials used for manufacturing electrodes is also promising. Biofilms of *R. erythropolis* 11-2 on TEG are capable of converting acrylamide into acrylic acid in more than 20 reaction cycles while maintaining at least 50% amidase activity.

Keywords: bioselecting agent, biosensor, acrylamide, acrylic acid, amidase, actinobacteria, proteobacteria, immobilized cells, biofilms

УДК 578.8

ИНДУЦИРУЕМЫЙ ЦЕЛЬНОКЛЕТОЧНЫЙ БИОСЕНСОР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ИОНОВ ФОРМИАТА

© 2024 г. А. А. Черенкова^{1, 2}, Т. В. Юзбашев³, О. Е. Мелькина^{1, *}

¹“Курчатовский институт” Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий,
Москва, 123098 Россия

²Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Москва, 125480 Россия

³Plant Sciences and the Bioeconomy, Rothamsted Research, West Common, Harpenden,
AL5 2JQ, Hertfordshire, UK

*e-mail: oligamelkina@gmail.com

Поступила в редакцию 27.03.2024 г.

После доработки 16.04.2024 г.

Принята к печати 26.04.2024 г.

Сконструировано 10 штаммов дрожжей *Yarrowia lipolytica*, в геном которых интегрированы промоторы генов формиатдегидрогеназ, расположенные перед геном-репортером *hrGFP*. Полученные штаммы могут выступать в качестве цельноклеточных биосенсоров для детекции ионов формиата в различных средах. На основании визуальной оценки флуоресценции биомассы было отобрано 3 наиболее перспективных варианта. Проведено измерение основных характеристик (пороговая чувствительность, амплитуда и время ответа) выбранных штаммов. В результате штамм В26 был признан наиболее подходящим по характеристикам для детекции ионов формиата. Для питательной среды подобран источник углерода, не снижающий активацию биосенсора. Показано, что в отличие от ионов формиата и формальдегида, метанол практически не активирует флуоресценцию биосенсора.

Ключевые слова: индуцируемый промотор, флуоресценция, формиат-ион, цельноклеточный биосенсор, *Yarrowia lipolytica*

DOI: 10.31857/S0555109924050128 EDN: QSTNOY

Муравьиная кислота (формиат-ион, HCOO^-) является простейшим карбоксильным соединением, метаболитом растений, насекомых и микроорганизмов. Она используется в качестве консерванта в кормах и пищевых продуктах, подкислителя в текстильной и кожевенной промышленности, реагента в химических производствах и в современных топливных элементах (<https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive.html?archive=All>) [1, 2]. Формиат образуется как побочный продукт в ряде технологических процессов; например, при ферментативной обработке лигноцеллюлозного сырья он ингибирует последующий гидролиз или процесс ферментации [3, 4]. Формиат натрия добавляют в антигололедные реагенты для снижения их коррозионной активности, что может привести к накоплению химических реагентов в глубинных слоях почвы придорожной полосы [5]. Также муравьиная кислота может служить индикатором интоксикации организма формальдегидом, метанолом или ацетоном [6]. Все это подчеркивает необходимость определения формиат-иона в различных средах и субстанциях.

Для детекции формиат-иона используют высокоэффективную жидкостную и газовую хроматографии. Однако данные методы обладают невысокой селективностью, их применение иногда затруднено сложной пробоподготовкой, потребностью в маломобильном дорогостоящем оборудовании и высококвалифицированном персонале [7–10]. Одна из альтернатив хроматографическим методам детекции – применение биосенсоров. Цельноклеточные индуцируемые биосенсоры – это клетки микроорганизмов с встроенными в геном двумя основными элементами: регуляторной системой (промоторно-операторная область) и транскрипционно-слитыми с ней генами-репортерами. В качестве генов-репортеров чаще всего используют *lacZ* (кодирует б-галактозидазу), *gfp* (кодирует зеленый флуоресцентный белок) и *luxCDABE* (кодируют люциферазу и редуктазу) [11, 12]. В норме (при отсутствии в среде индуктора) промотор перед генами-репортерами закрыт, и клетки биосенсора не отличаются от контрольного штамма. При появлении в среде индуктора происходит активация промотора с последующим синтезом белка-репортера.

В этом случае клетки биосенсора начинают флуоресцировать, люминесцировать и т.д.

Гены формиадегидрогеназ (КФ:1.2.2.1, 1.17.1.9, 1.17.1.10, 1.17.2.3, 1.17.5.3, 1.17.98.3, 1.17.98.4) обнаружены во многих метилотрофных и немилотрофных микроорганизмах: *Methylorubrum extorquens* [13], *Pseudomonas aeruginosa* [14], *Escherichia coli* [15], *Candida boidinii* [16], *Hansenula polymorpha* [17], *Saccharomyces cerevisiae* [18] и др. [19]. В немилотрофных дрожжах *Yarrowia lipolytica* идентифицировано 10 генов формиадегидрогеназ и соответствующих им 10 промоторных последовательностей [20]. На основе их регуляторных областей возможно конструирование специфических биосенсоров разной степени чувствительности.

Цель настоящей работы – создание индуцируемых, специфических биосенсоров (с геном-репортером *hrGFP*) для детекции ионов формиа.

МЕТОДИКА

Штаммы микроорганизмов и плазмиды. Для наработки плазмидной ДНК использовали штамм *Escherichia coli* TOP10 F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *nupG* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galE15* *galK16* *rpsL*(*StrR*) *endA1* λ⁻ [21].

В работе использовали штаммы дрожжей *Yarrowia lipolytica* Y-3178 W29 MatA (дикий тип) и Y-4973 W29 Δ*ku70* Δ*URA3* – оба получены из БРЦ ВКПМ.

Плазмидный вектор pProUA-mScarlet содержит ген устойчивости к ампициллину (Ap^r), ген зеленого флуоресцентного белка (*hrGFP*), который оптимизирован по кодонам для экспрессии в *Y. lipolytica*, а также селективный маркер для дрожжей *URA3* (ген синтеза урацила). Хелперная плазида pCasNA-IntC2 содержит ген белка Cas9, последовательность ДНК-мишени (sgRNA), гены устойчивости к ноурсетрицину (Nat^r) и ампициллину (Ap^r) [22].

Конструирование биосенсорных штаммов *Y. lipolytica*. Гены формиадегидрогеназ в геноме *Y. lipolytica* были идентифицированы по гомологии аминокислотных последовательностей с формиадегидрогеназой FDH1 *S. cerevisiae* (КФ:1.17.1.9) с помощью программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI, США). Согласно базе данных GenBank (NCBI, США) гены формиадегидрогеназ в геноме *Y. lipolytica* расположены в следующих локусах: YALI1_A12502g, YALI1_B26033g, YALI1_B29419g, YALI1_C10762g, YALI1_C20054g, YALI1_F18740g, YALI1_F21426g, YALI1_F36552g, YALI1_E17326g, YALI1_E19014g.

Штаммы *Y. lipolytica* для тестирования промоторов были сконструированы согласно мануалу *YaliCraft* с использованием Pro Module [22]. Для этого нуклеотидные последовательности длиной 800 п.н., расположенные перед генами

формиадегидрогеназ (*FDH*) дрожжей *Y. lipolytica*, были химически синтезированы компанией “Twist Bioscience” (США) и встроены в предоставленный компанией вектор pProUA-mScarlet непосредственно перед геном-репортером *hrGFP*. Полученные от “Twist Bioscience” плазмиды pProUA-pFDH_A1, pProUA-pFDH_B26, pProUA-pFDH_B29, pProUA-pFDH_C1, pProUA-pFDH_C2, pProUA-pFDH_F1, pProUA-pFDH_F2, pProUA-pFDH_F3, pProUA-pFDH_E17, pProUA-pFDH_E19 трансформировали в клетки *E. coli* TOP10 для наработки плазмидной ДНК. Трансформацию клеток и выделение плазмидной ДНК проводили согласно [21].

Наработанные плазмиды линеаризовали по сайтам рестрикции NotI и встраивали в хромосому С штамма Y-4973 *Y. lipolytica*. Трансформацию дрожжей проводили совместно с хелперной плазмидой pCasNA-IntC2 по ранее описанному протоколу [22]. Верификацию трансформантов проводили методом ПЦР. Сконструированные штаммы биосенсоров приведены в табл. 1.

Питательные среды и условия роста. Клетки *E. coli* TOP10 выращивали в бульоне Лурия–Бертани (LB) при 37°C в течение 2 ч до середины экспоненциальной фазы роста. Селекцию трансформированных штаммов TOP10 проводили на L-агаре с добавлением ампициллина (100 мкг/мл).

Для трансформации клетки *Y. lipolytica* Y-4973 выращивали при 30°C в течение 16–20 ч до экспоненциальной фазы роста на агаризованной среде YP (пептон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л) с добавлением глюкозы (1 об. %) в качестве источника углерода. Отбор трансформированных штаммов дрожжей проводили на агаризованной среде YNB (Yeast Nitrogen Base; M139, “HIMEDIA”, Индия, 6.75 г/л) с глюкозой (1 об. %) и ноурсетрицином (50 мкг/мл). Для дальнейших экспериментов штаммы *Y. lipolytica* выращивали на агаризованной или в жидкой среде YNB с добавлением источника углерода до требуемой концентрации.

Ферменты и химические вещества. Все химические препараты были аналитической чистоты. Ферменты для работы с ДНК получены от “Fermentas” (Литва). В качестве индукторов использовали формиа натрия, формальдегид и метанол фирмы “Sigma-Aldrich” (США). Все тест-растворы готовили непосредственно перед их использованием.

Измерение и визуальная оценка флуоресценции биосенсоров. Для визуальной оценки флуоресценции сконструированных биосенсоров ночную культуру дрожжевых штаммов разводили в стерильном физиологическом растворе до оптической плотности 0.8, после чего высевали по 5 мкл клеточных суспензий на чашки Петри с агаризованной YNB, содержащей 1% глюкозы и различной концентрации формиа натрия. Чашки инкубировали при 30°C в течение 24 ч. Активность биосенсоров оценивали по интенсивности зеленой флуоресценции

Таблица 1. Описание генотипов сконструированных штаммов биосенсоров

Промотор (локус гена <i>FDH</i>)	Плазмида для интеграции	Штамм <i>Y. lipolytica</i>	Обозначение штамма
YALI1_A12502g	pProUA-pFDH_A1	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_A1} -hrGFP-T _{LIP2}	A1
YALI1_B26033g	pProUA-pFDH_B26	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_B26} -hrGFP-T _{LIP2}	B26
YALI1_B29419g	pProUA-pFDH_B29	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_B29} -hrGFP-T _{LIP2}	B29
YALI1_C10762g	pProUA-pFDH_C1	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_C1} -hrGFP-T _{LIP2}	C1
YALI1_C20054g	pProUA-pFDH_C2	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_C2} -hrGFP-T _{LIP2}	C2
YALI1_F18740g	pProUA-pFDH_F1	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_F1} -hrGFP-T _{LIP2}	F1
YALI1_F21426g	pProUA-pFDH_F2	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_F2} -hrGFP-T _{LIP2}	F2
YALI1_F36552g	pProUA-pFDH_F3	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_F3} -hrGFP-T _{LIP2}	F3
YALI1_E17326g	pProUA-pFDH_E17	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_E17} -hrGFP-T _{LIP2}	E17
YALI1_E19014g	pProUA-pFDH_E19	W29 $\Delta ku70$ IntC2::P _{FDH_E19} -hrGFP-T _{LIP2}	E19

выросшей биомассы, просматривая чашки в синем светодиодном трансиллюминаторе DR46B “Clare Chemical Research” (США) с оранжевым фильтром.

Для измерения временной зависимости интенсивности флуоресценции биосенсоров от различных концентраций индуктора дрожжевые штаммы рассеивали на агаризованной YNB с 1 об./об. % глюкозы и выращивали при 30°C в течение 20 ч. Выросшую биомассу клеток разводили в жидкой YNB, содержащей необходимые концентрации источника углерода и индуктора, до оптической плотности 0.3. Контрольные пробы готовили аналогично, но без добавления индуктора. По 100 мкл приготовленных проб переносили в лунки планшета 655096 “Greiner Bio-One” (Германия), который затем помещали в мультимодальный ридер CLARIOstar Plus (“BMG Labtech”, Германия) и инкубировали при 30°C и 500 об./мин в течение 6 ч с измерением оптической плотности и флуоресценции каждые 15 мин согласно [22]. Относительную флуоресценцию для каждой лунки рассчитывали путем деления измеренных значений флуоресценции на значения оптической плотности (FLU/OD₆₀₀). Количество повторов составляло 5 лунок для каждой концентрации формиата натрия. Обработку данных проводили с использованием программного обеспечения MARS (“BMG Labtech”, Германия) и Excel (“Microsoft”, США).

На основании полученных данных были определены три основных параметра, характеризующих качество биосенсора: амплитуда ответа (АО), минимальное время ответа (t_m) и пороговая чувствительность. АО определяется по формуле: $AO = I_t - I_o / I_k - I_o$, где I_o – относительная

флуоресценция препарата в момент добавления индуктора ($t = 0$); I_k – относительная флуоресценция контрольного препарата в момент t ; I_t – относительная флуоресценция опытного препарата в момент t . Минимальное время ответа t_m определяется интервалом времени между моментом добавления индуктора и моментом фиксации люминометром достоверного усиления сигнала по сравнению с ($I_k - I_o$). Пороговая чувствительность определяется минимальной концентрацией индуктора, при которой АО равна примерно 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Качественная оценка флуоресценции сконструированных штаммов. На первом этапе активность сконструированных биосенсоров (табл. 1) оценивали качественно: по интенсивности зеленой флуоресценции биомассы штаммов, выращенных на агаризованной среде, содержащей 0 (контроль) и 10 мМ формиата натрия (рис. 1). Видно, что большая часть тестируемых штаммов не флуоресцирует, как и дикий штамм Y-3178 (wt), даже в присутствии формиата (рис. 1 б). Выраженное зеленое свечение демонстрируют 3 варианта штамма – A1, B26 и B29.

На основании качественной оценки штаммы A1, B26 и B29 были отобраны в качестве возможных биосенсоров для количественного измерения флуоресценции и сравнения их характеристик.

Количественная оценка флуоресценции штаммов A1, B26 и B29. На рис. 2 приведены кривые зависимости нормализованной по оптической плотности (OD) флуоресценции штаммов A1, B26 и B29 от времени инкубации в среде, содержащей

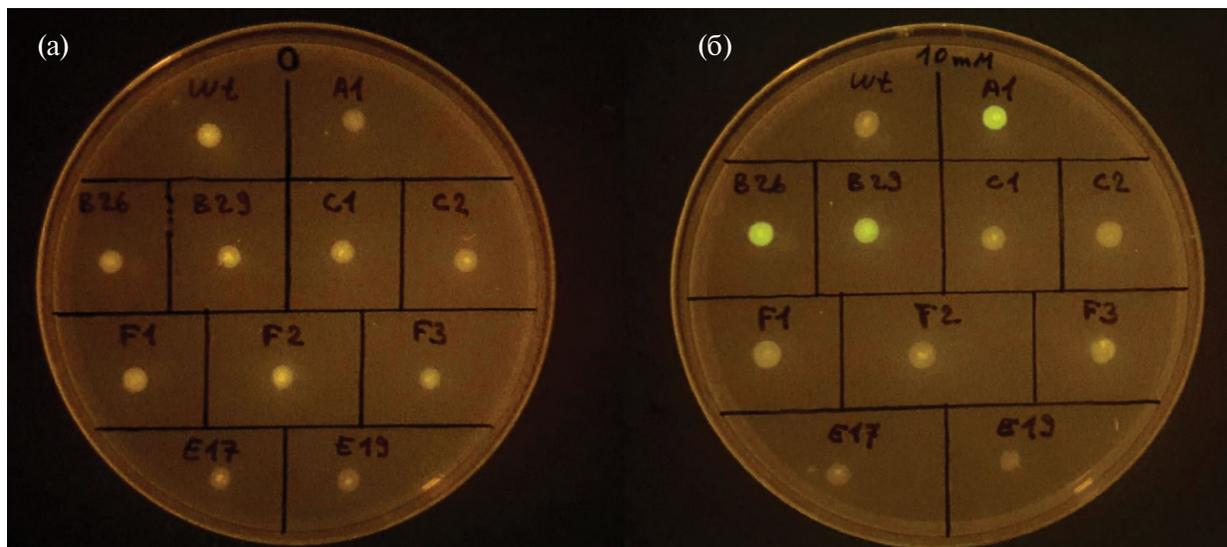


Рис. 1. Флуоресценция (hrGFP) биомассы штаммов дрожжей после выращивания в течение 20 ч на агаризованной среде YNB с 1% глюкозы без формиата (а) и с добавлением 10 мМ формиата натрия (б). Контрольный штамм Y-3178 W29 MatA (дикий тип) обозначен как wt.

различные концентрации формиата натрия. Дрожжевые штаммы рассеивали на агаризованной YNB с 1% глюкозы и выращивали при 30°C в течение 20 ч. Выросшую биомассу клеток разводили в жидкой YNB с 1% глюкозы до оптической плотности 0.3. Далее по 100 мкл клеточной суспензии переносили в лунки планшета 655096 “Greiner Bio-One” (Германия) и добавляли формиат натрия в заданных концентрациях в качестве индуктора. Затем планшет помещали в мультимодальный ридер CLARIOstar Plus (“BMG Labtech”, Германия) и инкубировали при 30°C и 500 об./мин в течение 6 ч с измерением оптической плотности и флуоресценции каждые 15 мин согласно [22].

Как видим, все три штамма (A1, B26 и B29) отвечали усилением флуоресценции при добавлении формиата натрия. Время ответа совпадало для всех трех штаммов и составляло 60–70 мин. Однако среди тестируемых штаммов наиболее низкую пороговую концентрацию в 10 мкМ показывал B26 (рис. 2б), в то время как пороговая концентрация для A1 составляла 100 мкМ (рис. 2а), а для B29 – 1 мМ (рис. 2в). Необходимо отметить более высокий фон флуоресценции у штамма B29 по сравнению с A1 и B26, что приводило к снижению амплитуды ответа. Таким образом, оптимальным штаммом для определения содержания в среде формиат-ионов являлся B26.

На рис. 3 приведены зависимости максимальной отдачи (АО) штаммов A1, B26 и B29 от различных концентраций формиата натрия. Согласно приведенному графику штамм B26 показывал наибольшую АО по всем проверенным концентрациям формиата натрия, поэтому штамм B26 был выбран

в качестве цельноклеточного биосенсора для детекции ионов формиата.

Подбор оптимального источника углерода. В предыдущих работах показано, что добавление глюкозы в качестве источника углерода может снижать индукцию промоторов генов формиатдегидрогеназ [23, 24]. В питательную среду в качестве источников углерода добавляли глюкозу (1%), сорбит (1.5%), маннит (1%) или цитрат (1%) и сравнивали уровень открытия промотора в штамме B26 при добавлении 10 мМ формиата. Результат эксперимента приведен на рис. 4.

Хуже всего на активацию биосенсора повлияло добавление в питательную среду цитрата. Добавление сорбита или маннита показало одинаковый уровень открытия промотора, при этом АО биосенсора в среде с маннитом или сорбитом действительно оказалась выше, чем в среде с глюкозой. В результате, в качестве источника углерода для питательной среды был выбран маннит, поскольку *Y. lipolytica* утилизировала его лучше сорбита.

Измерение основных характеристик и проверка специфичности биосенсора B26. Известно, что формиатдегидрогеназы дрожжей (как метилотрофных, так и немилотрофных) участвуют в процессе окисления формальдегида до углекислого газа [18]. Формальдегид, который образуется при окислении метанола или в других клеточных процессах, цитотоксичен, поэтому все организмы имеют пути детоксикации формальдегида [25]. Несмотря на то, что *Y. lipolytica* не относится к метилотрофным дрожжам, была проведена проверка возможной активации биосенсора B26 не только формальдегидом, но и метанолом.

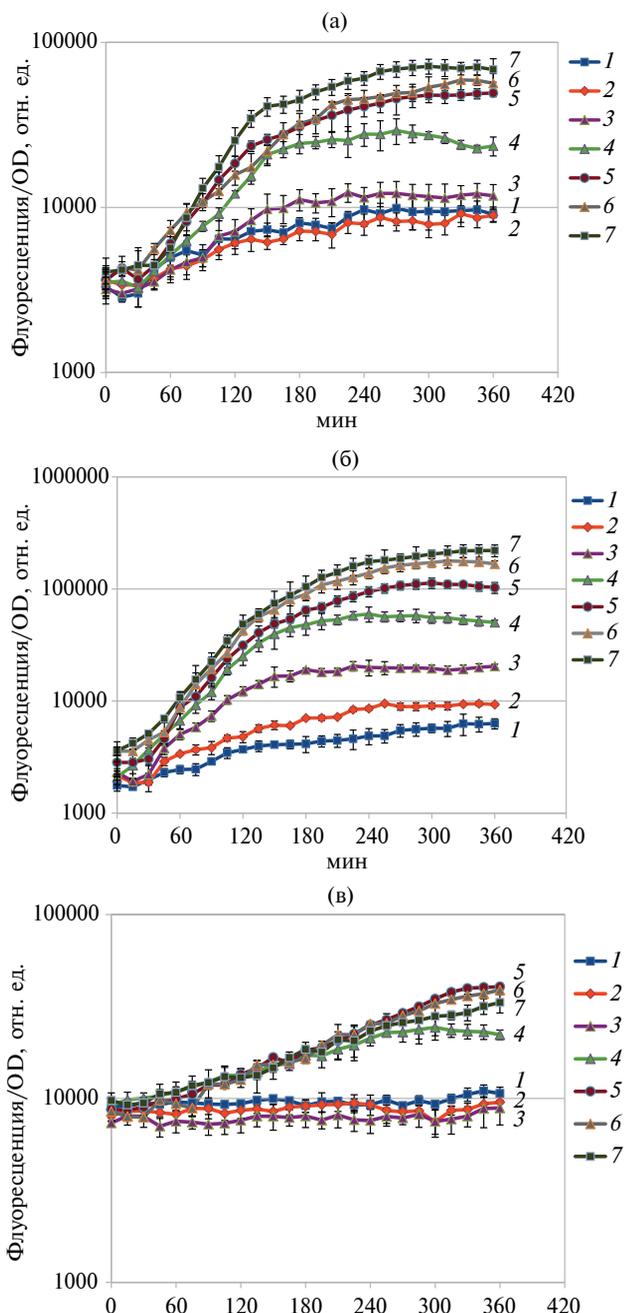


Рис. 2. Зависимость нормализованной по оптической плотности (OD) флуоресценции штаммов A1 (а), B26 (б) и B29 (в) от времени инкубации в среде с формиатом натрия: 1 – без формиата натрия, 2 – 10 мкМ, 3 – 100 мкМ, 4 – 1 мМ, 5 – 10 мМ, 6 – 90 мМ, 7 – 440 мМ.

На рис. 5 приведены кривые зависимости нормализованной по оптической плотности (OD) флуоресценции биосенсора B26 от времени инкубации в среде YNB с 1% маннита и различными концентрациями формиата натрия, формальдегида или метанола. Диапазон нормализованной флуоресценции клеток биосенсора при добавлении формиата натрия колебался от 10000 до

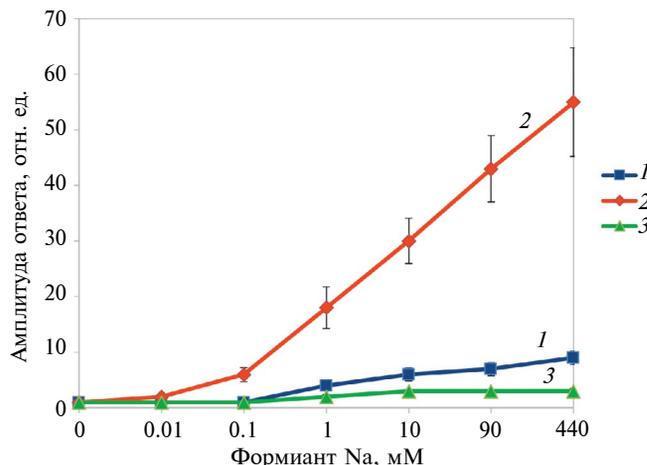


Рис. 3. Зависимость максимального ответа (АО) штаммов A1, B26 и B29 от различных концентраций формиата натрия. 1 – A1, 2 – B26, 3 – B29.

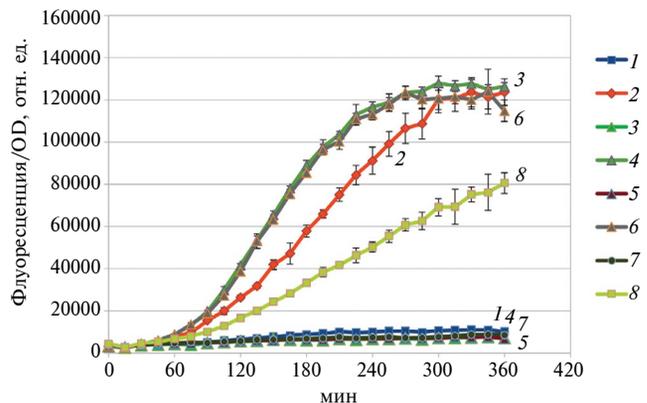


Рис. 4. Влияние источников углерода в питательной среде на активацию биосенсора B26 при добавлении 10 мМ формиата: 1 – глюкоза (1%), 2 – глюкоза и формиат, 3 – сорбит (1.5%), 4 – сорбит и формиат, 5 – маннит (1%), 6 – маннит и формиат, 7 – цитрат (1%), 8 – цитрат и формиат.

200000 в зависимости от концентрации индуктора в среде (рис. 5а). Пороговая концентрация составляла 10 мкМ, минимальное время ответа – 70 мин и зависело от концентрации индуктора. Следует отметить, что клетки биосенсора хорошо перенесли добавление высоких концентраций формиата натрия (до 6%).

Если в качестве индуктора использовался формальдегид (рис. 5б), то диапазон рабочих концентраций биосенсора резко сузился из-за высокой цитотоксичности индуктора. При этом, чувствительность биосенсора к формальдегиду была достаточно низкой, пороговая концентрация составляла 400 мкМ. Минимальное время ответа пролонгировано относительно времени ответа биосенсора на ионы формиата и составляло 1.5 ч.

При добавлении метанола активация биосенсора практически отсутствовала. Наблюдалось

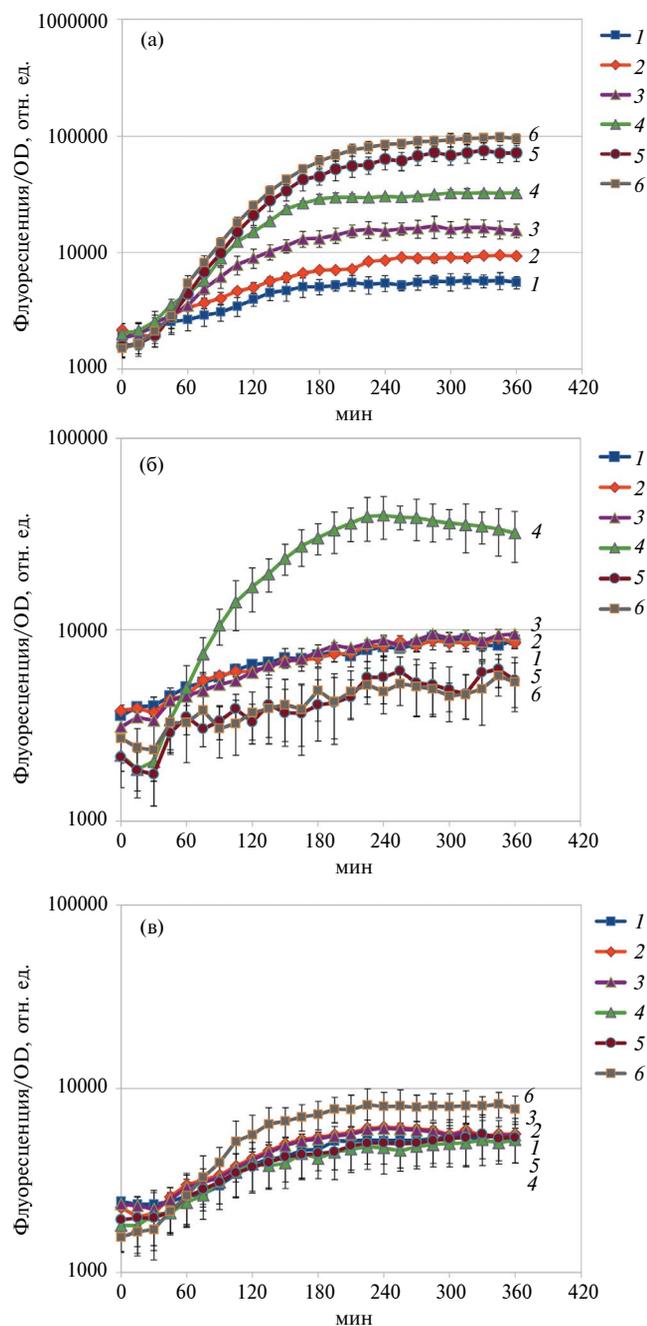


Рис. 5. Зависимость нормализованной по оптической плотности (OD) флуоресценции биосенсора В26 от времени инкубации в питательной среде, содержащей маннит (1%) и формиат натрия (а), формальдегид (б) или метанол (в) в концентрациях: 1 – без добавления, 2 – 10 мкМ, 3 – 100 мкМ, 4 – 1 мМ, 5 – 10 мМ, 6 – 100 мМ.

незначительное увеличение флуоресценции при концентрации метанола в среде 100 мМ (рис. 5в). Таким образом, применение такого биосенсора для детекции метанола не рекомендуется.

Расчитанные значения основных параметров биосенсора В26 представлены в табл. 2.

Таблица 2. Основные характеристики биосенсора В26

Индуктор	[С]*, М	AO _{max}	t _m , мин	Пороговая чувствительность
Формиат натрия	10 ⁻⁴	6 ± 1.8	70	10 ⁻⁵ М
	10 ⁻³	18 ± 4.0		
	10 ⁻²	30 ± 6.0		
	0.1	43 ± 9.8		
Формальдегид	10 ⁻³	6 ± 1.3	90	0.4·10 ⁻³ М
Метанол	0.1	2.3 ± 0.9	120	0.1 М

*[С] – концентрация индуктора, при которой АО максимальна.

* * *

В данной работе для определения формиат-иона (НСОО⁻) в различных средах сконструирован цельноклеточный биосенсор на основе дрожжей *Y. lipolytica* с пороговой чувствительностью 10 мкМ, что сопоставимо с хроматографическими методами анализа [26]. Предложенный в работе цельноклеточный биосенсор уступал по чувствительности другому типу биосенсоров, основанных на ферментативной активности формиатдегидрогеназ, функционирующих в свободном виде [6, 27, 28] или локализованных на поверхности микробных клеток [26]. Пороговая концентрация таких биосенсоров составляет 2–5 мкМ. Однако трудоемкость выделения чистого фермента, проверка его локализации, стабильности и активности, а также сложность детекции продуктов ферментативной реакции могут препятствовать широкому применению подобных систем. Разработанный биосенсор лишен этих недостатков и может применяться в любой лаборатории, оснащенной флуориметром. При концентрации ионов формиата выше 5 мМ возможна визуальная оценка активации биосенсора при его посеве на агаризованную питательную среду.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена в рамках Государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАР-ТОВ. Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Robles H.* Encyclopedia of Toxicology. 2nd Ed. / Ed. P. Wexler: Elsevier, 2005. P. 378–380.
2. *Cunha S., Rangaiah G.P., Hidajat K.* Computer Aided Chemical Engineering. / Eds. A. Espuña, M. Graells, L. Puigjaner: Elsevier, 2017. V. 40. P. 1093–1098.

3. Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tengborg C., Stenberg K., Zacchi G., Nilvebrant N.O. // *Enzyme Microb. Technol.* 1999. V. 24. P. 151–159.
4. Zaldivar J., Martinez A., Ingram L.O. // *Biotechnol. Bioeng.* 2000. V. 68. № 5. P. 524–530.
5. Кочетков А.В. // *Строительные материалы.* 2011. № 7. С. 44–46.
6. Triebig G., Schaller K.H. // *Clin Chim Acta.* 1980. V. 108. № 3. P. 355–360.
7. Ohmori S., Sumii I., Toyonaga Y., Nakata K., Kawase M. // *J. Chromatogr.* 1988. V. 426. № 1. P. 15–24.
8. Kim, J.K., Shiraishi T., Fukusaki E.I., Kobayashi A. // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 986. № 2. P. 313–317.
9. Abolin C., McRae J.D., Tozer T.N., Takki S. // *Biochem. Med.* 1980. V. 23. № 2. P. 209–218.
10. Campos A.F., Cassella R.J. // *Food Chem.* 2018. V. 269. P. 252–257.
11. Cheng Vollmer A., Van Dyk T.K. // *Adv. Microb. Physiol.* 2004. V. 49. P. 131–174.
12. Bazhenov S.V., Novoyatlova U.S., Scheglova E.S., Prazdnova E.V., Mazanko M.S., Kessenikh A.G. et al. // *Biosens. Bioelectron.* X. 2023. V. 13. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2023.100323>.
13. Chistoserdova L., Laukel M., Portais J.C., Vorholt J.A., Lidstrom M.E. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 1. P. 22–28.
14. Godfrey C., Coddington A., Greenwood C., Thomson A.J., Gadsby P.M. // *Biochem. J.* 1987. V. 243. № 1. P. 225–233.
15. Benoit S., Abaibou H., Mandrand-Berthelot M.A. // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. № 24. P. 6625–6634.
16. Sakai Y., Murdanoto A.P., Konishi T., Iwamatsu A., Kato N. // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. № 14. P. 4480–4485.
17. Патент ЕС. 1988. № 0299108A1.
18. Overkamp K.M., Kötter P., van der Hoek R., Schoondermark-Stolk S., Luttk M.A., van Dijken J.P., Pronk J.T. // *Yeast.* 2002. V. 19. № 6. P. 509–520.
19. Kobayashi A., Taketa M., Sowa K., Kano K., Higuchi Y., Ogata H. // *IUCrJ.* 2023. V. 10. P. 544–554.
20. Патент Великобритании, Германия. 2022. № WO2022008929A1.
21. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Москва: Мир, 1984. 480 с.
22. Yuzbashev T.V., Yuzbasheva E.Y., Melkina O.E., Patel D., Bubnov D., Dietz H., Ledesma-Amaro R. // *Commun. Biol.* 2023. V. 6. № 1. P. 858.
23. Yurimoto H., Komeda T., Lim C.R., Nakagawa T., Kondo K., Kato N., Sakai Y. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1493. P. 56–63.
24. Hartner F.S., Glieder A. // *Microb. Cell Fact.* 2006. V. 5. P. 39.
25. Chen N.H., Djoko K.Y., Veyrier F.J., McEwan A.G. // *Front Microbiol.* 2016. V. 7. P. 257.
26. Liu A., Feng R., Liang B. // *Enzyme Microb. Technol.* 2016. V. 91. P. 59–65.
27. Buttery J.E., Chamberlain B.R. // *J. Anal. Toxicol.* 1988. V. 12. № 5. P. 292–294.
28. Ogata M., Iwamoto T. // *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1990. V. 62. № 3. P. 227–232.

Inducible Whole-Cell Biosensor for Detection of Formate Ions

A. A. Cherenkova^{a, b}, T. V. Yuzbashev^c, and O. E. Melkina^{a, *}

^aComplex of NBICS Technologies, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123098 Russia

^bMendeleev University of Chemical Technology, Moscow, 125480 Russia

^cPlant Sciences and the Bioeconomy, Rothamsted Research, West Common, Harpenden, AL5 2JQ, Hertfordshire, UK

*e-mail: oligamelkina@gmail.com

Ten strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* were constructed, the genomes of which contain *hrGFP* gene under the regulation of the formate dehydrogenase promoters. The resulting strains can act as whole-cell biosensors for the detection of formate ions in various mediums. By visual assessment of biomass fluorescence, we selected the three most promising yeast strains. The main biosensor characteristics (threshold sensitivity, amplitude and response time) of the selected strains were measured. As a result, in terms of characteristics, the B26 strain was recognized as the most suitable for the detection of formate ions. A carbon source for the nutrient medium that does not reduce the activation of the biosensor was selected. Furthermore, we showed that unlike formate and formaldehyde, methanol practically does not induce the biosensor fluorescence response.

Keywords: inducible promoter, fluorescence, formate ion, whole-cell biosensor, *Yarrowia lipolytica*

УДК 577.151.45

МЕТОД *in vivo* БИОТИНИЛИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ

© 2024 г. В. Н. Никитин¹, Ю. А. Меркульева¹, Д. Н. Щербаков^{1, 2, *}

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

²Алтайский государственный университет, Барнаул, 656049 Россия

*e-mail: dnshcherbakov@gmail.com

Поступила в редакцию 27.10.2024 г.

После доработки 09.03.2024 г.

Принята к публикации 30.04.2024 г.

В работе реализован метод специфического *in vivo* биотинилирования рекомбинантных белков М1 и В7 вируса натуральной оспы при биосинтезе в клетках СНО-К1. Для этого проводили коэкспрессию биотин-лигазы BigA и целевых генов, кодирующих эктодомены белков М1 и В7 с С-концевым avi-tag в клетках СНО-К1 в присутствии биотина в культуральной среде. Оптимальная концентрация биотина для экспрессии белков М1 и В7 составила 125 мкМ. Продукция биотинилированных рекомбинантных белков была осложнена низким выходом. Для повышения продукции целевых белков в культуральную среду добавляли низкомолекулярные энхансеры: лития ацетат, натрия вальпроат и кофеин. Энхансеры увеличивали продукцию целевого белка в 1.3–4.9 раза и не оказывали негативного влияния на выход биотинилированного белка. Наиболее высокий выход биотинилированного белка достигался при одновременном добавлении лития ацетата в концентрации 10 мМ и натрия вальпроата 2.5 мМ. Полученные таким образом белки могут быть использованы для сортировки специфических В-лимфоцитов.

Ключевые слова: рекомбинантные вирусные белки, биотинилирование, биотин-лигаза BigA, пептид акцептор биотина

DOI: 10.31857/S0555109924050132 EDN: QRSAL

Взаимодействие пар молекул, характеризующихся высокой аффинностью и специфичностью, давно и прочно вошли в практику методов изучения молекулярных механизмов биологических процессов. При помощи подобных пар удается изучать белок-белковые взаимодействия, внутриклеточную локализацию белков, а также механизмы специфичного транспорта белков [1–4].

Один из наиболее популярных подходов базируется на взаимодействии пары биотин – (стрепт) авидин. При этом как правило биотин связан с интересующим белком, а (стрепт)авидин выполняет роль носителя метки или иммобилизован на сорбенте.

В настоящее время разработано множество вариаций биотинилирования белков, основанных на химической и ферментативной реакциях легирования молекулы биотина с целевым белком. Химическое биотинилирование часто приводит к образованию гетерогенных продуктов, активность которых может быть ингибирована, или сделать недоступными области связывания белок-лиганд.

Химические подходы требуют высокой чистоты целевого белка, а также проведение дополнительной стадии очистки из реакционной смеси, что сопровождается потерей белка на каждой стадии и накладывает дополнительные временные ограничения.

Ферментативные методы подразумевают сайт-специфическое биотинилирование белковых молекул, в состав которых включают последовательности различных пептидов, распознаваемых биотин-лигазами. К настоящему времени накопилась информация о большом количестве вариантов фермента биотинлигазы [5] и пептидных последовательностей акцепторов биотина, называемых AviTag [6]. Одним из наиболее широко используемых, является пептид длиной 15 аминокислотных остатков (-GLNDIFEAQKIEWNE-). Данная последовательность представляет собой специфическую метку, распознаваемую биотин-лигазой BigA *E. coli*, которая присоединяет одну молекулу биотина к одному остатку лизина. Полученный рекомбинантный белок подвергается биотинилированию *in vitro* с использованием очищенного фермента, или *in vivo* в клетках *E. coli*. Реже, такой подход

используют для клеток млекопитающих, в этом случае проводят котрансфекцию плазмидами, кодирующими оба белка, или одной плазмидой в которой находится сразу оба гена [7]. Биотинилирование *in vitro* также требует введение дополнительной стадии диализа и хроматографической очистки целевого белка, что сопровождается потерей белка на каждой операции и временными потерями. Напротив, метод *in vivo* позволяет получить биотинилированные белки непосредственно после хроматографической очистки из культуральной среды.

Практика получения белков, указывает на взаимосвязь посттрансляционных модификаций, которые может обеспечить выбранная система экспрессии, его фолдингом и функциональной активностью [8]. Преобладающая, сегодня, практика использования клеточной линии CHO-K1, известные клеточные механизмы посттрансляционной модификации, а также накопленные знания по модификации и условиям культивирования, делают данную линию удобным инструментом для наработки белков [9, 10]. Получение некоторых белков в клетках млекопитающих сталкивается с рядом сложностей, связанных с низким выходом, для решения которых известны различные генно-инженерные и селекционные подходы [11, 12]. Особые сложности вызывают белки вирусного происхождения, уровень продукции которых, в неоптимизированной системе не превышал 0.5–1.5 мг/л [13], для решения которых часто прибегают к использованию других систем экспрессии [14, 15]. Подобные белки имеют свойство угнетать метаболическую активность клеток, или распознаются цитоплазматическими сенсорами как чужеродные элементы и подвергаются деградации [16, 17]. Как показано, в случае получения гликопротеина NS1 Zika, в клетках НЕК, не превышают 10 мг/л в оптимизированной системе продукции с добавлением энхансеров, при этом продукция была увеличена в 39 раз [8]. Другим, не менее эффективным способом повышения продукции целевого белка является добавление в культуральную среду веществ-энхансеров, которые, например, останавливают клеточный цикл на стадиях G2 или G1 [18], делают ДНК более доступной [19, 20] повышают проницаемость клеточных мембран, хотя для некоторых энхансеров

механизмы действия не установлены, они длительное время используются, как стратегия повышения продукции белков [18]. С этой целью успешно применяются следующие соединения: кофеин, ацетат лития, вальпроат натрия, цитрат железа и бутират натрия и другие [21, 22].

Цель работы – разработка метода получения биотинилированных рекомбинантных вирусных белков в клетках линии CHO-K1, а также исследование влияния энхансеров ацетата лития, вольпрата натрия, кофеина и их комбинаций на продукцию биотинилированных белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн плазмидных векторов. Векторы для получения *in vivo* биотинилированных рекомбинантных белков конструировали с использованием оригинальных векторов экспрессии pVEAL [23] и pVEAL2 [24], использующих систему интеграции транспозазы Sleeping Beauty. Плазмидные векторы pVEAL2-M1 и pVEAL2-B7 получали встройкой фрагментов генов, кодирующих эктодомены белков M1 и B7 натуральной оспы по сайтам рестрикции *Asu*NI и *Sa*I с использованием соответствующих ферментов (“Сибэнзайм”, Россия). Обратные праймеры содержали последовательности, кодирующие *his*-tag и *avi*-tag для введения в С-конец генов M1R и B7R. Плазмидный вектор pVEAL-BirA получали путем встройки нуклеотидной последовательности BirA по сайтам рестрикции *Asu*NI и *Zsp*2I с использованием соответствующих ферментов (“Сибэнзайм”, Россия). Нуклеотидные последовательности целевых генов и праймеров для амплификации генов M1R и B7R были синтезированы в коммерческой научно-производственной организации (“ДНК-Синтез”, Россия). Праймеры (табл. 1) были рассчитаны с помощью программы SnapGene 3.2.1.

Нуклеотидные последовательности полученных плазмидных конструкций анализировали при помощи метода секвенирования по Сенгеру.

Получение стабильных клеточных линий CHO-BirA-M1 и CHO-BirA-B7. Стабильные продуценты рекомбинантных вирусных белков M1 и B7 получали путем трансфекции клеток

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры использованные для амплификации генов M1 и B7 натуральной оспы

Ген	Праймер	Последовательность олигонуклеотидного праймера (5'–3')
M1	M1R_Afe_F	gctggccgcaagcatacagacgacgggtga
	A30L_His_R	CCGTGGTGATGGTGGTGATGctgaactcctgtaccagcaact
B7	B7R_Afe_F	gctggccacatgtactgtaccactatgaataac
	B7R_Avi_R	tttttGCGGCCGCattaTTCATGCCACTCGATCTTCTGAGCCTCGAAGATGTCGTT CAGGCCGTGGTGATGGTGGTGATGatgataagttgcttctaacgattctattct

целевыми плазмидами с использованием реагента Lipofectamine 3000 (“Invitrogen”, США) [25]. Клеточную линию СНО-К1 выращивали до 90% конfluence в среде DMEM F12 (“Invitrogen”, США) содержащей 10% FBS (“Invitrogen”, США), затем среду меняли на бессывороточную и котрансфицировали плазмидными конструкциями pVEAL2-M1 и pVEAL-BirA или pVEAL2-B7 и pVEAL-BirA, для интеграции экспрессионных каскад векторов в геном клеток также добавляли плазмиду pSB100X, кодирующую транспозазу Sleeping Beauty в соотношении 1/12 по массе. Заменяли среду на свежую с 2% FBS (“Invitrogen”, США) и проводили селекцию с использованием двух антибиотиков zeocin и puromycin (“Thermo Fisher Scientific”, США). Для контроля селекции использовали клеточную линию, не содержащую вставки.

Оценка жизнеспособности клеток при культивировании в присутствии биотина в МТТ-тесте. Оценку токсической концентрации биотина устанавливали методом МТТ-теста [26]. В каждую лунку плоского 96-луночного планшета вносили клетки СНО-BirA и СНО-К1 и инкубировали до 90% конfluence в полной ростовой среде DMEM/F-12 с 10% FBS. Затем среду меняли на свежую содержащую 2% FBS. К клеткам добавляли раствор биотина в различных концентрациях от 2 до 0.015 мМ в ДМСО и инкубировали 3 сут. В контрольные лунки добавляли ДМСО. Среду отбирали, лунки промывали раствором PBS, добавляли по 100 мкл раствора МТТ (“Диаэм”, Россия) с концентрацией 1 мг/мл и инкубировали 2.5 ч при 37°C. По истечении этого времени раствор МТТ заменяли раствором ДМСО и инкубировали клетки при комнатной температуре. В каждой лунке измеряли оптическую плотность (ОП) при 490 нм (с учетом фонового поглощения на 655 нм). МТТ-тест проводили в трех повторностях. ОП каждого образца измеряли 3 раза.

Культивирование клеток продуцентов. Нарработку целевого белка проводили при адгезионном культивировании, во всех случаях клетки-продуценты культивировали 5 сут [27]. Клеточные линии СНО-BirA-M1 и СНО-BirA-B7 подращивали до 90% конfluence в среде DMEM F12 с содержанием 10% FBS. Затем среду заменяли на поддерживающую, содержащую 2% FBS, и вносили различные концентрации биотина и низкомолекулярных энхансеров продукции. Для оптимизации условий получения биотинилированных белков, клеточные линии рассевали в 24-луночные планшеты и культивировали в присутствии биотина в концентрации от 0.031 до 2 мкМ. Для оценки влияния энхансеров на продукцию белка и степень биотинилирования клеточные линии культивировали в 24-луночных планшетах в присутствии единичных энхансеров ацетата лития, вальпроата натрия и кофеина или их комбинации. Нарработку белка проводили в T25 культуральных матрасах. Собранную культуральную среду диализовали против базового

буфера содержащего 0.2 М Na_2HPO_4 , 0.5 М NaCl и 0.02 М имидазола, добавляли консервант NaN_3 и хранили при 4°C до следующей стадии очистки.

Хроматографическая очистка белков. Целевой белок очищали методом металл-аффинной хроматографии (ИМАС) на сорбенте Ni^{2+} -NTA HisTrap FF (“GE Healthcare”, США). Образец наносили на колонку, уравновешенную базовым буфером, промывали и элюировали в градиенте концентрации имидазола 20 мМ – 300 мМ. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли, диализовали против 0.1%-ного PBS и хранили при 4°C.

Для очистки биотинилированного белка использовали сорбент стрептавидин-сефароза HP (“GE Healthcare”, США). К 200 мкл смолы добавляли к 500 мкл очищенного лизата и помещали в шейкер на 4 ч при 4°C. После инкубации сорбент трижды промывали 0.1%-ным PBS, после чего смолу осаждали при 2000 g в течение 5 мин. Этап элюирования проводился в течение ночи добавлением 300 мкл буфера, содержащего 5 мМ биотина, после чего раствор диализовали против 0.1%-ного PBS.

Концентрацию очищенных белков измеряли спектрофотометрическим методом с использованием коэффициентов молярной экстинкции 45380 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для B7, 12950 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для M1 при 280 нм, и 338357 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для B7, 620890 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для M1 это все в индексе должно быть при 214 нм. Введение биотина в белковые молекулы не вносит значительного вклада в кривую поглощения на длине волны 280 нм [28]. Измерения спектров поглощения каждого образца проводили в 3 повторностях.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Относительное содержание белков B7 и M1 определяли методом сэндвич-ИФА с использованием рекомбинантных scFv моноклональных антител 283 и M12B9 [29, 30]. Антитела вносили в лунки 96-луночных планшетов и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, и блокировали раствором 1%-ного казеина в PBS. Затем вносили последовательные разведения исследуемых белков и инкубировали 1 ч при 37°C. Далее, добавляли мышинные моноклональные антитела специфичные в отношении 6×His конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) (ab1187, “Abcam”, США). Анализ биотинилированных рекомбинантных белков проводили по аналогичной схеме с внесением, на последней стадии стрептавидин-HRP (“Invitrogen”, США). Между каждым этапом планшеты трижды промывали раствором 0.1%-ного Tween-20 в PBS. Использование конъюгатов проводили в соответствии с инструкциями производителя. Реакцию проявляли с помощью реагента 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (“Sigma”, США) и детектировали сигнал на длине волны 450 нм. Измерения оптической плотности каждого образца проводили в 3 повторностях.

Электрофоретический анализ и вестерн-блот. Образцы анализировали в 15%-ном ПААГ с Na-ДДС

в восстанавливающих условиях в трис-глициновом буфере. После электрофореза гель переносили на мембрану PVDF ("Millipore", США). Мембрану блокировали 5%-ным казеином в растворе PBS, промывали PBST и инкубировали с соответствующими антителами. Наличие белка, определяли с помощью вестерн-блот анализа с использованием мышиных anti-6×His антител конъюгированных с щелочной фосфатазой AP при окрашивании мембраны с помощью раствора BCIP(5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат)/NBT (нитротетразолий синий). Относительное количество биотинилированного белка определяли с использованием одновалентного стрептавидина конъюгированного с HRP ("Invitrogen", США) при окрашивании хемилюминисцентным субстратом ECL. Детекцию сигнала ECL проводили с помощью гель-документирующей системы iBright ("Thermo Fisher Scientific", США) в режиме ChemiBlot.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение продуцентов белков M1 и B7. (табл. 2). Для получения стабильных продуцентов была выбрана система интеграции в геном с использованием транспозона Sleeping Beauty. Плазмидные векторы pVEAL-BirA, pVEAL2-M1 и pVEAL2-B7 сконструированы по общей схеме для векторов, интегрируемых транспозазой Sleeping Beauty и содержат каскету экспрессии, ограниченную плечами интеграции IR/DR [31]. Касета экспрессии содержит энхансер и промотор CMV, внутренний сайт посадки рибосомы IRES, целевой ген и ген устойчивости к антибиотику Zeocin (pVEAL) или Puromicine (pVEAL2) (рис. 1). Так как нашей целью является наработка секретируемых белков, было необходимо направить трансляцию всех белков в один компартмент [32]. Для колокализации биотин-лигазы и целевых белков в N-конец гена BirA была введена последовательность, кодирующая сигнальный лидерный пептид

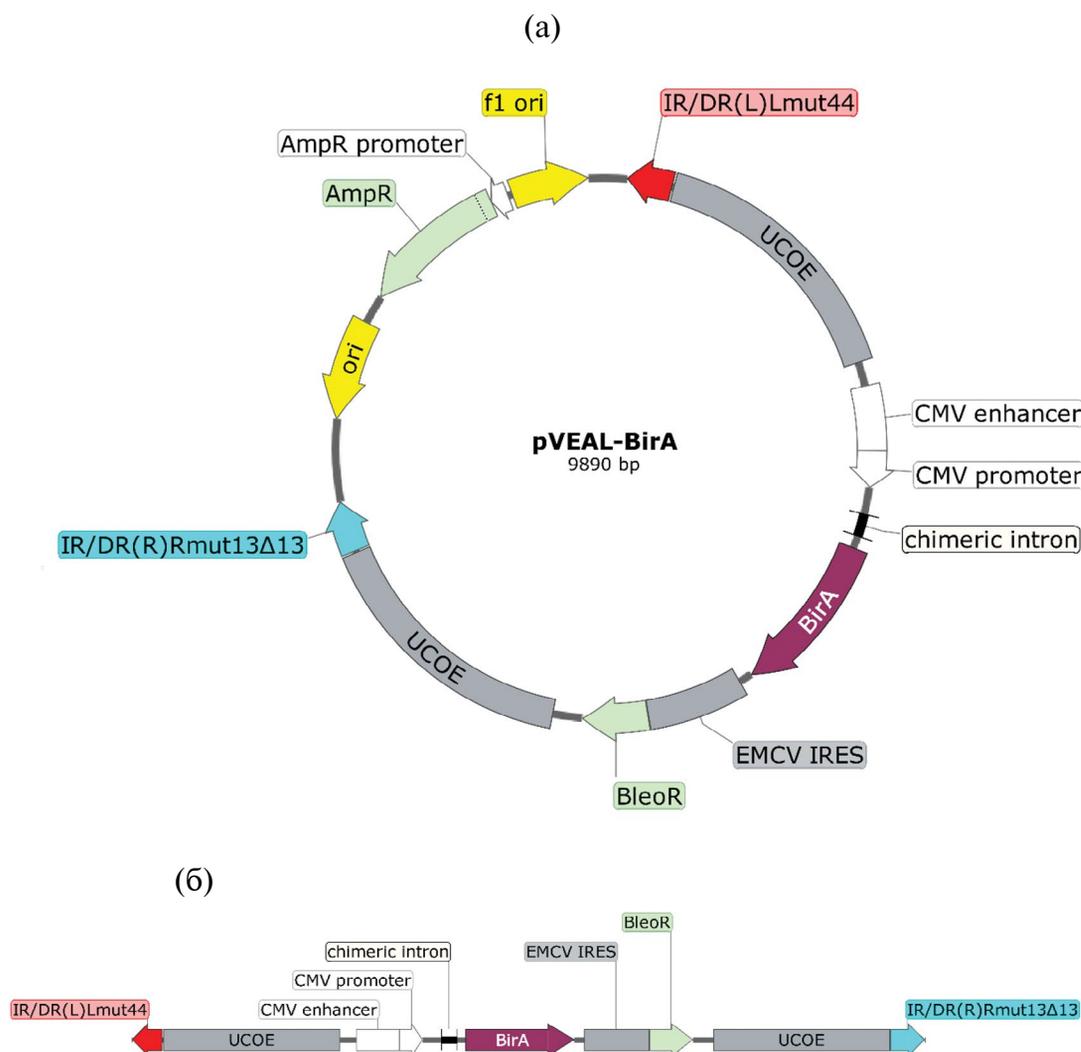


Рис. 1. Карта плазмидного вектора pVEAL-BirA (а) и последовательность каскеты экспрессии гена BirA (б).

KDLT, чтобы обеспечить транслокацию фермента в ЭПР (рис. 1). Секретия целевых белков обеспечивалась сигнальной последовательностью V19 MMRPVLVLLFATSALA, введенной в N-конец [33]. Для специфического мечения, детекции и очистки белков, в С-концевую последовательность белков были введены последовательности avi-tag GLNDIFEAQKIEWHE и 6×his-tag (рис. 2).

Для продукции рекомбинантных вирусных белков клеточную линию CHO-K1 ко-трансфицировали тремя генетическими конструкциями, кодирующими биотин-лигазу BirA белки M1 или B7, и вектором для кратковременной продукции транспозазы SB100X Sleeping Beauty. Предварительную оценку продукции целевых белков проводили методом ИФА со специфическими антителами к M1 и B7. Высокий уровень сигнала был выявлен только в лунках с белками, инкубированными со специфическими антителами, внесение неспецифических моноклональных антител и сывороток показало фоновые значения сигнала. Анализ целевых белков

был осложнен стабильно низкой продукцией. Для подтверждения специфичности биотинилирования вирусных белков M1 и B7 культуральную среду анализировали при помощи вестерн-блот анализа. Как видно из рис. 3 и 4, биотинилирование протекало высокоспецифично по отношению к целевым белкам и только в присутствии экзогенного биотина в культуральной среде.

Производство биотинилированных рекомбинантных белков M1 и B7 вируса натуральной оспы. *In vivo* биотинилирование белков в клетках прокариот (*E. coli*) протекало при конечной концентрации биотина 50 - 100 мкМ [34]. Для *in vivo* биотинилирования белков в экспрессионной системе клеток млекопитающих, как правило используются концентрации биотина в диапазоне 100–200 мкМ [35, 36]. При оптимизации условий биотинилирования белков в клетках млекопитающих был выбран диапазон концентраций от 2 до 0.015 мкМ и была определена максимальная концентрация биотина,

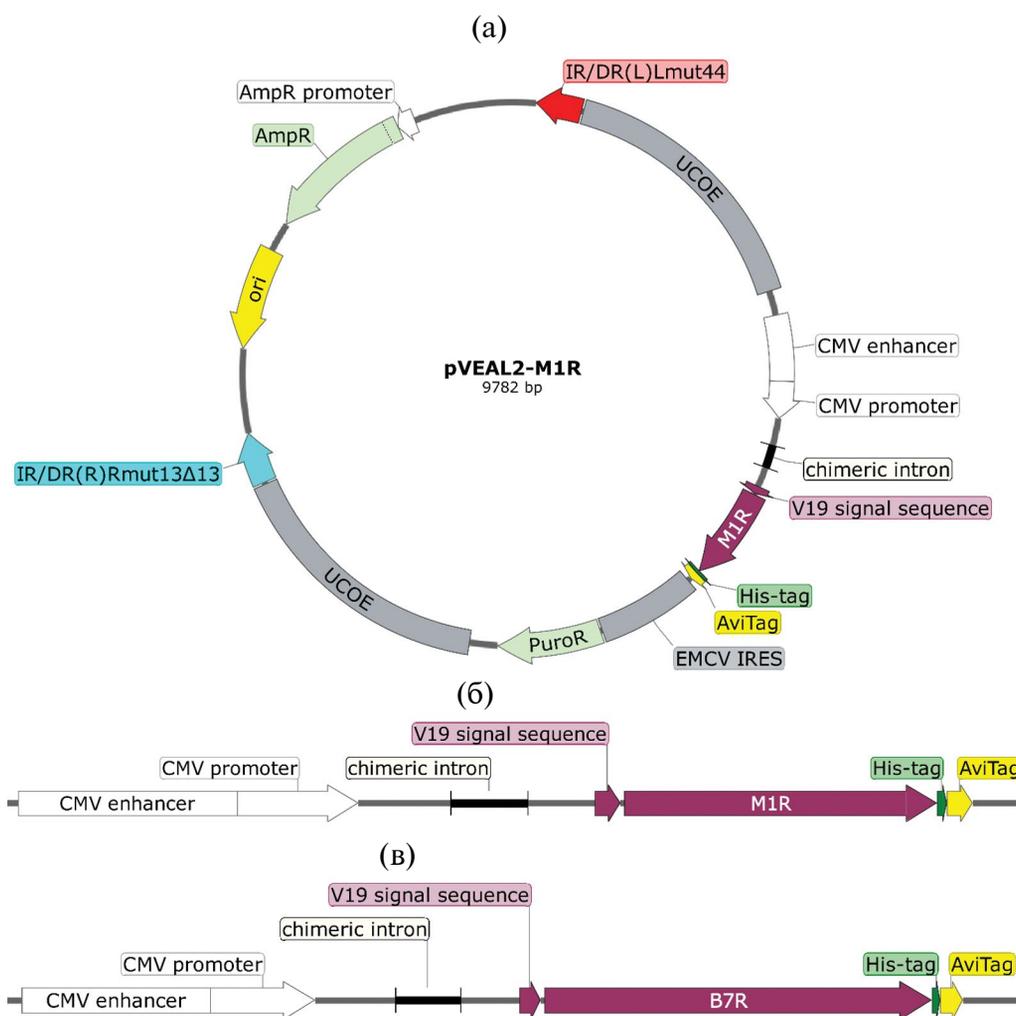


Рис. 2. Карта плазмидного вектора pVEAL2 (а) и генов M1R (б) и B7R (в), содержащих сигнальный пептид секреции, метки his-tag и avi-tag.

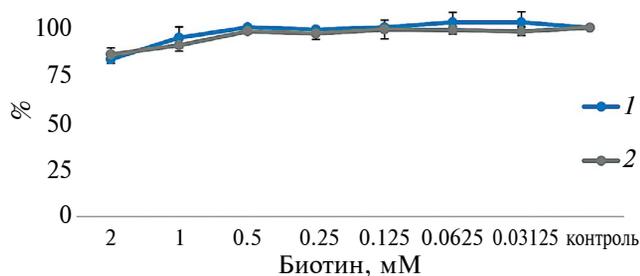


Рис. 3. Жизнеспособность клеток CHO-K1 (1) и CHO-BirA (2) при культивировании в присутствии различных концентраций биотина.

не оказывающая токсического действия на контрольную клеточную культуру CHO-K1 и клеточную линию, продуцирующую CHO-K1-BirA. Негативного влияния на метаболическую активность клеток не наблюдалось при концентрации биотина вплоть до 0.5 мкМ (рис. 3). Определение концентрации биотина, обеспечивающей максимально возможный уровень биотинилирования проводили на клеточной линии CHO-BirA-B7. В оценке использовали весь диапазон концентраций, с учетом тех, которые выходят за порог токсического действия. Независимо от времени наработки оптимальной была концентрация биотина 0.125 мкМ (рис. 5). Так же при концентрации биотина 2.0 и 1.0 мкМ не наблюдалось снижения уровня сигнала белка, несмотря на достижение уровня токсичной концентрации.

Использование низкомолекулярных энхансеров для повышения продукции белков M1 и B7. Независимо от времени культивирования и метода трансфекции клеток, клеточная линия CHO-K1 показывала выход целевого белка, после стадий очистки и диализа, не более 0.9 мг/л для B7 и 0.65 мг/л для

M1. Для повышения продукции целевых белков были протестированы три наиболее доступных энхансера, с различными механизмами действия: кофеин, ацетат лития и вальпроат натрия.

Вальпроевая кислота ингибирует активность гистондеацетилазы, усиливая экспрессию генов в стабильных культурах, также увеличивает выход белка и при транзientной экспрессии, механизм действия этого процесса не до конца понятен, известны некоторые аспекты взаимодействия с клеточными факторами [37]. Было показано, что вальпроевая кислота увеличивает уровень шаперонов в ЭПР, таких как GRP78, GRP94, HSP47, протеин-дисульфид-изомеразы, HSP70. Также было обнаружено, что вальпроевая кислота влияла как на киназу, регулирующую внеклеточными сигналами (ERK), протеинкиназу C (PKC), так и на пути Wnt/ β -катенин, регулируя дифференцировку и пролиферацию различных клеток [38].

Механизм действия кофеина описан как ингибирование нескольких киназ, в том числе ATM (мутированная атаксия-телеангиэктазия), ATR (атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок) и DNA-PKcs (каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы), которые являются важными сигнальными белками, участвующими в репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Показано, что при миллимолярных концентрациях кофеин действует как ингибитор фосфодиэстеразы, что потенциально приводит к повышению уровня цАМФ и усилению экспрессии с промотора/энхансера CMV, который содержит элементы ответа цАМФ. Транскриптомные данные указывают на другой потенциальный механизм, с помощью которого кофеин может усиливать транскрипцию за счет подавления синтеза ингибитора транскрипции Eid3 [39]. Ацетат лития оказывает влияние на

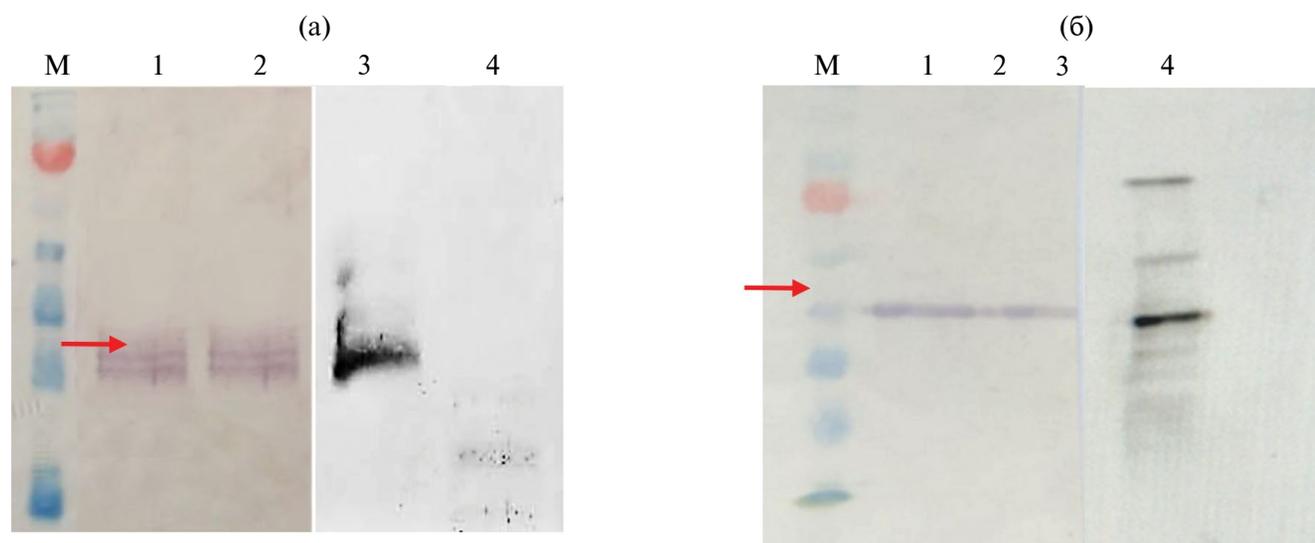


Рис. 4. Вестрен-блот анализ биотинилированных белков: M1 (а) и B7 (б), 1, 3 – выделенных из культуральной среды с добавлением экзогенного биотина, 2, 4 – из культуральной среды без биотина, М – маркер.

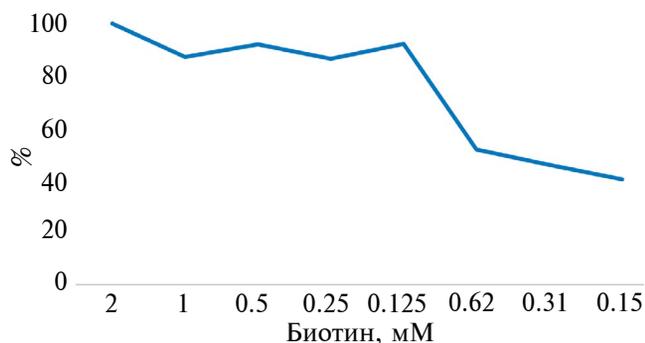


Рис. 5. Уровень биотинилирования (%) белка В7 вируса натуральной оспы в зависимости от концентрации биотина в культуральной среде. Представлены значения, нормализованные по максимальной оптической плотности.

текучесть мембраны, индуцирует остановку клеток в фазе G2/M и является негативным регулятором апоптоза [22].

Оценку действия энхансеров проводили методом сэндвич-ИФА, при этом аликвоты отбирали непосредственно из культуральной среды. Добавление каждого из энхансеров приводило к увеличению сигнала поглощения ОП в среднем в 2.5–3.0 раза для В7 и 1.3–1.8 раза для М1 (рис. 6). Кофеин оказывал наименьший положительный эффект ~ 1.1 и был исключен из дальнейших исследований. При внесении комбинации препаратов вальпроата натрия и ацетата лития в максимальных концентрациях, сигнал ИФА был максимальным. Оценку абсолютного значения концентрации каждого из белков, которые по результатам теста ИФА показали лучший результат, проводили методом УФ спектроскопии. Клеточная линия

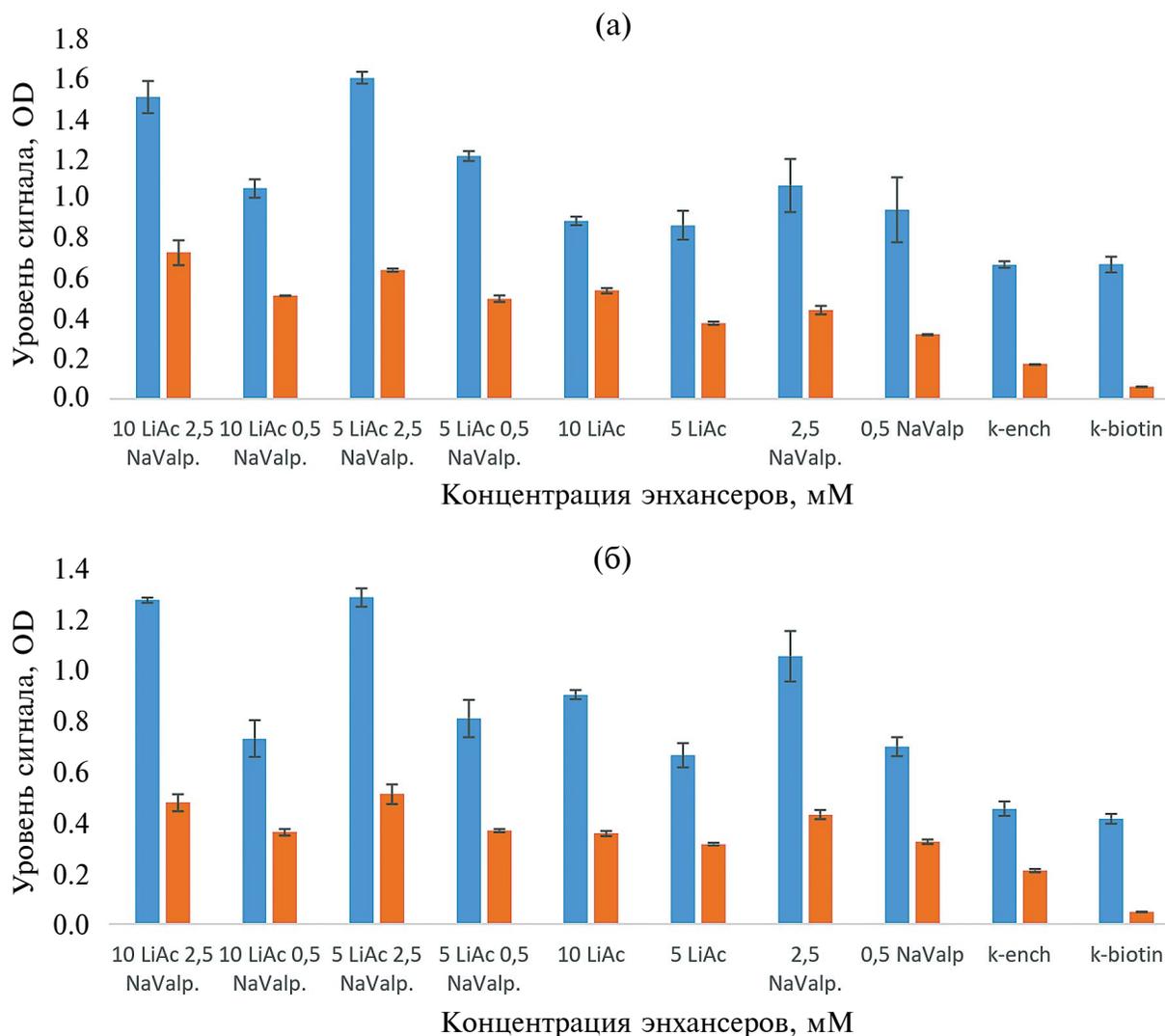


Рис. 6. Количество общего и биотинилированного рекомбинантного белка В7 (а) и М1 (б) вируса натуральной оспы в культуральной среде, в зависимости от концентрации энхансеров в среде.

СНО-BirA-M1 продуцировала меньшее количество общего белка – 1.5 мг/л, по сравнению с 4.5 мг/л для СНО-BirA-V7, и меньше реагировала на присутствие энхансеров в ростовой среде, независимо от их концентрации. Не зависимо от концентрации и комбинации внесенных энхансеров не наблюдалось негативного влияния на биотинилирование целевого белка. При оценке продукции биотинилированного белка в присутствии энхансеров и без них наблюдали прямую зависимость между увеличением абсолютного значения общего и биотинилированного белка. Количество биотинилированного белка в условиях ведения клеточных линий на среде, содержащей комбинацию энхансеров в максимальной концентрации, составило 2.03 мг/л для V7 и 0.23 мг/л для M1. Без добавления энхансеров выход белка, при аналогичных условиях культивирования составил 0.29 для V7 и 0.1 мг/л для M1. Таким образом, при добавлении энхансеров к клеткам СНО-BirA-V7 наблюдалось повышение выхода биотинилированного белка с 32 до 45%, однако, в случае с клеточной линией, продуцирующей белок M1, процент выхода оставался постоянным и составлял 35%.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mendoza-Topaz C.* // *Methods Mol. Biol.* 2020. V. 2169. P. 89–103.
2. *Habel J.E.* // *Methods Mol. Biol.* 2021. V. 2261. P. 357–379.
3. *Suzuki Y., Kadomatsu K., Sakamoto K.* // *The Journal of Biochemistry.* 2023. V. 173. № 6. P. 413–415. <https://doi.org/10.1093/jb/mvad013>
4. *De Boer E., Rodriguez P., Bonte E., Krijgsveldt J., Katsantoni E., Heckt A. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2003. V. 100. № 13. P. 7480–7485.
5. *Kido K., Yamanaka S., Nakano S., Motani K., Shinohara S., Nozawa A., et al.* // *Elife.* 2020. V. 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.54983>
6. *Kulyyassov A., Ramankulov Y., Ogryzko V.* // *Life.* 2022. V. 12. № 2. P. 300. <https://doi.org/10.3390/life12020300>
7. *Wang Q., Wagner R.T., Cooney A.J.* // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 5. P. e63532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063532>
8. *Roldán J.S., Cassola A., Castillo D.S.* // *Biotechnology Reports.* 2020. V. 25. p. e00434. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00434>
9. *Rahimi A., Karimipoor M., Mahdian R., Alipour A., Hosseini S., Mohammadi M. et al.* // *Iran J. Biotechnol.* 2023. V. 21. № 2. e3388. <https://doi.org/10.30498/ijb.2023.343428.3388>
10. *Ghaderi D., Zhang M., Hurtado-Ziola N., Varki A.* // *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews.* 2013. V. 28. P. 147–176.
11. *Yang W., Zhang J., Xiao Y., Li W., Wang T.* // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. V. 10. P. 858478. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.858478>
12. *Bhatwa A., Wang W., Hassan Y.I., Abraham N., Li X.Z., Zhou T.* // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551>
13. *Stuible M., Gervais C., Lord-Dufour S., Perret S., L'Abbé D., Schrag J. et al.* // *J. Biotechnol.* 2021. V. 326. P. 21–27.
14. *Kusakabe T.* // *J. Pharmacol. Sci.* 2023. V. 151. № 3. P. 156–161.
15. *Thoring L., Dondapati S.K., Stech M., Wüstenhagen D.A., Kubick S.* // *Scientific Reports.* 2017. V. 7. № 1. P. 1–15.
16. *Iwasaki A.* // *Annu Rev Microbiol.* 2012. V. 66. P. 177–196.
17. *Mojzesz M., Rakus K., Chadzinska M., Nakagami K., Biswas G., Sakai M. et al.* // *Int. J. Mol. Sciences.* 2020. V. 21. № 19. P. 7289. <https://doi.org/10.3390/ijms21197289>
18. *Ha T.K., Kim Y.G., Lee G.M.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 98. № 22. P. 9239–9248.
19. *Yang W.C., Lu J., Nguyen N.B., Zhang A., Healy N.V., Kshirsagar R. et al.* // *Mol Biotechnol.* 2014. V. 56. № 5. P. 421–428.
20. *Backliwal G., Hildinger M., Kuettel I., Delegrange F., Hacker D.L., Wurm F.M.* // *Biotechnol Bioeng.* 2008. V. 101. № 1. P. 182–189.
21. *Avello V., Torres M., Vergara M., Berrios J., Valdez-Cruz N.A., Acevedo C. et al.* // *PLoS One.* 2022. V. 17. № 11. P. e0277620. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0277620>
22. *Ha T.K., Kim D., Kim C.L., Grav L.M., Lee G. M.* // *Biotechnol Adv.* 2022. V. 54. P. 107831. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107831>
23. Патент Россия. 2020. RU2749459C1.
24. Патент Россия. 2021. RU2752858C1.
25. *Dobson L.J., Saunderson S.C., Smith-Bell S.W.J., McLellan A.D.* // *Immunol Cell Biol.* 2023. V. 101. № 9. P. 847–856.
26. *Kupcsik L.* // *Methods Mol Biol.* 2011. V. 740. P. 13–19.
27. *YekrangSafakar A., Mehrnezhad A., Wu T., Park K.* // *Biotechnol Bioeng.* 2022. V. 119. № 6. P. 1498–1508.

28. Hou X., Wei W., Fan Y., Zhang J., Zhu N., Hong H. et al. // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017. V. 101. № 13. P. 5259–5266.
29. Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., Lampley R., Singh V., Kose N. et al. // *Cell.* V. 167. № 3. P. 684–694.
30. Kaefer T., Meng X., Matho M. H., Schlossman A., Li S., Sela-Culang I. et al. // *J Virol.* 2014. V. 88. № 19. P. 11339–11355.
31. Ivics Z., Hackett P.B., Plasterk R.H., Izsvák Z. // *Cell.* 1997. V. 91. № 4. P. 501–510.
32. Niers J.M., Chen J.W., Weissleder R., Tannous B.A. // *Anal Chem.* 2011. V. 83. № 3. P. 994–999.
33. Патент США. 2008. US8241870B2.
34. Gräslund S., Savitsky P., Müller-Knapp S. // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1586. P. 337–344.
35. Petris G., Vecchi L., Bestagno M., Burrone O.R. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 8. P. e23712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023712>.
36. Predonzani A., Arnoldi F., López-Requena A., Burrone O.R. // *BMC Biotechnol.* 2008. V. 8. P. 41. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-41>.
37. Rubiyana Y., Damajanti Soejoedono R., Santoso A. // *Indonesian Journal of Biotechnology.* 2020. V. 25. № 1. P. 28. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.52621>.
38. Wulhfard S., Baldi L., Hacker D.L., Wurm F. // *Biotechnol.* 2010. V. 148. № 2–3. P. 128–132.
39. Fomina-Yadlin D., Mujacic M., Maggiora K., Quesnell G., Saleem R., McGrew J.T. // *J. Biotechnol.* 2015. V. 212. P. 106–115.

***In vivo* Method for Biotinylation of Recombinant Variola Virus Proteins**

V. N. Nikitin^a, Yu. A. Merkuleva^a, and D. N. Shcherbakov^{a, b, *}

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

^bAltai State University, Barnaul, 656049 Russia

*e-mail: dshcherbakov@gmail.com

The work implements a method for specific *in vivo* biotinylation of recombinant proteins M1 and B7 of the variola virus during biosynthesis in CHO-K1 cells. To do this, co-expression of the biotin ligase BirA and target genes encoding the ectodomains of the M1 and B7 proteins with a C-terminal avi-tag was carried out in CHO-K1 cells in the presence of biotin in the culture medium. The optimal biotin concentration for the expression of M1 and B7 proteins was 125 μ M. The production of biotinylated recombinant proteins has been complicated by low yields. To increase the production of target proteins, low molecular weight enhancers were added to the culture medium: lithium acetate, sodium valproate and caffeine. The enhancers increased the yield of the target protein by 1.3–4.9 times and did not affect the efficiency of biotinylation. The highest yield of biotinylated protein was achieved with the simultaneous addition of a concentration of 10 mM lithium acetate and 2.5 mM sodium valproate.

Keywords: recombinant viral proteins, biotinylation, biotin ligase BirA, biotin acceptor peptides (BAP)