

УДК 579.222

## ДЕГРАДАЦИЯ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ РИЗОСФЕРНЫМ ШТАММОМ *ACHROMOBACTER INSOLITUS* LCU2

© 2024 г. Е. В. Крючкова<sup>а, \*</sup>, Е. С. Морозова<sup>б</sup>, В. С. Гринев<sup>а, с</sup>, Г. Л. Бурьгин<sup>а, с</sup>,  
Н. Е. Гоголева<sup>д, е</sup>, Ю. В. Гоголев<sup>д, ф</sup>

<sup>а</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”,  
Саратов, 410049, Россия

<sup>б</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034, Россия

<sup>с</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского,  
Саратов, 410012, Россия

<sup>д</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008, Россия

<sup>е</sup>Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, 460000, Россия

<sup>ф</sup>Казанский институт биохимии и биофизики Казанского НЦ РАН, Казань, 420008, Россия

\*e-mail: kryu-lena@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.01.2024 г.

После доработки 25.01.2024 г.

Принята к публикации 30.01.2024 г.

Штамм *Achromobacter insolitus* LCU2, изолированный с корней люцерны посевной (*Medicago sativa* L.), утилизировал коричную кислоту, а также ее метокси-производные – ванилиновую и феруловую кислоты – в качестве единственного источника углерода. Слабый рост был отмечен на м-кумаровой, но не на о- и п-кумаровых кислотах. Рост на коричной кислоте был медленным и диауксичным. Убыль субстрата из среды культивирования составила 53%, деструктивная эффективность – 30 мкг/мг сырой биомассы в течение 14 сут. Несмотря на бактерицидное действие коричной кислоты, культура *A. insolitus* LCU2 длительное время сохраняла жизнеспособность. Геномный анализ позволил выявить два генных кластера *hca* и *mhp*, отвечающих за дигидроксилирование фенольного кольца (*hcaA1A2CDB*) и его последующее расщепление до продуктов центрального метаболизма (*mhpACDE*), а также транскрипционный регулятор (*hcaR*) и предполагаемый транспортер (*hcaT*). Предположительный биохимический путь деградации коричной кислоты штаммом *A. insolitus* LCU2 был предсказан с использованием геномных данных.

**Ключевые слова:** коричная кислота, диоксигеназа, бактерии-деструкторы, *hca*, *mhp*, *Achromobacter insolitus*

DOI: 10.31857/S0026365624050053

Фенольные кислоты (ФК) – это соединения с химической структурой (С6–С3), синтезируемые в основном растениями, как структурные компоненты предшественников лигнина (Croteau et al., 2000; Kefeli et al., 2003), как защитные молекулы в ответ на биотические факторы, а также как соединения, обеспечивающие сигналинг в растительно-микробных симбиозах (Siqueira et al., 1991; Mandal et al., 2010). В почву ФК попадают с корневыми экссудатами, в процессе разложения растительных остатков, в стоках винодельческих, маслоэкстракционных, целлюлозно-бумажных предприятий (Monisha et al., 2018), в качестве интермедиатов катаболизма полиароматики, например, нафталина (Анохина и соавт., 2020). Коричная кислота (КК) – основной предшественник синтеза растительных

фенольных компонентов (Croteau et al., 2000). Она обладает аллелопатическими свойствами, ингибирует рост бактерий и образование биопленок, а в определенных концентрациях негативно влияет на развитие растений (Ye et al., 2006; Salvador et al., 2013; Rajkumari et al., 2018). Бактериальные штаммы, способные к деградации КК, перспективны не только с точки зрения естественного цикла разложения ароматических компонентов, оздоровления почвы и повышения ее плодородия, но также могут использоваться как модельные объекты, которые преодолевают неспецифическую защиту растений и колонизируют их.

На сегодняшний день описано несколько путей бактериальной трансформации и деградации КК: а) β-окисление трехуглеродного хвоста

с образованием бензоата у *Cupriavidus necator* JMP134 (Perez-Pantoja et al., 2008); б) восстановление двойной связи в трехуглеродном хвосте с последующим гидроксигенированием бензольного кольца монооксигеназами до протокатеховой кислоты у *Stenotrophomonas* sp. TRMK2 (Monisha et al., 2018); в) дигидроксилирование бензольного кольца диоксигеназой (ДО) типа Риске с дальнейшим расщеплением кольца у *Escherichia coli* K-12 (Diaz et al., 1998). Лишь диоксигенолитический путь деградации КК описан полностью, указаны все ферменты и биохимические реакции с соответствующими субстратами и продуктами.

Цель данного исследования – изучить возможность утилизации коричной кислоты и ее производных ризосферным штаммом *Achromobacter insolitus* LCu2 и с помощью геномного анализа предсказать биохимический путь деградации КК у исследуемых бактерий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объект исследования.** Используемый в работе штамм *A. insolitus* LCu2 выделен с корней люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) и депонирован в двух микробных коллекциях под номерами IBPPM 631 (<http://collection.ibppm.ru/>) и RCAM 04723 (<http://www.arriam.spb.ru/eng/lab10/>).

**Рост бактерий на фенольных кислотах.** Бактерии культивировали в минеральной среде MS1 (Ермакова и соавт., 2008) с некоторыми модификациями. В качестве источника фосфора использовали 0.5 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Коричную, *o*-, *m*-, *p*-кумаровую, ванилиновую и феруловую кислоты добавляли в автоклавированную среду (1 атм, 30 мин) в качестве единственного источника углерода (0.5–1.0 г/л), предварительно растворив их в небольшом объеме диметилсульфоксида (ДМСО). Стерилизованный фильтрованием 0.22 мкм раствор витаминов (мг/100 мл): тиамин – 1.0; биотин – 0.2; никотиновая кислота – 2.0; пиридоксамин – 5.0 добавляли в MS1 (2 мл/л); pH среды доводили 1М раствором NaOH до 6.8–7.0.

Для инокулята одну полную петлю бактериальной культуры засевали в MS1 с яблочной кислотой (0.5 г/л) и выращивали в течение 1 сут. Клетки осаждали при 5000 *g* в течение 10 мин, ресуспендировали свежей средой без источника углерода и вносили в экспериментальные варианты до начальной оптической плотности 0.02 или 0.09 при 420 нм. Бактерии культивировали в колбах, содержащих 50 мл жидкой MS1, на шейкере при 140 об./мин и температуре 35°C.

Для получения адаптированной к КК культуры LCu2 осуществляли серию многократных последовательных пересевов на среды, содержащие КК

(0.5 или 1.0 г/л) в качестве единственного источника углерода.

**Контроль ростовых характеристик.** Рост бактерий контролировали по изменению оптической плотности (ОП) на спектрофотометре Specol 221 (Германия) при длине волны 420 нм в кювете с длиной оптического пути 0.2 см. Удельную скорость роста ( $\mu$ ) и время генерации (*g*) рассчитывали по формулам:

$$\mu = \lg X_t - \lg X_0 \times 2.303 / (t - t_0),$$

где  $X_t$  и  $X_0$  – начальная и конечная плотность культуры в моменты времени *t* и  $t_0$ ;

$$g = 0.693 / \mu.$$

Деструктивную активность (*Q*) культур определяли как отношение потребленной коричной кислоты к сырой биомассе бактерий (мг/г).

**Жизнеспособность бактериальных культур.** Количество живых клеток в суспензиях определяли, высевая и подсчитывая значения колониеобразующих единиц (КОЕ). 100 мкл бактериальной суспензии добавляли к 900 мкл физраствора, готовили серию разведений от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$ . Из разведений  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  по 200 мкл высевали на плотные среды LB, а также на MS1 с коричной кислотой (0.5 и 1 г/л). Высевы производились в пяти повторностях. Учет КОЕ проводили после 5 сут культивирования на LB и после 14 сут на MS1 с коричной кислотой.

**Аналитические методы.** Возможную трансформацию ФК определяли методом УФ-спектрометрии на спектрофотометре Specord 250 (“Analytik Jena”, Германия). Бактерии осаждали центрифугированием при 5000 *g* в течение 10 мин. Надосадочную жидкость аккуратно отбирали, разбавляли дистиллированной водой (1 : 10) и измеряли спектры в диапазоне от 200 до 400 нм.

Остаточное содержание КК в супернатантах определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Dionex UltiMate 3000 с колонкой C18 и УФ-детектором, при 240 нм. Элюент ацетонитрил– $\text{H}_2\text{O}$ –уксусная кислота (30 : 69.5 : 0.5, по объему) использовали для анализа. Скорость потока 0.6 мл/мин, объем образца 5 мкл.

Значения pH супернатантов доводили до 7 ед. раствором 0.25 М NaOH; ФК экстрагировали этилацетатом трижды из каждого варианта в пропорции 1 : 1 (200 мкл надосадочной жидкости к 200 мкл этилацетата). Полученные экстракты упаривали, осадки растворяли в ацетонитриле и объединяли. Для построения калибровочного графика 1 мг КК растворяли в 1 мл ДМСО, а затем 500 мкл этого раствора растворяли в 500 мкл дистиллированной воды, получая концентрацию 500 мкг/мл.

**Фитотоксичности бактериальных супернатантов.** В эксперименте использовали мягкую

яровую пшеницу (*Triticum aestivum* L.) сорта Саратовская 29. Зерновки отбирали, калибровали по размеру, отмывали детергентом 5 мин, затем тщательно промывали проточной водой до исчезновения мыльной пены и замачивали в 0.2% растворе диацита на 15 мин. Стерилизованные семена трижды отмывали стерильной H<sub>2</sub>O на 15 мин. Семена по 10 шт. выкладывали в чашки Петри на поверхность фильтровальной бумаги, смоченной 5 мл среды для растений Мурасиге–Скуга с добавлением 100 мкл бактериальных супернатантов до конечного содержания коричной кислоты 1 мг на чашку. В каждом варианте было по 30 семян. Измерение длины корня и стебля у проростков производилось на 3 и 5 сут.

**Геномный анализ.** Геном *A. insolitus* LCu2 аннотирован в NCBI под номером (CP038034). Аминокислотные последовательности ферментов, по литературным данным участвующие в деградации коричной кислоты, были экстрагированы из Uniprot (The UniProt Consortium, 2023) или PDB (Berman et al., 2000) и использованы для поиска гомологов в геноме LCu2 с BLASTP алгоритмом (protein-protein BLAST) (Johnson et al., 2008). Для дальнейшей работы отбирали аминокислотные последовательности, удовлетворяющие следующим критериям: покрытие >80%; E-value <10<sup>-10</sup>; идентичность >20%, а также имеющие соответствующее геномное окружение. На основании геномного анализа был сконструирован предположительный биохимический путь деградации коричной кислоты штаммом *A. insolitus* LCu2. В качестве референсного использовали диоксигенолитический путь, приведенный для *E. coli* K-12 в KEGG (Kanehisa, Goto, 2000), подтвержденный экспериментальными данными (Diaz et al., 1998).

**Статистический анализ данных.** Все эксперименты проводили три раза в трех повторностях. Для полученной выборки рассчитывали значения ошибки средней и доверительного интервала, со степенью достоверности  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Рост *A. insolitus* LCu2 на фенольных кислотах.** На начальном этапе мы протестировали способность *A. insolitus* LCu2 к росту на коричной кислоте (КК) и ее гидроксигированных и метоксилированных производных. Ростовые параметры представлены в табл. 1.

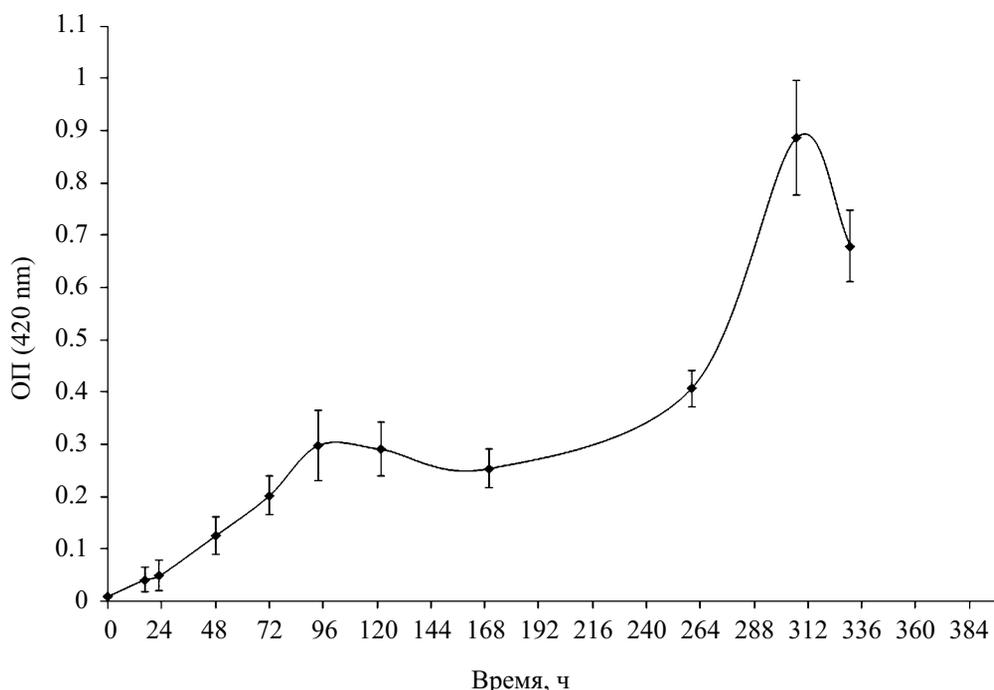
*A. insolitus* LCu2 рос на КК и на ее окси-производных: феруловой и ванилиновой кислотах. Слабый рост наблюдался на *m*-кумаровой кислоте и полное отсутствие роста – на *o*- и *n*-кумаровых кислотах в течение 96 ч культивирования. В целом, рост культур был медленным, что можно объяснить бактерицидными свойствами фенольных кислот, в частности, КК (Malheiro et al., 2019). Время генерации для растущих культур составило более 12 ч (табл. 1).

Анализ литературы показал, что бактериальные способы трансформации или деградации КК различны и не всегда сопряжены с увеличением биомассы. Отсутствие роста в анаэробных условиях отмечено для *Clostridium glycolicum*, который использовал молекулы КК в качестве акцептора протонов, восстанавливая их до фенилпропионовой кислоты (ФПК) (Chamkha et al., 2001). Штамм *E. coli* K-12, для которого выявлены *hca* и *mhp* генные кластеры диоксигенолитического пути, не мог расти на КК. Для индукции роста *E. coli* K-12 на КК необходимо было предварительное культивирование бактерий на ФПК. Примечательно, что клонирование *hca* генов K-12 в *Salmonella typhimurium* LT2 индуцировало рост на КК и образование 2,3-дигидроксикоричной кислоты, в то время как у дикого типа сальмонеллы эти признаки отсутствовали (Diaz et al., 1998). Способность использовать КК в качестве источника углерода показана для нескольких видов *Pseudomonas*, но ростовые характеристики не приводятся (Andreoni, Bestetti, 1986). Единственный штамм, который достигал стационарной фазы

**Таблица 1.** Ростовые параметры *A. insolitus* LCu2 на средах с различными фенольными кислотами

Источник углерода, г/л	Плотность засева	$\mu$ , ч <sup>-1</sup>	g, ч
Коричная кислота, 0.5	0.02	0.041	16.9
Коричная кислота, 1.0	0.02	0.045	15.4
Коричная кислота, 0.5	0.09	0.034	20.4
Коричная кислота, 1.0	0.09	0.035	19.8
<i>m</i> -Кумаровая кислота, 0.5	0.02	0.020	34.6
<i>o</i> -Кумаровая кислота, 0.5	0.02	—	—
<i>n</i> -Кумаровая кислота, 0.5	0.02	—	—
Феруловая кислота, 0.5	0.09	0.043	16.1
Ванилиновая кислота, 0.5	0.09	0.043	16.1

Примечание.  $\mu$  – удельная скорость роста; g – время генерации; указаны для периода 48 ч.



**Рис. 1.** Двухфазная кривая роста *A. insolitus* LCu2 на 0.5 г/л коричной кислоты. Каждая точка является средней из трех повторностей; погрешности показывают доверительный интервал для  $p \leq 0.05$ .

роста на КК уже через 19 ч, — *Stenotrophomonas* sp. TRMK2 (Monisha et al., 2018).

На следующем этапе мы попытались получить адаптированную к КК культуру LCu2, осуществив серию последовательных пересевов. Кривая роста такой культуры представлена на рис. 1.

Рост не был сбалансированным: кривая имела два пика. Как правило, диауксический рост свидетельствует о наличии в среде двух разных источников углерода и энергии. В этом случае бактерии утилизируют сначала один субстрат, а когда он исчерпан, происходит синтез ферментов, позволяющих утилизировать другой. В нашей работе подобный рост может быть связан с образованием нескольких интермедиатов КК, последовательно используемых бактериями для роста.

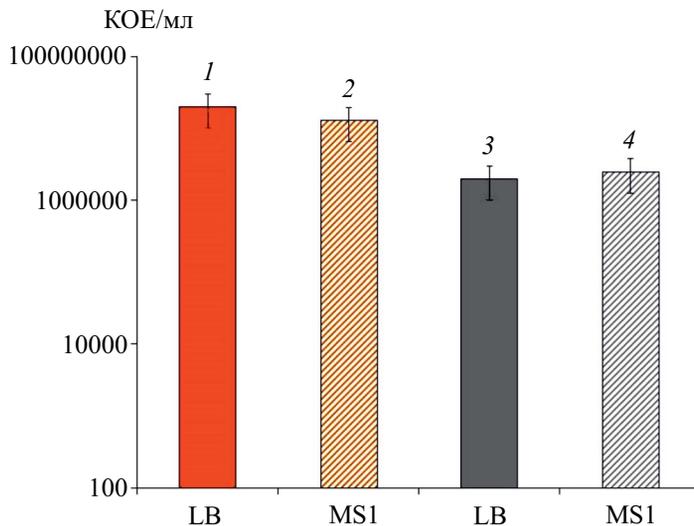
Первая стационарная фаза роста зарегистрирована через 96 ч, вторая — через 307 ч. Скорость роста для обоих пиков была одинаковой и составила  $0.017\text{--}0.018\text{ ч}^{-1}$ , а время генерации  $38.5\text{--}41.0\text{ ч}$  соответственно (рис. 1). Максимальное значение ОП<sub>420</sub> было в 2.3 раза выше, чем у исходной культуры LCu2. Прирост сырой биомассы за 307 ч составил 9 мг/мл.

**Жизнеспособность бактерий, культивируемых длительное время на коричной кислоте.** Чтобы проверить устойчивость *A. insolitus* LCu2 к биоцидному действию КК, бактерии в течение 1 мес. культивировали на КК, добавленной в среду в качестве единственного источника углерода и энергии

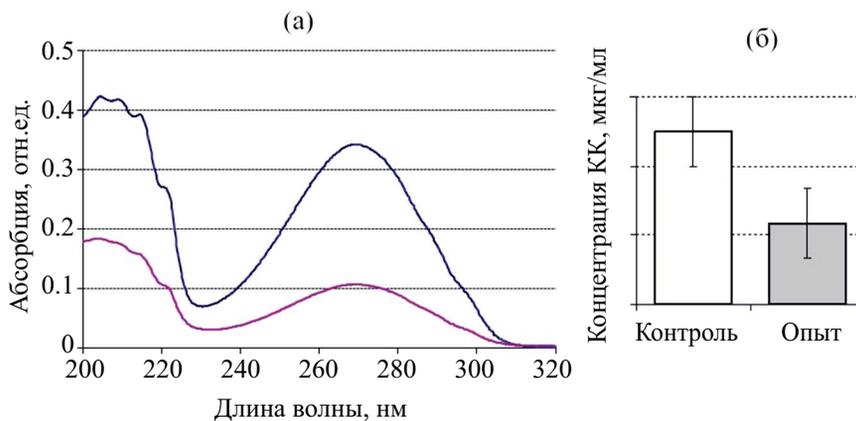
(0.5–1.0 г/л). Затем бактериальные суспензии высевали на два типа сред — богатую LB без добавления КК и синтетическую MS1 с КК (0.5 г/л). Жизнеспособность культур сохранялась. На обоих типах сред значения колониеобразующих единиц (КОЕ) статистически достоверно не отличались друг от друга, но КОЕ культур, высеянных из среды с КК (0.5 г/л), было на один порядок выше, чем у культур из среды с концентрацией КК (1 г/л) (рис. 2). Внешний вид колоний на разных средах значительно отличался. Колонии на MS1 с КК были мелкими и прозрачными. На богатой среде LB без КК вырастали крупные слизистые колонии.

**Убыль и трансформация коричной кислоты.** Чтобы оценить возможную трансформацию КК в процессе бактериального роста, были измерены УФ-спектры супернатантов (рис. 3а). УФ-спектр КК в химическом контроле имел два диапазона поглощения: первый от 200 до 230 нм, содержащий несколько максимумов абсорбции  $\lambda_{\text{max}1}$  205, 209, 215, 222 нм; и второй с  $\lambda_{\text{max}2}$  270 (269) нм. После роста бактерий существенное снижение интенсивности абсорбции в 3 и более раза (примерно на 69%) наблюдалось в районе обоих диапазонов поглощения, что свидетельствует о пропорциональном снижении концентрации КК в среде.

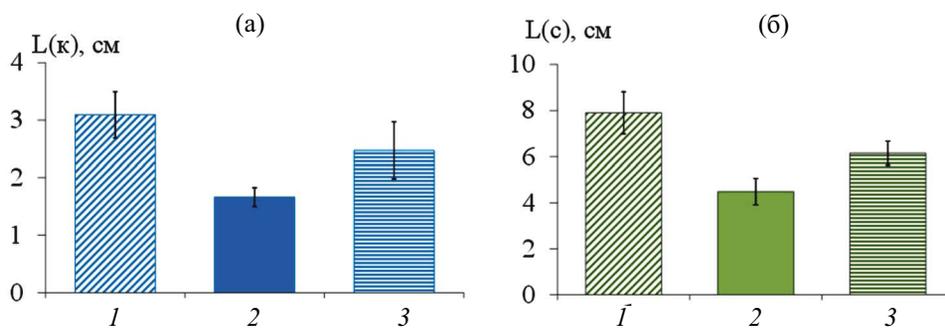
Для количественного определения остаточного содержания в среде КК использовали ВЭЖХ анализ.



**Рис. 2.** Жизнеспособность бактерий, культивируемых в течение месяца на коричневой кислоте: 1, 2 – культуры, выращенные на 0.5 г/л; 3, 4 – на 1.0 г/л коричневой кислоты, высеванные на минерально-синтетическую (MS1) и LB среды; доверительный интервал для  $p \leq 0.05$ .



**Рис. 3.** УФ спектры (а) и ВЭЖХ анализ (б) коричневой кислоты до и после культивирования *A. insolitus* LCu2. Синяя кривая – химический контроль, красная – после культивирования бактерий.



**Рис. 4.** Фитотоксичность супернатантов с коричневой кислотой по отношению к проросткам пшеницы сорта Саратовская 29: а – средняя длина корня; б – средняя длина стебля; 1 – биологический контроль; 2 – химический контроль; 3 – культуральная жидкость LCu2. Погрешности показывают доверительный интервал для  $p \leq 0.05$ ; в каждом варианте  $n = 25$ ; возраст растений 5 сут; содержание коричневой кислоты 1 мг.

**Таблица 2.** Гены, кодирующие ферменты диоксигенолитического пути катаболизма коричной кислоты, в геноме *A. insolitus* LCu2

Белок запроса ID в Uniprot	Ген	ID белка в геноме штамма LCu2 в GenBank	Покрытие, %	E-value	Id, %
<b>Гидроксирование субстрата</b>					
P0ABR53 фенилпропионат/циннамат ДО субъединица $\alpha$	<i>hcaA1</i>	QEK92585 фенилпропионат/циннамат ДО субъекдиница $\alpha$	90	4e-33	26.62
Q47140 фенилпропионат/циннамат ДО субъекдиница $\beta$	<i>hcaA2</i>	QEK92584 фенилпропионат/циннамат ДО субъекдиница $\beta$	84	1e-13	23.01
P0ABW0 субъединица ферредоксина 3-фенилпропионат/циннамат ДО	<i>hcaC</i>	QEK92586 железосодержащий ферредоксин	68	8e-26	48.65
P77650 NAD <sup>+</sup> ферредоксин редуктаза 3-фенилпропионат/циннамат ДО	<i>hcaD</i>	QEK95941 ферредоксин редуктаза	95	5e-61	34.24
P0C131 фенилпропионат/циннамат дигидродиол дегидрогеназа	<i>hcaB</i>	QEK92582 дегидрогеназа	–	–	–
<b>Разрыв фенильного кольца</b>					
2PHD_A салицилат 1,2-ДО	<i>sdoA</i>	QEK92583 гипотетический протеин	30	1e-10	31.58
AAQ91293.1 салицилат 1,2-ДО			30	1e-11	32.46
2D40_A гентизат 1,2-ДО	<i>gdoA</i>		35	2e-10	34.34
Q330M9.1 гентизат 1,2-ДО			50	6e-09	29.66
AFC47847 1-гидрокси-2-нафтоат ДО	<i>phdI</i>		88	1e-12	26.21
BAA31235 1-гидрокси-2-нафтоат ДО			77	8e-12	23.87
ARB18233 5-аминосалицилат-1,2 ДО	<i>mabB</i>		75	1e-11	24.36
P0ABR9 2,3-дигидроксифенилпропионат/ 2,3-дигидроксициннамат 1,2-ДО	<i>mhpB</i>		–	–	–
<b>Образование центральных метаболитов ЦТК</b>					
B7N8Q6 2-гидрокси-6-оксононадиендиоат/ 2-гидрокси-6-оксонатриендиоат гидроксилаза	<i>mhpC</i>	QEK92296.1 альфа/бета складчатая гидролаза	86	2e-14	26.17
P77608 2-кето-4-пентаноат гидратаза	<i>mhpD</i>	QEK92581 2-кето-4-пентаноат гидратаза	13	0,003	36.36
P51020 4-гидрокси-2-оксовалериат альдолаза	<i>mhpE</i>	QEK93369	80	4e-08	25.57
<b>Регуляция транскрипции и транспорт</b>					
Q47141 транскрипционный активатор LysR	<i>hcaR</i>	QEK94968.1 транскрипционный регулятор LysR	92	7e-39	34.78
Q47142.2 транспортер 3-фенилпропионовой кислоты	<i>hcaT</i>	QEK93400 MFS транспортер	94	2e-25	26.45

Примечание. ID – идентификационный номер в базах данных; Id – идентичность между двумя аминокислотными последовательностями.

Убыль КК после культивирования LCu2 составила 266 мг или 53% по сравнению с химическим контролем (рис. 3б). С учетом результатов ВЭЖХ анализа

и прироста биомассы рассчитывали эффективность деградации (Q) для адаптированной культуры, которая составила 30 мкг/мг.

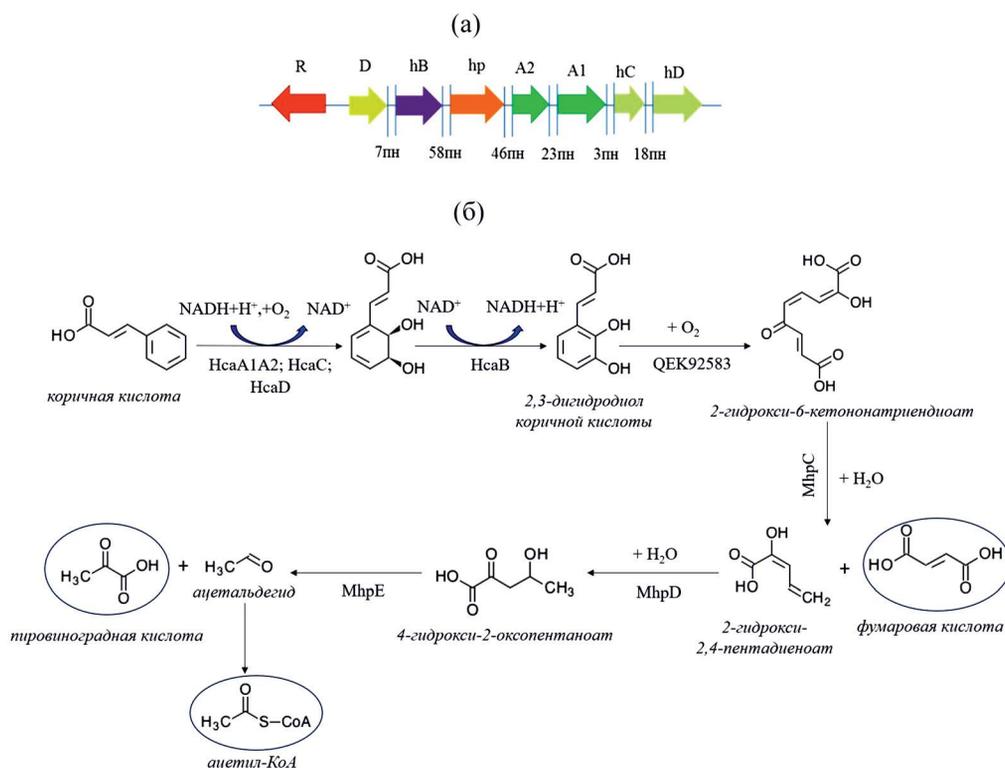
**Фитотоксичность бактериальных супернатантов.** Влияние остаточного содержания КК в супернатантах до и после культивирования LСu2 на морфометрические параметры растений мягкой яровой пшеницы Саратовская 29 показано на рис. 4.

У проростков, выращенных на чашках с добавлением химического контроля, на 46% ингибировалась длина корня L(к) и на 43% длина стебля L(с) (рис. 4). После культивирования бактерий фитотоксичность среды значительно снижалась. Процент ингибирования морфометрических показателей составил всего 20% для корней и 22% для стеблей по отношению к биологическому контролю. По сравнению с химическим контролем L(к) была больше на 33%, а L(с) на 27%. Кроме того, у проростков, выращенных с добавлением культуральной жидкости LСu2, наблюдался активный рост корневых волосков, который отсутствовал в биологическом контроле.

**Биоинформатический поиск генов катаболизма коричневой кислоты.** Поскольку диоксигенолитический путь – единственный полностью описанный

путь деградации КК (Diaz et al., 1998), а ферменты, кодирующие биохимические реакции, аннотированы в Uniprot, мы использовали его в качестве референсного. Диоксигенолитический путь описан для двух субстратов: фенилпропионовой и коричневой кислот. Начинается он с дигидроксилирования ароматического кольца в положениях 2, 3 ферментным комплексом, состоящим из четырех белков:  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц 3-фенилпропионат/циннамат диоксигеназы (HcaA1A2) [EC 1.14.12.19] и соответствующих ферредоксина (HcaC) и ферредоксин редуктазы (HcaD) [EC 1.18.1.3]. В геноме LСu2 найдены все четыре гена, кодирующие ферментный комплекс, отвечающий за дигидроксилирование кольца ФПК и КК (табл. 2). Гены *hcaA1A2CDB* расположены рядом и транскрибируются с одной цепи (рис. 5а).

За дальнейшее расщепление кольца образовавшихся дигидродиолов у *E. coli* K-12 отвечает MhpV диоксигеназа [EC 1.13.11.16] семейства LigV/MhpV экстрадиольных диоксигеназ, катализирующая негемовое Fe(II)-зависимое расщепление кольца



**Рис. 5.** Структурная организация генного кластера, содержащего *hca*- и *mhp*-гены, и предполагаемый биохимический путь деградации коричневой кислоты штаммом *A. insolitus* LСu2. а: **R** – *gniR* (транскрипционный регулятор); **D** – *mhpD*; **hB** – *hcaB*; **hp** – QEK92583; **A2** – *hcaA2*; **A1** – *hcaA1*; **hC** – *hcaC*; **hD** – *hcaD*; б: **HcaA1A2** –  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы транс/циннамат диоксигеназы; **HcaC** – ферредоксин; **HcaD** – ферредоксинредуктаза; **HcaB** – 2,3-дигидрофенилпропионат дегидрогеназа; **QEK92583** – гипотетический белок – предположительно, экстрадиольная диоксигеназа; **MhpC** – 2-гидрокси-6-оксопентадиендиол/2-гидрокси-6-оксонатриендиол гидроксилаза; **MhpD** – 2-кето-4-пентаноат гидратаза; **MhpE** – 4-гидрокси-2-оксовалериат альдолаза. Овалами обозначены центральные метаболиты.

в молекулах 2,3-дигидроксикоричной и 2,3-дигидроксибензилпропионовой кислот (Bugg, 1993; Mendel et al., 2004).

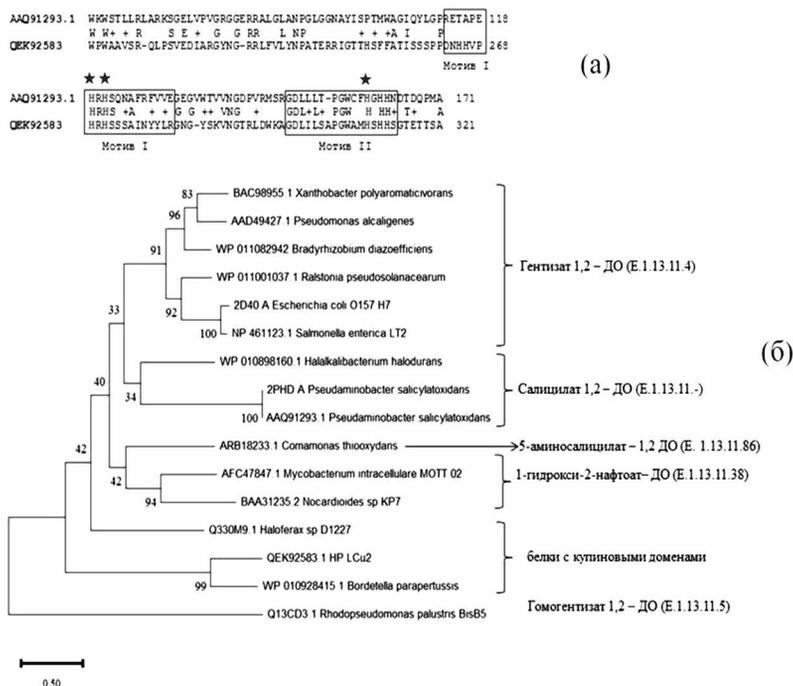
В геноме *A. insolitus* LCu2 не обнаружено гомологичных MhpV последовательностей. Однако рядом с дегидрогеназой (QEK92582) штамма LCu2 расположен гипотетический белок (QEK92583), демонстрирующий родство с белковым суперсемейством бикупиновых экстрадиольных диоксигеназ III класса, расщепляющих химическую связь в бензольном кольце между карбоксилированным и гидроксильным углеродами (табл. 2). Представителями семейства являются: гентизат 1,2-ДО [ЕС 1.13.11.4]; салицилат 1,2-ДО [ЕС 1.13.11.-]; 1-гидрокси-2-нафтоат ДО [ЕС 1.13.11.38]; гомогентизат ДО [ЕС 1.13.11.5] (Chen et al., 2008; Ferraroni et al., 2012). BLASTP анализ гипотетического белка (QEK92583) с представителями купинового суперсемейства показал слабую гомологию в каталитической области (табл. 2). На филогенетическом дереве (рис. 6б) QEK92583 располагался ближе к кластеру с 1-гидрокси-2-нафтоат ДО, но не к гентизат 1,2-ДО. Также белок LCu2 продемонстрировал эволюционное родство с последовательностью Q330M9, для которой показана экспрессия, индуцируемая коричной и фенилпропионой

кислотами, а также 3-гидроксибензоатом (Fairley et al., 2006).

Попарное выравнивание QEK92583 с наиболее изученным представителем семейства-салицилат 1,2-ДО (AAQ91293.1) выявило наличие трех остатков гистидина, которые координируют Fe(II) в каталитическом центре (рис. 6а). Таким образом, биоинформатический анализ позволяет предположить, что гипотетический протеин (QEK92583) имеет потенциал к разрыву химической связи между 1 и 2 атомами углерода фенильного кольца. Безусловно, данное предположение требует дальнейших исследований.

Гены кластера *mhpCDE*, отвечающие за последующий катаболизм образовавшихся интермедиатов до продуктов ЦТК, и транскрипционный регулятор *hcaR* и транспортер *hcaT* также найдены в геноме LCu2 (табл. 2; рис. 5). На основании геномного анализа предсказан предположительный биохимический путь катаболизма КК штаммом *A. insolitus* LCu2, который сходен с описанным для *E. coli* K-12 (Diaz et al., 1998), кроме ключевого белка, расщепляющего связь в фенильном кольце (рис. 5б).

Полученные результаты отражают метаболический потенциал бактерий рода *Achromobacter*, а также



**Рис. 6.** Биоинформатический анализ аминокислотной последовательности (QEK92583) из *A. insolitus* LCu2: а – сравнение фрагментов аминокислотных последовательностей салицилат 1,2-диоксигеназы из *P. salicylatoidans* BN12 (AAQ91293.1) и гипотетического белка *A. insolitus* LCu2 (QEK92583). Купиновый домен с тремя остатками гистидина (His<sub>119</sub>; His<sub>121</sub> и His<sub>160</sub>), координирующими Fe<sup>2+</sup> в каталитическом центре (Matera et al., 2008), отмечен голубыми прямоугольниками и звездами, и обозначен как Мотив I и Мотив II; б – филогенетический анализ белков с купиновыми доменами методом Maximum-Likelihood в Mega X (Kumar et al., 2018), бутстрэп 1000, последовательности выровнены в ClustalOmega W с настройками по умолчанию; корень – гомогентизат 1,2-диоксигеназа.

важны для подбора условий биохимических экспериментов и оптимизации деструктивной активности бактерий по отношению к фенилпропаноидам.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Хроматографический анализ проводили на оборудовании ЦКП “Симбиоз” Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов.

### ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания 1022040700974-4. Работа поддержана Российским научным фондом (полное геномное секвенирование, проект № 22-14-00317).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анохина Т.О., Есикова Т.З., Гафаров А.Б., Поливцева В.Н., Баскунов Б.П., Соляникова И.П. Альтернативный путь метаболизма нафталина у штамма *Rhodococcus opacus* 3D, включающий образование орто-фталевой и производных коричной кислоты // Биохимия. 2020. Т. 85. P. 412–427.
- Anokhina T.O., Esikova T.Z., Gafarov A.B., Polivtseva V.N., Baskunov B.P., Solyanikova I.P. Alternative naphthalene metabolic pathway includes formation of ortho-phthalic acid and cinnamic acid derivatives in the *Rhodococcus opacus* strain 3D // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. P. 355–368.
- Ермакова И.Т., Шушкова Т.В., Леонтьевский А.А. Микробная деструкция органофосфонатов почвенными бактериями // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 689–695.
- Ermakova I.T., Shushkova T.V., Leont'evskii A.A. Microbial degradation of organophosphonates by soil bacteria // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 615–620.
- Andreoni V., Bestetti G. Comparative analysis of different *Pseudomonas* strains that degrade cinnamic acid // Appl. Environ. Microbiol. 1986. V. 52. P. 930–934.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bugg T.D.H. Overproduction, purification and properties of 2,3-dihydroxyphenylpropionate 1,2-dioxygenase from *Escherichia coli* // Biochim. Biophys. Acta. Protein Struct. Mol. Enzymol. 1993. V. 1202. P. 258–264.
- Chamkha M., Labat M., Patel B.K., Garcia J.L. Isolation of a cinnamic acid-metabolizing *Clostridium glycolicum* strain from oil mill wastewaters and emendation of the species description // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001. V. 51. P. 2049–2054.
- Chen J., Li W., Wang M., Zhu G., Liu D., Sun F., Zhang X.C. Crystal structure and mutagenic analysis of GDOsp, a gentisate 1, 2-dioxygenase from *Silicibacter pomeroyi* // Protein Sci. 2008. V. 17. P. 1362–1373.
- Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. Natural products (secondary metabolites) // Biochemistry and molecular biology of plants / Eds. B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. Ch. 24. 2000. P. 1250–1319.
- Díaz E., Ferrández A., García J.L. Characterization of the *hca* cluster encoding the dioxygenolytic pathway for initial catabolism of 3-phenylpropionic acid in *Escherichia coli* K-12 // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 2915–2923.
- Fairley D.J., Wang G., Rensing C., Pepper I.L., Larkin M.J. Expression of gentisate 1,2-dioxygenase (*gdoA*) genes involved in aromatic degradation in two haloarchaeal genera // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 73. P. 691–695.
- Ferraroni M., Matera I., Steimer L., Bürger S., Scozzafava A., Stolz A., Briganti F. Crystal structures of salicylate 1,2-dioxygenase-substrates adducts: a step towards the comprehension of the structural basis for substrate selection in class III ring cleaving dioxygenases // J. Struct. Biol. 2012. V. 177. P. 431–438.
- Johnson M., Zaretskaya I., Raytselis Y., Merezhuk Y., McGinnis S., Madden T.L. NCBI BLAST: a better web interface // Nucl. Acids Res. 2008. V. 36. Suppl. 2. P. W5–W9.
- Kanehisa M., Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. P. 27–30.
- Kefeli V.I., Kalevitch M.V., Borsari B. Phenolic cycle in plants and environment // J. Cell Mol. Biol. 2003. V. 2. P. 13–18.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA-X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
- Malheiro J.F., Maillard J.Y., Borges F., Simões M. Evaluation of cinnamaldehyde and cinnamic acid derivatives in microbial growth control // Int. Biodeterior. Biodegrad. 2019. V. 141. P. 71–78.
- Mandal S.M., Chakraborty D., Dey S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses // Plant Signal. Behav. 2010. V. 5. P. 359–368.
- Mendel S., Arndt A., Bugg T.D.H. Acid-base catalysis in the extradiol catechol dioxygenase reaction mechanism: site-directed mutagenesis of His-115 and His-179 in *Escherichia coli* 2,3-dihydroxyphenylpropionate

- 1,2-dioxygenase (MhpB) // *Biochem.* 2004. V. 43. P. 13390–13396.
- Monisha T.R., Ismailsab M., Masarbo R., Nayak A.S., Karegoudar T.B. Degradation of cinnamic acid by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas* sp. TRMK2 // *3 Biotech.* 2018. V. 8. P. 1–8.
- Perez-Pantoja D., De la Iglesia R., Pieper D.H., González B. Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134 // *FEMS Microbiol. Rev.* 2008. V. 32. P. 736–794.
- Rajkumari J., Borkotoky S., Murali A., Suchiang K., Mohanty S.K., Busi S. Cinnamic acid attenuates quorum sensing associated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // *Biotechnol. Lett.* 2018. V. 40. P. 1087–1100.
- Salvador V.H., Lima R.B., dos Santos W.D., Soares A.R., Böhm P.A.F., Marchiosi R., Ferrarese-Filho O. Cinnamic acid increases lignin production and inhibits soybean root growth // *PLoS One.* 2013. V. 8. Art. e69105.
- Siqueira J.O., Nair M.G., Hammerschmidt R., Safir G.R., Putnam A.R. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems // *Crit. Rev. Plant Sci.* 1991. V. 10. P. 63–121.
- The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023 // *Nucl. Acids Res.* 2023. V. 51. Iss. D1. P. D523–D531.
- Ye S.F., Zhou Y.H., Sun Y., Zou L.Y., Yu J.Q. Cinnamic acid causes oxidative stress in cucumber roots, and promotes incidence of *Fusarium* wilt // *Environ. Exp. Bot.* 2006. V. 56. P. 255–262.

---



---

 EXPERIMENTAL ARTICLES
 

---



---

## Degradation of Cinnamic Acid by the Rhizosphere Strain *Achromobacter insolitus* LCu2

E. V. Kryuchkova<sup>1, \*</sup>, E. S. Morozova<sup>2</sup>, V. S. Grinev<sup>1, 3</sup>, G. L. Burygin<sup>1, 3</sup>,  
N. E. Gogoleva<sup>4, 5</sup>, and Yu. V. Gogolev<sup>4, 6</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, FRCenter “Saratov Scientific Center RAS”, Saratov, 410049, Russia*

<sup>2</sup>*St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, Russia*

<sup>3</sup>*Saratov National Research State University named after N. G. Chernyshevsky, Saratov, 410012, Russia*

<sup>4</sup>*Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008, Russia*

<sup>5</sup>*Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, 460000, Russia*

<sup>6</sup>*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, 420008, Russia*

\*e-mail: kryu-lena@yandex.ru

**Abstract.** The *Achromobacter insolitus* LCu2 strain, isolated from the roots of alfalfa (*Medicago sativa* L.), utilized cinnamic acid, as well as its methoxy derivatives – vanillic and ferulic acids – as the only carbon source. Weak growth was observed on m-coumaric acid, but not on o- and p-coumaric acids. Growth on cinnamic acid was slow and diauxic. The loss of substrate from the cultivation medium was 53%, the destructive efficiency was 30 µg/mg of raw biomass for 14 days. Despite the bactericidal effect of cinnamic acid, the *A. insolitus* LCu2 culture remained viable for a long time. Genomic analysis revealed two gene clusters, *hca* and *mhp*, responsible for dihydroxylation of the phenyl ring (*hcaA1A2CDB*) and its subsequent cleavage to central metabolic products (*mhpACDE*), as well as a transcriptional regulator (*hcaR*) and a putative transporter (*hcaT*). A putative biochemical pathway for cinnamic acid degradation by *A. insolitus* strain LCu2 was predicted using genomic data.

**Keywords:** cinnamic acid, dioxygenase, decomposer bacteria, *hca*, *mhp*, *Achromobacter insolitus*