

Том 60, Номер 3

ISSN 0555-1099

Май – Июнь 2024



ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ и МИКРОБИОЛОГИЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 60, номер 3, 2024

Биосинтез метионина в микроорганизмах: <i>O</i> -ацетилгомосерин-сульфгидрилаза – основной фермент пути прямого сульфгидрирования (Обзор) <i>В. В. Куликова, Е. А. Морозова, А. Д. Лыфенко, В. С. Коваль, Н. В. Ануфриева, П. Н. Сольев, С. В. Ревтович</i>	221
Гидрофобины грибов: структура, свойства, возможности применения в биотехнологии (Обзор) <i>Е. В. Лопатухин, Ю. А. Ихалайнен, Н. Н. Маркелова, А. Е. Куварица, В. С. Садыкова</i>	234
Эффект интенсификации цикла трикарбоновых кислот на биосинтез адипиновой кислоты штаммами <i>Escherichia coli</i> по обращенному β -окислению жирных кислот <i>А. Ю. Гулевич, А. Ю. Скороходова, В. Г. Дебабов</i>	246
Рекомбинантная химотрипсиноподобная пептидаза <i>Tenebrio molitor</i> с неканоническим субстрат-связывающим сайтом <i>В. Ф. Терещенкова, Н. И. Жиганов, А. С. Губаева, Ф. И. Акентьев, Я. Е. Дунаевский, Д. Г. Козлов, М. А. Белозерский, Е. Н. Элидина</i>	254
Сравнительная оценка эффективности биокаталитического синтеза и антибактериальной активности известных антибиотиков и “химерных” соединений цефалоспоринового ряда <i>А. В. Склярченко, И. А. Грошкова, Н. А. Горбунов, А. В. Васильев, А. В. Камаев, С. В. Яроцкий</i>	266
Ферментативная конверсия промышленных целлюлозно-бумажных полуфабрикатов <i>А. С. Аксенов, И. Г. Синельников, А. Р. Шевченко, К. А. Майорова, Д. Г. Чухчин, Д. О. Осипов, М. В. Семёнова, О. А. Синецкина, А. М. Рожкова, Е. В. Новожилов, А. П. Синецкин</i>	274
Обесцвечивание кристаллического фиолетового смешанной культурой в условиях биоэлектрохимической стимуляции <i>А. А. Самков, Е. В. Панкратова, М. Н. Круглова, А. В. Беспалов, С. М. Самкова, Н. Н. Волченко, А. А. Худокормов</i>	284
Получение аналогов кисломолочных продуктов из шрота семян с использованием новых штаммов молочнокислых бактерий <i>А. В. Синельников, Т. В. Колганова, Р. В. Уланова</i>	294
Диатомовая водоросль <i>Nanofrustulum shiloi</i> как перспективный объект современной биотехнологии <i>А. А. Благина, С. Н. Железнова, Е. С. Мирошниченко, Р. Г. Геворгиз, Л. И. Рябушко</i>	301
Разработка микропланшетного иммуноферментного определения нонилфенола с магнитным концентрированием проб <i>А. Н. Берлина, Л. В. Баршевская, К. В. Серебренникова, Н. С. Комова, А. В. Жердев, Б. Б. Дзантиев</i>	315

CONTENTS

Vol. 60, No. 3, 2024

<i>O</i> -Acetylhomoserine Sulfhydrylase as a Key Enzyme of Direct Sulfhydrylation in Microbial Methionine Biosynthesis <i>V. V. Kulikova, E. A. Morozova, A. D. Lyfenko, V. S. Koval, N. V. Anufrieva, P. N. Sol'yev, and S. V. Revtovich</i>	221
Fungal Hydrophobins: Biosynthesis, Properties, Possibilities of Application in Biotechnology (Review) <i>E. V. Lopatukhin, Yu. A. Ihalainen, N. N. Markelova, A. E. Kuvarina, and V. S. Sadykova</i>	234
Effect of the Tricarboxylic Acid Cycle Intensification on Biosynthesis of Adipic Acid through the Inverted Fatty Acid β -Oxidation by <i>Escherichia coli</i> Strains <i>A. Yu. Gulevich, A. Yu. Skorokhodova, and V. G. Debabov</i>	246
Recombinant Chymotrypsin-Like Peptidase from <i>Tenebrio molitor</i> with a Non-Canonical Substrate-Binding Site <i>V. F. Tereshchenkova, N. I. Zhiganov, A. S. Gubaeva, F. I. Akentyev, Ya. E. Dunaevsky, D. G. Kozlov, M. A. Belozersky, and E. N. Elpidina</i>	254
Comparative Evaluation of Effectiveness of Biocatalytic Synthesis and Antibacterial Activity of Known Antibiotics and "Chimeric" Cephalosporin Compounds <i>A. V. Sklyarenko, I. A. Groshkov, N. A. Gorbunov, A. V. Vasiliev, A. V. Kamaev, and S. V. Yarotsky</i>	266
Enzymatic Conversion of Wood Materials from the Pulp and Paper Industry <i>A. S. Aksenov, I. G. Sinelnikov, A. R. Shevchenko, K. A. Mayorova, D. G. Chukhchin, D. G. Osipov, M. V. Semenova, O. A. Sinitsyna, A. M. Rozhkova, E. V. Novozhilov, and A. P. Sinitsyn</i>	274
Decolorization of Crystal Violet by Mixed Culture under the Influence of Bioelectrochemical Stimulation <i>A. A. Samkov, E. V. Pankratova, M. N. Kruglova, A. V. Bespalov, S. M. Samkova, N. N. Volchenko, and A. A. Khudokormov</i>	284
Obtaining Analogues of Fermented Milk Products from Seed Meal Using New Strains of Lactic Acid Bacteria <i>A. V. Sinelnikov, T. V. Kolganova, and R. V. Ulanova</i>	294
The Diatom <i>Nanofrustulum shiloi</i> as a Promising Species in Modern Biotechnology <i>A. A. Blaginina, S. N. Zheleznova, E. S. Miroshnichenko, R. G. Gevorgiz, and L. I. Ryabushko</i>	301
Development of Microplate Immunoenzyme Determination of Nonylphenol with Magnetic Sample Concentration <i>A. N. Berlina, L. V. Barshevskaya, K. V. Serebrennikova, N. S. Komova, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev</i>	315

УДК 577.151.42

БИОСИНТЕЗ МЕТИОНИНА В МИКРООРГАНИЗМАХ: О-АЦЕТИЛГОМОСЕРИН-СУЛЬФИДРИЛАЗА – ОСНОВНОЙ ФЕРМЕНТ ПУТИ ПРЯМОГО СУЛЬФИДРИЛИРОВАНИЯ (ОБЗОР)

© 2024 г. В. В. Куликова^{1, *}, Е. А. Морозова¹, А. Д. Лыфенко¹, В. С. Коваль¹,
Н. В. Ануфриева¹, П. Н. Сольев¹, С. В. Ревтович¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

*e-mail: vitviku@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.10.2023 г.

После доработки 04.12.2023 г.

Принята к печати 10.01.2024 г.

Биосинтез метионина в большинстве микроорганизмов осуществляется двумя альтернативными путями. Каждый путь катализируется независимыми ферментами и регулируется по механизму обратной связи метионином. Путь транссульфурирования включает образование промежуточного продукта цистатионина, а в качестве источника серы выступает цистеин. Ферменты этого метаболического пути подробно охарактеризованы. Путь прямого сульфидрирования подразумевает синтез гомоцистеина с участием неорганического источника серы напрямую из О-ацетилгомосерина и является преобладающим в большинстве классов бактерий. Предметом настоящего обзора являются свойства и функционирование одного из наименее изученных ферментов пути прямого сульфидрирования – О-ацетилгомосерин-сульфидрилазы. Глубокое понимание механизмов, контролирующих субстратную и реакционную специфичность О-ацетилгомосерин-сульфидрилазы, является необходимым шагом рационального редизайна фермента с целью создания перспективного катализатора для синтеза метионина и его производных, а также, в комплексе с кристаллографическими данными, для разработки новых антимикробных соединений на основе эффективных ингибиторов фермента.

Ключевые слова: О-ацетилгомосерин-сульфидрилаза, биосинтез метионина, прямое сульфидрирование

DOI: 10.31857/S0555109924030017 EDN: EXEKTZ

Метионин является незаменимой протеиногенной аминокислотой, уникальные функции которой заключаются в биосинтезе серосодержащих соединений, инициации трансляции [1]. Большинство микроорганизмов могут синтезировать метионин, в то время как животные, включая людей, зависят от внешних источников метионина [2]. Как основная серосодержащая аминокислота, метионин является предшественником всех других серосодержащих аминокислот и их производных, таких как гомоцистеин и глутатион [3]. Метионин является ключевым компонентом одноуглеродного метаболизма, а в форме своего производного S-аденозилметионина является метильным донором в эпигенетической регуляции и процессах детоксикации [4].

В современном обществе метионин стал массовым товаром в мировой экономике – ежегодно производится более 1 млн тонн метионина из нефти для обогащения кормов для скота, что является третьим показателем в мире после глутаминовой кислоты и лизина. Синтетическое производство способствует производству дешевого животного

белка и оказывает прямое влияние на здоровье человека и экосистемы [5]. Однако 95% такого синтетически получаемого метионина образуется в виде D, L-смеси изомеров. Для решения проблемы рацемического синтеза перспективно изучение ферментов, участвующих в метаболизме метионина, для разработки биотехнологических методов синтеза метионина путём рационального редизайна ферментов и потенциального получения суперпродукта [6].

Метаболический путь биосинтеза метионина в бактериях наиболее подробно охарактеризован у *Escherichia coli* [7, 8]. В клетках *E. coli* предшественник метионина гомоцистеин синтезируется по пути транссульфурирования из О-суццинил-L-гомосерина в две стадии (рис. 1), катализируемые цистатионин γ -синтазой (CGS, КФ 2.5.1.48) и цистатионин β -лиазой (CBL, в настоящее время включена в КФ 4.4.1.13, цистеин-S-конъюгат β -лиаза). В большинстве классов бактерий, в отличие от *E. coli*, преобладающим является путь прямого сульфидрирования

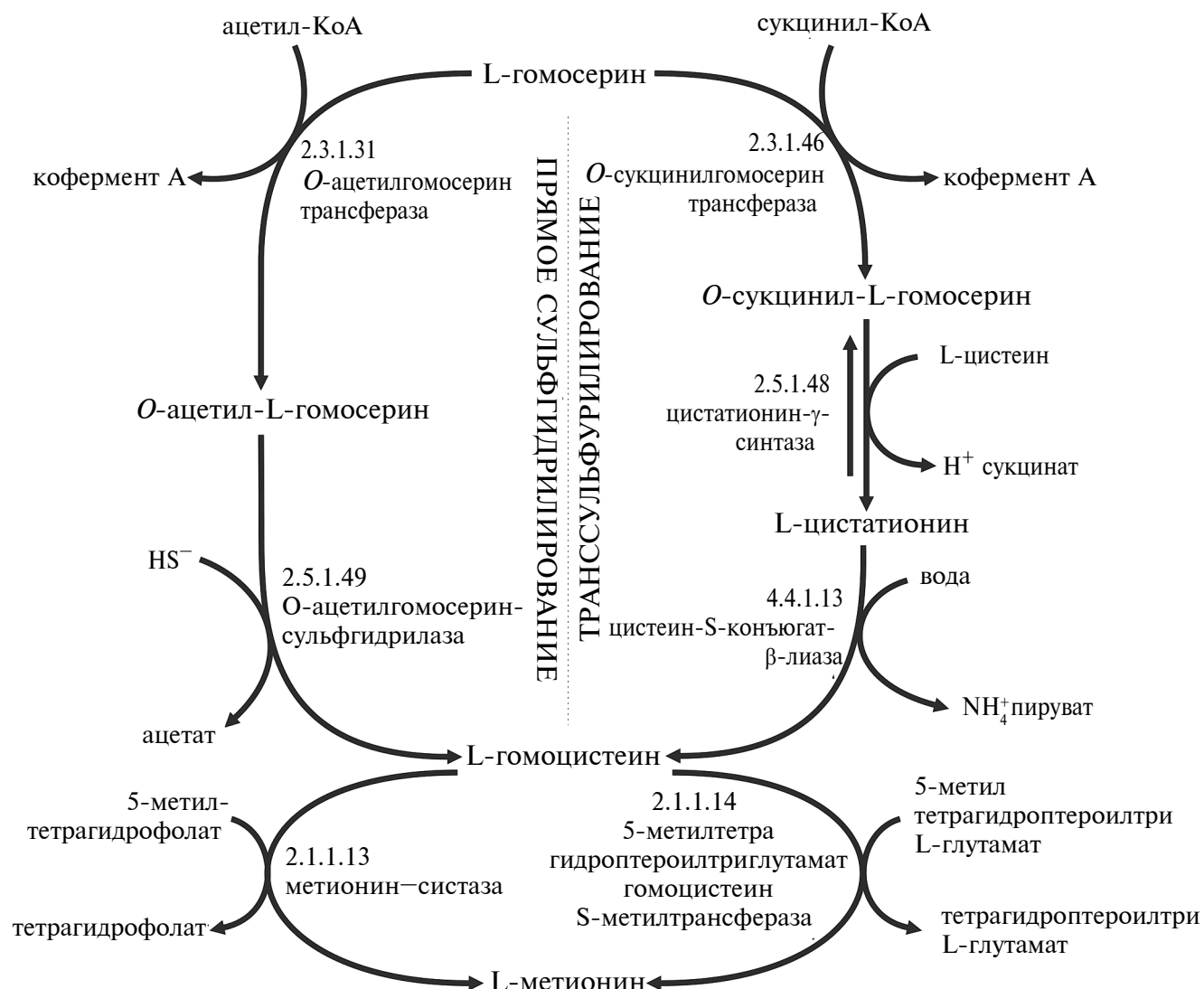


Рис. 1. Биосинтез метионина в микроорганизмах.

(рис. 1), либо используются оба пути [9], что обеспечивает метаболическую гибкость и адаптивность микроорганизмов. Функциональность обоих путей подробно исследована у таких бактерий как *Pseudomonas aeruginosa* [10], *P. putida* [11], *Corynebacterium glutamicum* [12–14], *Leptospira meyeri* [15, 16], *Thermus thermophilus* [17, 18], *Streptococcus anginosus* [19]. Анализ геномов выявил, что транссульфирование, как единственный путь биосинтеза метионина, присутствует в основном в протеобактериях [9].

O-ацетилгомосерин-аминокарбоксипропилтрансфераза катализирует прямое сульфидрирование *O*-ацетил-*L*-гомосерина (ОАН). Предшествующее название — *O*-ацетилгомосерин(тиол)-лиаза — было основано на ее первоначальной классификации (КФ 4.2.99.10). Позднее Комиссия по ферментам определила его в класс

трансфераз (КФ 2.5.1.49) [20]. В настоящее время общепринятыми названиями являются *O*-ацетилгомосерин-аминокарбоксипропилтрансфераза и *O*-ацетилгомосерин-сульфгидрилаза [21]. Микроорганизмы используют *O*-ацетилгомосерин-сульфгидрилазу (ОАНС) для катализа образования предшественника *L*-метионина — *L*-гомоцистеина из *O*-ацетил-*L*-гомосерина и бисульфида или для прямого синтеза *L*-метионина с использованием метантиола (рис. 2). В некоторых микроорганизмах, например у *Bacillus subtilis* и *E. coli*, CGS может действовать как сульфгидрилаза с использованием в качестве субстрата как *O*-ацетил-*L*-гомосерина, так и *O*-сукцинил-*L*-гомосерина [22, 23]. Данные о разнообразии бактериальных путей биосинтеза метионина важны для понимания жизнедеятельности и эволюции бактерий, а также могут быть использованы в микробной биотехнологии. За последние годы возросла активность

Таблица 1. Кинетические параметры реакции γ -замещения *O*-ацетил-L-гомосерина, катализируемой ОАHS из различных источников

Микроорганизм	Удельная активность*, мкмоль/мин мг	$k_{\text{кат}},$ с ⁻¹	$K_M,$ мМ	$k_{\text{кат}}/K_M,$ М ⁻¹ с ⁻¹	Ссылка
<i>T. thermophilus</i> HB8 oah1	49.8 (pH 7.8, 70°C)	н.о.	6.8	н.о.	[18]
<i>T. thermophilus</i> HB8 oah2	67.7 (pH 7.8, 70°C)	н.о.	2.0	н.о.	[35]
<i>B. stearothermophilus</i> CN3	17.2 (pH 7.5, 45°C)	н.о.	1.9	н.о.	[26]
<i>S. cerevisiae</i>	10.5 (pH 7.8, 30°C)	н.о.	4.5×10^{-3}	н.о.	[36]
<i>N. crassa</i>	4.2 (pH 8.0, 30°C)	н.о.	7.0×10^{-3}	н.о.	[40]
<i>Aspergillus nidulans</i>	4.4 (pH 8.0, 30°C)	н.о.	н.о.	н.о.	[31]
<i>L. meyeri</i>	15.0 (pH 7.5, 30°C)	н.о.	н.о.	н.о.	[15]
<i>C. glutamicum</i>	6.0 (pH 7.5, 30°C)	28.0	6.4	4.4×10^3	[41]
<i>T. maritima</i>	1521.0 (pH 7.0, 70°C)	900.0	8.0	1.0×10^5	[28]
<i>C. difficile</i>	50.0 (pH 7.5, 25°C)	94.1	0.6	1.6×10^5	[27]
<i>C. novyi</i>	0.9 (pH 7.5, 25°C)	1.3	0.1	1.3×10^4	[37]

* Условия, при которых определяли активность, указаны в скобках; н.о. — не определяли.

исследований в области ферментативного получения аминокислот [6]. На сегодняшний день является актуальным получение L-метионина в промышленных масштабах методом ферментативного синтеза с применением ферментов, участвующих в метаболизме серы [24].

В настоящем обзоре собраны данные о каталитических свойствах ОАHS из различных микробных источников, обсуждается механизм ферментативной реакции и роль отдельных аминокислотных остатков активного центра с учетом анализа имеющихся в международных базах кристаллографических структур фермента и данных мутагенеза.

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

ОАHS является пиридоксаль-5'-фосфат (ПДФ)-зависимым ферментом, который катализирует реакцию γ -замещения *O*-ацетил-L-гомосерина с использованием сульфидиона с образованием L-гомоцистеина и ацетата (рис. 2). Один из ферментов альтернативного пути транссульфурирования, CGS, катализирует сходную реакцию γ -замещения,

используя в качестве субстрата *O*-сукцинил-L-гомосерин или, в условиях отсутствия *O*-сукцинил-L-гомосерина, *O*-ацетил-L-гомосерин, и L-цистеин в качестве источника серы [25]. ОАHS из большинства микробных источников являются строго специфичными к *O*-ацетил-L-гомосерину и не катализируют реакцию γ -замещения *O*-сукцинил-

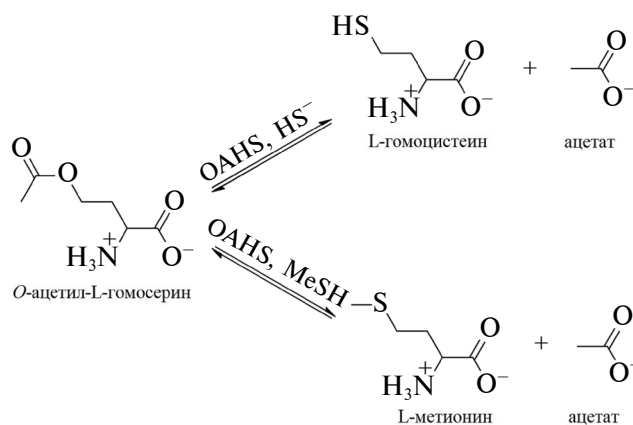


Рис. 2. Схема реакции γ -замещения, катализируемой ОАHS.

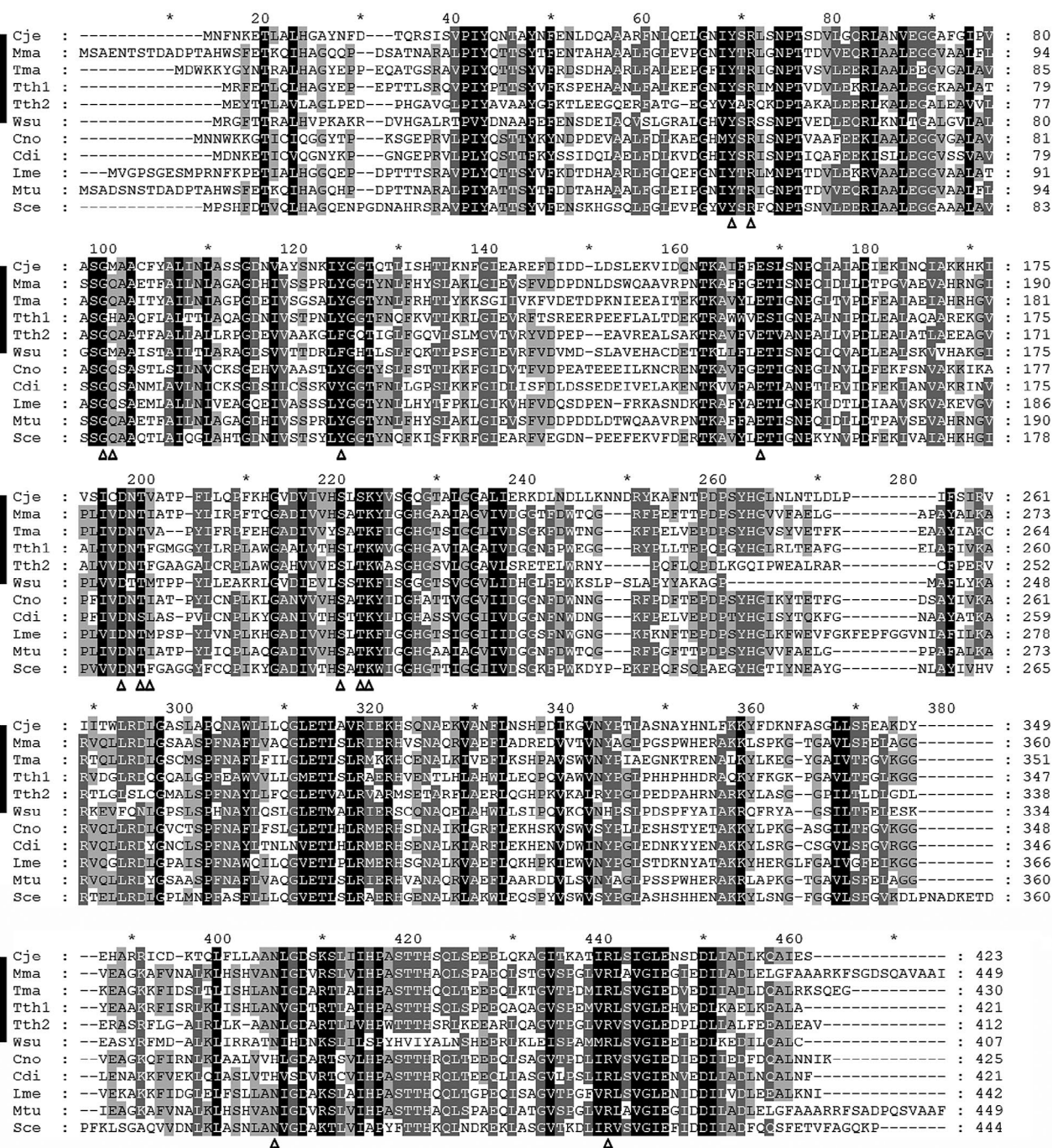


Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей OAHs из *Campylobacter jejuni* (Cje; 40C9), *Mycobacterium marinum* (Mma; B2HDS7), *T. maritima* (Tma; Q9WZY4), *T. thermophilus* (Tth1; Q5SK88 и Tth2; Q5SJ58), *W. succinogenes* (Wsu; Q7M9C8), *Clostridium novyi* (Cno; A0A5B8NE14), *Clostridium difficile* (Cdi; A0A1L7H895), *L. meyeri* (Lme; P94890), *M. tuberculosis* (Mtu; L7N4M1), *Saccharomyces cerevisiae* (Sce; P06106). Консервативные остатки отмечены черным. Последовательности ферментов с известными 3D структурами отмечены вертикальной линией; треугольниками отмечены функциональные остатки активного центра.

Л-гомосерина [26, 27], либо катализируют со скоростями, на несколько порядков ниже, чем скорость основной реакции [10, 18, 28]. Также фермент не может использоваться в качестве источника серы L-цистеин [29]. Источник серы, используемый OAHs в процессе биосинтеза

метионина, может отличаться у разных организмов. Например, у OAHs из *Wolinella succinogenes* источником серы является тиокарбоксилат белка, так что атом серы метионина включается OHSS с использованием белка-переносчика серы, а не сульфиды, как это имеет место у других OAHs [30].

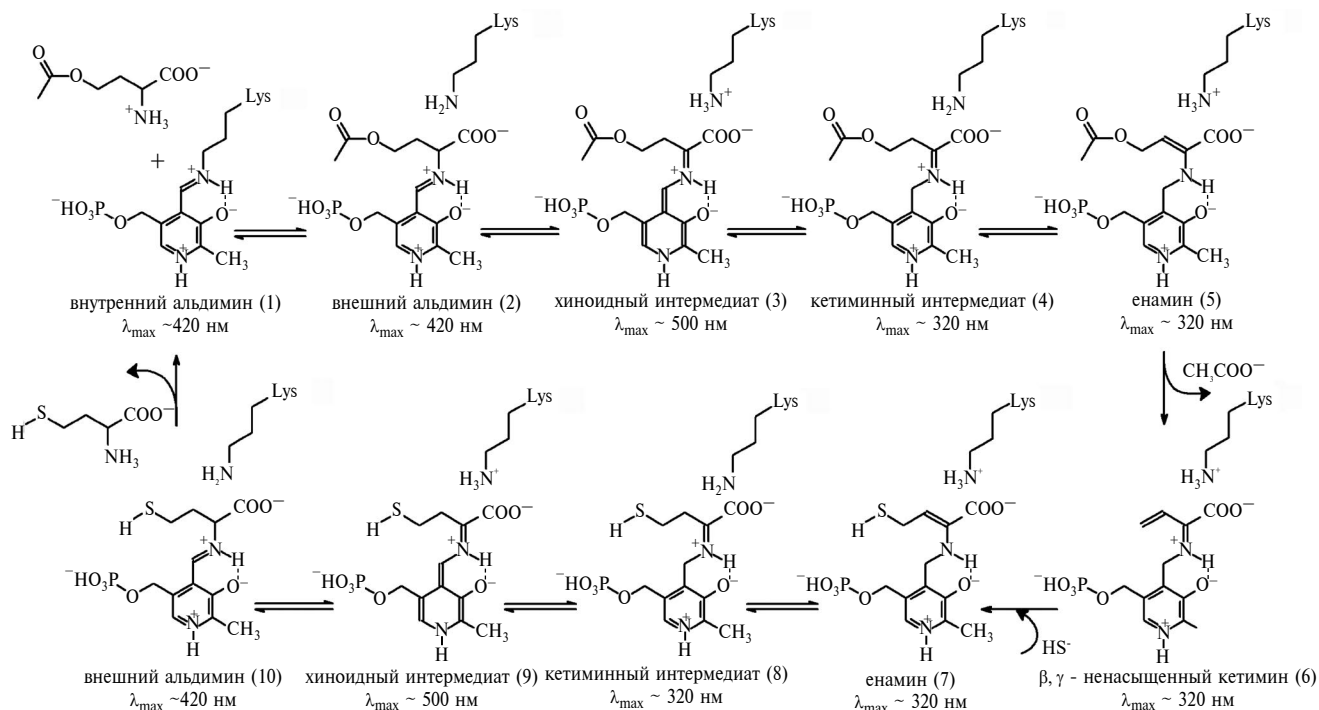


Рис. 4. Предполагаемый механизм реакции γ -замещения, катализируемой ОАHS.

В качестве источника серы фермент может использовать так же меркаптоэтанол, метилмеркаптан, этилмеркаптан [26, 31, 32]. Кроме того, в реакции γ -замещения *O*-ацетил-L-гомосерина, катализируемой ОАHS, в качестве присоединяемого нуклеофила может выступать азид, как в ОАHS из *C. glutamicum* [33] или диселенид, как в ферменте из дрожжей [34]. В литературе имеются ограниченные количество данных о каталитических параметрах реакции γ -замещения *O*-ацетил-L-гомосерина, катализируемой ОАHS из различных источников (табл. 1). Сродство к субстрату у разных ферментов варьируется в широком диапазоне в зависимости от микроорганизма (0.004–8.0 mM). Кинетические параметры реакции ($k_{\text{кат}}$ и $k_{\text{кат}}/K_M$) были определены только для четырех очищенных ферментов, наибольшую скорость реакции проявлял фермент из термофильной бактерии *Thermotoga maritima* (табл. 1), при этом эффективность катализа была в 1.6 раз выше у ОАHS из *Clostridium difficile* за счет меньшей величины K_M . Ферменты из другой термофильной бактерии *T. thermophilus* также обладали высокой активностью (табл. 1). Сульфгидрильная активность с *O*-ацетил-L-гомосерином и *O*-сукцинил-L-гомосерином была обнаружена в клеточных экстрактах *P. putida* и *P. aeruginosa* [10, 11]. Поскольку в данных бактериях присутствуют ферменты обоих путей биосинтеза метионина, активность с *O*-сукцинил-L-гомосерином может быть связана с наличием CGS, которая, как было отмечено выше, способна катализировать данную реакцию.

Температурный оптимум ОАHS из термофильных бактерий *T. thermophilus* и *T. maritima* составил 70°C, *B. stearothermophilus* – 60°C [18, 26, 28, 35]. pH оптимум ферментов из различных источников находился в диапазоне 7.0–8.0 [18, 25, 28, 36–39].

МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ

ПЛФ-зависимые ферменты используют один и тот же кофактор для катализа различных реакций, поэтому промежуточные стадии катализа имеют много общего [42], при этом белковая матрица обеспечивает реакционную и субстратную специфичность этих ферментов. Механизмы, посредством которых ПЛФ-зависимые ферменты контролируют переходные состояния кофактора в процессе катализа, исследуются при помощи рентгеноструктурного анализа и сайт-направленного мутагенеза. Для ряда ПЛФ-зависимых ферментов, участвующих в биосинтезе L-метионина, были получены мутантные формы [23, 38, 43–45], исследование которых позволило сделать предположения о роли отдельных аминокислотных остатков в катализе. Анализ кинетических и спектральных свойств, а также имеющихся кристаллических структур ферментов и комплексов фермент-ингибитор позволяет сделать предположение о механизме реакций, катализируемых этими ферментами [42, 39, 46–50].

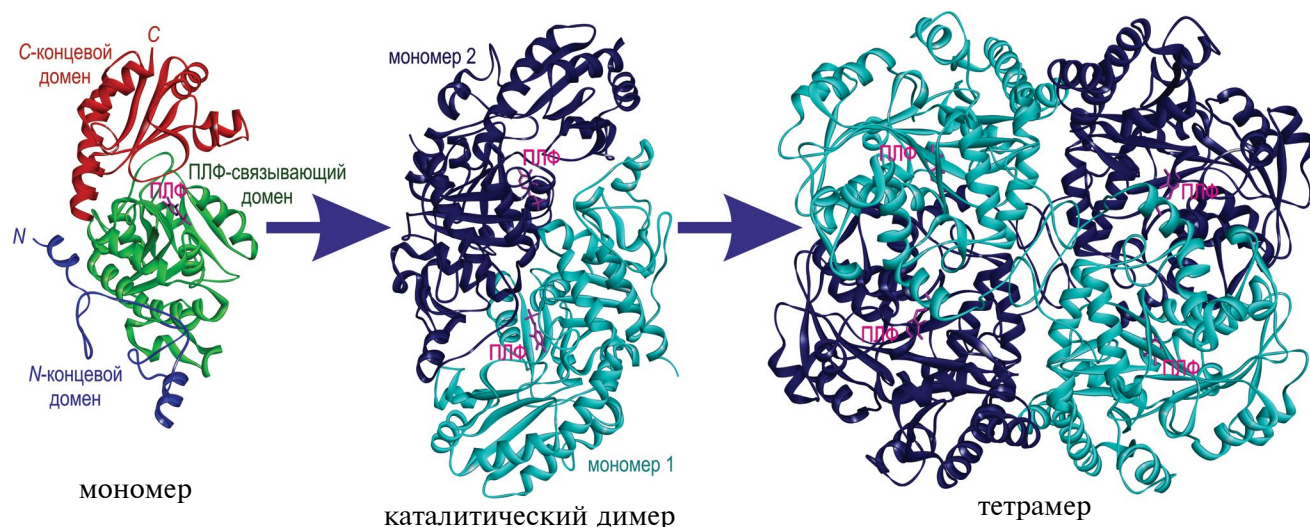


Рис. 5. Тетрамерная организация ОАHS на примере структуры фермента из *T. thermophilus* (pdb код 2ctz).

Предполагаемый механизм реакции γ -замещения, катализируемой ОАHS, включает несколько стадий (рис. 4). В активном центре фермента ПЛФ, связанный с остатком лизина, образует внутренний альдимин (1). При связывании *O*-ацетил-*L*-гомосерина происходит образование внешнего альдимина (2). Последующий отрыв $\text{C}\alpha$ -протона субстрата приводит к образованию хиноидного интермедиата (3), следствием протонирования $\text{C4}'$ -атома кофактора является образование кетимина (4). Дальнейший отрыв $\text{C}\beta$ -протона приводит к отщеплению ацетильной группы субстрата и образованию ключевого интермедиата ферментативной реакции – β, γ -ненасыщенного кетимина (6). Присоединение сульфид-иона к β, γ -ненасыщенному кетимину и последующий перенос протонов приводят к образованию второго хиноидного интермедиата (9), дальнейшее протонирование $\text{C}\alpha$ -положения которого приводит к образованию внешнего альдимина (10) и высвобождению продукта реакции – гомоцистеина. Для протекания реакции необходимо участие каталитического основания фермента на стадии отрыва $\text{C}\alpha$ - и $\text{C}\beta$ -протонов субстрата и кислотный катализ на стадии элиминирования γ -заместителя. Для ряда ПЛФ-зависимых ферментов было сделано предположение, что каталитическим основанием является аминокислота ПЛФ-связывающего остатка лизина [42]. Исследование мутантных форм ОАHS из *S. difficile* с заменами остатков Y52 и Y107 на аланин и фенилаланин позволило сделать предположение, что Y107 может выполнять функцию общего кислотного катализатора на стадии элиминирования ацетата [45].

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА И РОЛЬ ОТДЕЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ

ОАHS принадлежит к первому структурному классу ПЛФ-зависимых ферментов, подклассу CBL [42]. В настоящее время определены семь пространственных структур ОАHS из пяти источников: *T. thermophilus* (pdb 2CTZ, 2CB1) [18], *W. succinogenes* (pdb 3RI6) [51], *M. marinus* (pdb 4KAM) [52], *T. maritima* (pdb 7KB0, 7KB1) [28] и *S. jejuni* (pdb 4OC9). Функциональной единицей фермента является димер (рис. 5), однако, как и многие ПЛФ-зависимые ферменты, ОАHS существует в растворе в виде тетрамера или гексамера, что подтверждается как биохимическими, так и структурными данными [18, 27, 31, 36, 37, 51, 52]. Отдельный мономер представляет собой α/β белок, состоящий из 421–453 аминокислот, уложенных в 11–14 α -спиралей, несколько 3_{10} -спиралей и 11, 12 или 14 β -слоев (рис. 5). Мономер состоит из трех доменов, что характерно для всех ПЛФ-зависимых ферментов первого типа укладки, включая ферменты сульфурилирования, участвующие в биосинтезе метионина [42, 53]. Небольшой N-концевой домен состоит из двух α -спиралей, соединенных длинной петлей, способствует образованию тетрамера, а также совместно с аминокислотными остатками большого ПЛФ-связывающего домена соседней субъединицы формирует активный центр фермента. Большой ПЛФ-связывающий домен состоит из β -слоя, окруженного α -спиралями, и содержит большинство каталитических остатков активного центра (рис. 5, табл. 2), в том числе ковалентно связанный с ПЛФ остаток лизина, образующий внутренний альдимин. С-концевой домен содержит четырехслойную β -структуру, которая образует

Таблица 2. Роль остатков активного центра ОАHS с известными 3D структурами

Функциональная роль	Микроорганизм*					
	Cje	Mma	Tma	Tth1	Tth2	Wsu
	PDB код					
	4OC9	4KAM	7KB1	2CTZ	2CB1	3RI6
Образует водородную связь с фосфатной группой ПЛФ. Предположительно участвует в обеспечении оптимального положения каталитического кофермент-связывающего остатка лизина на стадиях элиминирования C-α-протона и боковой группы субстрата	Y53	Y67	Y58	Y52	Y50	Y53
Образует водородную связь с фосфатной группой ПЛФ	R55	R69	R60	R54	R52	R55
Взаимодействуют с фосфатной группой ПЛФ атомами азота главной цепи	G83	G97	G88	G82	G80	G83
	M84	Q98	Q89	H83	Q81	M84
Фенольное кольцо копланарно кольцу ПЛФ. Стабилизирует пиридиновое кольцо ПЛФ через π-стэкинг-взаимодействие. Увеличивает электронно-акцепторный характер кофактора	Y108	Y122	Y113	Y107	F105	F108
Ориентирует положение Tug108 (нумерация <i>C. jejuni</i>) в активном центре фермента	E151	E166	E157	E151	E147	E151
Образует солевой мостик с N1H атомом ПЛФ. Играет ключевую роль в стабилизации положительного заряда атома пиридина N1, тем самым повышая электрофильный характер кофактора	D180	D195	D186	D180	D176	D180
Ограничивает подвижность кольца ПЛФ (π-сигма взаимодействие с электронным кольцом кофактора). Азот амидной группы фиксирует положение боковой цепи Asp180 (нумерация <i>C. jejuni</i>), обеспечивая оптимальное расположение Asp180 для взаимодействия с N1H атомом пиридина	T182	T197	T188	T182	T178	T182
π-алкил взаимодействие с гидрофобной частью кольца ПЛФ, ограничивает подвижность кольца кофактора	V183	I198	V189	F183	F179	M183
Образуют водородные связи с фосфатной группой ПЛФ	S202	S217	S207	S203	S199	S202
	S204	T219	T209	T205	T201	T204
Образует внутренний альдимин с ПЛФ	K205	K220	K210	K206	K202	K205
Участвует в обеспечении оптимального положения каталитического кофермент-связывающего остатка лизина на стадиях элиминирования C-α-протона и боковой группы субстрата	N367	N379	N370	N366	N355	N352
Гуанидиновая группа аргинина взаимодействует с карбоксилатной группой субстрата	R402	R414	R405	R401	R390	R387

* Cje – *C. jejuni*, Mma – *M. marinum*, Tma – *T. maritima*, Tth – *T. thermophilus*, Wsu – *W. succinogenes*.

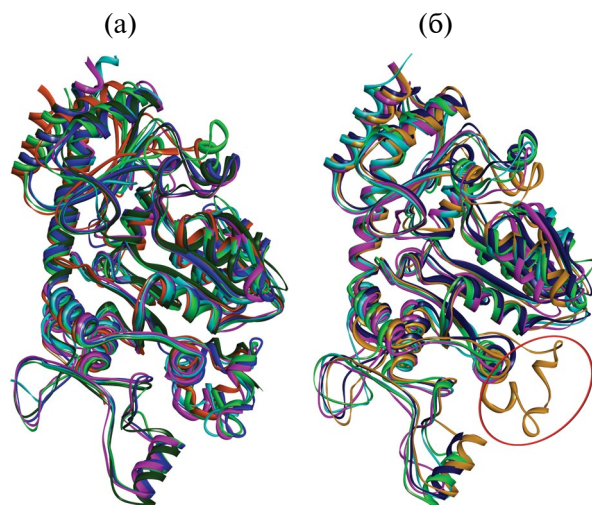


Рис. 6. Наложение полипептидных цепей (а) пространственных структур OASH из разных микроорганизмов: *C. jejuni* OASH (pdb код 4OC9) – темно-синий, *M. marinum* OASH (pdb код 4KAM) – голубой, *T. maritima* OASH (pdb код 7KB1) – пурпурный, *T. thermophilus* OASH (pdb код 2CTZ) – зеленый, *T. thermophilus* OASH (pdb код 2CB1) – темно-зеленый, *W. succinogenes* OASH (pdb код 3RI6) – оранжевый; (б) пространственных структур ферментов подкласса CBL: *T. maritima* OASH (pdb код 7KB1) – оранжевый, *Citrobacter freundii* метионин γ -лиаза МГЛ (pdb код 2RFV) – темно-синий, *Arabidopsis thaliana* CBL (pdb код 1IBJ) – голубой, *Nicotiana tabacum* CGS (pdb код 1I4I) – зеленый, *S. cerevisiae* цистатионин γ -лиаза (pdb код 1N8P) – пурпурный. Овалом выделен уникальный фрагмент, характерный для фермента OASH.

субстрат-связывающий карман в активном центре, закрытый α -спиралями. Активный центр OASH, расположенный на границе раздела димеров, образован аминокислотными остатками обеих субъединиц, таким образом, молекула гомотетрамера содержит четыре активных центра (рис. 5).

Пространственные укладки известных структур OASH схожи как между собой (рис. 6а), так и с пространственными укладками других ферментов подкласса CBL (рис. 6б), однако отличаются от последних уникальным фрагментом, состоящим из примерно 30 аминокислотных остатков [54], следующих после последнего β -листа ПЛФ-связывающего домена.

Вымачивание кристаллов OASH из *Thermotoga maritima* в растворе *O*-ацетил-L-гомосерина приводило к образованию стабильного промежуточного продукта в активном центре фермента (6 на рис. 4), то есть в отсутствие сульфид-иона реакция не могла дойти до завершения и протекала до стадии образования β , γ -ненасыщенного кетимина [28]. В пространственной структуре комплекса OASH с *O*-ацетил-L-гомосерином карбоксилат

этого промежуточного интермедиата образует солевой мостик с боковой группой остатка R405 (рис. 7), $S\beta$ - и $S\gamma$ -атомы располагаются в относительно просторном кармане на расстоянии около 3 Å от боковых цепей остатков K210 и Y58*. Для OASH из *Clostridioides difficile* было сделано предположение, что гомологичный остаток Y52* обеспечивает оптимальное положение ПЛФ-связывающего остатка K205 на стадиях отрыва $S\alpha$ -прото-на и ацетата [45]. В структурно похожем ферменте CGS в отсутствие второго субстрата (L-цистеина) β , γ -ненасыщенный кетимин таутомеризуется в винилглициновый хиноидный интермедиат и далее в α -аминокротонат с последующим его гидролизом до α -кетобутирата и аммиака [25, 38, 39]. Согласно биохимическим данным, полученным для OASH из нескольких источников, фермент не катализирует побочную реакцию γ -элиминирования *O*-ацетил-L-гомосерина [26, 27, 37, 40], что подтверждается и кристаллографическими данными о наличии стабильного β , γ -ненасыщенного кетимина (6 на рис. 4) в комплексе фермента с субстратом [28]. Метионин γ -лиаза является структурным гомологом OASH и также принадлежит к структурному подклассу CBL [42]. Для метионин γ -лиазы из *Citrobacter freundii* было показано, что остаток S339 необходим для эффективного катализа реакции γ -элиминирования [55]. Гомологичный остаток серина является консервативным для ферментов подкласса CBL, за исключением OASH [54]. В последовательностях OASH из различных источников положение остатка S339 занимают остатки аспарагина или гистидина, возможно, из-за отсутствия именно этого остатка OASH может катализировать только реакцию γ -замещения.

Анализ пространственной структуры OASH из *T. maritima* и CGS из *Xanthomonas oryzae* [56] позволил идентифицировать R270 активного центра как остаток, который препятствует связыванию *O*-сукцинил-L-гомосерина, а также обеспечивает строгую специфичность к бисульфиду в качестве второго субстрата за счет перекрывания доступа к активному центру более крупного субстрата – L-цистеина как источника серы [28]. Однако для OASH с доказанной функцией и определенными пространственными структурами из *T. thermophilus* и *W. succinogenes* в данной позиции находятся S258 и Q254 соответственно (рис. 3).

ИНГИБИТОРЫ И СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТА

Транссульфурирование и сульфгидрилирование регулируются метионином, ингибирующим ферменты обоих биосинтетических путей [57]. Ингибирование реакции γ -замещения OAH различными аминокислотами было исследовано для OASH из *C. difficile* и *C. novyi* [27, 37]. Конечный продукт

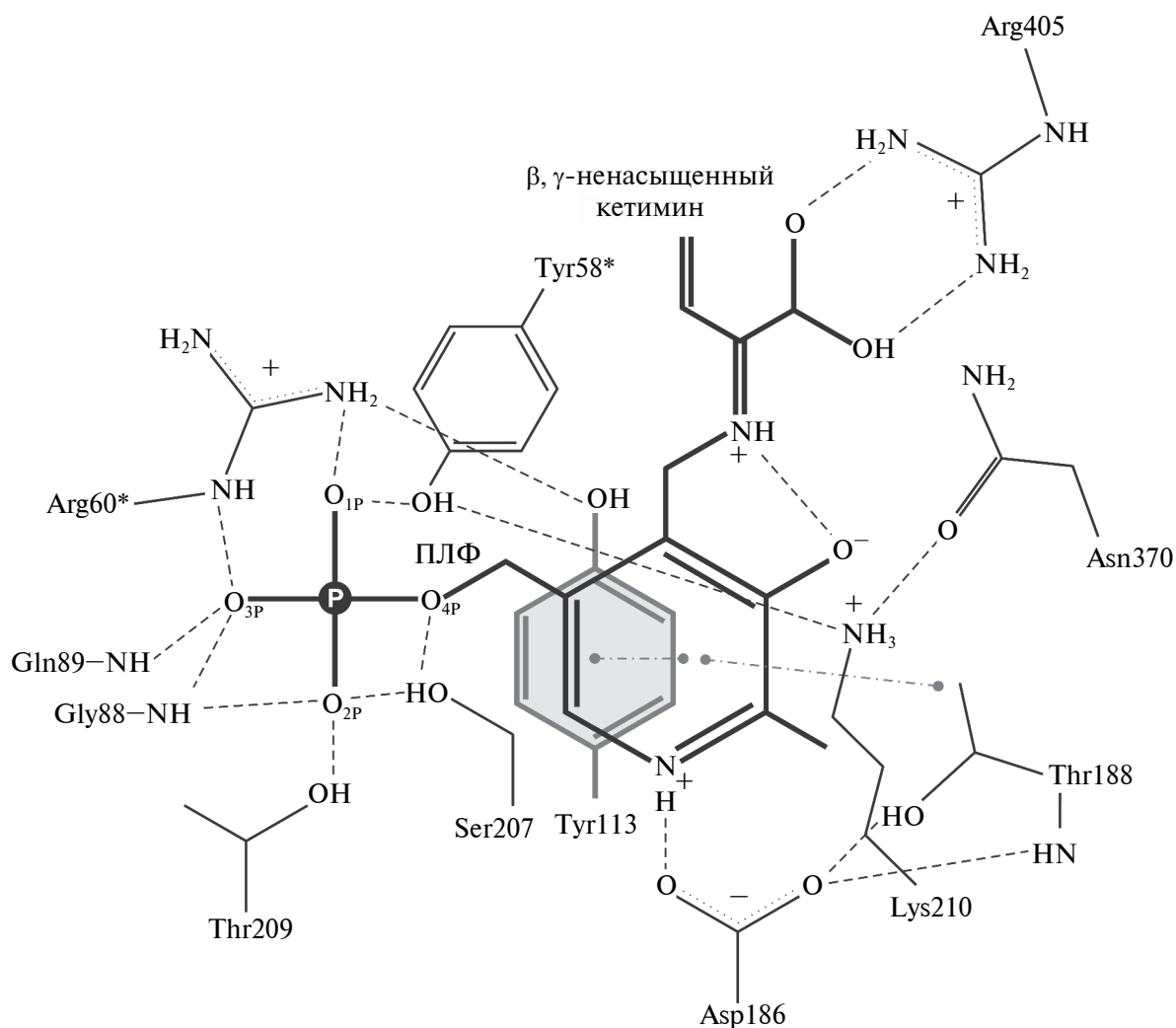


Рис. 7. Схема взаимодействий α,β -ненасыщенного кетимина с аминокислотными остатками активного центра ОАHS (нумерация *T. maritima*). Аминокислотные остатки соседнего мономера обозначены звёздочкой. Штриховыми линиями показаны водородные связи, штрих-пунктирными — π -взаимодействия.

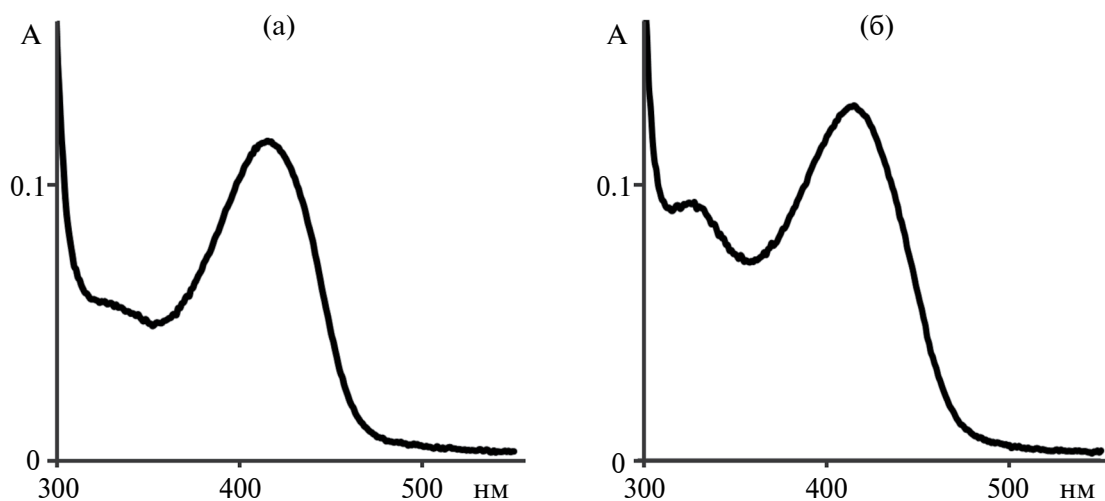


Рис. 8. Спектры поглощения ОАHS из *C. difficile* (а) и *C. novyi* (б) при pH 7.5.

биосинтетического пути L-метионин оказался конкурентным ингибитором фермента с величиной $K_i = 9$ мМ. N γ -ацетил-L-2,4-диаминомасляная кислота, которая является структурным аналогом субстрата, может останавливать каталитическую реакцию на стадии образования енамина (5 на рис. 4) из-за отсутствия уходящей группы в γ -положении. N γ -ацетил-L-2,4-диаминомасляная кислота обратимо ингибировала реакцию γ -замещения ОАН с величиной $K_i = 0.04$ мМ. Пропаргилглицин, являющийся суицидальным ингибитором пиридоксальных ферментов, участвующих в метаболизме серосодержащих аминокислот (цистатинин γ -лиазы, CGS и CBL), приводил к полной необратимой инактивации ОАНС из *C. difficile* [27]. Благодаря наличию ПЛФ в активном центре холофермент и его комплексы с аминокислотами обладают характерными спектрами поглощения, которые отражают состояние внутреннего альдимины и позволяют идентифицировать интермедиаты ферментативной реакции. Спектры поглощения ОАНС из *C. difficile* и *C. novyi* при pH 7.5 в области 300–550 нм имеют вид, типичный для внутренних альдиминов ПЛФ-зависимых ферментов, с основной полосой в области 415 нм и минорной в области 320 нм (рис. 8). Фермент из *T. thermophilus* имел похожий спектр поглощения с максимумом при 425 нм [18].

В спектрах поглощения комплексов ОАНС из *C. difficile* и *C. novyi* с L-метионином и N γ -ацетил-L-2,4-диаминомасляной кислотой интенсивность полосы в области 420 нм уменьшалась, а поглощение в области 320–360 нм увеличивалось, что может быть связано с изменением ионного состояния внешних альдиминов и их таутомеризацией, а также с поглощением интермедиатов, имитирующих промежуточные продукты реакции (рис. 4).

Для фермента из *T. thermophilus* было показано, что L-метионин и D, L-пропаргилглицин также ингибировали реакцию γ -замещения с ОАН [18, 35]. L-метионин являлся конкурентным ингибитором ОАНС из *S. cerevisiae* ($K_i = 0.9$ мМ) [36] и *C. glutamicum* [41]. Кроме того, O-ацетил-L-серин ($K_i = 21.8$ мМ), O-сукцинил-D, L-гомосерин ($K_i = 19.0$ мМ) и L-гомосерин ($K_i = 16.0$ мМ) ингибировали ОАНС дрожжей по конкурентному типу [36].

ЭВОЛЮЦИЯ ПУТИ БИОСИНТЕЗА МЕТИОНИНА В МИКРООРГАНИЗМАХ

Поскольку в некоторых микроорганизмах присутствует бифункциональная CGS, которая может участвовать в пути прямого сульфгидрирования, а также в присущем ей пути транссульфурирования, возникает вопрос эволюционного обоснования выбора микроорганизмами различных путей биосинтеза метионина. Для выяснения этого были проведены тесты на комплементацию *in vivo*

и филогенетический анализ ферментов, участвующих в биосинтезе метионина в микроорганизмах [58, 59]. Полученные данные, в комплексе с анализом субстратной специфичности, позволили сделать предположение, что общий предковый ген этих ферментов был способен действовать как сульфгидрилаза O-ацетил-L-гомосерина или O-сукцинил-L-гомосерина. У некоторых бактерий этот древний фермент, скорее всего, эволюционировал в CGS, тем самым сохранив способность использовать различные гомосеринэтерифицированные субстраты, а также различные источники серы, и, таким образом, сохранил мультисубстратную специфичность своего предка. В некоторых организмах этот предковый ген, вероятно, подвергся дупликации, в результате которой образовались отдельно CGS и сульфгидрилаза. Это привело к развитию двух параллельных путей получения метионина, транссульфурированию и прямому сульфгидрированию в этих организмах. Хотя оба пути существуют у нескольких организмов, большинство из них, по-видимому, используют один специфический путь биосинтеза метионина. Скорее всего, выбор микроорганизмами того или иного пути биосинтеза метионина связан с особенностями их внутреннего метаболизма и зависит от их естественной среды обитания.

ПРИМЕНЕНИЕ ОАНС ДЛЯ СИНТЕЗА АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Метионин применяется главным образом при производстве современных комплексных кормов для сельского хозяйства. Выявлено положительное влияние метионина на показатели продуктивности в животноводстве [60, 61]. Кроме того, метионин используется в фармацевтике и спортивном питании [62]. Промышленное получение L-метионина путем микробиологической ферментации является затруднительным ввиду строгой клеточной регуляции его биосинтеза, поэтому он производится преимущественно синтетическим путем, в результате чего образуется рацемическая смесь D, L-метионина [63]. Во многих живых организмах может усваиваться только L-форма, и именно она используется для синтеза гормонов, ферментов и других белков. Биологически активный L-метионин может быть получен ферментативным синтезом с использованием биоконверсии предшественников [64].

К настоящему времени многочисленные протеиногенные аминокислоты и некоторые специальные аминокислоты, важные для фармацевтики, производятся путем ферментации [24, 65]. В связи с этим является актуальным получение аминокислот и их производных при помощи изолированных ферментов. Такие бактерии как *E. coli*, *C. glutamicum* широко используются в промышленности для микробного синтеза аминокислот.

Ферментативный способ с применением определенных штаммов бактерий или дрожжей достаточно прост, но с другой стороны, микроорганизмы могут быть чувствительны к изменениям условий процесса, в частности pH, температуре.

В живых организмах ПЛФ-зависимые ферменты способны катализировать широкий спектр биохимических реакций с участием субстратов – аминокислот и их аналогов [66, 67]. По этой причине ПЛФ-зависимые ферменты вызывают интерес как инструмент в биотехнологии для производства ряда специфических аминокислот и их производных [68, 69]. Кроме того, тонкое регулирование метаболических путей, опосредуемых ПЛФ-зависимыми ферментами, является многообещающим подходом к продуцированию клетками неканонических аминокислот из простых источников углерода или предшественников [70]. Методами генной инженерии был создан метионин-штамм *E. coli* ауксотрофный по метионину, позволяющий получить L-азидогомоаланин из O-ацетил-L-гомосерина и азидата натрия и включить его в рекомбинантные белки-мишени [33]. В данной системе путь биосинтеза метионина у *E. coli* сначала был перенаправлен в сторону получения желаемой неканонической аминокислоты, используя широкую субстратную специфичность рекомбинантной ОАHS из *C. glutamicum*, а затем была достигнута экспрессия целевого белка барстар, которая сопровождалась эффективным включением L-азидогомоаланина вместо L-метионина [33].

В последние годы исследуются новые пути получения L-метионина с использованием свойств ОАHS. Биосинтез метионина подробно исследовался в *C. glutamicum* с целью использования этой бактерии как промышленного продуцента. В результате были созданы новые штаммы с повышенным производством L-метионина и S-аденозил-L-метионина [24, 32, 63, 71–74]. Замена естественного пути транссульфурирования в *E. coli* более распространенным путем прямого сульфгидрирования, используемым другими бактериями, привела к увеличению по сравнению с штаммом дикого типа выработки L-метионина у ауксотрофного штамма *E. coli* (MG1655) [75]. Для получения такого метионинового штамма из генома кишечной палочки были удалены гены CGS и CBL и добавлен ген ОАHS. ОАHS дрожжей, полученная из рекомбинантного штамма *E. coli* BL-21, была использована для получения L-метионина из O-ацетил-L-гомосерина и 3-метилтиопропиональдегида *in vitro* [76]. Известны примеры улучшения каталитических свойств ОАHS по сравнению с природным ферментом в реакции O-ацетил-L-гомосерина с метилмеркаптаном [77]. С целью получения эффективного продуцента L-метионина была получена мутантная форма ОАHS из *Rhodobacter sphaeroides* при помощи сайт-направленного

мутагенеза: ген ОАHS из *R. sphaeroides* с заменами трех аминокислотных остатков был клонирован в клетках *E. coli* K-12. В результате активность мутантной формы с заменами I3N, F65Y и V104A оказалась в 1.75 раз выше по сравнению с ферментом дикого типа [77].

Таким образом, представленные в настоящем обзоре данные позволяют рассматривать ОАHS как перспективный объект для использования ее в ферментативном синтезе L-метионина, других аминокислот, а также их производных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22–24–00255).

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. Cavuoto P., Fenech M.F. // Cancer Treat. Rev. 2012. V. 38. P. 726–736.
2. Finkelstein J.D. // J. Nutr. Biochem. 1990. V. 1. P. 228–237.
3. Stipanuk M.H. // Annu. Rev. Nutr. 2004. V. 24. P. 539–577.
4. Locasale J.W. // Nat. Rev. Cancer. 2013. V. 13. P. 572–583.
5. Neubauer C., Landecker H. // Lancet Planet Health. 2021. V. 5. P. 560–569.
6. François J.M. // Biotechnol. Adv. 2023. V. 19. P. 108259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108259>
7. Born T.L., Blanchard J.S. // Biochemistry. 1999. V. 38. P. 14416–14423.
8. Clausen T., Huber R., Laber B., Pohlenz H.D., Messerschmidt A. // J. Mol. Biol. 1996. V. 262. P. 202–224.
9. Ferla M.P., Patrick W.M. // Microbiology. 2014. V. 160. P. 1571–1584.
10. Foglino M., Borne F., Bally M., Ball G., Patte J. // Microbiology. 1995. V. 141. P. 431–439.
11. Vermeij P., Kertesz M.A. // J. Bacteriol. 1999. V. 181. P. 5833–5837.
12. Hwang B.J., Kim Y., Kim H.B., Hwang H.J., Kim J.H., Lee H.S. // Mol. Cells. 1999. V. 9. P. 300–308.
13. Hwang B.J., Yeom H.J., Kim Y., Lee H.S. // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 1277–1286.
14. Lee H., Hwang B. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 62. P. 459–467.
15. Belfaiza J., Martel A., Margarita D., Saint Girons I. // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 250–255.
16. Picardeau M., Bauby H., Saint Girons I. // FEMS Microbiol. Lett. 2003. V. 225. P. 257–262.

17. Yamagata S., Ichioka K., Goto K., Mizuno Y., Iwama T. // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 2086–2092.
18. Shimizu H., Yamagata S., Masui R., Inoue Y., Shibata T., Yokoyama S. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2001. V. 1549. P. 61–72.
19. Yoshida Y., Negishi M., Nakano Y. // FEMS Microbiol. Lett. 2003. V. 221. P. 277–284.
20. Bairoch A. // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. P. 304–305.
21. UniProt Consortium // Nucleic Acids Res. 2023. V. 51 (D1). D523–D531.
22. Auger S., Yuen W.H., Danchin A., Martin-Verstraete I. // Microbiology. 2002. V. 148. P. 507–518.
23. Farsi A., Lodha P.H., Skanes J.E., Los H., Kalidindi N., Aitken S.M. // Biochem. Cell Biol. 2009. V. 87. P. 445–457.
24. Shim J., Shin Y., Lee I., Kim S.Y. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2017. V. 159. P. 153–177.
25. Aitken S.M., Kim D.H., Kirsch J.F. // Biochemistry. 2003. V. 42. P. 11297–11306.
26. Omura H., Ikemoto M., Kobayashi M., Shimizu S., Yoshida T., Nagasawa T. // J. Biosci. Bioeng. 2003. V. 96. P. 53–58.
27. Kulikova V.V., Revtovich S.V., Bazhulina N.P., Anufrieva N.V., Kotlov M.I., Koval V.S. et al. // IUBMB Life. 2019. V. 71. P. 1815–1823.
28. Brewster J.L., Pachl P., McKellar J.L., Selmer M., Squire C.J., Patrick W.M. // J. Biol. Chem. 2021. V. 296. P. 100797.
29. Ferla M.P., Brewster J.L., Hall K.R., Evans G.B., Patrick W.M. // Mol. Microbiol. 2017. V. 105. P. 508–524.
30. Krishnamoorthy K., Begley T.P. // J. Am. Chem. Soc. 2011. V. 133. P. 379–386.
31. Brzywczy J., Yamagata S., Paszewski A. // Acta Biochim. Pol. 1993. V. 40. P. 421–428.
32. Bolten C.J., Schröder H., Dickschat J., Wittmann C.J. // Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 20. P. 1196–1203.
33. Ma Y., Biava H., Contestabile R., Budisa N., di Salvo M.L. // Molecules. 2014. V. 19. P. 1004–1022.
34. Dauplais M., Bierla K., Maizeray C., Lestini R., Lobinski R., Pierre Plateau P. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22: 2241. <https://doi.org/10.3390/ijms22052241>.
35. Iwama T., Hosokawa H., Lin W., Shimizu H., Kawai K., Yamagata S. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2004. V. 68. P. 1357–1361.
36. Yamagata S. // J. Biochem. 1971. V. 70. P. 1035–1045.
37. Kulikova V.V., Anufrieva N.V., Kotlov M.I., Morozova E.A., Koval V.S., Belyi Y.F. et al. // Protein Expr. Purif. 2021. V. 180. P. 105810.
38. Aitken S.M., Kirsch J.F. // Arch. Biochem. Biophys. 2005. V. 433. P. 166–175.
39. Brzovic P., Holbrook E.L., Greene R.C., Dunn M. // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 442–451.
40. Kerr D.S. // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. P. 95–102.
41. Hwang B.J., Park S.D., Kim Y., Kim P., Lee H.S. // J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 17. P. 1010–1017.
42. Messerschmidt A., Worbs M., Steegborn C., Wahl M. C., Huber R., Laber B., Clausen T. // Biol. Chem. 2003. V. 384. P. 373–386.
43. Aitken S.M., Lodha P.H., Morneau, D.J.K. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 814. P. 1511–1517.
44. Lodha P.H., Jaworski A.F., Aitken S.M. // Protein Sci. 2010. V. 19. P. 383–391.
45. Куликова В.В., Ревтович С.В., Лыфенко А.Д., Морозова Е.А., Коваль В.С., Бажулина Н.П. и др. // Биохимия. 2023. Т. 88. С. 737–747.
46. Clausen T., Huber R., Laber B., Pohlenz H.-D., Messerschmidt A. // J. Mol. Biol. 1996. V. 262. P. 202–224.
47. Clausen T., Huber R., Messerschmidt A., Pohlenz H.D., Laber B. // Biochemistry. 1997. V. 36. P. 12633–12643.
48. Clausen T., Huber R., Prade L., Wahl M.C., Messerschmidt A. // EMBO J. 1998. V. 23. P. 6827–6838.
49. Steegborn C., Messerschmidt A., Laber B., Streber W., Huber R., Clausen T. // J. Mol. Biol. 1999. V. 290. P. 983–996.
50. Breiteringer U., Clausen T., Ehlert S., Huber R., Laber B., Schmidt F. et al. // Plant Physiol. 2001. V. 126. P. 631–642.
51. Tran T., Krishnamoorthy K., Begley T.P., Ealick S.E. // Acta Cryst. 2011. V. D67. P. 831–838.
52. Baugh L., Phan I., Begley D.W., Clifton M.C., Armour B. et al. // Tuberculosis (Edinb). 2015. V. 95. P. 142–148.
53. Wahl M.C., Huber R., Prade L., Marinkovic S., Messerschmidt A., Clausen T. // FEBS Lett. 1997. V. 414. P. 492–496.
54. Ревтович С.В., Морозова Е.А., Ануфриева Н.В., Котлов М.И., Белый Ю.Ф., Демидкина Т.В. // Докл. АН. 2012. Т. 445. № 2. С. 214–220.
55. Ануфриева Н.В., Морозова Е.А., Ревтович С.В., Бажулина Н.П., Тимофеев В.П., Ткачев Я.В. и др. // Acta Naturae. 2022. Т. 14. С. 4–15.
56. Ngo H.-P.-T., Kim J.-K., Kim S.-H., Pham T.-V., Tran T.-H., Nguyen D.-D., Kim J.-G., Chung S., Ahn Y.-J., Kang L.-W. // Acta Crystallogr. Sect. F. 2012. V. 68. P. 1515–1517.
57. Mondal S., Das Y.B., Chatterjee S.P. // Folia Microbiol (Praha). 1996. V. 41. P. 465–472.
58. Hacham Y., Gophna U., Amir, R. // Mol. Biol. Evol. 2003. V. 20. P. 1513–1520.
59. Gophna U., Baptiste E., Doolittle W.F., Biran D., Ron E.Z. // Gene. 2005. V. 1. P. 48–57.
60. Jankowski J., Ognik K., Konieczka P., Dariusz Mikulski D. // Poult. Sci. 2020. V. 99. P. 4730–4740.

61. Konieczka P., Tykałowski B., Ognik K., Kinsner M., Szkopek D., Wójcik et al. // Vet. Res. 2022. V. 26 P. 59. <https://doi.org/10.1186/s13567-022-01080-7>.
62. Navik U., Sheth V.G., Khurana A., Jawalekar S.S., Allawadhi P., Gaddam R.R., Bhatti J.S., Tikoo K. // Ageing Res. Rev. 2021. V. 72. P. 101500.
63. Li Y., Cong H., Liu B., Song J., Sun X., Zhang J., Yang Q. // Antonie Van Leeuwenhoek. 2016. V. 109. P. 1185–1197.
64. Kumar D., Gomes J. // Biotechnol Adv. 2005. V. 23. P. 41–61.
65. Hashimoto S.-I. // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2017. V. 159. P. 15–34.
66. Eliot A. C., Kirsch J. F. // Annu. Rev. Biochem. 2004. V. 73. P. 383–415.
67. Paiardini A., Contestabile R., Buckle A.M., Cellini B. // Biomed. Res. Int. 2014. Article ID856076. <https://doi.org/10.1155/2014/856076>.
68. Omura H., Ikemoto M., Kobayashi M., Shimizu S., Yoshida T., Nagasawa T. // J. Biosci. Bioeng. 2003. V. 96. P. 53–58.
69. Di Salvo M.L., Fesko K., Phillips R.S., Contestabile R. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. V. 8. Article ID52. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00052>.
70. Ravikumar Y., Nadarajan S.P., Yoo T.H., Lee C.-S., Yun H. // Biotechnol. J. 2015. V. 10. P. 1862–1876.
71. Ковалева Г.Ю., Гельфанд М.С. // Молекулярная биология. 2007. Т. 41. № 1. С. 139–150.
72. Park S.D., Lee J.Y., Sim S.Y., Kim Y., Lee H.S. // Metab. Eng. 2007. V. 9. P. 327–336.
73. Han G., Hu X., Qin T., Li Y., Wang X. // Enzyme Microb. Technol. 2016. V. 83. P. 14–21.
74. Qin T., Hu X., Hu J., Wang X. // Biotechnol. Appl. Biochem. 2015. V. 62. P. 563–573.
75. Gruzdev N., Hacham Y., Haviv H., Stern I., Gabay M., Bloch I. et al. // Microbial Cell Factories. 2023. V. 22:151 <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02150-x>
76. Wang H., Li Y., Che Y., Yang D., Wang Q., Yang H. et al. // J. Agric. Food Chem. 2021. V. 69. P. 7932–7937.
77. Кум С.Й., Син Й.Ю., Сео Ч.И., Сон С.К., Хео И.К., Лу Х.Д., Кум Д.Е., Кум Х.А., Бае Д.Й., Ха К.Х. Патент РФ 2011. № 2573 928 С2.

***O*-Acetylhomoserine Sulfhydrylase as a Key Enzyme of Direct Sulfhydrylation in Microbial Methionine Biosynthesis**

**V. V. Kulikova^{a,*}, E. A. Morozova^a, A. D. Lyfenko^a, V. S. Koval^a, N. V. Anufrieva^a,
P. N. Solov'ev^a, and S. V. Revtovich^a**

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

^{*}*e-mail: vitviku@yandex.ru*

Methionine biosynthesis in most microorganisms proceeds in two alternative ways. Each pathway is catalyzed by independent enzymes and is tightly regulated by methionine. The transsulfurylation pathway involves the formation of a cystathionine, and cysteine acts as a source of sulfur. The enzymes of this metabolic pathway are characterized in detail. The direct sulfhydrylation pathway involves the synthesis of homocysteine with the participation of an inorganic sulfur source directly from *O*-acetylhomoserine and is predominant in most classes of bacteria. The subject of this review is the properties and functioning of one of the least studied enzymes of the direct sulfhydrylation pathway – *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase. A deep understanding of the mechanisms controlling the substrate and reaction specificity of *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase is a necessary step in the rational redesign of the enzyme in order to create a promising catalyst for the synthesis of methionine and its derivatives, as well as, in combination with crystallographic data, for the development of new antimicrobial compounds based on effective enzyme inhibitors.

Keywords: *O*-Acetylhomoserine Sulfhydrylase, methionine biosynthesis, direct sulfhydrylation

УДК 579.222, 579.64, 504.062

ГИДРОФОБИНЫ ГРИБОВ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ (ОБЗОР)

© 2024 г. Е. В. Лопатухин¹, Ю. А. Ихалайнен², Н. Н. Маркелова¹,
А. Е. Куварина¹, *, В. С. Садыкова¹, **

¹Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе,
Москва, 119021 Россия

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

*e-mail: nastena.lysenko@mail.ru

**e-mail: sadykova_09@mail.ru

Поступила в редакцию 11.12.2023 г.

После исправления 10.01.2024 г.

Принята к печати 10.01.2024 г.

В обзоре обобщена актуальная информация о гидрофобинах — низкомолекулярных белках, синтезируемых мицелиальными грибами и являющимися одним из сильнейших клеточных биосурфактантов. Представлена структура различных классов гидрофобин и спектр его природных и синтетических изоформ, биологическая активность и роль в регуляции процессов жизнедеятельности продуцентов. Продемонстрирован потенциал использования гидрофобин в биотехнологии.

Ключевые слова: гидрофобины, белки, поверхностно-активные вещества, биологическая активность

DOI: 10.31857/S0555109924030026 EDN: EXDOZL

Исторически термин “гидрофобин” использовался для описания любых гидрофобных соединений, входящих в структуру микробных мембран, однако в настоящий момент этим термином обозначается семейство белков, секретируемых мицелиальными грибами. Одной из особенностей этой группы соединений являются их уникальные поверхностно активные свойства, в том числе — способность к самоорганизации на границах раздела фаз [1]. Гидрофобины адсорбируются на твердых поверхностях и локализуются на границах раздела гидрофобных (воздух, масло или воск) и гидрофильных (вода или клеточная стенка) фаз [2]. Они растворяются в концентрациях ниже критической концентрации мицеллообразования, а при более высоких концентрациях образуют димеры, тетрамеры и другие многомерные формы в растворе [3]. Роль гидрофобин в росте и развитии грибов тесно связана с их уникальными физико-химическими свойствами: формирование слоя гидрофобин на границе раздела фаз позволяет уменьшить поверхностное натяжение и облегчить формирование воздушных гиф мицелия, а также изменить смачиваемость их поверхности и обеспечить прилипание гиф к гидрофобным поверхностям.

Структурное разнообразие гидрофобин. Гидрофобины — белки с относительно небольшой молекулярной массой (5–20 кДа), имеющие в своей

структуре от 50 до 200 аминокислот в зависимости от конкретного белка [4]. На основании физико-химических и структурных особенностей выделяют 2 класса гидрофобин [5]. Для обоих классов характерно наличие консервативных участков в аминокислотной последовательности (~18% для класса I и ~37% для класса II) [6]. Разделение на два класса основывается на распределении цистеинов и кластеризации гидрофильных и гидрофобных остатков: гидрофобины I класса характеризуются наличием 8 цистеинов, которые образуют 4 дисульфидные связи [7]. Гидрофобины I класса подразделяют на два подкласса: класс IA, гены которого обнаружены у аскомицетовых грибов, и класс IB, выделяемые только из базидиальных грибов [8]. Некоторые гидрофобины, секретируемые грибами видов *Aspergillus*, выделяют в отдельный класс III за счет отличного положения дисульфидных связей и наличия дополнительных цистеинов в первичной структуре. Для *Trichoderma* описаны гидрофобины неизвестного класса и псевдокласс I [9]. На рисунке 1 представлено схематичное изображение гидрофобин I, II и III классов с описанием положения дисульфидных связей.

Одной из особенностей структуры гидрофобин I класса является открытая “полубочковая” конформация белка в растворе, возможная благодаря относительно коротким участкам β-листов, которые не

образуют между собой водородных связей [11]. Благодаря этому, для этого класса гидрофобинов характерно наличие структурного ядра, ответственного за формирование полимерных структур, называемых “палочки”, которые структурно схожи с фибриллами β -амилоида [12]. Данные структуры образуются на границах раздела фаз и являются крайне устойчивыми, слабо деградируя в растворах сильных кислот и щелочей, а также додецилсульфата натрия даже при нагревании [13]. Для них также характерна хорошая растворимость в растворах трифторуксусной и муравьиной кислот, притом, после удаления кислоты и растворения в воде, эти формы гидрофобинов повторно сворачиваются, сохраняя ту же мономерную структуру, которая наблюдалась до растворения в трифторуксусной кислоте [14]. Гидрофобины класса I имеют три области гидрофобных петель (петли Cys3–Cys4, Cys4–Cys5 и Cys7–Cys8) [15]. На основании аминокислотных последовательностей предполагается, что гидрофобины класса III образуют палочки, схожие с гидрофобинами класса I [6].

Гидрофобины класса II образуют высокоупорядоченные самоорганизующиеся слои, которые лишены морфологии палочек класса I. Гидрофобины класса II имеют более короткие петли Cys3–Cys4 и Cys7–Cys8, чем гидрофобины класса I, а гидрофобная область занимает меньшую часть поверхности, чем у гидрофобин класса I [9]. Благодаря этому, белки данного класса легко растворяются в спиртовых растворах и растворе 2% додецилсульфата натрия [12]. Во время самосборки на границе раздела воздух/вода у белков класса II, в отличие от I, не наблюдаются изменения вторичной структуры [16]. Изменения в структуре белка также влияют и на его свойства: например, гидрофобины класса II имеют большую склонность к пенообразованию, чем класс I, но хуже адгезируют к поверхностям [17]. Все это обусловлено наличием водородных связей между β -листами в белке, что препятствует образованию амилоидных структур [11].

Для гидрофобин не характерно наличие пост-трансляционных модификаций, однако для некоторых белков было описано гликозилирование остатками маннозы по треонину в различных положениях [18]. Отмечается, что данная модификация не влияет на способность белков к образованию упорядоченных структур на границах раздела фаз. Описана также трансформация белков этого класса, индуцированная продолжительным хранением их растворов при различных значениях pH [19]: в нейтральных и щелочных средах наблюдается деаминация аспаргинов, а также расщепление пептидных связей, в результате нуклеофильной атаки атомом азота амидной группы карбонильного атома углерода. Первый процесс, в силу кинетических особенностей, является более распространенным, в связи с чем свойства растворов не сильно изменяются при хранении, так как доля

расщепленных белков остается достаточно низкой даже при высоких значениях pH, а деаминированные формы не влияют на способность гидрофобин к агрегации.

Продуценты гидрофобин, особенности генной организации и их функциональная роль в онтогенезе грибов. Гидрофобины, относящиеся к классу I, обнаружены у мицелиальных грибов отделов *Ascomycota* и *Basidiomycota*, тогда как гидрофобины класса II – встречаются только среди видов *Ascomycota*. Класс III продуцируется аскомицетами *Aspergillus*. Основные продуценты гидрофобин приведены в таблице 1. Гидрофобины класса II демонстрируют большую консервативность аминокислот между остатками цистеина, гидрофобины класса I соответствуют известной консенсусной последовательности C-X₅₋₇-C-C-X₁₉₋₃₉-C-X₈₋₂₃-C-X₅-C-C-X₆₋₁₈-C-X₂₋₁₃ [35,73]. Гидрофобины присутствуют у общего предка аскомицетов и базидиомицетов, и анализ геномов грибов показал, что гены, кодирующие гидрофобины, у большинства видов образуют в геномах мультигенные семейства, возникшие в результате эволюции путем дупликации первичной последовательности. В подтверждение этому были выявлены псевдогены, представляющие один из вариантов эволюционного сценария – инактивацию генов из-за накопления вредных мутаций. Некоторые гены гидрофобин, образованные последовательностями паралогов, сгруппированы в кластеры. Такое расположение может быть результатом появления новых копий генов в геноме за счет дупликаций, о чем свидетельствует филогенетический анализ белков, в ходе которого выявлена высокая степень сходства их последовательностей. В то же время часть генных кластеров может быть потеряна в результате гомологичной рекомбинации [74].

Гидрофобины II класса HFBIII могут иметь молекулярные функции, связывающие белки (GTP-связывающий белок) и патогенез, что позволяет предположить возможность их роли в качестве белков – эффекторов. Анализ последовательности и филогенетический анализ подтвердили для гидрофобин II класса эволюционную консервативность (на уровне сайта). Масс-спектрометрический анализ белков подтвердил у них наличие консервативного пролина (2), глицина (2) и цистеина (8), что обеспечивает жесткость и стабильность их структур. Анализ вторичной структуры показал наличие одной спирали и двух β -листов, расположенных в области доменов HFBIII.

Из базы данных NCBI были извлечены геномные последовательности 45 белков – гидрофобин класса II с разными аминокислотными последовательностями. Выходные данные физико-химических свойств для этих белков, включая молекулярную массу, теоретическое значение изоэлектрической точки, индекс нестабильности,

алифатический индекс, и GRAVY были проанализированы с использованием инструмента ExPASy ProtParam. Физические и химические параметры могут определять поведение и стабильность белков в разных условиях *in vitro* [75].

Большинство идентифицированных генов гидрофобин состоят из трех экзонов, но встречаются гены гидрофобин с двумя экзонами, также был обнаружен ген квадروهидрофобина (A9K55_003394) в геноме *C. militaris*, который в отличие от других генов гидрофобин *Cmhyd* этого вида не содержит интронов [35]. Количество генов гидрофобина может варьировать между видами грибов. У базидиомицетов, например, количество копий — от 1 до 40. Различия в количестве копий генов гидрофобина у аскомицетов связывают с образом жизни грибов: при среднем показателе 5–6 копий на геном, более 70% представлены гидрофобином класса II. Самое большое количество генов, кодирующих гидрофобины, выявлено у микопаразитических грибов, наименьшее — у сапротрофных грибов, в среднем 3,7, что указывает на вероятное участие гидрофобин в антагонистических взаимодействиях грибов. Некоторые виды, такие как *Tolypocladium paradoxum*, *T. harzianum* и *Clonostachys rosea*, содержат только гидрофобины класса II [35, 74].

Благодаря схожим свойствам между гидрофобинами (особенно класса II) и эффекторными белками фитопатогенов, многие исследователи предполагают возможную роль гидрофобин класса II во взаимодействиях грибов и растений. Роль генов гидрофобин класса II в патогенезе была продемонстрирована на некоторых грибах. Гидрофобин MHP1 рисового патогена *Magnaporthe grisea* определяет его патогенность. Трансформанты, в которых MHP1 был инактивирован, формировали гифы, смачиваемые детергентом. У мутантов по гену *mhp1* снижалось образование и прорастание конидий, а многие конидии несли дефекты в клеточных органеллах и быстро теряли жизнеспособность, проявляя также пониженную способность заражать и колонизировать восприимчивые растения [76]. У микопаразитического гриба *T. longibrachiatum* гидрофобин II типа проявляет прямую противогрибковую активность. В очень низких дозах стимулирует рост растений, устойчивость к болезням, активируя оксипин, фиталексин, активные формы кислорода, супероксиддисмутазу и образование белков, связанных с патогенезом. Направленный нокаут соответствующего гена *Hyt101* значительно снижает как антагонистическую активность, так и стимуляцию роста растений [48]. Крипарин — гидрофобин класса II из аскомицета *Cryphonectria parasitica*, одного из самых разрушительных патогенов растений, действует как фактор патогенности, способствует прорастанию плодовых тел гриба через кору дерева-хозяина.

Удаление гена, кодирующего крипарин, приводит к фенотипу легко смачиваемых гиф, а при выращивании на естественном субстрате мутанты не могут производить полноценные плодовые тела [77]. Несмотря на информацию о роли гидрофобин второго класса в патогенезе грибов, роль этих белков в защите растений до сих пор остается неясной [78].

Гидрофобины класса I также участвуют в патогенезе, изменяя свойства поверхности. Это свойство является отличительной чертой всех гидрофобин, при этом гидрофобины класса I образуют монослой, состоящие из цилиндрических амилоидных наноструктур. Исследования гидрофобин класса I, полученных рекомбинантным путем, включая RodA и RodB из *Aspergillus fumigatus*, MPG1 из *Magnaporthe oryzae*, DewA из *Aspergillus nidulans* и EAS из *Neurospora crassa*, показали, что они образуют функциональные бета-амилоидные микроволокна, которые самоорганизуются в слой с морфологией палочек [79]. RodA покрывает стенку конидий *A. fumigatus*, придавая ей гидрофобные характеристики и укрывая от мукоцилиарного клиренса в дыхательных путях хозяина. Кроме того, экспрессия гидрофобин повышается во время развития биопленок. Мутанты RodA подвержены фагоцитозу альвеолярными макрофагами [80]. Нативные или мутированные белки RodA сами по себе иммунологически молчат. Гидрофобины маскируют молекулярные структуры, связанные с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP), у фагоцитов, и только появление различных молекул углеводов и белков на конидиальной поверхности мутантов RodA приводит к активации клеток врожденного иммунитета [81].

Геном многих грибов содержит избыточное количество функционально идентичных генов гидрофобин. Поэтому, потеря некоторых из них не вызывает нарушения тех или иных функций. Например, индуцированная делеция каждого гена гидрофобина у *Fusarium graminearum* не приводила к снижению у него формирования конидий и вирулентности. Безусловно, наличие многих копий генов гидрофобин свидетельствует об их важной роли в экологии гриба. В других случаях также показана тесная связь между гидрофобинами и приспособляемостью грибов к различным условиям среды. Гидрофобин HFB4 у *T. guizhouense* и *T. harzianum* играет противоположные роли в распространении грибов в воздухе. Потеря *hfb4* у *T. harzianum* увеличивает его способность к воздушному рассеянию, а у *T. guizhouense* — уменьшает его распространение в воздухе, но усиливает в воде. Исследование роли всего семейства генов гидрофобин у фитопатогенного гриба *P. expansum* показало, что потеря гидрофобина приводит, с одной стороны, к нарушению распространения спор, с другой — повышает колонизацию растения-хозяина [82, 83].

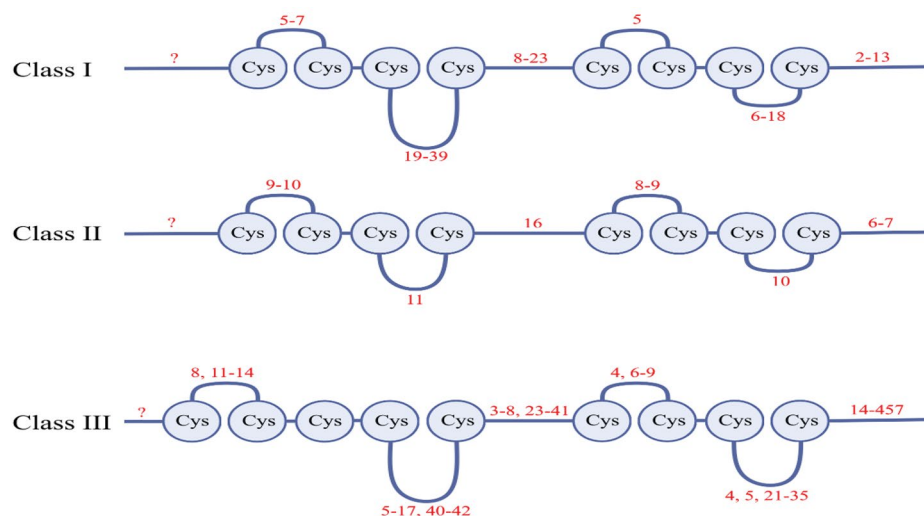


Рис. 1. Первичная структура гидрофобин. Синими линиями обозначена аминокислотная последовательность, красными цифрами обозначена длина цепи, кружки “Cys” — цистеины в аминокислотной цепи [10].

Перспективы использования гидрофобин в медицинских и сельскохозяйственных биотехнологиях, промышленности. Благодаря своей необычной структуре и свойствам, применение гидрофобин крайне разнообразно. Амфипатическая природа гидрофобин способствует их применению как систем для доставки гидрофобных лекарственных препаратов. Таким образом, гидрофобин являются эффективными адъювантами для улучшения растворимости, стабильности и биодоступности лекарственных средств. Также среди последних применений гидрофобин можно назвать поверхностные покрытия, диспергирование гидрофобных материалов в водных растворах, предотвращение образования пены в производственных процессах, очистка рекомбинантных белков, производство самоочищающихся материалов [84, 85] и создание биоматериалов [86, 87]. В медицинской биотехнологии гидрофобин, благодаря своим гидрофильным свойствам, увеличивают адгезию клеток к некоторым поверхностям и, таким образом, позволяют создать биосовместимые материалы [88, 89]. Способность гидрофобин образовывать высокостабильные эмульгаторы имеет решающее значение при приготовлении стабильных растворов в фармацевтических целях [86, 90]. Кроме того, гидрофобин были предложены и для иммобилизации белков [16]. При этом использование гидрофобин в нанобиотехнологических приложениях может повысить чувствительность [91], качество и срок службы биосенсоров [92].

Биосенсоры являются передовым достижением для быстрой диагностики количества различных по химической природе веществ и представляют собой эффективный альтернативный способ традиционным методам анализа содержания различных компонентов в реакционной смеси [93]. Например,

гидрофобин были использованы М. Тао с коллегами для резонаторов акустических волн, позволяющие разработать чувствительную систему с возможностью обнаружения летучих органических соединений (ЛОС) [94]. ЛОС представляют собой биомаркеры ряда заболеваний [95], таким образом, их обнаружение и количественная оценка очень важны. Покрытие, полученное в результате капельного нанесения гидрофобина HFBI из *Trichoderma reesei* на мембрану, позволило улучшить адсорбцию биосенсора за счет отрицательно заряженной природы HFBI. А. Пискителли с соавторами разработали глутатион-S-трансферазу на основе биосенсора для обнаружения пестицидов, таких как молинат и каптан, в водных пробах окружающей среды. Авторы получали рекомбинантно вырабатываемый с помощью *Escherichia coli* рекомбинантный белок, состоящий из глутатион-S-трансфера и гидрофобина Vmh2 класса I из *Pleurotus ostreatus* [96].

Совсем недавно М. Барани с коллегами было исследовано новое покрытие нисом с доксорубицином на основе гидрофобина HFBI из *Trichoderma reesei*, состоящее из неионогенных поверхностно-активных веществ. Полученная модель представляла собой многообещающую систему доставки лекарств для лечения онкологических заболеваний, благодаря их постепенному высвобождению, что очень важно при длительном приеме лекарственного препарата [97]. Используя другой подход, Л. Реутер с соавторами улучшили доставку лекарств к конкретным клеткам-мишеням с помощью наночастиц пористого кремния путем плавления белка, сочетающего гидрофобин HFBI из *Trichoderma reesei* и человеческого трансферрин. Наночастицы получились стабильными, разлагаемыми, неиммуногенными и достигли своих назначенных целей. Покрытие гидрофобин-трансферрин

Таблица 1. Организмы, продуцирующие гидрофобины

Организм	Гидрофобин	Класс	Ссылка на источник
<i>Agaricus bisporus</i>	ABH1/HYPA ABH2/HYPC ABH3 HYPB	IB	[20, 21]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Rod A Rod B Rod C Rod D Rod E Rod F Rod G	IA IA IA IA IA III III	[7, 13, 22, 23]
<i>Aspergillus nidulans</i>	Rod A Dew A Dew B Dew C Dew D Dew E	IA IA IA IA неизвестный IA	[24, 25]
<i>Aspergillus oryzae</i>	Rol A	IA	[26]
<i>Beauveria bassiana</i>	Hyd1 Hyd2	IA IA	[27]
<i>Cladosporium fulvum</i>	HCf 1 HCf 2 HCf 3 HCf 4 HCf 5 HCf 6 Ecp14-1	IA IA IA IA II II II	[28, 29]
<i>Cladosporium herbarum</i>	HCh 1	IA	[30]
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	A5	IA	[31]
<i>Claviceps fusiformis</i>	CFTH1	II	[32]
<i>Claviceps purpurea</i>	CPPH1	II	[33]
<i>Coprinus cinereus</i>	CoH1 CoH2	IB	[34]
<i>Cordyceps militaris</i>	Cmhyd1 Cmhyd2 Cmhyd3 Cmhyd4	II II IA IA	[35]
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Cryparin	II	[36]
<i>Dictyonema glabratum</i>	DGH2 DGH3 DGH 1 FVH 1	IB	[37]
<i>Flammulina velutipes</i>	Hyd-1/Fv-hyd1	IB	[38]
<i>Fusarium culmorum</i>	FcHyd5p FcHyd3p	II IA	[39, 40]
<i>Fusarium graminearum</i>	FgHyd1 FgHyd2 FgHyd3 FgHyd4 FgHyd5	IA IA IA IA II	[41–43]
<i>Fusarium verticillioids</i>	Hyd 1 Hyd 2 Hyd 3 Hyd 4 Hyd 5 Hyd 6 Hyd 7 Hyd 8	IA IA IA II II II неизвестный IA	[44]

Таблица 1. (Окончание)

Организм	Гидрофобин	Класс	Ссылка на источник
<i>Grifola frondosa</i>	HGFI HGFI	IA IA	[45–47]
<i>Magnaporthe grisea</i>	MPG1 MHP1	IA II	[48]
<i>Metarhizium brunneum</i>	HYD1 HYD2 HYD3	IA II IA	[49]
<i>Neurospora crassa</i>	EAS NC2	IA II	[50, 51]
<i>Ophiostoma ulmi</i>	Cerato-ulmin	II	[52]
<i>Paecilomyces farinosus</i>	PfaH2	IA	[53]
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	PLHYD	IA	[54]
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	PbHYD1 PbHYD2	IA IA	[55]
<i>Pisolithus tinctorius</i>	HYDPt-1 HYDPt-2 HYDPt-3	IB	[56,57]
<i>Pleurotus floridanus</i>	PfH	IB	[58]
<i>Pleurotus nebrodensis</i>	PN1	IB	[59]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	POH1 POH2 POH3 Vmh1 Vmh2 Vmh3 Po.Hyd	IB	[60, 61]
<i>Schizophyllum commune</i>	SC1 SC3 SC4 SC6	IB	[62, 63]
<i>Sodiomyces alkalinus</i>	Sa-HFB1	II	[64]
<i>Trichoderma asperellum</i>	HFB2-6	II	[65]
<i>Trichoderma atroviride</i>	HFB22b HFB1A HFB1a	IA	[66]
<i>Trichoderma harzianum</i>	HYTRA1	II	[67]
<i>Trichoderma reesei</i>	HFB I HFBII HFB III	II	[68,69]
<i>Tricholoma terreum</i>	Hyd 1	IB	[70]
<i>Tricholoma vaccinum</i>	Hyd1 Hyd2 Hyd3 Hyd4 Hyd5 Hyd6 Hyd7 Hyd8	IB	[71]
<i>Xanthoria ectaneoides</i> <i>Xanthoria parietina</i>	XEH1 XPH1	IA IA	[72]

также повлияло на биораспределение наночастиц. Так, в опытах данные наночастицы внутривенно вводили крысам, что позволило снизить адсорбцию белков плазмы крови вокруг наночастиц и, следовательно, их агрегацию и потерю активности [98]. Кроме того, гидрофобин HGF1 класса I из *Grifola frondosa* использовался для модификации нанотрубок из галлуазитовой глины, наполненных противоопухолевым препаратом. Результаты подтвердили, что покрытие вышеуказанным гидрофобином повышает стабильность дисперсии, а также позволяет продлить pH-зависимое высвобождение лекарственного средства и, таким образом, повысить цитотоксичность [99].

Несмотря на многочисленные прорывы в науке и технике, значительная часть медицинских имплантатов по-прежнему остается инфицирована бактериями. По литературным данным, инфекционное поражение имплантата является причиной около одной пятой отказов имплантата, которые могут произойти в любой момент после имплантации [100]. Поскольку патогенные микроорганизмы разрастаются на поверхности, то чаще всего, они образуют биопленку — сложную структуру, состоящую из полисахаридов, белков и внеклеточной ДНК, которая в свою очередь характеризуется сильной устойчивостью ко многим видам лечения [101]. Наиболее частые подходы к предотвращению образования биопленки на имплантатах включают в себя нанесение покрытия, убивающего бактерии, такого как антибиотики, противомикробные пептиды и наночастицы металлов [101]. М. Артини с соавторами показали, что самоорганизующиеся амфифильные слои, образованные двумя грибными гидрофобинами Vmh2 и Ras3, выделенными из морского гриба *Acremonium sclerotigenum*, ингибировали образование биопленки, образуемой внутрибольничными штаммами *Staphylococcus epidermidis*, на полистирольной поверхности [102]. Гидрофобин SC3 из *Schizophyllum commune* использовался для покрытия азотсодержащего полимера, создавая противообрастающий слой, который синергетически повышал антибактериальную и антиагрегантную активность выделяемого оксида азота [103].

С. Бёф с соавт. [104] использовали гидрофобин I класса из *A. nidulans* для ортопедических поверхностей имплантатов. Было получено два варианта гидрофобинов: один с сайтами рецепторов фибронектина, а другой с доменом ламинина, которые продемонстрировали постоянную адгезию клеток человека без увеличения адгезии бактериальных клеток.

В патенте М. Шуфанг и соавт. разработан метод приготовления нового биоактивного белка. Для этого они обогатили материал стента с помощью амфифильного белка HFB1 из *Trichoderma reesei*. В результате это позволило улучшить биосовместимость стента, а также его способность к клеточной миграции и васкуляризации [105].

В рамках исследования способности к образованию антибиотических веществ у грибов с облигатным типом алкалофилии А. Кувариной с соавт. были изучены 25 штаммов алкалофильного вида *Sodiomyces alkalinus*. В результате был выделен и идентифицирован новый белок Sa-HFB1 II класса гидрофобинов с противогрибковой активностью. В экспериментах *in vitro* он показал высокую активность к дрожжевым патогенным грибам, включая клинические изоляты с мультирезистентностью к полиенам и азолам. Минимальная подавляющая концентрация Sa-HFB1 для клинического резистентного изолята *Cryptococcus neoformans* составляла 1 мкг/мл, а в концентрации 2–16 мкг/мл он ингибирует патогенные изоляты рода *Candida* [64, 106].

* * *

Даже спустя пятьдесят лет после открытия, гидрофобины по-прежнему остаются привлекательными белковыми соединениями для потенциального промышленного применения в различных отраслях народного хозяйства, особенно биотехнологии. Огромное разнообразие структур гидрофобинов, специфичность конкретных гидрофобинов в их роли в развитии грибов, а также их уникальные структуры и поверхностная активность делают гидрофобины полезными агентами там, где необходимо изменить, соединить или стабилизировать границы раздела фаз. Для биомедицинского применения гидрофобины были особенно полезны в случае составления и доставки гидрофобных лекарственных средств, в пищевой промышленности в качестве эмульгаторов. Характеристики самосборки гидрофобинов делают их также пригодными для применения в биосенсорах. Некоторые дополнительные применения включают гидрофобины, используемые в качестве меток для очистки, иммобилизации белков и клеток, антимикробных покрытий и биоминерализации.

Хотя ряд гидрофобинов уже получают промышленным способом с использованием гетерологичных хозяев — дрожжевых организмов, до сих пор ощущается недостаток производства как природных, так и их инженерных форм гидрофобинов для полной реализации их потенциала. Кроме того, более глубокое понимание взаимосвязи структуры и функции гидрофобина позволило бы создать новый дизайн для конкретных применений, что имело бы огромное значение во многих важных областях, таких как фармацевтика, электроника, микрофлюидика и пищевые продукты.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Данная работа финансировалась за счет средств бюджета института (учреждения, организации). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

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. Wösten H.A., Schuren F.H., Wessels J.G. // The EMBO Journal. 1994. V. 13. № 24. P. 5848–5854.
2. Lumsdon S.O., Green J., Stieglitz B. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2005. V. 44. № 4. P. 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.06.012>
3. Kallio J.M., Linder M.B., Rouvinen J. // Journal of biological chemistry. 2007. V. 282. № 39. P. 28733–28739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704238200>
4. Dokouhaki M., Hung A., Kasapis S., Gras S.L. // Trends in Food Science & Technology. 2021. V. 111. P. 378–387. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.001>
5. Lo V.C., Ren Q., Pham C.L.L., Morris V.K., Kwan A.H., Sunde M. // Nanomaterials. 2014. V. 4. № 3. P. 827–843. <https://doi.org/10.3390/nano4030827>
6. Gandier J.A., Master E.R. // Microorganisms. 2018. V. 6. № 1. P. 3–23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6010003>
7. Wösten H.A.B. // Annual Reviews in Microbiology. 2001. V. 55. № 1. P. 625–646. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.625>
8. Gandier J.A., Langelaan D.N., Won A., O'Donnell K., Grondin J.L., Spencer H.L., Wong P., Tillier E., Yip C., Smith S.P., Master E.R. // Scientific Reports. 2017. V. 7. № 45863. P. 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep45863>
9. Jensen B.G., Andersen M.R., Pedersen M.H., Frisvad J.C., Sondergaard I.B. // BMC Research Notes. 2010. V. 3. № 1. P. 1–6. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-344>
10. Ball S.R., Kwan A.H., Sunde M. // The Fungal Cell Wall: An Armour and a Weapon for Human Fungal Pathogens. 2020. V. 425. P. 29–51. https://doi.org/10.1007/82_2019_186
11. Morris V.K., Kwan A.H., Sunde M. // Journal of molecular biology. 2013. V. 425. № 2. P. 244–256. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.10.021>
12. Pham C.L.L., Rey A., Lo V., Soules M., Ren Q., Meisl G., Knowles T.P.S., Kwan A.H., Sunde M. // Scientific reports. 2016. V. 6. № 25288. P. 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep25288>
13. Hektor H.J., Scholtmeijer K. // Current opinion in biotechnology. 2005. V. 16. № 4. P. 434–439. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.05.004>
14. Szilvay G.R. Self-assembly of hydrophobin proteins from the fungus *Trichoderma reesei* // Ed. M. Linder. Finland: VTT Publications, 2007. 70 p.
15. Tanaka T., Terauchi Y., Yoshimi A., Abe K. // Microorganisms. 2022. V. 10. № 8. P. 1498–1522. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081498>
16. Kisko K., Szilvay G.R., Vainio U., Linder M.B., Serimaa R. // Biophysical journal. 2008. V. 94. № 1. P. 198–206. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112359>
17. Linder M.B. // Current Opinion in Colloid & Interface Science. 2009. V. 14. № 5. P. 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.04.001>
18. Scholtmeijer K., Janssen M., Gerssen B., de Vocht M.L., van Leeuwen B.M., van Kooten T.G., Wösten H.A.B., Wessels J.G.H. // Applied and Environmental Microbiology. 2002. V. 68. № 3. P. 1367–1373. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1367-1373.2002>
19. Vereman J., Thysens T., Weiland F., Impe J.V., Derdelinckx G., de Voorde I.V. // Process Biochemistry. 2023. V. 130. P. 455–463. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.05.008>
20. De Groot P.W.J., Roeven R.T.P., van Griencven L.J.L.D., Visser J., Schaap P.J. // Microbiology. 1999. V. 145. № 5. P. 1105–1113.
21. Lugones L.G., Wösten H.A.B., Wessels J.G.H. // Microbiology. 1998. V. 144. № 8. P. 2345–2353. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-8-2345>
22. Valsecchi I., Dupres V., Stephen-Victor E., Guijarro J.I., Gibbons J., Beau R., Bayry J., Coppee J.-Y., Lafont F., Latge J.-P., Beauvais A. // Journal of fungi. 2017. V. 4. № 1. P. 2–20. <https://doi.org/10.3390/jof4010002>
23. Littlejohn K.A., Hooley P., Cox P.W. // Food Hydrocolloids. 2012. V. 27. № 2. P. 503–516. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.08.018>
24. Winandy L., Hilpert F., Schlebusch O., Fisher R. // Scientific reports. 2018. V. 8. № 12033. P. 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29749-0>
25. Ahn S.O., Lim H.-D., You S.-H., Cheong D.-E., Kim G.-J. // International Journal of Molecular Sciences. 2021. V. 22. № 7843. P. 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms22157843>
26. Terauchi Y., Nagayama M., Tanaka T., Tanabe H., Yoshimi A., Nanatani K., Yabu H., Arita T., Higuchi T., Kameda T., Abe K. // Applied and environmental microbiology. 2022. V. 88. № e0208721. P. 1–21. <https://doi.org/10.1128/AEM.02087-21>
27. Moonjely S., Keyhani N.O., Bidochka M.J. // Microbiology. 2018. V. 164. № 4. P. 517–528. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000644>
28. Lacroix H., Spanu P.D. // Applied and environmental microbiology. 2009. V. 75. № 2. P. 542–546. <https://doi.org/10.1128/AEM.01816-08>

29. Mesarich C.H., Okmen B., Rovenich H., Griffiths S.A., Wang C., Jashni M.K., Mihajlovski A., Collemare J., Hunziker L., Deng C.H., van der Burgt A., Beenen H.G., Templeton M.D., Bradshaw R.E., de Wit P.J.G.M. // Molecular plant-microbe interactions. 2018. V. 31. № 1. P. 145–162. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-17-0114-FI>
30. Weichel M., Schmid-Grendelmeier P., Rhyner C., Achatz G., Blaser K., Cramer R. // Clinical & Experimental Allergy. 2003. V. 33. № 1. P. 72–77. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01574.x>
31. Turgut B.A., Ortucu S. // Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2023. V. 53. № 10. <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2201930>
32. De Vries O.M., Moore S., Arntz S., Wessels J.G., Tudzynski P. European journal of biochemistry. 1999. V. 262. № 2. P. 377–385. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00387.x>
33. Mey G., Correia T., Oeser B., Kershaw M.J., Garre V., Arntz C., Talbot N.J., Tudzynski P. // Molecular Plant Pathology. 2003. V. 4. № 1. P. 31–41. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00138.x>
34. Ásgeirsdóttir S.A., Halsall J.R., Casselton L.A. // Fungal Genetics and Biology. 1997. V. 22. № 1. P. 54–63. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1997.0992>
35. Li X., Wang F., Xu Y., Liu G., Dong C. // International Journal of Molecular Sciences. 2021. V. 22. № 2. P. 643–660. <https://doi.org/10.3390/ijms22020643>
36. So K.K., Kim D.H. // Mycobiology. 2017. V. 45. № 4. P. 362–369. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.362>
37. Trembley M.L., Ringli C., Honegger R. // New Phytologist. 2002. V. 154. № 1. P. 185–195. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00360.x>
38. Kim H.I., Lee C.S., Park Y.J. // Mycoscience. 2016. V. 57. № 5. P. 320–325. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2016.04.004>
39. Stübner M., Lutterschmid G., Vogel R.F., Niessen L. // International journal of food microbiology. 2010. V. 141. № 1-2. P. 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.003>
40. Zapf M.W., Theisen S., Vogel R.F., Niessen L. // Journal of the Institute of Brewing. 2006. V. 112. № 3. P. 237–245. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00719.x>
41. Quarantin A., Hadeler B., Kroger C., Schafer W., Favaron F., Sella L., Martinez-Rocha A.L. // Frontiers in Microbiology. 2019. V. 10. P. 751–770. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00751>
42. Sarlin T., Kivioja T., Kalkkinen N., Linder M.B., Nakari-Setälä T. // Journal of basic microbiology. 2012. V. 52. № 2. P. 184–194. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100053>
43. Minenko E., Vogel R.F., Niessen L. // Fungal biology. 2014. V. 118. № 4. P. 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.02.003>
44. Niu C., Payne G.A., Woloshuk C.P. // BMC microbiology. 2015. V. 15. № 1. P. 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0427-3>
45. Song D., Gao Z., Zhao L., Wang X., Xu H., Bai Y., Zhang X., Linder M.B., Feng H., Qiao M. // Protein expression and purification. 2016. V. 128. P. 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.07.014>
46. Yang J., Ge L., Song B., Ma Z., Yang X., Wang B., Dai Y., Xu H., Qiao M. // Frontiers in Microbiology. 2022. V. 13. № 990231. P. 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.990231>
47. Ma Z., Song B., Yu J., Yang Z., Han Z., Yang J., Wang B., Song D., Xu H., Qiao M. // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2023. V. 656. № 130344. P. 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.130344>
48. Kim S., Ahn I.P., Rho H.S., Lee Y.H. // Molecular Microbiology. 2005. V. 57. № 5. P. 1224–1237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04750.x>
49. Jiang Z.Y., Ligoxygakis P., Xia Y.X. // International Journal of Biological Macromolecules. 2020. V. 165. P. 1303–1311. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.222>
50. Mackay J.P., Matthews J.M., Winefield R.D., Mackay L.G., Haverkamp R.G., Templeton M.D. // Structure. 2001. V. 9. № 2. P. 83–91. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00559-1](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00559-1)
51. Ren Q., Kwan A.H., Sunde M. // Proteins. 2014. V. 82. № 6. P. 990–1003. <https://doi.org/10.1002/prot.24473>
52. Temple B., Horgen P.A. // Mycologia. 2000. V. 92. № 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.2307/3761443>
53. Zelena K., Takenberg M., Lunkenbein S., Woche S.K., Nimtz M., Berger R.G. // Biotechnology and Applied Biochemistry. 2013. V. 60. № 2. P. 147–154. <https://doi.org/10.1002/bab.1077>
54. Viguera G., Shirai K., Hernandez-Guerrero M., Morales M., Revah S. // Process Biochemistry. 2014. V. 49. № 10. P. 1606–1611. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.015>
55. Albuquerque P., Kyaw C.M., Saldanha R.R., Brigido M.M., Felipe M.S.S., Silva-Pereira I. // Fungal Genetics and Biology. 2004. V. 41. № 5. P. 510–520. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.01.001>

56. Tagu D., de Bellis R., Balestrini R., de Vries O.M.H., Piccoli G., Stocchi V., Bonfante P., Martin F. // *New Phytologist*. 2001. V. 149. № 1. P. 127–135. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00009.x>
57. Acioli-Santos B., Sebastiana M., Pessoa F., Sousa L., Figueiredo A., Fortes A.M., Balde A., Maia L.C., Pais M.S. // *Current microbiology*. 2008. V. 57. № 6. P. 620–625. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9253-2>
58. Rafeeq C.M., Vaishnav A.B., Ali P.P.M. // *Protein Expression and Purification*. 2021. V. 182. № 105834. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105834>
59. Zhang R.Y., Hu D.D., Gu J.G., Zhang J.X., Goodwin P.H., Hu Q.X. // *European journal of plant pathology*. 2015. V. 143. P. 823–831. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0734-4>
60. Xu D., Wang Y., Keerio A.A., Ma A. // *Microbiological Research*. 2021. V. 247. № 126723. P. 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126723>
61. Kulkarni S.S., Nene S.N., Joshi K.S. // *Protein Expression and Purification*. 2022. V. 195–196. № 106095. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2022.106095>
62. Van Wetter M.A., Wösten H.A., Wessels J.G. // *Molecular microbiology*. 2000. V. 36. № 1. P. 201–210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01848.x>
63. Askolin S., Linder M., Scholtmeijer K., Tenkanen M., Penttilä M., de Vocht M.L., Wosten H.A.B. // *Biomacromolecules*. 2006. V. 7. № 4. P. 1295–1301. <https://doi.org/10.1021/bm050676s>
64. Kuvarina A.E., Rogozhin E.A., Sykonnikov M.A., Timofeeva A.V., Serebryakova M.V., Fedorova N.V., Kokaeva L.Y., Efimenko T.A., Georgieva M.L., Sadykova V.S. // *Journal of Fungi*. 2022. V. 8. № 7. P. 1–11. <https://doi.org/10.3390/jof8070659>
65. Huang Y., Mijiti G., Wang Z., Yu W., Fan H., Zhang R., Liu Z. // *Microbiological Research*. 2015. V. 171. P. 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.12.004>
66. Seidl-Seiboth V., Gruber S., Sezerman U., Schwecke T., Albayrak A., Neuhaus T., von Dohren H., Baker S.E., Kubicek C.P. // *Journal of molecular evolution*. 2011. V. 72. P. 339–351. <https://doi.org/10.1007/s00239-011-9438-3>
67. Puglisi I., Faedda R., Sanzaro V., Lo Piero A.R., Petrone G., Cacciola S.O. // *Gene*. 2012. V. 506. № 2. P. 325–330. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.06.091>
68. He R., Li C., Feng J., Zhang D. // *FEMS microbiology letters*. 2017. V. 364. № 8. P. 1–21. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw297>
69. Alamprese C., Rollini M., Musatti A., Ferranti P., Barbiroli A. // *LWT*. 2022. V. 157. № 113060. P. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113060>
70. Mankel A., Krause K., Kothe E. // *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. V. 68. № 3. P. 1408–1413. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1408-1413.2002>
71. Sammer D., Krause K., Gube M., Wagner K., Kothe E. // *PLoS One*. 2016. V. 11. № e0167773. P. 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167773>
72. Scherrer S., de Vries O.M.H., Dudler R., Wessels J.G.H., Honegger R. // *Fungal Genetics and Biology*. 2000. V. 30. № 1. P. 81–93. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1205>
73. Kershaw M.J., Talbot N.J. // *Fungal Genetics and Biology*. 1998. V. 23. № 1. P. 18–33. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1997.1022>
74. Mgbeahuruike A.C., Kovalchuk A., Asiegbu F.O. // *Mycologia*. 2013. V. 105. № 6. P. 1471–1478. <https://doi.org/10.3852/13-077>
75. Bouqellah N.A., Farag P.F. // *Microorganisms*. 2023. V. 11. № 2632. P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112632>
76. Ruocco M., Lanzuise S., Lombardi N., Woo S.L., Vinale F., Marra R., Varlese R., Manganiello G., Pascale A., Scala V., Turrà D., Scala F., Lorito M. // *Mol. Plant. Microbe Interact.* 2015. V. 28. № 2. P. 167–179. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-14-0194-R>
77. Kazmierczak P., Kim D.H., Turina M., Van Alfen N.K. // *Eukaryot. Cell*. 2005. V. 4. № 5. P. 931–936. <https://doi.org/10.1128/EC.4.5.931-936.2005>
78. Gallo M., Luti S., Baroni F., Baccelli I., Cilli E.M., Cicchi C., Leri M., Spisni A., Pertinhez T.A., Pazzagli L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 2251. P. 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms24032251>
79. Buchanan J.A., Varghese N.R., Johnston C.L., Sunde M. // *Journal of Molecular Biology*. 2023. V. 435. № 167919. P. 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2022.167919>
80. Kashyap V.K., Mishra A., Bordoloi S., Varma A., Joshi N.C. // *Mycoses*. 2023. V. 66. № 9. P. 737–754. <https://doi.org/10.1111/myc.13619>
81. Latgé J.-P. // *Fungal Biology*. 2023. V. 127. № 7–8. P. 1259–1266. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.05.001>
82. Cai F., Gao R., Zhao Z., Ding M., Jiang S., Yagtu C., Zhu H., Zhang J., Ebner T., Mayrhofer-Reinhartshuber M., Kainz P., Chenthamara K., Akcapinar G.B., Shen Q., Druzhinina I.S. // *ISME J.* 2020. V. 14. № 10. P. 2610–2624. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0709-0>

83. *Luciano-Rosario D., Eagan J.L., Aryal N., Dominguez E.G., Hull C.M., Keller N.P.* // *mBio*. 2022. V. 13. № e0275422. P. 1–12. <https://doi.org/10.1128/mbio.02754-22>.
84. *Kulkarni S., Nene S., Joshi K.* // *Process Biochemistry*. 2017. V. 61. P. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.012>
85. *Stanzione I., Pitocchi R., Pennacchio A., Cicatiello P., Piscitelli A., Giardina P.* // *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022. V. 9. № 959166. P. 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.959166>
86. *Kirkland B.H., Keyhani N.O.* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2011. V. 38. № 2. P. 327–335. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0777-7>
87. *Rieder A., Ladnorg T., Wöll C., Obst U., Fischer R., Schwartz T.* // *Biofouling*. 2011. V. 27. № 10. P. 1073–1085. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.631168>
88. *Janssen M.I., Leeuwen M.B.M., van Kooten T.G., Vries J., Dijkhuizen L., Wösten H.A.B.* // *Biomaterials*. 2004. V. 25. № 14. P. 2731–2739. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.060>
89. *Bimbo L.M., Mäkilä E., Raula J., Laaksonen T., Laaksonen P., Strommer K., Kauppinen E.I., Salonen J., Linder M.B., Hirvonen J., Santos H.A.* // *Biomaterials*. 2011. V. 32. № 34. P. 9089–9099. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.011>
90. *Linder M.B., Szilvay G.R., Nakari-Setälä T., Penttilä M.E.* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2005. V. 29. № 5. P. 877–896. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.01.004>
91. *Khalesi M., Gebruers K., Derdelinckx G.* // *Protein J.* 2015. V. 34. № 4. P. 243–255. <https://doi.org/10.1007/s10930-015-9621-2>
92. *Chakarova S.D., Carlsson A.E.* // *Phys. Rev. E*. 2004. V. 69. № 021907. P. 1–9. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.69.021907>
93. *Scognamiglio V., Arduini F., Palleschi G., Rea G.* // *Trac. Trends Anal. Chem.* 2014. V. 62. P. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.007>
94. *Tao J., Chang Y., Liang J., Duan X., Pang W., Wang Y., Wang Z.* // *Appl. Phys. Lett.* 2019. V. 115. № 163502. P. 1–5. <https://doi.org/10.1063/1.5124525>
95. *Fitzgerald J.E., Bui E.T.H., Simon N.M., Fenniri H.* // *Trends Biotechnol.* 2017. V. 35. P. 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.005>
96. *Piscitelli A., Pennacchio A., Longobardi S., Velotta R., Giardina P.* // *Biotechnol. Bioeng.* 2017. V. 114. P. 46–52. <https://doi.org/10.1002/bit.26049>
97. *Barani M., Mirzaei M., Torkzadeh-Mahani M., Lohrasbi-Nejad A., Nematollahi M.H.* // *Materials Science & engineering. C, Materials for Biological Applications*. 2020. V. 113. № 110975. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110975>
98. *Reuter L.J., Shahbazi M.-A., Mäkilä E.M., Salonen J.J., Saberianfar R., Menassa R., Santos H.A., Joensuu J.J., Ritala A.* // *Bioconjug. Chem.* 2017. V. 28. P. 1639–1648. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00075>
99. *Wang B., Han Z., Song B., Yu L., Ma Z., Xu H., Qiao M.* // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2021. V. 628. № 127351. P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127351>
100. *VanEpps J.S., Younger J.G.* // *Shock*. 2016. V. 46. P. 597–608. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000692>
101. *Maan A.M.C., Hofman A.H., de Vos W.M., Kamperman M.* // *Advanced Functional Materials*. 2020. V. 30. № 2000936. P. 1–30. <https://doi.org/10.1002/adfm.202000936>
102. *Artini M., Cicatiello P., Ricciardelli A., Papa R., Selan L., Dardano P., Tilotta M., Vrenna G., Tutino M.L., Giardina P., Parrilli E.* // *Biofouling*. 2017. V. 33. P. 601–611. <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1338690>
103. *Devine R., Singha P., Handa H.* // *Biomater. Sci.* 2019. V. 7. P. 3438–3449. <https://doi.org/10.1039/c9bm00469f>
104. *Boeuf S., Throm T., Gutt B., Strunk T., Hoffmann M., Seebach E., Muhlberg L., Brocher J., Gotterbarm T., Wenzel W., Fischer R., Richter W.* // *Acta Biomater.* 2012. V. 8. P. 1037–1047. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.022>
105. Patent CN107308501A. Method for loading bioactive protein on hydrophobic stent material. Shufang, W., Li, J., Tang, D. 2017.
106. *Kuvarina A.E., Georgieva M.L., Rogozhin E.A., Kulko A.B., Gavryushina I.A., Sadykova V.S.* // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2021. V. 57. № 1. P. 86–93. <https://doi.org/10.1134/S0003683821010142>

Fungal Hydrophobins: Biosynthesis, Properties, Possibilities of Application in Biotechnology (Review)

E. V. Lopatukhin^a, Yu. A. Ihalainen^b, N. N. Markelova^a, A. E. Kuvarina^{a, *}, and V. S. Sadykova^{a, **}

^a*Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia*

^b*Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

^{*}*e-mail: nastena.lysenko@mail.ru*

^{**}*e-mail: sadykova_09@mail.ru*

The review summarizes current information about hydrophobins – low molecular weight proteins synthesized by filamentous fungi and which are one of the strongest cellular biosurfactants. The mechanism of biosynthesis of hydrophobins, the chemical structures and spectrum of its natural and synthetic isoforms, biological activity and role in the regulation of vital processes of producers are presented. The potential for using hydrophobins in biotechnology has been demonstrated.

Keywords: hydrophobins, proteins, surfactants, biological activity

УДК 577.121

ЭФФЕКТ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ НА БИОСИНТЕЗ АДПИНОВОЙ КИСЛОТЫ ШТАММАМИ *Escherichia coli* ПО ОБРАЩЕННОМУ β -ОКИСЛЕНИЮ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 2024 г. А. Ю. Гулевич¹, *, А. Ю. Скороходова¹, В. Г. Дебабов¹¹Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

*e-mail: andrey.gulevich@gmail.com

Поступила в редакцию 18.09.2023 г.

После доработки 15.11.2023 г.

Принята к печати 10.12.2023 г.

С использованием в качестве базового ранее сконструированного адипат-секретирующего штамма *Escherichia coli* MG1655 *lacI*^Q, Δ *ackA-pta*, Δ *proxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, P_L-SD_{φ10}-*atoB*, P_{trc-ideal-4}-SD_{φ10}-*fadB*, Δ *fadE*, P_L-SD_{φ10}-*tesB*, Δ *yciA*, P_{trc-ideal-4}-SD_{φ10}-*fabI*, P_L-SD_{φ10}-*paal*, Δ *aceBAK*, Δ *glcB* получены штаммы-производные, способные к повышенному синтезу целевого соединения из глюкозы по обращенному пути β -окисления жирных кислот. Такой эффект достигнут при интенсификации в клетках цикла трикарбонных кислот. Прекращение множественных обращений цикла за счет инактивации в штамме сукцинатдегидрогеназы не оказывало выраженного влияния на формирование рекомбинантом адипиновой кислоты. При интенсификации цикла за счет усиления анаплеротического формирования шавелевоуксусной кислоты из фосфоенолпирувата, в результате повышения экспрессии нативного гена *pps*, синтез адипиновой кислоты возрастал в 1.2 раза до ~390 мкМ. Обеспечение возможности формирования шавелевоуксусной кислоты из пировиноградной, при введении в штамм активности гетерологичной пируваткарбоксилазы *Bacillus subtilis*, приводило к интенсификации цикла в 1.5 раз и сопровождалось ростом секреции адипиновой кислоты до ~496 мкМ. Последующая инактивация в штамме генов *sdhAB* повышала секрецию целевого соединения лишь незначительно и титр адипиновой кислоты достигал ~520 мкМ. Полученные данные указывали на прямую зависимость эффективности синтеза адипиновой кислоты сконструированными рекомбинантами от степени интенсификации в них цикла трикарбонных кислот.

Ключевые слова: адипиновая кислота, β -окисление жирных кислот, метаболическая инженерия, сукцинил-КоА, цикл трикарбонных кислот, *Escherichia coli*

DOI: 10.31857/S0555109924030033 EDN: EXDGH

Адипиновая кислота — это алифатическая дикарбоновая кислота, которая может быть удобным предшественником в последующем синтезе широкого спектра производных с высокой добавленной стоимостью, таких как смазочные материалы, пластификаторы, фармацевтические субстанции и компоненты искусственных волокон [1]. В настоящее время большая часть адипиновой кислоты производится нефтехимическим синтезом с использованием бензола в качестве предшественника [2]. Тем не менее, адипиновая кислота может быть получена из возобновляемого сырья рядом биотехнологических способов, представляющих экологически оправданную альтернативу традиционному методу.

Один из первых предложенных методов биотехнологической конверсии растительного сырья в адипиновую кислоту предполагал первичное

получение из возобновляемых источников углерода *cis*, *cis*-муконовой кислоты с последующим образованием из нее целевого продукта в результате каталитического гидрирования [3]. Возможность эффективной микробиологической конверсии глюкозы и глицерина в *cis*, *cis*-муконовую кислоту была продемонстрирована с использованием ряда направленно сконструированных штаммов *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae* [4–7]. Кроме того, сообщалось об успешном формировании адипиновой кислоты из соответствующего предшественника в результате биокаталитического гидрирования [8].

Альтернативой двухстадийному методу синтеза адипиновой кислоты, включающему как биосинтетическую, так и каталитическую стадии, является прямой босинтетический способ микробиологического синтеза этого дикарбоксилата, основанный

на принципе обратимости биохимических реакций β -окисления, таких как реакции деградации фенилацетата или деградации жирных кислот. Формирование адипиновой кислоты из консервативных для биотехнологически значимых микроорганизмов метаболитов-предшественников, согласно данному подходу, предполагает первичную конденсацию ацетил-КоА и сукцинил-КоА, с последующим превращением 3-оксоадипил-КоА в 3-гидроксиадипил-КоА, затем в 2,3-дидегидроадипил-КоА и, в итоге, в адипил-КоА. Гидролиз тиоэфирной связи последнего КоА-производного, ведущий к получению целевого соединения, может катализироваться тиоэстеразами, обладающими необходимой субстратной специфичностью.

Синтез адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному пути деградации фенилацетата был успешно продемонстрирован [9–12] при оверэкспрессии в клетках *E. coli* как нативных генов *paa*-оперона, обеспечивающих формирование 2,3-дидегидроадипил-КоА, так и вспомогательных генов гетерологичных ферментов, ответственных за конверсию 2,3-дидегидроадипил-КоА в адипил-КоА и гидролиз его тиоэфирной связи. Также, при усилении в *E. coli* экспрессии нативных генов 3-оксоацил-КоА-тиолазы (КФ 2.3.1.174), бифункциональной (*S*)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы/еноил-КоА-редуктазы (КФ 1.1.1.35/КФ 4.2.1.17), еноил-ацилпереносящий белок (АПБ)-редуктазы/ацил-КоА-дегидрогеназы (КФ 1.3.1.9) и тиоэстеразы II (КФ 3.1.2.20) недавно был показан синтез адипиновой кислоты из глюкозы в результате функционального обращения β -окисления жирных кислот (БОЖК) [13].

Эффективность протекания всей последовательности реакций обращенного β -окисления напрямую зависит от эффективности первичной конденсации ацетил-КоА и сукцинил-КоА. В данной связи, были предприняты попытки улучшения биосинтетических характеристик адипат-секретирующих рекомбинантов за счет повышения внутриклеточной доступности сукцинил-КоА.

Поскольку этот метаболит является интермедиатом цикла трикарбонных кислот (ЦТК), подходы к повышению его внутриклеточной доступности для реакций обращенного β -окисления включали, в первую очередь, предотвращение утилизации сформированного сукцинил-КоА в последующих реакциях цикла за счет инактивации сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.5.1) [10] или сукцинил-КоА-синтазы (КФ 6.2.1.5) [14]. Альтернативный подход заключался в инактивации глиоксيلاتного шунта [13], расходующего непрямой предшественник сукцинил-КоА, изоцитрат, и активизирующегося при интенсивном формировании в клетке ацетил-КоА [15]. Вместе с тем, внутриклеточная доступность сукцинил-КоА для реакций биосинтеза адипиновой кислоты может быть

повышена не только за счет “сбережения” соответствующего тиоэфира, но и в результате усиления его образования, при интенсификации ЦТК.

Цель работы – оценка влияния интенсификации ЦТК на биосинтез адипиновой кислоты рекомбинантными штаммами *E. coli*, способными к формированию целевого соединения по обращенному β -окислению жирных кислот.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали Taq ДНК-полимеразу и дезоксинуклеозидтрифосфаты “Thermo Scientific” (Литва). Компоненты питательных сред, соли и другие реактивы были производства “Pan-reac” (Испания) и “Sigma” (США).

Бактериальные штаммы, плазмиды и среды. Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195) и ранее сконструированный штамм *E. coli* BOX3.3 $\Delta 4$ *P_{trc}-id-4-fabI P_L-paaJ Δ aceBAK Δ glcB* [13], обозначенный как AdiBOX1.0, с измененной регуляцией экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты аэробного β -окисления жирных кислот, еноил-АПБ-редуктазу, 3-оксоацил-КоА-тиолазу и тиоэстеразу II, а также лишенный путей смешанно-кислотного брожения, глиоксيلاتного шунта и активности неспецифичной тиоэстеразы YciA, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе рекомбинантов. Используемые в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл. 1. Для культивирования бактерий применяли богатую среду LB и минимальную среду M9 [16] с добавлением при необходимости ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

Конструирование штаммов. Целевые генетические модификации были индивидуально введены в хромосому штамма *E. coli* MG1655 с использованием Red-зависимой системы гомологичной рекомбинации фага лямбда по методу описанному ранее [17]. Производные штамма AdiBOX 1.0, несущие соответствующие генетические модификации, были получены с помощью P1-зависимых трансдукций [16]. В случае инактивации генов *sdhAB*, замены природной регуляторной области гена *pps* искусственным генетическим элементом *P_L-SD_{phi10}* и интеграции на место гена *roxB* гена *pusA* *B. subtilis* под контролем промотора *P_L* фага лямбда, использовали ранее полученные препараты P1-трансдуцирующих фагов, содержащие соответствующие маркированные модификации [18–20]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с использованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [21]. Трансформацию штаммов плазмидами осуществляли по стандартной методике.

Таблица 1. Штаммы и плазмиды, сконструированные и использованные в работе

Объект	Генотип	Ссылка
Штамм		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
AdiBOX 1.0	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fabI</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>paaJ</i> , Δ <i>aceBAK</i> , Δ <i>glcB</i>	[13]
AdiBOX 1.0 Δ <i>sdhAB</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fabI</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>paaJ</i> , Δ <i>aceBAK</i> , Δ <i>glcB</i> , Δ <i>sdhAB</i>	Данная работа
AdiBOX 1.0 P _L - <i>ppc</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>poxB</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fabI</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>paaJ</i> , Δ <i>aceBAK</i> , Δ <i>glcB</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>ppc</i>	Данная работа
AdiBOX 1.0 P _L - <i>pycA</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fabI</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>paaJ</i> , Δ <i>aceBAK</i> , Δ <i>glcB</i> , <i>poxB</i> :: P _L - <i>pycA</i> ^{Bs}	Данная работа
AdiBOX 1.0 P _L - <i>pycA</i> Δ <i>sdhAB</i>	<i>E. coli</i> MG1655 <i>lacI</i> ^Q , Δ <i>ackA-pta</i> , Δ <i>ldhA</i> , Δ <i>adhE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>atoB</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fadB</i> , Δ <i>fadE</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>tesB</i> , Δ <i>yciA</i> , P _{trc-ideal-4} -SD _{φ10} - <i>fabI</i> , P _L -SD _{φ10} - <i>paaJ</i> , Δ <i>aceBAK</i> , Δ <i>glcB</i> , <i>poxB</i> :: P _L - <i>pycA</i> ^{Bs} , Δ <i>sdhAB</i>	Данная работа
Плазмида		
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P _R - λ <i>xis-int</i> , <i>cIts857</i>	[21]

Культивирование штаммов. Рекомбинантные штаммы выращивали в течение ночи в среде М9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37°C. Для микроаэробного культивирования по 5 мл полученных ночных культур разбавляли в 10 раз, добавляя 45 мл среды М9, содержащей 10 г/л глюкозы, 10 г/л дрожжевого экстракта и 2.5 г/л NaHCO₃. Полученные культуры инкубировали в колбах объемом 750 мл, закрытых ватными пробками на роторной качалке при 250 об./мин в течение 8 ч при 37°C. Насыщение среды кислородом оценивали в контрольных колбах с соответствующими культурами при инкубации в присутствии резазурина. Экспрессию генов, находящихся под контролем LacI-зависимого промотора P_{trc-ideal-4}, индуцировали спустя 3 ч от начала инкубации, добавляя в среды культивирования изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1.0 мМ.

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

Аналитические методы. Концентрации органических кислот в культуральных жидкостях, освобожденных от биомассы центрифугированием, определяли методом ВЭЖХ с использованием системы “Waters” HPLC system (США). Применяли ион-эксклюзионную колонку Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) (“Phenomenex”, США) с детекцией

при длине волны 210 нм. В качестве подвижной фазы использовали водный раствор серной кислоты (2.5 мМ) со скоростью потока 0.5 мл/мин. Для измерения концентрации глюкозы, система была укомплектована рефрактивным детектором “Waters” 2414 и колонкой Spherisorb-NH2 (“Waters”, США). Подвижной фазой служила смесь ацетонитрил-вода в соотношении 75 : 25 об./об. при скорости потока 1.0 мл/мин.

Идентификацию и количественный анализ масляной и адипиновой кислот в культуральных жидкостях осуществляли методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, как описано ранее [13]. Использовали газовый хроматограф Agilent 6890N, с автосамплером 7683B и масс-селективным детектором Agilent 5975 MSD, укомплектованный капиллярной колонкой Agilent DB-5MS (“Agilent”, США). В качестве внутренних стандартов использовали валериановую и пимелиновую кислоты. Для ионизации аналитов была использована ионизация электронами (70 eV). Масс-анализатор функционировал в режиме селективного детектирования (145 *m/z* и 73 *m/z* для масляной кислоты, 275 *m/z* и 172 *m/z* для адипиновой кислоты, 159 *m/z* для валериановой кислоты, 289 *m/z* для пимелиновой кислоты).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее сконструированный штамм *E. coli* MG1655 *lacI*^Q, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*,

$P_{L-SD_{\phi 10-atoB}}$, $P_{trc-ideal-4-SD_{\phi 10-fadB}}$, $\Delta fadE$, $P_{L-SD_{\phi 10-tesB}}$, $\Delta yciA$, $P_{trc-ideal-4-SD_{\phi 10-fabI}}$, $P_{L-SD_{\phi 10-paaJ}}$ [13] был способен к синтезу адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК при катализе терминальных реакций цикла еноил-АПБ-редуктазой/ацил-КоА-дегидрогеназой *FabI*, промежуточном образовании 3-гидроксиадипил-КоА и 2,3-дидегидроадипил-КоА бифункциональной (S)-3-гидроксацил-КоА-дегидрогеназой/еноил-КоА-редуктазой *FadB* и в результате первичной конденсации ацетил-КоА и сукцинил-КоА под действием 3-оксоацил-КоА-тиолазы *PaaJ*. Инактивация в штамме глиоксилатного шунта способствовала “сбережению” изоцитрата, предшественника сукцинил-КоА, и обеспечивала увеличение продукции адипиновой кислоты штаммом *E. coli* MG1655 *lacI^Q*, $\Delta ackA-pta$, $\Delta proxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $P_{L-SD_{\phi 10-atoB}}$, $P_{trc-ideal-4-SD_{\phi 10-fadB}}$, $\Delta fadE$, $P_{L-SD_{\phi 10-tesB}}$, $\Delta yciA$, $P_{trc-ideal-4-SD_{\phi 10-fabI}}$, $P_{L-SD_{\phi 10-paaJ}}$, $\Delta aceBAK$, $\Delta glcB$ (AdiBOX 1.0) в 3.3 раза, с ~101 до ~330 мкМ, за счет повышения относительной внутриклеточной доступности соответствующего КоА-производного для целевых биосинтетических реакций. При этом, значимая секреция штаммом AdiBOX 1.0 уксусной кислоты (табл. 2) свидетельствовала об избыточной генерации в клетках рекомбинанта ацетил-КоА и формировании сукцинил-КоА в количествах, недостаточных для эффективного и полного вовлечения этих тиоэфиров в реакции обращенного БОЖК. Сукцинил-КоА, являясь интермедиатом ЦТК, как формируется, так и потребляется в реакциях соответствующего цикла. Поэтому его сниженная внутриклеточная доступность для конденсации с ацетил-КоА могла быть связана как с пониженной интенсивностью его образования из 2-кетоглутарата под действием 2-кетоглутаратдегидрогеназы (КФ 1.2.1.105), так и с его интенсивной конверсией в янтарную кислоту сукцинил-КоА синтетазой. Для оценки эффективности формирования сукцинил-КоА в реакциях ЦТК, гены *sdhAB*, кодирующие компоненты сукцинатдегидрогеназного ферментативного комплекса, были инактивированы в штамме AdiBOX 1.0. Количество янтарной кислоты, секретированное соответствующим рекомбинантом в ходе потребления глюкозы, могло служить индикатором максимального уровня формирования в штамме сукцинил-КоА, являющегося прямым предшественником этого легко детектируемого дикарбоксилата. При утилизации углеродного субстрата, штамм AdiBOX 1.0 $\Delta sdhAB$ синтезировал янтарную кислоту в количествах, возросших в ~3 раза по сравнению с родительским штаммом, тогда как секреция адипиновой кислоты повышалась лишь незначительно (на ~5%), в первую очередь, по-видимому, за счет некоторого снижения продукции рекомбинантом уксусной кислоты (табл. 2). Приращение в уровне секретированной штаммом янтарной кислоты в 2.2 мМ указывало, в первую очередь, на то

количество углерода, которое вовлекалось в родительском штамме в повторные раунды оксидативного ЦТК с формированием CO_2 в качестве конечного продукта. В результате, эффект прекращения полноценного функционирования цикла вследствие инактивации в штамме сукцинатдегидрогеназы был, таким образом, незначительным и не оказывал существенного влияния на формирование рекомбинантом основных секретированных метаболитов. Более того, полученные данные свидетельствовали о том, что лишь ~7% потребленной штаммом глюкозы вовлекалось в реакции ЦТК и уровень формирования рекомбинантом сукцинил-КоА мог достигать максимум 3.1 мМ.

Основными метаболитами, секретированными штаммами AdiBOX 1.0 и AdiBOX 1.0 $\Delta sdhAB$, являлись пировиноградная и уксусная кислоты. При этом, соответствующие рекомбинанты конвертировали более половины потребленного углеродного субстрата в пировиноградную кислоту с выходом, составляющим около 55%, тогда как выход секретированной штаммами уксусной кислоты был существенно ниже (табл. 2). Это, с учетом полученных данных о секреции штаммом AdiBOX 1.0 $\Delta sdhAB$ янтарной кислоты, указывало на то, что гликолитические предшественники не эффективно вовлекались в ЦТК, в первую очередь, по-видимому, в силу дефицита в клетках рекомбинантов щавелевоуксусной кислоты (ЩУК), образующейся при карбоксилировании трехуглеродных продуктов гликолиза. Таким образом, повышение внутриклеточной доступности сукцинил-КоА для инициации биосинтеза адипиновой кислоты по обращенному БОЖК требовало интенсификации ЦТК. Согласно полученным результатам, соответствующая интенсификация могла быть обеспечена в результате повышения в штаммах активности ферментов, ответственных за формирование ЩУК из трехуглеродных субстратов. В *E. coli* анаплеротическое образование ЩУК происходит под действием карбоксилирующей фосфоенолпируват фосфоенолпируваткарбоксилазы *Ppc* (КФ 4.1.1.31). Для повышения внутриклеточной доступности ЩУК для ее конденсации с ацетил-КоА и, соответственно, интенсификации ЦТК, экспрессия гена *ppc* в штамме AdiBOX 1.0 была усилена.

В результате внесения данной модификации, продукция пировиноградной кислоты соответствующим производным штаммом AdiBOX 1.0 P_{L-ppc} снижалась более чем вдвое, с 22.3 мМ до 10.2 мМ, тогда как секреция адипиновой кислоты возрастала в ~1.2 раза, с ~330 мкМ до ~390 мкМ (табл. 2). При этом, уровень формирования штаммом AdiBOX 1.0 P_{L-ppc} уксусной кислоты оставался практически неизменным по сравнению с родительским штаммом AdiBOX 1.0, а секреция янтарной кислоты возрастала в ~1.5 раз (табл. 2). При неизменном уровне формирования штаммом уксусной

Таблица 2. Концентрации и выходы основных метаболитов, а также концентрации производных обращенного β-окисления жирных кислот, секретируемых сконструированными штаммами при микроаэробной утилизации глюкозы*

Штамм	Глюкоза, мМ	Пировиноградная кислота,		Уксусная кислота,		Янтарная кислота,		Масляная кислота, мкМ	Адипиновая кислота, мкМ
		мМ	моль/моль, %	мМ	моль/моль, %	мМ	моль/моль, %		
AdiBOX 1.0	42.0 ± 2.4	22.3 ± 1.0	53.1	13.0 ± 1.1	30.9	0.9 ± 0.1	2.1	134.2 ± 11.8	330.6 ± 32.7
AdiBOX 1.0 Δ <i>sdhAB</i>	41.0 ± 2.1	22.7 ± 1.3	55.4	10.8 ± 0.6	26.3	3.1 ± 0.3	7.6	130.7 ± 11.5	346.0 ± 34.3
AdiBOX 1.0 P _L - <i>ppc</i>	42.2 ± 2.3	10.2 ± 0.6	24.1	13.6 ± 1.2	32.2	1.4 ± 0.1	3.3	138.5 ± 12.2	389.3 ± 36.2
AdiBOX 1.0 P _L - <i>pusA</i>	41.7 ± 2.0	7.3 ± 0.4	17.5	12.8 ± 0.8	30.7	2.0 ± 0.2	4.8	132.1 ± 11.6	496.1 ± 47.6
AdiBOX 1.0 P _L - <i>pusA</i> Δ <i>sdhAB</i>	40.3 ± 2.2	6.2 ± 0.4	15.4	11.3 ± 0.7	28.0	5.9 ± 0.4	14.6	133.6 ± 12.7	520.9 ± 45.8

* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов.

кислоты, полученные данные указывали на то, что снижение в 2.2 раза секреции рекомбинантом пировиноградной кислоты, являющейся как прямым производным фосфоенолпирувата, так и прямым предшественником ацетил-КоА, могло приводить к интенсификации ЦТК лишь в 1.1 раз. Соответствующая оценка совпала с ростом синтеза штаммом адипиновой кислоты.

Следует отметить, что в *E. coli* фосфоенолпируваткарбоксилаза конкурирует за общий субстрат, ФЕП, с гликолитическими пируваткиназами PycA и PycF (КФ 2.7.1.40), синтезирующими из соответствующего предшественника пировиноградную кислоту, необходимую для дальнейшего образования ацетил-КоА. При этом, было показано, что экспрессия в клетках *E. coli* гена гетерологичной пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1), формирующей ЩУК из пировиноградной кислоты, способствует такому перераспределению потоков углерода в метаболическом узле ЩУК – фосфоенолпируват – пировиноградная кислота – ацетил-КоА, который ведет к повышенному формированию рекомбинантами производных ЦТК [19, 20, 22].

При введении в клетки базового штамма гена *pusA* *B. subtilis*, кодирующего пируваткарбоксилазу, и его экспрессии под контролем сильного конститутивного промотора P_L фага лямбда, секреция пировиноградной кислоты полученным рекомбинантом AdiBOX 1.0 P_L-*pusA* снижалась до 7.3 мМ при выходе 17.5%, что соответствовало падению в 3 раза относительно показателя родительского штамма AdiBOX 1.0 (табл. 2). Как и в случае усиления туннелирования фосфоенолпирувата к ЩУК в штамме AdiBOX 1.0 P_L-*ppc*, выраженное перенаправление пировиноградной кислоты в сторону формирования соответствующего производного в штамме AdiBOX 1.0 P_L-*pusA* не оказывало значимого влияния на формирование рекомбинантом уксусной кислоты. Вместе с тем, синтез адипиновой кислоты штаммом AdiBOX 1.0 P_L-*pusA* возрос в 1.5 раз до ~ 500 мкМ, на фоне роста секреции янтарной кислоты в 2 раза (табл. 2). По аналогии с оценкой синтеза метаболитов штаммом AdiBOX 1.0 P_L-*ppc*, полученные результаты косвенно свидетельствовали об интенсификации ЦТК в клетках штамма AdiBOX 1.0 P_L-*pusA* в 1.5 раза.

Таким образом, рост биосинтеза адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК сконструированными штаммами был прямо пропорционален оценочной степени интенсификации в них ЦТК. Вместе с тем, демонстрируемые штаммами AdiBOX 1.0 P_L-*ppc* и AdiBOX 1.0 P_L-*pusA* значения углеродного баланса, рассчитанного как отношение общего количества молей углерода в детектированных продуктах, к количеству молей углерода потребленной глюкозы, составляли лишь 0.25 и 0.22 соответственно. Это могло указывать на более выраженную, нежели рассчитанную на

основании изменения секреции пировиноградной кислоты, интенсификацию в рекомбинантах ЦТК, сопровождающуюся значительными потерями углерода в виде CO_2 при множественных обращениях цикла. Для проверки этого предположения, в штамме *AdiBOX 1.0 P_L-pycA* была осуществлена инактивация сукцинатдегидрогеназы, позволяющая, как указывалось выше, прямо оценить интенсивность ЦТК в соответствующем производном по уровню секреции им янтарной кислоты.

Полученный штамм *AdiBOX 1.0 P_L-pycA ΔsdhAB* синтезировал янтарную кислоту из глюкозы с выходом, возросшим до 14.6% и в 1.9 раз превышающим показатель штамма *AdiBOX 1.0 ΔsdhAB* (табл. 2). Таким образом, экспрессия в штамме *AdiBOX 1.0 P_L-pycA ΔsdhAB* гена пируваткарбоксилазы обеспечивала интенсификацию ЦТК в рекомбинанте в 1.9 раз. Соответствующее значение лишь немного превосходило подобное, ранее рассчитанное на основании изменения секреции пировиноградной кислоты для штамма *AdiBOX 1.0 P_L-pycA* (1.5 раза). Секреция адипиновой кислоты штаммом *AdiBOX 1.0 P_L-pycA ΔsdhAB* ~520 мкМ, также была в 1.5 раза выше аналогичного показателя соответствующего контрольного штамма (табл. 2). Таким образом, эти данные служили четким подтверждением предположения о прямой зависимости роста эффективности биосинтеза адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК сконструированными штаммами от степени интенсификации в них ЦТК. Вместе с тем, полученные результаты свидетельствовали об общей невысокой эффективности формирования в рекомбинантах сукцинил-КоА в реакциях ЦТК даже после интенсификации цикла. Действительно, лишь ~14% потребленной штаммом *AdiBOX 1.0 P_L-pycA ΔsdhAB* глюкозы было конвертировано в янтарную кислоту, указывая на максимально возможный уровень синтеза рекомбинантом сукцинил-КоА в пределах 6 мМ (табл. 2). Несмотря на то, что в результате инактивации сукцинатдегидрогеназы относительная внутриклеточная доступность сукцинил-КоА для реакций обращенного БОЖК потенциально была повышена в штамме *AdiBOX 1.0 P_L-pycA ΔsdhAB* в ~3 раза по сравнению со штаммом *AdiBOX 1.0 P_L-pycA* (5.9 мМ против 2.0 мМ), синтез адипиновой кислоты соответствующим рекомбинантом увеличивался лишь на 5%. Таким образом, можно было заключить, что поток углерода через реакцию катализируемую 2-кетоглутаратдегидрогеназой, достигнутый в сконструированных штаммах и обеспечивающий формирование сукцинил-КоА в вышеуказанных количествах, был недостаточным для эффективного туннелирования последнего в реакции обращенного БОЖК. В совокупности с полученными результатами, свидетельствующими о позитивном эффекте интенсификации ЦТК на биосинтез целевого соединения, это предполагает необходимость дальнейшей оптимизации

функциональности цикла в сконструированных штаммах для повышения эффективности образования ими адипиновой кислоты.

Известно, что активность 2-кетоглутаратдегидрогеназы в *E. coli* снижена при выращивании клеток в богатых и содержащих глюкозу средах [23], что ограничивает поток углерода к янтарной кислоте через сукцинил-КоА и обуславливает проявление эффекта избыточного метаболизма глутаминовой кислоты (“glutamate overflow”), выражающегося в перенаправлении 2-кетоглутарата из ЦТК в сторону формирования соответствующей аминокислоты [24, 25]. Одним из подходов к преодолению соответствующей лимитации является обеспечение в клетках *E. coli* функциональности искусственного шунта 2-кетоглутарат – сукцинат-полуальдегид – янтарная кислота, опосредованного действием гетерологичной 2-кетоглутаратдекарбоксилазы (КФ 4.1.1.71) и нативных для данной бактерии сукцинат-полуальдегиддегидрогеназ (КФ 1.2.1.24/1.2.1.7) [19, 20, 22]. При этом, поскольку сукцинил-КоА-синтетаза катализирует обратимую интерконверсию янтарной кислоты и сукцинил-КоА, синтезированная рекомбинантами янтарная кислота может быть превращена в соответствующий тиоэфир, необходимый для биосинтеза тех или иных целевых соединений, при усилении в штаммах экспрессии генов, кодирующих компоненты соответствующего ферментативного комплекса [26, 27]. Соответственно, перенаправление потока углерода от 2-кетоглутарата к сукцинил-КоА через промежуточное образование сукцинат-полуальдегида и янтарной кислоты может рассматриваться в качестве одной из возможных стратегий для дальнейшего улучшения биосинтетических характеристик полученных в работе рекомбинантов.

В итоге, в результате проведенного исследования, сконструированы штаммы *E. coli* способные к повышенному биосинтезу адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК. Показано позитивное влияние усиления генерации ЩУК из трехуглеродных предшественников на биосинтез штаммами целевого соединения. Выявлена прямая зависимость между интенсификацией ЦТК и ростом эффективности биосинтеза полученными рекомбинантами адипиновой кислоты. Предложена стратегия дальнейшего улучшения биосинтетических характеристик соответствующих адипат-продуцирующих штаммов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект № 22–14–00040).

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. *Lang M., Li H.* // *ChemSusChem*. 2022. V. 15. № 1. e202101531.
<https://doi.org/10.1002/cssc.202101531>
2. *Skoog E., Shin J.H., Saez-Jimenez V., Mapelli V., Olsson L.* // *Biotechnol. Adv.* 2018. V. 36. № 8. P. 2248–2263.
3. *Thomas J.M., Raja R., Johnson B.F., O'Connell T.J., Sankar G., Khimyak T.* // *Chem. Commun.* 2003. V. 21 № 10. P. 1126–1127.
4. *Lin Y., Sun X., Yuan Q., Yan Y.* // *Metab. Eng.* 2014. V. 23. P. 62–69.
5. *Zhang H., Li Z., Pereira B., Stephanopoulos G.* // *Microb. Cell. Factories*. 2015. V. 14. № 1.
<https://doi.org/10.1186/s12934-015-0319-0>
6. *Weber C., Brueckner C., Weinreb S., Lehr C., Essl C., Boles E.* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. V. 78. P. 8421–8430.
7. *Curran K.A., Leavitt J.M., Karim A.S., Alper H.S.* // *Metab. Eng.* 2013. V. 15. P. 55–66.
8. *Raj K., Partow S., Correia K., Khusnutdinova A.N., Yakunin A.F., Mahadevan R.* // *Metab. Eng. Commun.* 2018. V. 6. P. 28–32.
9. *Kallscheuer T., Gätgens J., Lübcke M., Pietruszka J., Bott M., Polen T.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. V. 101. № 6. P. 2371–2382.
10. *Yu J.L., Xia X.X., Zhong J.J., Qian Z.G.* // *Biotechnol. Bioeng.* 2014. V. 111. № 12. P. 2580–2586.
11. *Babu T., Yun E.J., Kim S., Kim D.H., Liu K.H., Kim S.R., Kim K.H.* // *Proc. Bioch.* 2015. V. 50. № 12. P. 2066–2071.
12. *Cheong S., Clomburg J.M., Gonzalez R.* // *Nat. Biotechnol.* 2016. V. 34. № 5. P. 556–561.
13. *Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2023. Т. 59. № 3. С. 235–243.
14. *Zhao M., Huang D., Zhang X., Koffas M.A.G., Zhou J., Deng Y.* // *Metab. Eng.* 2018. V. 47. P. 254–262.
15. *Skorokhodova A.Y., Gulevich A.Y., Morzhakova A.A., Shakulov R.S., Debabov V.G.* // *Biotechnol. Lett.* 2013. V. 35. № 4. P. 577–583.
16. *Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T.* // *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2 nd Ed., N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
17. *Datsenko K.A., Wanner B.L.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
18. *Скороходова А.Ю., Стасенко А.А., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2018. Т. 54. № 3. С. 244–252.
19. *Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2023. Т. 59. № 6.
<https://doi.org/10.31857/S0555109923060168>
20. *Skorokhodova A.Y., Gulevich A.Y., Debabov V.G.* // *Biotechnol. Rep.* 2022. V. 33. e00703.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00703>
21. *Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М. и др.* // *Молекулярная биология*. 2009. Т. 43. № 3. С. 547–557.
22. *Skorokhodova A.Y., Stasenko A.A., Krasilnikova N.V., Gulevich A.Y., Debabov V.G.* // *Fermentation*. 2022. V. 8. № 12. 738.
<https://doi.org/10.3390/fermentation8120738>
23. *Park S.J., Chao G., Gunsalus R.P.* // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. № 13. P. 4138–4142.
24. *Chang D.E., Shin S., Rhee J.S., Pan J.G.* // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. № 21. P. 6656–6663.
25. *Burgard A., Burk M.J., Osterhout R., Van Dien S., Yim H.* // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016. V. 42. P. 118–125.
26. *Choi S., Kim H.U., Kim T.Y., Lee S.Y.* // *Metab. Eng.* 2016. V. 38. P. 264–273.
27. *Yim H., Haselbeck R., Niu W., Pujol-Baxley C., Burgard A., Boldt J. et al.* // *Nat. Chem. Biol.* 2011. V. 7. № 7. P. 445–452.

Effect of the Tricarboxylic Acid Cycle Intensification on Biosynthesis of Adipic Acid Through the Inverted Fatty Acid β -Oxidation by *Escherichia coli* Strains

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

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

*e-mail: andrey.gulevich@gmail.com.ru

Using previously engineered adipate-secreting *Escherichia* MG1655 *lacI*^Q, Δ *ackA-pta*, Δ *poxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, P_L-SD_{φ10}-*atoB*, P_{trc-ideal-4}-SD_{φ10}-*fadB*, Δ *fadE*, P_L-SD_{φ10}-*tesB*, Δ *yciA*, P_{trc-ideal-4}-SD_{φ10}-*fabI*, P_L-SD_{φ10}-*paaJ*, Δ *aceBAK*, Δ *glcB* as a core strain, the derivatives capable of enhanced synthesis of the target compound from glucose via the reversed fatty acid β -oxidation pathway were obtained. The respective effect was achieved due to the intensification of the tricarboxylic acid cycle in the cells. Prevention of multiple cycle turnovers, resulting from the inactivation of succinate dehydrogenase, had no pronounced effect on the formation of adipic acid by the recombinant. Upon the cycle intensification due to enhancing anaplerotic oxaloacetic acetic acid formation from phosphoenolpyruvate, resulting from the increased expression of the native *ppc* gene, the synthesis of adipic acid rose 1.2-fold to ~390 μ M. Enabling the formation of oxaloacetate from pyruvic acid, by introducing in the cells of heterologous *Bacillus subtilis* pyruvate carboxylase, resulted in a 1.5-fold intensification of the cycle, concomitantly with the proportional increase in adipic acid secretion to ~496 μ M. Subsequent inactivation of *sdhAB* genes in the strain increased the secretion of the target compound only slightly and adipic acid titer reached ~520 μ M. The obtained data indicated a direct dependence of the efficiency of adipic acid synthesis by the engineered strains on the degree of intensification of the tricarboxylic acid cycle.

Keywords: adipic acid, *Escherichia coli*, fatty acid β -oxidation, metabolic engineering, tricarboxylic acid cycle, succinyl-CoA

УДК 577.15.08;577.152.34

РЕКОМБИНАНТНАЯ ХИМОТРИПСИНОПОДОБНАЯ ПЕПТИДАЗА *Tenebrio molitor* С НЕКАНОНИЧЕСКИМ СУБСТРАТ-СВЯЗЫВАЮЩИМ САЙТОМ

© 2024 г. В. Ф. Терешенкова¹, Н. И. Жиганов², А. С. Губаева¹, Ф. И. Акентьев^{3, 4}, Я. Е. Дунаевский⁵, Д. Г. Козлов³, М. А. Белозерский⁵, Е. Н. Элпидина^{5, *}

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

³Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

⁴“Курчатовский геномный центр”, НИЦ “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

⁵Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Москва, 119991 Россия

*e-mail: elp@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 14.12.2023 г.

После доработки 08.01.2024 г.

Принята к печати 10.01.2024 г.

Охарактеризована щелочная химотрипсиноподобная сериновая пептидаза большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* с неканоническим субстрат-связывающим субсайтом, которая может быть использована в качестве добавки в различные биопрепараты. Фермент был получен в форме рекомбинантного препарата, очистка была проведена с использованием аффинной хроматографии на Ni²⁺-НТА агарозе. Было определено, что константы специфичности (k_{cat}/K_m) для субстратов химотрипсина Glp-AAF-pNA, Suc-AAPF-pNA и Ac-Y-pNA составляли 7.0, 4.2 и 0.9 (мкМ·мин)⁻¹ соответственно. Оптимум активности наблюдался при pH 9.0. Фермент был стабилен при щелочных pH, в присутствии БСА также и при кислых pH. Пептидаза ингибировалась синтетическими ингибиторами, такими как RMSF, ТРСК, химостатин, в то время как ЭДТА, Е-64, пепстатин не влияли на активность фермента. Очищенный фермент продемонстрировал высокую стабильность в течение 2.5 ч в присутствии БСА. Короткий жизненный цикл насекомого и секреция множества пептидаз в средней кишке с высокой каталитической активностью и стабильностью могут сделать *T. molitor* отличным альтернативным источником промышленно важных ферментов для использования в качестве добавок в различных биопрепаратах (например, пятновыводителях, моющих средствах и т.п.).

Ключевые слова: сериновые пептидазы, химотрипсиноподобные пептидазы, протеолитические ферменты, пептидазы насекомых, SerP38, *Tenebrio molitor*

DOI: 10.31857/S0555109924030045 EDN: EXBTGS

В связи с бурным развитием биотехнологии наблюдается растущий интерес и спрос на ферменты с новыми свойствами. Пептидазы, которые играют важную роль в метаболизме всех форм жизни, включая прокариот, грибы, растения и животных, составляют почти 60% от общего объема промышленного рынка ферментов [1]. Изучение различных свойств пептидаз является необходимым и непрерывным процессом как из-за их физиологической важности, так и из-за широкого применения в научных исследованиях и промышленности [2, 3]. Большой коммерческий спрос обуславливает непрекращающийся поиск альтернативных источников пептидаз с подходящей специфичностью и широким диапазоном устойчивости к различным факторам внешней

среды. Щелочные пептидазы бактерий и грибов являются основным источником для промышленного применения [4, 5]. Пептидазам насекомых уделяется относительно меньшее внимание, чем микробным протеазам. Однако пептидазы насекомых могли бы стать отличными кандидатами для промышленного применения. Протеолиз — это важная часть переваривания пищи у насекомых, и он опосредуется согласованным действием нескольких пептидаз [6–8]. Сериновые пептидазы из кишечника насекомых, охарактеризованные у *Osphranteria coerulescens* Redtenbacher, *Periplaneta americana* L., *Glyphodes pyloalis* Walker и др., обладали важными свойствами, такими как стабильность при высоких температурах и высокая активность при щелочных pH [8–10].

Сериновые пептидазы представляют собой очень разнообразную группу протеолитических ферментов и относятся к наиболее хорошо изученным и охарактеризованным с биохимической точки зрения пептидазам млекопитающих. Одно из наиболее важных семейств сериновых пептидаз S1 включает такие ферменты, как трипсины, химотрипсины и эластазы, которые обладают очень консервативной каталитической триадой His-Asp-Ser. Однако в случае насекомых число работ, связанных с выделением и биохимической идентификацией сериновых пептидаз, достаточно ограничено, хотя они являются важнейшими протеолитическими ферментами, ответственными за пищеварение, развитие и другие процессы, включая передачу сигналов и иммунные реакции у насекомых [11–14]. Активные химотрипсиноподобные пептидазы мало охарактеризованы, что мешает их коммерческому использованию. Между тем биоинформатические исследования последних лет выявили огромное разнообразие сериновых пептидаз у насекомых. Так, у плодовой мушки *Drosophila melanogaster* было выявлено 190 генов предположительно активных сериновых пептидаз [15], у комара *Anopheles gambiae* 220 генов [16], у капустной моли *Plutella xylostella* (L.) 120 генов [17]. В геномных и транскриптомных исследованиях гены пищеварительных пептидаз демонстрируют максимальные уровни экспрессии. Но если свойства трипсинов насекомых очень близки к ферментам других животных, то химотрипсины и химотрипсиноподобные пептидазы отличаются по ряду свойств от ферментов позвоночных животных. Отнесение указанных ферментов к химотрипсинам во многом обусловлено их субстратной специфичностью, проявляющейся в способности гидролизовать синтетические субстраты, содержащиеся в положении P1 остаток ароматических аминокислот — Phe, Tyr, реже остаток алифатического Leu. Для химотрипсинов насекомых при этом наблюдается явное предпочтение более длинных пептидных субстратов, таких как Suc-AAPF-pNA, в то же время короткие субстраты, такие как Suc-F-pNA, гидролизуются гораздо менее эффективно. Это наблюдение было подтверждено для пищеварительных химотрипсинов насекомых, относящихся к разным видам (*Tenebrio molitor*, *Periplaneta americana*, *Diatraea saccharalis*, *Spodoptera frugiperda*) [18, 19]. В работе [20] было показано, что для химотрипсинов насекомых наиболее предпочтителен остаток Phe в положении P1, гораздо менее эффективен остаток Tyr. Поэтому для обнаружения химотрипсиноподобных пептидаз у насекомых обычно используют более длинные субстраты, содержащие остаток Phe в P1.

Многообразие химотрипсиноподобных пептидаз с разной чувствительностью к ингибиторам у насекомых позволяет им адаптироваться к пище, содержащей различные ингибиторы. Так, в работе

[21] на насекомых *Helicoverpa zea* и *Agrotis ipsilon* было продемонстрировано, что если в их диете отсутствовал соевый ингибитор трипсина (STI), способный ингибировать также химотрипсин, то их химотрипсины были чувствительны к данному ингибитору. В то же время, если диета насекомых включала 1% STI, их химотрипсины оказывались нечувствительны к его действию.

Был проведен анализ объединенных транскриптомов кишечника личинок большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* и транскриптомов разных стадий онтогенеза этого жука, который позволил обнаружить 269 транскриптов сериновых пептидаз семейства химотрипсина S1, включающих транскрипты 137 активных пептидаз, 125 неактивных гомологов и 7 полипептидаз, содержащих в своем составе как активные пептидазы, так и неактивные гомологи. Их подробное изучение позволит получить новые знания об эволюции пептидаз, а также о механизмах пищеварения и метаболизма у насекомых.

В ряду выявленных пептидаз обращает на себя внимание пептидаза SerP38 (Serine Peptidase 38). Ген этого фермента относится к числу наиболее высокоэкспрессируемых сериновых пептидаз семейства S1 в кишечнике личинок *T. molitor* и предположительно участвует в пищеварительном процессе. Важным отличием SerP38 является неканонический состав субстрат-связывающего субсайта S1, характерный только для членистоногих животных. В настоящее время такие ферменты у млекопитающих неизвестны. Выявленная у сериновой пептидазы SerP38 структурная особенность вызывает интерес к ее изучению. У крабов пептидаза с подобным составом субсайта S1 гидролизует субстраты как химотрипсина, так и трипсина, а также коллаген [22, 23], в то время как у единственного охарактеризованного фермента насекомого, *Solenopsis invicta*, выявлена только активность по отношению к субстратам химотрипсина [24].

Характеристика пептидазы SerP38 может расширить наши представления о разнообразии и функциональных свойствах сериновых пептидаз семейства S1 и позволит углубить понимание их роли в биологических процессах.

Цель работы — характеристика физико-химических и энзиматических свойств рекомбинантной сериновой пептидазы rSerP38 *T. molitor*.

МЕТОДИКА

Материалы. В работе использовали следующие реактивы: акриламид, метилен-бис-акриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED) (“Reanal”, Венгрия), персульфат аммония, додецилсульфат натрия, кумаси G-250 (“Serva”, Германия), 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил] этансульфоновая кислота (HEPES), имидазол

(“Panreac”, США), уксусная кислота (“Реахим”, Россия), бычий трипсин (КФ 3.4.21.4) (“Sigma”, США). Ингибиторы: транс-эпоксисукцинил-L-лейциламидо-(4-гуанидино)-бутан (E-64), пепстатин А, N α -тозил-L-лизин хлорметилкетон гидрохлорид (TLCK), химостатин (“Sigma”, США), фенилметилсульфонил фторид (PMSF) (“Serva”, Германия), тозил-L-фенилаланин хлорметилкетон (TPCK) (“Merck”, США), соевый ингибитор трипсина Кунитца (“Fluka”, Швейцария), ингибитор трипсина из яичного белка, ингибитор трипсина из фасоли (“ICN Biomedicals”, США), Ni²⁺-NTA агароза (“GE Healthcare”, США). Субстраты: Suc-AAPF-pNA (Suc N-сукцинил, pNA остаток *n*-нитроанилина), Suc-AAA-pNA, MeOSuc-AAPV-pNA (MeOSuc N-метоксисукцинил), Suc-AAPL-pNA, Glp-AAL-pNA (Glp остаток пироглутаминовой кислоты), Z-FR-pNA (Z N-бензилоксикарбонил), Z-RR-pNA, Bz-R-pNA (Bz N α -бензоил), Suc-AAPF-AMC (AMC остаток 7-амино-4-метил-кумарина), Z-FR-AMC (“Bachem”, Швейцария); Ac-Y-pNA (Ac ацетил) (“Serva”, Германия), Glp-FL-pNA, Glp-AAF-pNA, Glp-F-pNA, Ac-F-pNA, Suc-F-pNA, For-AAL-pNA (For формил), Glp-FQ-pNA и Glp-FA-pNA – были синтезированы по стандартным методикам [25] в лаборатории химии белка кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова. Рекомбинантные препараты пробелка rProSerP38 и зрелой пептидазы rSerP38 *T. molitor* были получены в НИЦ “Курчатовский институт” (Россия) [26].

Определение активности рекомбинантного препарата rSerP38 *T. molitor* по хромогенным субстратам. Ферментативную активность пептидазы определяли по начальной скорости гидролиза хромогенного пептидного субстрата, содержащего остаток *n*-нитроанилина для детекции. В ячейку микропланшета вносили от 5 до 20 мкл препарата фермента, после чего добавляли 20 мМ Tris-HCl буфер, pH 8.0, или 0.1 М ацетат-фосфат-боратный универсальный буфер (УБ), pH 7.9 [27] до конечного объема 195 мкл. Смесь инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Затем добавляли 5 мкл раствора субстрата в диметилформамиде (ДМФА). Стандартная конечная концентрация субстрата в пробе 0.25 мМ, концентрация ДМФА в реакционной смеси – 2.5% об. Количество образовавшегося *n*-нитроанилина определяли в 96-луночных планшетах на микропланшетном фотометре ELx808 (“BioTek Instruments, Inc.”, США), измеряя оптическую плотность раствора при 405 нм в нулевой момент времени и через каждые 5 мин. Смесь инкубировали при 37°C во встроенном термостате прибора ELx808 или в термостатируемом шкафу (“Binder”, Германия).

Активность пептидазы рассчитывали по формуле:

$$A = kdA_{405}/dt,$$

где *A* – активность препарата, нмоль/мин, *k* = 31.9 нмоль/опт.ед. – количество *n*-нитроанилина, при котором оптическая плотность раствора была равна 1 опт. ед. (коэффициент определялся в специальном опыте путем построения калибровочной прямой зависимости поглощения растворов от концентрации *n*-нитроанилина), dA_{405}/dt – изменение оптической плотности раствора при 405 нм в момент времени *t*, опт.ед./мин.

Каждый опыт проводили не менее чем в трех повторностях. Для статистической обработки полученных данных использовали Microsoft Excel 2013 с применением встроенных функций для оценки стандартного отклонения и доверительного интервала с использованием распределения Стьюдента (уровень значимости (альфа) – 0.1, используемый для вычисления доверительного уровня).

Процессинг рекомбинантного препарата пептидазы rProSerP38. Стандартные условия процессинга профермента rProSerP38 включали его инкубацию при 25°C в 0.1 М УБ, pH 7.9, в течение 45 мин в присутствии трипсина; концентрации компонентов в инкубационной смеси: 47 нМ rProSerP38, 5.7 нМ трипсина. При определении оптимального времени процессинга rProSerP38 и изучении стабильности процессированного препарата после активации профермента трипсином в реакционную смесь для ингибирования трипсина с целью остановки реакции добавляли TLCK (3.3 мМ).

Характеристика стабильности препаратов рекомбинантной пептидазы rSerP38. Зрелую пептидазу rSerP38 (5 мкг/мл) смешивали с 0.1 М УБ, pH 7.9, в объемном соотношении 1 : 38 и инкубировали при 25°C в течение 0, 30, 60, 90, 120 мин. Затем вносили по 195 мкл данной смеси в 96-луночный планшет, добавляли 5 мкл субстрата Suc-AAPF-pNA и определяли активность как указано выше.

В случае профермента проводили процессинг rProSerP38 трипсином, после чего раствор процессированной пептидазы rProSerP38 и трипсина смешивали с 0.13 М раствором TLCK и инкубировали в течение 0, 30, 60, 90, 120 мин. Затем вносили по 195 мкл данного раствора в 96-луночный планшет, добавляли 5 мкл субстрата и определяли активность. Стабильность препаратов характеризовали по скорости падения активности со временем.

Аффинная хроматография процессированной рекомбинантной пептидазы rProSerP38. Профермент rProSerP38 процессировали трипсином как указано выше, затем наносили на колонку, содержащую 1 мл Ni²⁺-NTA агарозы. Элюцию осуществляли ступенчато с использованием градиента концентрации имидазола 0, 25, 250 мМ в буфере А (50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 300 мМ NaCl). Активность во фракциях определяли по субстрату rSerP38 Suc-AAPF-pNA и субстрату трипсина Z-FR-pNA.

Последующее обессоливание и концентрирование препарата проводили на центриконах Amicon Ultra 3K (“Millipore”, Германия) на центрифугах Centrifuge 5415C и Minispin (“Eppendorf”, Германия) при 16800 g 20 мин.

Электрофорез в ПААГ в нативных условиях и постэлектрофоретическое тестирование активности по флуорогенным субстратам. Электрофорез в нативных условиях проводили в 12%-ном разделяющем и 4%-ном концентрирующем ПААГ в буфере, содержащем 35 мМ HEPES и 43 мМ имидазол, при pH 7.2, по методу, описанному в [28]. Объемы проб, которые наносили на гель, рассчитывали, уравнивая препараты по активности расщепления соответствующих хромогенных субстратов Z-FR-pNA и Suc-AAPF-pNA.

Постэлектрофоретическое тестирование активности сериновых пептидаз проводили непосредственно в ПААГ с использованием селективных флуорогенных субстратов Z-FR-AMC для трипсиноподобных пептидаз и Suc-AAPF-AMC для химотрипсиноподобных. После проведения электрофореза гель инкубировали в 0.125 мМ растворе субстрата в 0.1 М УБ, pH 7.9, в течение 10 мин. Флуоресцирующие полосы продуктов реакции визуализировали под УФ-лампой при 366 нм и фотографировали.

Изучение влияния бычьего сывороточного альбумина (БСА) на стабильность препарата зрелой пептидазы rSerP38. БСА в одной из концентраций (0.014, 0.069, 0.35, 1.7 мг/мл) смешивали с раствором rSerP38 (5 мкг/мл) и 0.1 М УБ, pH 7.9 в объемном соотношении 1 : 1 : 37. В контроле вместо раствора БСА добавляли такое же количество буферного раствора. Затем смесь инкубировали при 25°C в течение 0, 30, 60, 90, 120 мин, после чего вносили по 195 мкл смеси в 96-луночный планшет, добавляли 5 мкл субстрата и определяли активность.

Определение кинетических параметров реакции гидролиза хромогенных субстратов пептидазой rSerP38. Для исследования кинетики ферментативной реакции готовили набор растворов субстратов (Suc-AAPF-pNA, Glp-AAF-pNA, Ac-Y-pNA) в ДМФА в концентрациях 4–20 мМ с шагом 2 мМ. Измерение активности фермента проводили по хромогенным субстратам как описано выше. Для анализа полученных экспериментальных данных методом нелинейной регрессии использовали программу “Origin 2011b (9.85)”.

Влияние pH на активность и стабильность препарата rSerP38. Для определения pH-оптимума фермента измеряли его активность по субстратам Suc-AAPF-pNA или Glp-AAF-pNA в 0.1 М УБ в диапазоне pH от 3.0 до 11.0 с шагом 0.5.

Для изучения pH-стабильности препарат rSerP38 инкубировали в 0.01 М УБ с pH от 2.5 до

11.0 с интервалом 0.5 единиц pH в течение 30 мин при 25°C. Затем pH во всех пробах доводили до значения 7.9 путем добавления 0.1 М УБ и измеряли активность, как описано выше. В случае процессированного rSerP38 также исследовали pH-стабильность в присутствии 0.62 мкМ БСА, при этом время инкубации увеличивали до 2 ч. Условия инкубации: 0.01 М УБ с pH от 2.5 до 11.0. Условия измерения активности: 0.1 М УБ pH 7.9; Suc-AAPF-pNA (0.25 мМ); ДМФА (2.5 об. %).

Изучение влияния ингибиторов на активность rSerP38. Влияние ингибиторов изучали с использованием коммерчески доступных PMSF, TLCK в концентрациях от 10 мкМ до 1 мМ; TPCK, химостатина, E-64, пепстатина в концентрациях от 1 мкМ до 0.1 мМ; белковых природных ингибиторов трипсина из сои Кунитца (0.8 нМ – 0.5 мкМ), ингибитора трипсина из фасоли (7 нМ – 20 мкМ), а также ингибитора трипсина из яичного белка (13 нМ – 1.3 мкМ). Реакционную смесь, содержащую фермент, ингибитор и 20 мМ Tris-HCl, pH 7.9, инкубировали 20 мин при 25°C. Затем определяли остаточную активность по субстрату Suc-AAPF-pNA и выражали в %. Для сравнения ингибирующего действия изучаемых белковых ингибиторов рассчитывали величину IC_{50} .

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пептидаза SerP38 *T. molitor* (NCBI ID: QRE01764) была получена в виде двух рекомбинантных препаратов: зрелого фермента (rSerP38) и профермента (rProSerP38). Первичная структура профермента rProSerP38 приведена на рис. 1.

Разработка условий процессинга профермента rProSerP38. Для работы с препаратом профермента rProSerP38 были разработаны условия его процессинга. Так как пропептид в составе профермента rProSerP38 заканчивался остатком Arg (рис. 1), то для его процессинга использовали трипсин. Предварительно была подобрана концентрация ингибитора трипсина TLCK, необходимая для подавления активности трипсина по окончании процессинга – она составила 3.3 мМ

>SerP38

```
SPLDVDPLYSWR|VVGSTASAGQYPFIMSLRTIFNSHTCGGSLIANNW
VVTAARCVYNSSPSSYSVVAGINQLNSNSGVQVGVAEIIVHPNYQNLI
INDIALRLRSSIAESNLKIIIELESENADPRDCVLIGWRTSYPGSI
PNDLQHLPLKSVPYEQCKNAWINQEGTILESEICTLTQRGGACGHDG
GPLISQEGGNAKLIGLVSWGSPCAVGMPVYTRVSAFRDWIAQNIN
```

Рис. 1. Последовательность rProSerP38. R| – место процессинга трипсином (отщепление пропептида). Красным отмечены аминокислотные остатки активного центра (HDS), голубым – субстрат-связывающего субсайта S1 (GGD).

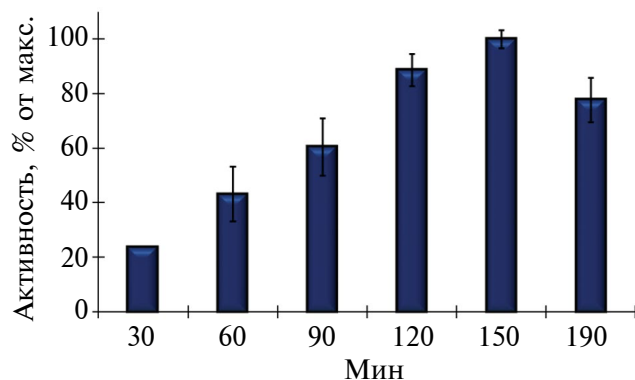


Рис. 2. Зависимость активности процессированного препарата рекомбинантной пропептидазы rProSerP38 *T. molitor* от времени процессинга. Планки погрешностей отражают доверительный интервал.

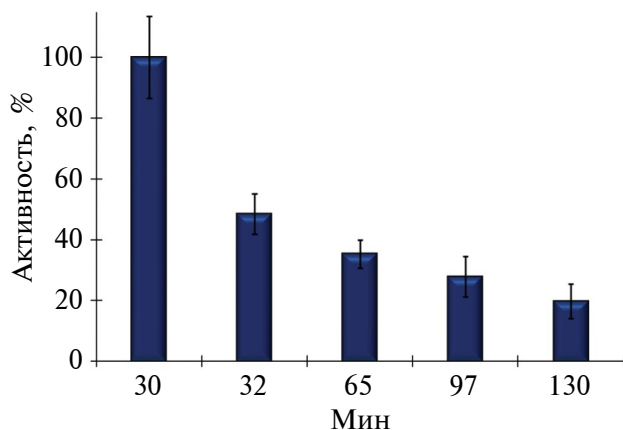


Рис. 3. Стабильность зрелой формы рекомбинантной пептидазы rSerP38 *T. molitor*. Планки погрешностей отражают доверительный интервал.

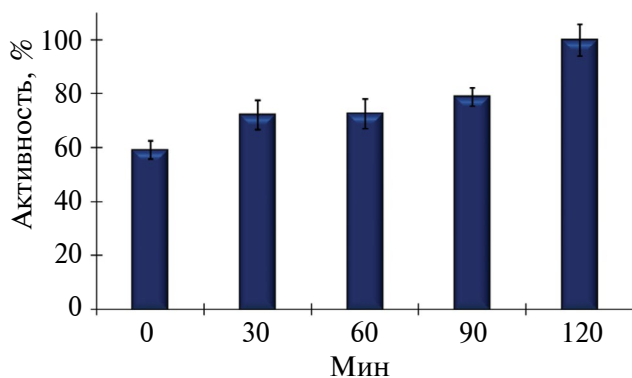


Рис. 4. Стабильность процессированной рекомбинантной пептидазы rProSerP38 *T. molitor*. Планки погрешностей отражают доверительный интервал.

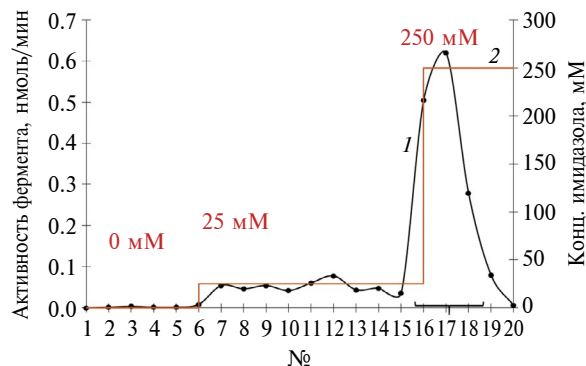


Рис. 5. Очистка процессированного препарата рекомбинантной пропептидазы rProSerP38 *T. molitor* методом металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni^{2+} -NTA агарозе: 1 – активность фермента по субстрату Suc-AAPF-pNA, 2 – градиент концентрации имидазола (mM).

TLCK в реакционной смеси. Анализ зависимости нарастания активности от времени процессинга трипсином показал, что максимум активности препарата rProSerP38 после процессинга наблюдается при 150 мин инкубации (рис. 2).

Характеристика стабильности препаратов пептидазы rSerP38 и процессированного профермента rProSerP38. Было проведено сравнение стабильности препаратов rSerP38 – зрелого рекомбинантного фермента, полученного без пропептида, и процессированного трипсином профермента rProSerP38.

В случае зрелой пептидазы rSerP38 наблюдалось снижение активности на протяжении 2 ч инкубации в буфере с pH 7.9 при температуре 25°C (рис. 3).

В случае процессированного препарата профермента rProSerP38 не наблюдалось падения активности, по крайней мере, в течение 2 ч инкубации при pH 7.9 и температуре 25°C (рис. 4). Различие в стабильности двух препаратов SerP38, зрелой пептидазы и активированной *in vitro* пропептидазы, предположительно связано с участием пропептида в стабилизации зрелого фермента, так как в случае профермента отщепившийся пропептид после процессинга остается в реакционной смеси и может способствовать поддержанию стабильности зрелой пептидазы.

Наблюдаемый в случае процессированного препарата профермента небольшой рост активности на протяжении 2 ч, предположительно, обусловлен тем, что оставшийся в препарате непроцессированный профермент подвергался автокаталитическому процессингу по связи, образованной остатком Tyr. На рис. 11 видно, что rSerP38 способна расщеплять Tyr-содержащий субстрат. Возможность автокаталитического процессинга была

показана ранее с использованием масс-спектрометрического анализа [26] и подтверждена на рис. 6, дорожка 1.

Возможность участия пропептида в стабилизации процессированного rProSerP38 была подтверждена удалением пропептида сразу после процессинга с использованием аффинной металл-хелатной хроматографии на Ni^{2+} -NTA-агарозе рекомбинантного профермента, содержащего на С-конце His₆-tag (рис. 5). В полученном элюате присутствовала активность только по специфическому субстрату химотрипсиноподобных пептидаз Suc-AAPF-pNA, и полностью отсутствовала активность по специфическому субстрату трипсина Z-FR-pNA. Фракции 16, 17 и 18, наиболее активные по субстрату пептидазы rSerP38 Suc-AAPF-pNA, объединяли, обессоливали и концентрировали.

Анализ результатов процессинга и очистки фермента проводили методом электрофореза в ПААГ в нативных условиях с последующим тестированием в геле активности по флуорогенным субстратам rSerP38 Suc-AAPF-AMC и трипсина Z-FR-AMC. Как и в случае с элюатом с колонки, по субстрату

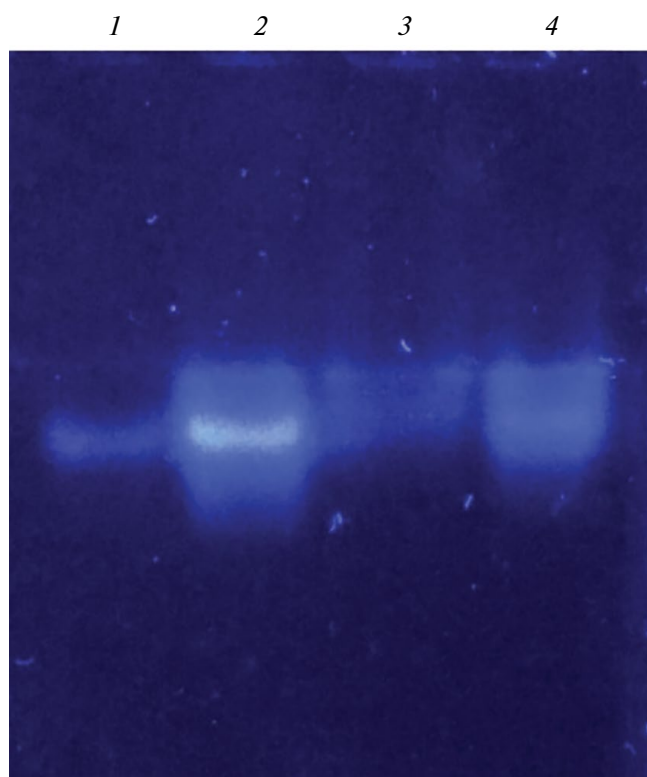


Рис. 6. Результат постэлектрофоретического тестирования активности по флуорогенному субстрату Suc-AAPF-AMC: 1 – препарат rProSerP38 до процессинга; 2 – препарат пептидазы rProSerP38, процессированной трипсином; 3 – объединенные фракции элюата 16–18 до обессоливания; 4 – объединенные фракции 16–18 после обессоливания и концентрирования.

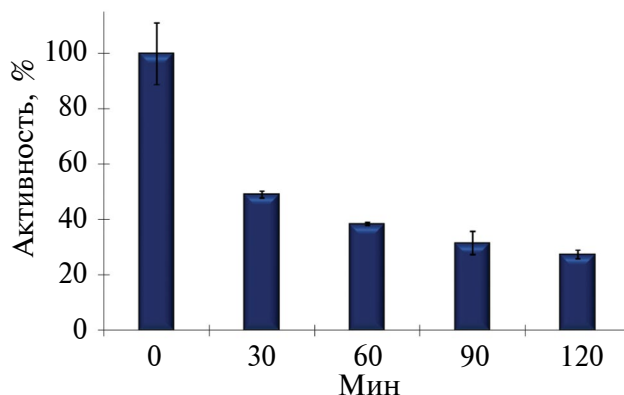


Рис. 7. Стабильность процессированного и очищенного препарата пептидазы rProSerP38 *T. molitor*. Планки погрешностей отражают доверительный интервал.

трипсина активность отсутствовала. На рис. 6 приведен результат детектирования ферментативной активности в геле по субстрату Suc-AAPF-AMC. Присутствие небольшой ферментативной активности на дорожке 1 в препарате профермента rProSerP38 до проведения процессинга трипсином подтвердило предположение об автопроцессинге профермента. Сравнение 1 и 2 дорожек свидетельствовало о явной активации в результате процессинга трипсином препарата профермента, который и был затем очищен аффинной хроматографией на Ni^{2+} -NTA-агарозе (дорожки 3, 4).

После очистки процессированного профермента наблюдаемое в течение 2 ч изменение его активности (рис. 7) отражало значительное ее падение и было аналогично изменениям, полученным для зрелой формы rSerP38 (рис. 3).

Стабильность зрелой пептидазы rSerP38 в присутствии БСА. Были разработаны условия стабилизации зрелой формы пептидазы rSerP38 в присутствии белкового субстрата. Для этого использовали растворы БСА в концентрациях, соответствующих молярным соотношениям rSerP38 и БСА 1 : 1, 1 : 5, 1 : 25, 1 : 125. Было обнаружено, что при соотношении rSerP38 : БСА, равном 1 : 125, активность фермента сохранялась в течение 2.5 ч. Предположительно, такой результат может объясняться отсутствием процесса автолиза зрелого фермента в этих условиях (рис. 8).

Кроме того, при этом же соотношении БСА и rSerP38 наблюдалось заметное увеличение активности пептидазы спустя 30 мин инкубации с БСА. Это может быть связано с тем, что БСА способствует правильному посттрансляционному фолдингу белка, в результате чего реакция протекает эффективнее.

Влияние pH на активность и стабильность рекомбинантной пептидазы rSerP38. pH-оптимум и pH-стабильность определяли в диапазоне от 3.0

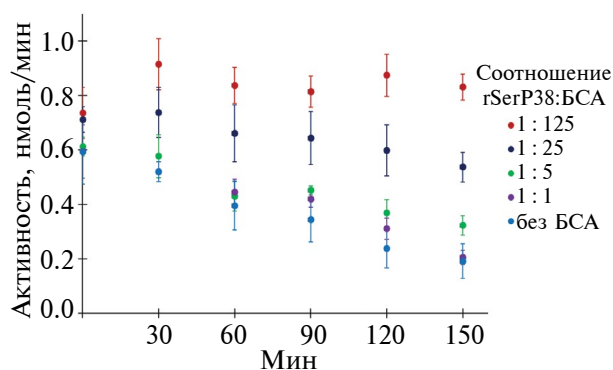


Рис. 8. Стабильность зрелой формы рекомбинантной пептидазы rSerP38 *T. molitor* в присутствии БСА.

до 11.0. Фермент проявлял наибольшую активность при щелочных pH с максимумом активности при pH 9.0 (рис. 9).

Из-за сравнительно низкой стабильности очищенного фермента для изучения зависимости его стабильности от pH использовали время инкубации при различных значениях pH 30 мин (рис. 10а). Чтобы оценить влияние pH на более длительном временном интервале в смесь для инкубации добавляли БСА и инкубировали в течение 2 ч (рис. 10б). На основании полученных результатов можно сделать вывод, что пептидаза сохраняла 85–100% активности при pH от 5.0 до 8.5 в отсутствие БСА, тогда как в присутствии БСА наблюдалась заметная стабилизация фермента в более кислой среде.

Определение субстратной специфичности рекомбинантной пептидазы rSerP38. Данные о субстратной специфичности rSerP38 указывают на то, что она является химотрипсиноподобной пептидазой (рис. 11). Предпочтительными оказались субстраты, содержащие остатки Tug и Phe в положении P1, в то время как активность по отношению к субстратам, содержащим Leu в P1, была значительно ниже. Совсем не гидролизировались субстраты эластаз (Suc-AAPV-pNA,

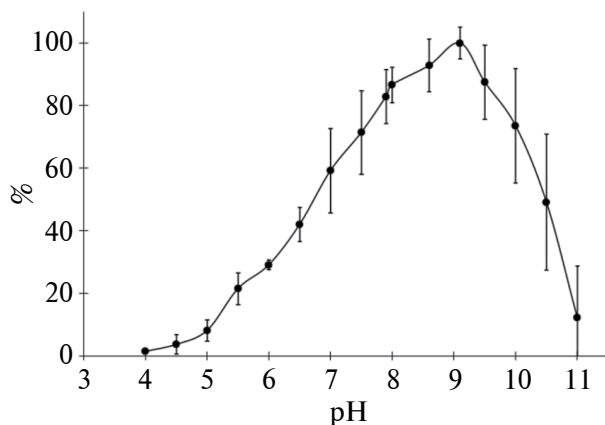


Рис. 9. Влияние pH на активность рекомбинантной пептидазы rSerP38 *T. molitor*.

Таблица 1. Кинетические параметры гидролиза субстратов рекомбинантной пептидазой rSerP38 *T. molitor*

Субстрат	K_M , mM	k_{cat} , мин ⁻¹	k_{cat}/K_M , (мкМ·мин) ⁻¹
Glp-AAF-pNA	0.21 ± 0.02	1510 ± 50	7.0 ± 1.0
Suc-AAPF-pNA	0.15 ± 0.02	620 ± 30	4.2 ± 0.8
Ac-Y-pNA	1.6 ± 0.3	1400 ± 200	0.9 ± 0.3

Suc-AAA-pNA), трипсиноподобных пептидаз (Z-FR-pNA, Z-RR-pNA, Bz-R-pNA) и цистеиновых пептидаз (Glp-FA-pNA, Glp-FQ-pNA).

Более эффективно реакция протекала для более длинных субстратов, но и короткие субстраты тоже гидролизировались, хотя с несколько меньшей эффективностью. Важность N-концевой защитной группы субстрата при определении ферментативной активности подтверждается тем, что при сравнении ряда коротких субстратов с одним и тем же аминокислотным остатком в положении P1 эффективность их гидролиза была различной и усиливалась в ряду Suc-F-pNA – Ac-F-pNA – Glp-F-pNA, что в данном случае отражало предпочтительность Glp в качестве защитной группы.

Кинетика реакций гидролиза субстратов Glp-AAF-pNA, Suc-AAPF-pNA и Ac-Y-pNA. Наибольшая активность для rSerP38 наблюдалась по отношению к субстратам Glp-AAF-pNA, Suc-AAPF-pNA и Ac-Y-pNA. Для них была исследована кинетика зависимости скорости реакций от концентрации субстрата (рис. 12а–в).

Полученные зависимости обрабатывали при помощи нелинейной регрессии и определяли кинетические параметры гидролиза – константу Михаэлиса K_M , каталитическую константу k_{cat} (табл. 1).

Наиболее высокой каталитической эффективностью k_{cat}/K_M характеризовался субстрат Glp-AAF-pNA, после него по убыванию эффективности – Suc-AAPF-pNA и Ac-Y-pNA.

Влияние ингибиторов на активность рекомбинантной пептидазы rSerP38. Изучение действия синтетических и белковых ингибиторов на пептидазу rSerP38 показало, что среди синтетических ингибиторов наиболее эффективными оказались ингибитор сериновых пептидаз PMSF и ингибиторы химотрипсиноподобных пептидаз – TPCK и химостатин (табл. 2). Это согласовывалось с результатами, полученными в ходе исследования субстратной специфичности, и подтверждало то, что rSerP38 являлась химотрипсиноподобной пептидазой. Ингибиторы цистеиновых пептидаз (E-64)

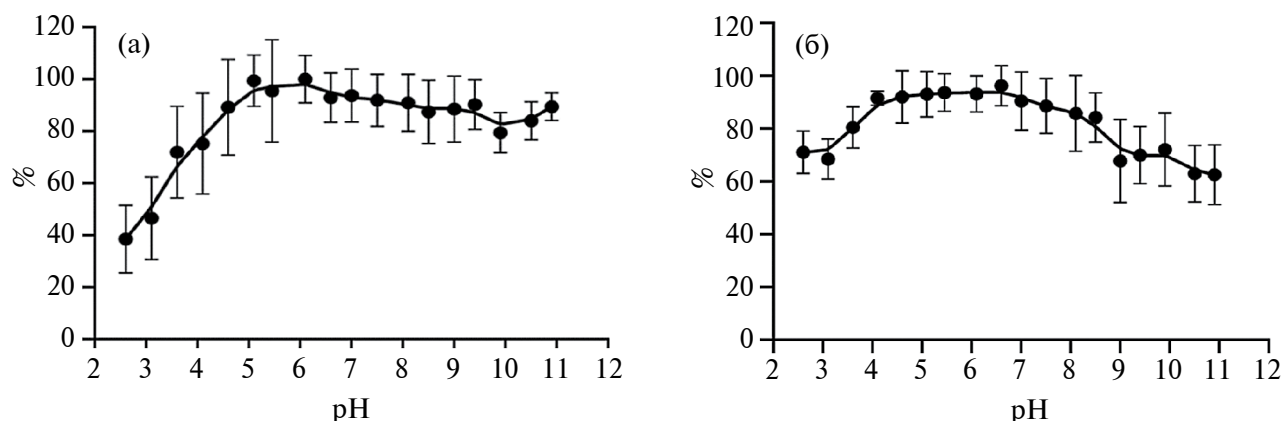


Рис. 10. Влияние pH на стабильность рекомбинантной пептидазы rSerP38 *T. molitor* (7 нМ): а) без БСА, инкубация 30 мин; б) в присутствии БСА (0.62 мкМ).

и трипсиноподобных пептидаз (TLCK) не подавляли активность rSerP38. Интересно, что некоторое ингибирующее действие было выявлено при использовании высокой концентрации ингибитора аспартильных пептидаз пепстатина.

Среди белковых ингибиторов пептидаз рассматривали действие на rSerP38 соевого ингибитора Кунитца, ингибитора трипсина из фасоли и ингибитора трипсина из яичного белка, способные ингибировать не только трипсин, но и химотрипсин [29, 30]. Эффективными оказались соевый ингибитор Кунитца и ингибитор трипсина из фасоли (табл. 3), тогда как ингибитор трипсина из яичного белка не только не подавлял активность пептидазы, а даже стабилизировал, оказывая эффект, аналогичный тому, что наблюдали в присутствии БСА. Для соевого ингибитора Кунитца и ингибитора трипсина из фасоли были определены также параметры IC_{50} .

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Активность исследуемой пептидазы регулируют три основных процесса: синтез и секреция, активация предшественника (зимогена) и распознавание сайта связывания субстрата. Результаты работы показали, что пропептид не только поддерживает пептидазу в неактивном состоянии, но и стабилизирует фермент после его процессинга. Удаление пропептида из среды после процессинга приводило к ускорению инактивации зрелого фермента. Наличие оптимума pH в щелочной области коррелирует с тем, что фермент активен в РМ, где pH содержимого в среднем 7.9 [31]. Следует отметить, что и другие химотрипсиноподобные пептидазы насекомых имели pH оптимум от 8 до 9.5 [19, 24, 32–36]. Поскольку ферменты средней кишки *T. molitor* обладали pH-оптимумом при щелочном pH, эти насекомые могли быть использованы

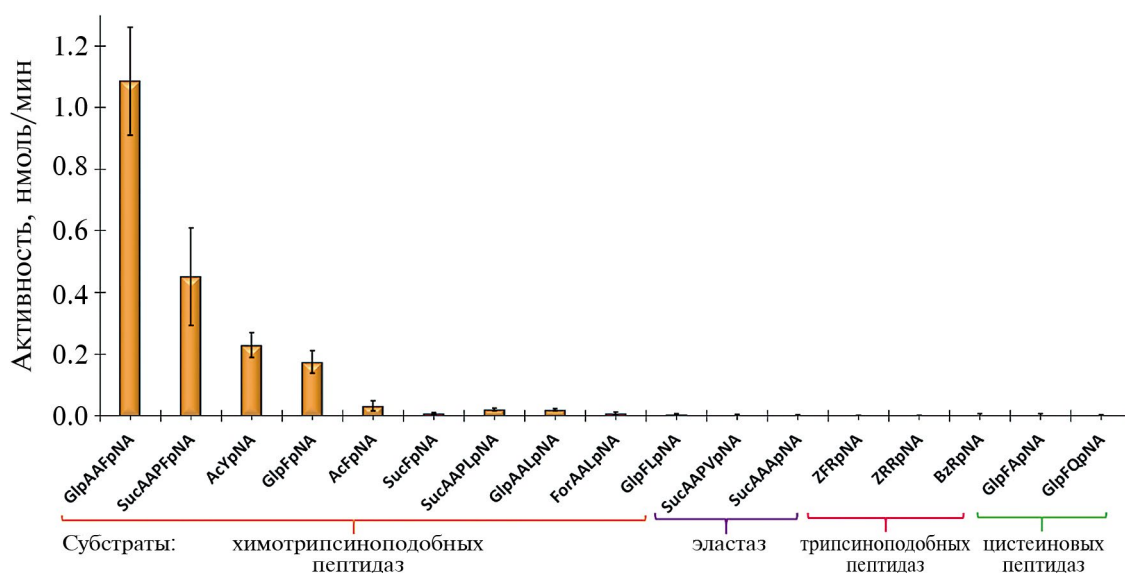


Рис. 11. Активность рекомбинантной пептидазы rSerP38 *T. molitor* по отношению к различным субстратам.

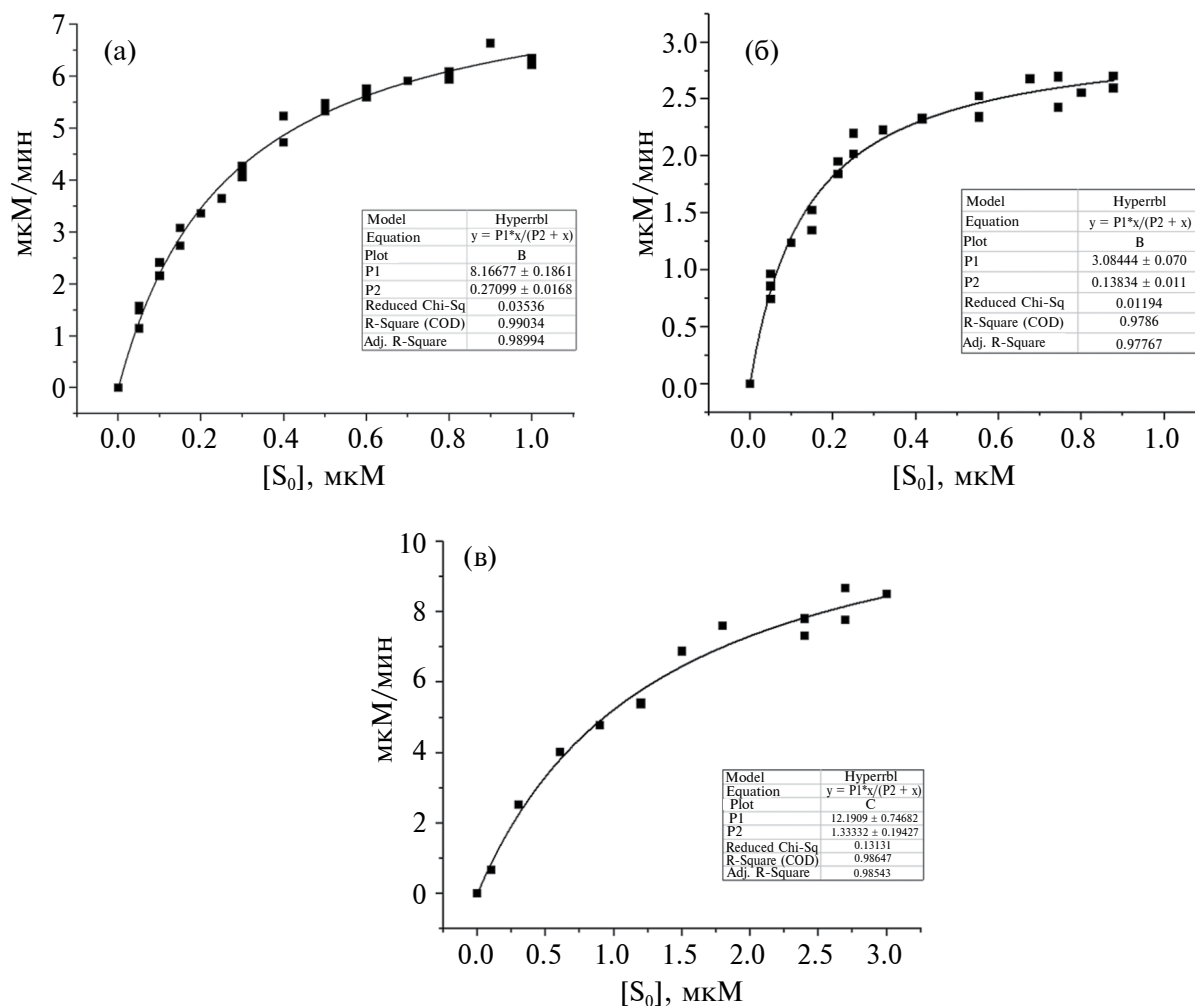


Рис. 12. Зависимость скорости ферментативной реакции гидролиза пептидазой rSerP38 субстратов: а) Gln-AAF-pNA (0.1–1.0 мкМ); б) Suc-AAPF-pNA (0.1–1.0 мМ); в) Ac-Y-pNA (0.1–3.0 мМ).

в качестве многообещающего источника пептидаз, имеющих промышленное применение. В настоящем исследовании была охарактеризована сериновая пептидаза химотрипсин из средней кишки *T. molitor* на предмет ее стабильности в экстремальных условиях щелочности, которые обычно встречаются при промышленной переработке. Пептидазы насекомых с высокой каталитической активностью и стабильностью в экстремальных условиях окружающей среды могут быть подходящими биокатализаторами для различного промышленного применения, а белковая инженерия может расширить возможности применения этих пептидаз для различных целей. rSerP38, как и другие химотрипсиноподобные пептидазы насекомых, хорошо гидролизует длинные синтетические субстраты. Наблюдалась незначительная разница в связывании пептидазой rSerP38 субстратов Gln-AAF-pNA и Suc-AAPF-pNA, на что указывали соответствующие значения K_m . В то же время субстрат Ac-Y-pNA характеризовался намного более высоким

параметром K_m , то есть значительно более низким сродством к исследуемому ферменту. Тем не менее, способность гидролизовать короткие субстраты могла свидетельствовать о том, что, в отличие от главного пищеварительного химотрипсина насекомого SerP69, который гидролизует только длинные субстраты [18], SerP38, активируясь на более поздних стадиях пищеварительного процесса, может расщеплять образовавшиеся короткие пептиды. Таким образом, полученные биохимические характеристики SerP38 коррелировали с выявленными ранее бионформатическими данными об отличиях исследованной нами пептидазы от других химотрипсиноподобных пептидаз пищеварительного комплекса *T. molitor*, возможно, свидетельствуя об особой роли, которую может играть SerP38 на разных этапах протеолиза. Следует отметить, что несмотря на неканоническую структуру субстрат-связывающего субсайта S1 GGD, выявленную только у представителей членистоногих, физико-химические и энзиматические свойства пептидазы rSerP38

Таблица 2. Влияние синтетических ингибиторов на активность рекомбинантной пептидазы rSerP38 *T. molitor*

Ингибитор	Концентрация, М	Активность, %
TPCK	10^{-4}	1
	10^{-5}	2
	10^{-6}	6
PMSF	10^{-3}	1
	10^{-4}	3
	10^{-5}	47
Химостатин	10^{-4}	0
	10^{-5}	2
	10^{-6}	10
E-64	10^{-4}	92
	10^{-5}	101
	10^{-6}	102
TLCK	10^{-3}	103
	10^{-4}	100
	10^{-5}	108
Пепстатин	10^{-4}	69
	10^{-5}	108
	10^{-6}	116

в целом близки к таковым химотрипсинов [37]. Сходные свойства были описаны и у единственного ранее охарактеризованного гомологичного фермента насекомых [24, 38]. В то же время, пептидаза с GGD структурой субстрат-связывающего субсайта S1 из краба *Uca pugilator* эффективно гидролизовала субстраты трипсина и демонстрировала коллагенолитическую активность [22, 23], которой rSerP38 не обладает (данные не приведены). Такие

различия в свойствах ферментов насекомых и ракообразных указывали на различия их структур, не отраженные общепринятым критерием специфичности в виде триады аминокислотных остатков субстрат-связывающего субсайта S1 [39].

Полученные результаты закладывают основу для дальнейших исследований функций этого семейства пептидаз у *T. molitor* и лучшего понимания его способности быстро адаптироваться к широкому спектру перемен окружающей среды, включая ингибиторы, встречающиеся естественным образом в растениях-хозяевах или в потребляемой пище. Этот вид демонстрирует высокую экологическую пластичность, которая и позволяет быстро адаптироваться к разнообразным средам обитания. Адаптация организма к критическим условиям существования требует оптимизации его ферментативного аппарата. Определение характеристик протеолитических пищеварительных ферментов насекомого открывает возможность для разработки эффективных стратегий борьбы с вредителями с помощью ингибиторов сериновых пептидаз в трансгенных продуктах. Такая работа имеет перспективу создания дополнительных генетических и метаболических мишеней для борьбы с вредителями в будущем.

Авторы чтут память безвременно ушедшей коллеги профессора Ирины Юрьевны Филипповой, направлявшей и руководившей данным исследованием.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22–24–00553, <https://rscf.ru/project/22–24–00553/>.

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

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

Таблица 3. Влияние белковых ингибиторов на активность рекомбинантной пептидазы rSerP38 *T. molitor*

Ингибитор	Концентрация, М	Активность, %	IC ₅₀ , нМ
SBTI Кунитца	$5 \cdot 10^{-7}$	1	25 ± 3
	$2 \cdot 10^{-8}$	68	
	$4 \cdot 10^{-9}$	98	
Ингибитор трипсина из фасоли	$4 \cdot 10^{-7}$	0	250 ± 40
	$2 \cdot 10^{-7}$	40	
	$7 \cdot 10^{-9}$	93	
Ингибитор трипсина из яичного белка	$1.3 \cdot 10^{-6}$	133	—
	$1.3 \cdot 10^{-7}$	126	
	$1.3 \cdot 10^{-8}$	119	

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *de Souza A.N., Martins M.L.* // Braz. J. Microbiol. 2001. V. 32. № 4. P. 271–275.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000400003>
2. *Zambare V.P., Nilegaonkar S.S., Kanekar P.P.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 23. P. 1569–1574.
<https://doi.org/10.1007/s11274-007-9402-y>
3. *Abidi F., Limam F., Nejib M.M.* // Process Biochem. 2008. V. 43. № 11. P. 1202–1208.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.018>
4. *Kumar C.G., Takagi H.* // Biotechnol. Adv. 1999. V. 17. № 7. P. 561–594.
[https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(99\)00027-0](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(99)00027-0)
5. *Singh J., Vohra R., Sahoo D.* // Biotechnol. Lett. 1999. V. 21. P. 921–924.
<https://doi.org/10.1023/A:1005502824637>
6. *Anwar A., Saleemuddin M.* // Arch. Insect. Biochem. Physiol. 2002. V. 51. № 1. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1002/arch.10046>
7. *Vinokurov K.S., Elpidina E.N., Oppert B., Prabhakar S., Zhuzhikov D.P., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A.* // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 2006 b. V. 145. № 2. P. 138–146.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.05.004>
8. *Sanatan P.T., Lomate P.R., Giri A.P., Hivrale V.K.* // BMC Biochem. 2013. V. 14.
<https://doi.org/10.1186/1471-2091-14-32>
9. *Sharifi M., Chitgar M.G., Ghadamyari M., Ajamhasani M.* // Romanian Journal of Biochemistry. 2012. V. 49. № 1. P. 33–47.
10. *Mahdavi A., Ghadamyari M., Sajedi R.H., Sharifi M., Kouchaki B.* // J. Insect Sci. 2013. V. 13.
<https://doi.org/10.1673/031.013.8101>
11. *Zou Z., Lopez D.L., Kanost M.R., Evans J.D., Jiang H.* // Insect Mol. Biol. 2006. V. 15. № 5. P. 603–614.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00684.x>
12. *Choo Y.M., Lee K.S., Yoon H.J., Lee S.B., Kim J.H., Sohn H.D., Jin B.R.* // Eur. J. Entomol. 2007. V. 104. № 1. P. 1–7.
<https://doi.org/10.14411/eje.2007.001>
13. *Jiang H., Vilcinskas A., Kanost M.R.* // Adv. Exp. Med. Biol. 2010. V. 708. P. 181–204.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_10
14. *Kanost M.R., Jiang H.* // Curr. Opin. Insect Sci. 2015. V. 11. P. 47–55.
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.09.003>
15. *Cao X., Jiang H.* // Insect Biochem. Mol. Biol. 2018. V. 103. P. 53–69.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.10.006>
16. *Cao X., Gulati M., Jiang H.* // Insect Biochem. Mol. Biol. 2017. V. 88. P. 48–62.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.07.008>
17. *Lin H., Xia X., Yu L., Vasseur L., Gurr G.M., Yao F., Yang G., You M.* // BMC Genomics. 2015. V. 16. Article 1054.
<https://doi.org/10.1186/s12864-015-2243-4>
18. *Elpidina E.N., Tsybina T.A., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A., Zhuzhikov D.P., Oppert B.* // Biochimie. 2005. V. 87. № 8. P. 771–779.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.02.013>
19. *Sato P.M., Lopes A.R., Juliano L., Juliano M.A., Terra W.R.* // Insect Biochem. Mol. Biol. 2008. V. 38. № 6. P. 628–633.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.03.006>
20. *Perona J.J., Tsu C.A., Craik C.S., Fletterick R.J.* // Biochemistry. 1997. V. 36. № 18. P. 5381–5392.
<https://doi.org/10.1021/bi9617522>
21. *Bown D.P., Wilkinson H.S., Gatehouse J.A.* // Insect Biochem. Mol. Biol. 1997. V. 27. № 7. P. 625–638.
[https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(97\)00043-x](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(97)00043-x)
22. *Tsu C.A., Perona J.J., Schellenberger V., Turck C.W., Craik C.S.* // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. № 30. P. 19565–19572.
23. *Tsu C.A., Craik C.S.* // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. № 19. P. 11563–11570.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.19.11563>
24. *Whitworth S.T., Blum M.S., Travis J.* // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 23. P. 14430–14434.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14430>
25. Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry: Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, 4th Ed. V. E22a. In: / Eds. Goodman M., Toniolo C., Moroder L., Felix A. Stuttgart, NY: Thieme, 2004. 785 p.
26. *Горбунов А.А., Акентьев Ф.И., Губайдуллин И.И., Жиганов Н.И., Терещенкова В.Ф., Элпидина Е.Н., Козлов Д.Г.* // Биотехнология. 2020. Т. 36. № 6. С. 136–145.
27. *Frugoni J.A.C.* // Gazz. Chem. Ital. 1957. V. 87. P. 403–407.
28. *Elpidina E.N., Semashko T.A., Smirnova Y.A., Dvoryakova E.A., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A., et al.* // Anal. Biochem. 2019. V. 567. P. 45–50.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.12.001>
29. *Krahn J., Stevens F.C.* // Biochemistry. 1970. V. 9. № 13. P. 2646–2652.
<https://doi.org/10.1021/bi00815a013>
30. *De Vonis Bidlingmeyer U., Leary T.R., Laskowski M.Jr.* // Biochemistry. 1972. V. 11. № 17. P. 3303–3310.
<https://doi.org/10.1021/bi00767a028>
31. *Vinokurov K.S., Elpidina E.N., Oppert B., Prabhakar S., Zhuzhikov D.P., Dunaevsky Y.E., Belozersky M.A.* // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2006 a. V. 145. № 2. P. 126–137.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.05.005>
32. *Zhu Y.C., Baker J.E.* // Arch. Insect. Biochem. Physiol. 2000. V. 43. № 4. P. 173–184.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(200004\)43:4<173::AID-ARCH3>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(200004)43:4<173::AID-ARCH3>3.0.CO;2-8)
33. *Mazumdar-Leighton S., Broadway R.M.* // Insect Biochem. Mol. Biol. 2001. V. 31. № 6–7. P. 633–644.
[https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(00\)00168-5](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(00)00168-5)

34. Herrero S., Combes E., Van Oers M.M., Vlak J.M., de Maagd R.A., Beekwilder J. // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 35. № 10. P. 1073–1082.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.05.006>
35. Tamaki F.K., Padilha M.H., Pimentel A.C., Ribeiro A.F., Terra W.R. // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2012. V. 42. № 7. P. 482–490.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.03.005>
36. Matsuoka T., Kawashima T., Nakamura T., Yabe T. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2017. V. 81. № 7. P. 1401–1404.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1318698>
37. Gráf L., Szilágyi L., Venekei I. Chapter 582 — Chymotrypsin. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 3 Ed. In: / Eds. Rawlings N.D., Salvesen G. Academic Press, 2013. P. 2626–2633.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00582-2>
38. Botos I., Meyer E., Nguyen M., Swanson S.M., Koomen J.M., Russell D.H., Meyer E.F. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 298. № 5. P. 895–901.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3699>
39. Perona J.J., Craik C.S. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. № 3. P. 337–360.
<https://doi.org/10.1002/pro.5560040301>

Recombinant Chymotrypsin-Like Peptidase from *Tenebrio molitor* with a Non-Canonical Substrate-Binding Site

V. F. Tereshchenkova^a, N. I. Zhiganov^b, A. S. Gubaeva^a, F. I. Akentyev^{c, d},
Ya. E. Dunaevsky^e, D. G. Kozlov^c, M. A. Belozersky^e, and E. N. Elpidina^{e, *}

^aLomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow, 119991 Russia

^bLomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119991 Russia

^cNational Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

^d“Kurchatov Genome Center”, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

^eLomonosov Moscow State University, A.N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: elp@belozersky.msu.ru

We characterized an alkaline chymotrypsin-like serine peptidase from the yellow mealworm *Tenebrio molitor* with a non-canonical substrate-binding subsite for its possible application as a component (an additive) in various biological products. The enzyme was obtained as a recombinant preparation. Purification was carried out using affinity chromatography on Ni²⁺-NTA agarose. The specificity constants (k_{cat}/K_M) for the chymotrypsin substrates, Glp-AAF-pNA, Suc-AAPF-pNA, and Ac-Y-pNA were 7, 4.2 and 0.9 ($\mu\text{M}\cdot\text{min}$)⁻¹, respectively. Optimum of the proteolytic activity was observed at pH 9.0. The enzyme was stable at the alkaline pH range, and in the presence of BSA also in the acidic region. Peptidase was inhibited by synthetic inhibitors such as PMSF, TPCK, chymostatin, while EDTA, E-64, and pepstatin had no effect on the enzyme activity. The purified enzyme showed high stability over time in the presence of BSA. The short life cycle of the insect and the production of a large number of peptidases in the midgut with high catalytic activity and stability can make *T. molitor* an excellent alternative source of industrially important enzymes for application as components (additives) in various biological products (e.g., stain removers, detergents, etc.).

Keywords: serine peptidases, chymotrypsin-like peptidases, proteolytic enzymes, insect peptidases, SerP38, *Tenebrio molitor*

УДК 577.181;579.61

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО СИНТЕЗА И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИЗВЕСТНЫХ АНТИБИОТИКОВ И “ХИМЕРНЫХ” СОЕДИНЕНИЙ ЦЕФАЛОСПОРИНОВОГО РЯДА

© 2024 г. А. В. Складенко¹, И. А. Грошкова¹*, Н. А. Горбунов¹, А. В. Васильев¹,
А. В. Камаев¹, С. В. Яроцкий¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”
(НИЦ – “Курчатовский институт”), Москва, 123182 Россия

*e-mail: ingagrosh@mail.ru

Поступила в редакцию 21.11.2023 г.

После доработки 13.12.2023 г.

Принята к печати 10.01.2024 г.

С использованием иммобилизованной синтетазы цефалоспоринов-кислот в мягких стандартных условиях осуществлены процессы биокаталитического синтеза цефамандола и цефазолина, а также четырех “химерных” цефалоспоринов, несущих в С3 или С7-положении β-лактама функциональные группы этих антибиотиков. Продемонстрирована более высокая эффективность биокаталитического ацилирования β-лактамов остатком 1(Н)-тетразолилуксусной кислоты по сравнению с ацилированием остатком миндальной кислоты. Химическая структура полученных соединений подтверждена с использованием метода ВЭЖХ–МС. Продемонстрирована возможность использования для оценки антибактериальной активности синтезированных соединений непосредственно реакционных смесей без выделения целевых продуктов. Методом диффузии в агар проведена оценка активности полученных цефалоспоринов по отношению к двенадцати микроорганизмам, относящимся к родам *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* и *Escherichia*. Показана активность синтезированных “химерных” цефалоспоринов в отношении четырех штаммов микроорганизмов: *Escherichia coli* ВКПМ В-6695, *Staphylococcus aureus* ВКПМ В-6646, *Staphylococcus aureus* ВКПМ В-8171 и *Staphylococcus epidermidis* ВКПМ В-12635.

Ключевые слова: новые цефалоспорины, биокаталитический синтез, антибиотики, антибактериальная активность

DOI: 10.31857/S0555109924030055 EDN: EWWSTE

Согласно отчету, опубликованному Allied Market Research®, в настоящее время цефалоспорины занимают около 30% мирового рынка антибиотиков [1]. В России полусинтетические цефалоспорины и пенициллины являются самым назначаемым классом препаратов при лечении госпитальных инфекций [2]. В связи с развитием резистентности микроорганизмов к антибиотикам [3, 4], насущной задачей является создание новых β-лактамов соединений с измененными свойствами, обладающих антимикробной активностью [5, 6]. Для этой цели могут быть использованы подходы комбинаторной химии, состоящие в получении “химерных” β-лактамов соединений путем объединения в одной молекуле частей, несущих функциональные группы нескольких антибиотиков [7, 8], в частности цефалоспоринов, с подтвержденной активностью. При этом для получения “химерных” соединений целесообразно применение методов

биокаталитического синтеза, обеспечивающих наработку образцов реакционных смесей, содержащих цефалоспорины, в стандартизованных мягких условиях в водной среде [9]. Это позволяет рассчитывать на возможность тестирования антимикробной активности синтезированных цефалоспориновых соединений непосредственно в реакционной смеси, исключая стадии выделения и очистки препаратов, что было бы необходимо в случае использования методов химического синтеза [10].

Ранее методом кинетически-контролируемого синтеза с использованием в качестве биокатализатора иммобилизованной синтетазы цефалоспоринов-кислот (CASA, КФ 3.5.1.11) [11, 12], продуцируемой рекомбинантным штаммом *Escherichia coli* ВКПМ В-12316, были получены новые “химерные” цефалоспорины, несущие С3-модифицированное β-лактамовое ядро цефамандола (CFM) и С7-заместители (ацильные части) различных

антибиотиков [9]. Кроме того, были разработаны методы биокаталитического ацилирования 7-аминоцефалоспоровановой кислоты (**7-ACA**) с образованием “химерных” цефалоспоринов, несущих ацильные части CFM и цефазолина (**CEZ**) и являющихся полупродуктами получения этих антибиотиков [13–15].

Цель настоящей работы – оценка эффективности биокаталитического синтеза и антибактериальной активности “химерных” цефалоспоринов (табл. 1), несущих в C3 или C7-положении β-лактама функциональные группы антибиотиков CFM и CEZ.

МЕТОДИКА

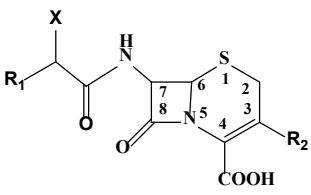
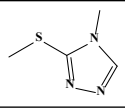
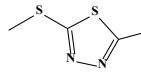
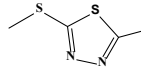
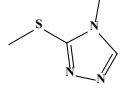
Материалы. В работе использованы коммерческие образцы 7-ACA (7-аминоцефалоспоровановая кислота, 97.0%) “Anhui BBCA Pharmaceutical” (Китай), TDA (7-амино-3-[2-метил-1,3,4-тиадиазол-5-ил]-тиометил]-3-цефем-4-карбоновая кислота, 98.0%), 7-TMCA (1-метил-5-меркапто-1,2,3,4-тетразолил-7-аминоцефалоспоровановая кислота, 96.5%) “Shandong Sihuan Pharmaceutical Co.” (Китай), натриевые соли цефазолина (98.0%) и цефамандола (99.0%), METzAA (метилловый эфир 1(Н)-тетразолилуксусной кислоты, 98.0%), МЕМА (метилловый эфир D-миндальной кислоты, 99.0%), TzAA (1(Н)-тетразолилуксусная кислота, 96.0%) “Sigma-Aldrich” (США), МА (миндальная кислота, 99.0%), “НеваТорг” (Россия), агар-агар бактериологический “Bacto, BD” (США), триптон микробиологический “Cell Culture” (Швейцария), экстракт дрожевой (бактериологический) “HiMedia Laboratories” (Индия).

Получение биокатализатора иммобилизованной синтетазы цефалоспоринов-кислот (IECASA). Биокатализатор для осуществления процессов синтеза цефалоспоринов получали путем иммобилизации CASA, продуцируемой рекомбинантным штаммом *E. coli* ВКПМ В-12316 на макропористом эпокси-активированном носителе Seplite LX-1000EP (“Sunresin New Materials”, Китай) согласно разработанной ранее методике [16]. Были использованы образцы IECASA со стандартной синтетазной активностью 300–420 МЕ/г влажного биокатализатора, определенной по синтезу CEZ из 7-амино-3-[2-метил-1,3,4-тиадиазол-5-ил]-тиометил]-3-цефем-4-карбоновая кислоты (**TDA**) и метилового эфира 1(Н)-тетразолилуксусной кислоты (**METzAA**). Содержание сухих веществ в образцах составляло 36–38%.

За единицу синтетазной активности (**1 МЕ**) принимали количество катализатора, которое обеспечивает образование 1 мкмоль CEZ в минуту при его синтезе в растворе, содержащем 60 мМ TDA и 240 мМ METzAA при pH 7.5 и 30°C [16].

Биокаталитический синтез цефалоспоринов. Синтез “химерных” цефалоспоринов осуществляли методом кинетически-контролируемого синтеза (синтеза с ацильным переносом) [11, 17], схема которого показана на рис. 1. Ключевыми аминокислотами (**КА**), несущими β-лактамную часть синтезируемого цефалоспориона, служили 1-метил-5-меркапто-1,2,3,4-тетразолил-7-аминоцефалоспоровановая кислота (**7-TMCA**), TDA и 7-ACA, а ацилирующими агентами (**АА**) – активированные производные двух карбоновых кислот (**КК**), а именно: D-миндальной кислоты (**МА**) и 1(Н)-тетразолилуксусной кислоты (**TzAA**) (см. табл. 1).

Таблица 1. Сопоставляемые цефалоспорины

Цефалоспорин (β-лактамная и ацильная части)		X	–R ₁	–R ₂
	CFM (7-TMCA_MA)	ОН		
	Chimera (7-ACA_MA)	ОН		
	Chimera (TDA_MA)	ОН		
	CEZ (TDA_TzAA)	Н		
	Chimera (7-ACA_TzAA)	Н		
	Chimera (7-TMCA_TzAA)	Н		

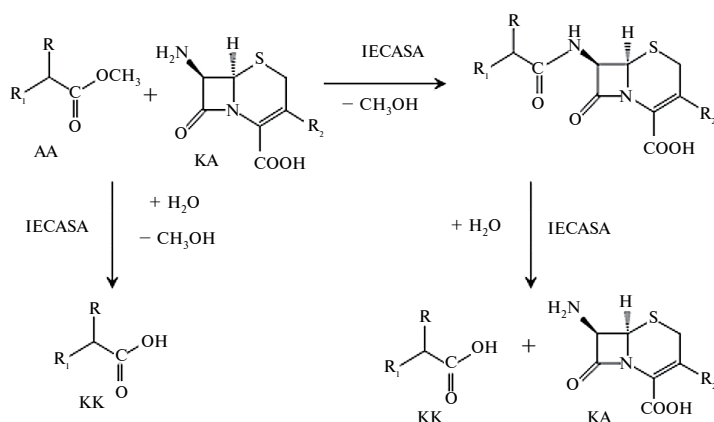


Рис. 1. Схема кинетически-контролируемого синтеза цефалоспоринов.

В качестве активированных производных КК использовали их метиловые эфиры: метиловый эфир D-миндальной кислоты (МЕМА) и METzAA.

Методики приготовления исходных реакционных смесей, осуществления кинетически-контролируемого синтеза цефалоспоринов, катализируемого IECASA, и контроля процессов методом ВЭЖХ подробно описаны в работах [13–16]. Биокаталитический синтез цефалоспоринов Chimer (TDA_MA) осуществлен впервые по аналогичной методике.

Процессы синтеза всех цефалоспоринов проводили в стандартных условиях: 30°C, 0.3 М фосфатно-натриевый буфер, содержание активного фермента в реакционной смеси $C_E = 10$ МЕ/мл, начальные концентрации КА и АА $C_{KA} = 60$ мМ и $C_{AA} = 200$ мМ соответственно (мольный избыток АА над КА $X^\circ = 3.3$ М/М). В результате протекания гидролитических реакций (см. рис. 1) pH в реакционной смеси снижался по ходу процесса за счет образования КК от 7.2–7.9 в момент добавления биокатализатора до 6.6–6.1 в конце процесса, что отвечало оптимальному диапазону активности и стабильности фермента CASA [16]. Биокатализатор отделяли от реакционной смеси вакуумной фильтрацией на пористом стеклянном фильтре.

Динамический контроль состава реакционной смеси по четырем компонентам (целевой цефалоспорин, КА, АА и КК) осуществляли, анализируя отбираемые по ходу процесса пробы методом ВЭЖХ в изократическом режиме. Использовали хроматограф фирмы “Gilson” (США), хроматографическую колонку “Spherisorb ODS”, 250 × 4 мм с диаметром частиц 7.5 мкм. Мобильной фазой служила смесь, состоящая из 0.05 М фосфатно-аммонийного буфера и метанола в соотношениях, описанных в работах [13–16]. Расход мобильной фазы 1 мл/мин.

Для каждой пробы рассчитывали степень трансформации КА в цефалоспорин (в %), баланс по

β-лактаму как сумму относительных концентраций (по отношению к C_{KA}°) КА и продукта, а также баланс по КК как сумму относительных концентраций (по отношению к C_{AA}°) АА, КК и продукта.

Определение молекулярной массы “химерных” цефалоспоринов. Молекулярную массу “химерных” цефалоспоринов, определяли методом ВЭЖХ-МС, используя реакционные смеси, полученные путем биокаталитического синтеза. Исследование проводили на жидкостном хроматографе фирмы “AgilentTechnologies” (США) модель 1290 с тройным масс-спектрометрическим детектором модели 6490 на обращенно-фазовой колонке PerfectSil 300 ODS C18, 250 × 4.6 мм с размером частиц 5 мкм. Разделение компонентов реакционной смеси, полученной при биокаталитическом синтезе цефалоспоринов, проводили в режиме градиентного элюирования смесью водного 10 мМ раствора формиата аммония (А) и ацетонитрила, содержащего 0.1% (об./об.) муравьиной кислоты (В), при линейном увеличении содержания раствора А в смеси от 5 до 15% (об./об.) за 15 мин. Скорость потока составляла 1.0 мл/мин. Детектирование выполняли на масс-спектрометре модели 6495 фирмы “Agilent Technologies” с электроспреем в режиме сканирования по полному ионному току в диапазоне m/z 100–1000.

Определение антибактериальной активности цефалоспоринов. Антибактериальную активность цефалоспоринов определяли методом диффузии в агар [18], осуществляя каждый тест в трех–пяти повторностях.

В качестве тест-культур использовали штаммы из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ): *Enterococcus durans* ВКПМ В-3166, *Enterococcus faecium* ВКПМ В-3491, *Enterococcus faecalis* ВКПМ В-4053, *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-7141, *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-2838, *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-4389 (ATCC 33304), *Serratia marcescens*

Таблица 2. Результаты экспериментов по синтезу цефалоспоринов, катализируемому IECASA

Структура цефалоспоринов	Обозначение	Молекулярная масса, Да		$C_{\text{цеф}}$, мМ	$\eta_{\text{макс}}$, %	$V_{\text{уд}}^{\circ}$, мМ/мин·МЕ
		расчет	ВЭЖХ–МС			
	CFM (7-TMCA_MA)	462.5	—	36 ± 1	60.3 ± 1.5	0.22 ± 0.01
	Chimera (7-ACA_MA)	406.4	410	33 ± 1	54.9 ± 1.5	0.21 ± 0.01
	Chimera (TDA_MA)	478.5	473	37 ± 1	61.9 ± 1.9	0.34 ± 0.02
	CEZ (TDA_TzAA)	454.5	—	54 ± 1	90.8 ± 1.7	0.70 ± 0.03
	Chimera (7-ACA_TzAA)	382.4	383	57 ± 1	94.4 ± 1.8	0.66 ± 0.03
	Chimera (7-TMCA_TzAA)	438.5	439	55 ± 1	91.4 ± 1.6	0.59 ± 0.03

ВКПМ В-143, *Pseudomonas aeruginosa* ВКПМ В-8243 (ATCC 27853), *Escherichia coli* ВКПМ В-6695 (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* ВКПМ В-6646 (ATCC 6538Р) и *Staphylococcus aureus* ВКПМ В-8171 (ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* ВКПМ В-12635 (ATCC 12228).

Чашки Петри с 2%-ной агаризованной двойной средой LB в асептических условиях засеивали 500 мкл бактериальной культуры, предварительно выращенной в жидкой двойной среде LB до наступления стационарной фазы роста. После засева чашки выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. В толще агара с помощью пипеток Пастера строго вертикально на равном расстоянии от центра и края чашки делали лунки диаметром 3 мм.

Для анализа антибактериальной активности цефалоспоринов использовали реакционные смеси, полученные методом биокаталитического синтеза, содержащие целевой цефалоспорин в концентрации ($C_{\text{цеф}}$, мМ) от 33 до 57 мМ (табл. 3),

определенной методом ВЭЖХ. Образцы реакционных смесей разбавляли стерильной дистиллированной водой для получения исследуемых образцов с концентрациями цефалоспорина 0.50, 0.25, 0.13, 0.07 и 0.03 мМ. В лунки вносили равные объемы (8 мкл) исследуемых образцов разбавленных реакционных смесей, содержащих цефалоспорины. Чашки инкубировали при температуре $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение 18 ч и измеряли диаметр зон подавления роста культуры вокруг лунок. Для каждого цефалоспорина выбирали наименьшую концентрацию, при которой наблюдалось достоверное подавление роста культуры (минимальная эффективная концентрация). Рассчитывали среднее значение диаметра зон подавления роста культуры при этой концентрации и по нему оценивали антибактериальную активность исследуемого цефалоспорина. Микроорганизм, рост которого не подавлялся при концентрации 0.5 мМ, считали резистентным к использованному цефалоспорину. Ошибка метода 15% при доверительной вероятности $P = 0.95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В водной среде в стандартных условиях был осуществлен катализируемый IECASA кинетически-контролируемый синтез (рис. 1) шести цефалоспоринов (табл. 1), а именно: антибиотиков CFM (7-TMCA_MA) и CEZ (TDA_TzAA); химер Chimera (7-ACA_MA) и Chimera (7-ACA_TzAA), сочетающих β -лактамную часть 7-ACA с ацильными частями CFM и CEZ, а также химер Chimera (7-TMCA_TzAA) и Chimera (TDA_MA), сочетающих между собой β -лактамные и ацильные части CFM и CEZ.

На рис. 2 представлены кривые накопления цефалоспоринов в ходе их биокаталитического синтеза, катализируемого IECASA, в виде зависимости степени трансформации КА в целевой продукт от времени. Они имеют плато различной протяженности. Продолжительные плато, характерные для процессов синтеза цефалоспоринов, несущих ацильную часть TzAA (кривые 4–6, рис. 2), свидетельствуют о благоприятном для биокаталитического ацилирования соотношении скоростей синтетазного и гидролитических процессов (рис. 1). Кривые накопления продуктов синтеза цефалоспоринов, несущих ацильную часть МА, имеют более или менее выраженные максимумы (кривые 1–3, рис. 2) вследствие доминирования гидролитических процессов над процессом собственно синтеза. В табл. 3 приведены максимальные достигаемые концентрации целевых цефалоспоринов ($C_{\text{цеф}}$, мМ) в реакционных смесях (на плато или в максимуме кривых накопления продукта).

Показатели эффективности, характеризующие изученные процессы биокаталитического синтеза цефалоспоринов, рассчитанные на основании кривых накопления продуктов (рис. 2), приведены в табл. 2. Эффективность процесса биокаталитического синтеза в целом оценивали по максимальному выходу цефалоспорина по отношению к КА ($\eta_{\text{макс}}$, %), который рассчитывали как среднюю на плато величину достигнутой максимальной степени трансформации КА в цефалоспорин. Величина $\eta_{\text{макс}}$ определялась соотношением скоростей синтетазной и обеих гидролитических реакций (рис. 1), катализируемых ферментом [11, 19]. Для каждого из изученных процессов было установлено сохранение по ходу биокаталитического синтеза практически 100% баланса как по β -лактаму, так и по КК (после полного растворения АА). Это свидетельствовало об отсутствии в системе побочных реакций, затрагивающих β -лактамное ядро или ацильную часть синтезируемого цефалоспорина и способных снижать $\eta_{\text{макс}}$.

Собственно синтетазную способность IECASA в изучаемых процессах биокаталитического ацилирования соответствующих КА оценивали по удельной начальной скорости синтеза ($V_{\text{уд}}$, мМ/мин·МЕ), то есть в условиях, когда гидролитические процессы еще не оказывают

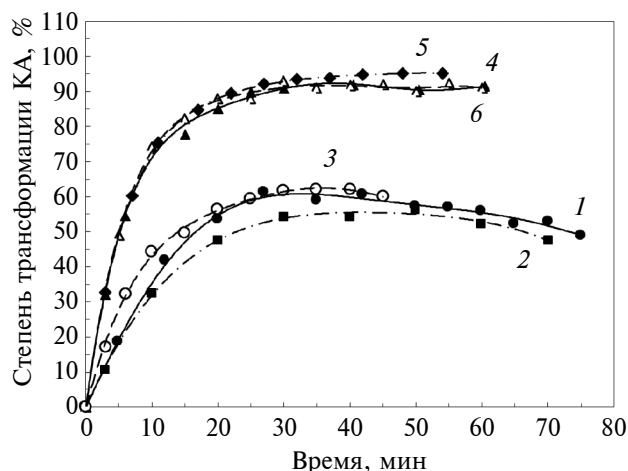


Рис. 2. Кривые накопления цефалоспоринов при синтезе с использованием биокатализатора IECASA: 1 – CFM (7-TMCA_MA), 2 – S-p CFM (7-ACA_MA), 3 – Chimera (TDA_MA), 4 – CEZ (TDA_TzAA), 5 – Sp-CEZ (7-ACA_TzAA), 6 – Chimera (7-TMCA_TzAA). Формулы цефалоспоринов приведены в табл. 2.

существенного влияния на реакцию образования ациламидной связи цефалоспорина. Этот параметр рассчитывали как отношение начальной скорости образования цефалоспорина, определенной по начальному участку соответствующей кривой накопления (рис. 2), отнесенной к содержанию активного фермента в реакционной смеси.

Результаты, представленные на рис. 2 и в табл. 2, наглядно показали, что как эффективность изученных процессов ацилирования КА, так и собственно синтетазная способность IECASA в этих процессах определялась ацильным остатком синтезируемого цефалоспорина. Так все три продукта, несущие остаток TzAA, были получены практически с одинаковым высоким выходом $\eta_{\text{макс}} = 91\text{--}94\%$ при близкой синтетазной способности IECASA = 0.6–0.7 мМ/мин·МЕ. Использование АА с ацильным остатком МА снижало эффективность процессов синтеза до $\eta_{\text{макс}} = 55\text{--}62\%$, а синтетазную способность IECASA до $V_{\text{уд}} = 0.2\text{--}0.3$ мМ/мин·МЕ.

Известные антибиотики CFM и CEZ были идентифицированы и количественно определены в реакционных смесях методом ВЭЖХ с использованием стандартных образцов. Структуры полученных “химерных” цефалоспоринов (табл. 2) были предположены на основании известной специфичности CASA при синтезе цефалоспоринов-кислот [11], механизма действия фермента в реакциях кинетически контролируемого синтеза [11, 13–16], а также по аналогии с процессами синтеза CFM и CEZ. Анализ методом ВЭЖХ-МС молекулярных масс компонентов реакционных смесей, полученных при биокаталитическом синтезе “химерных” цефалоспоринов,

Таблица 3. Антибактериальная активность цефалоспоринов, определенная методом диффузии в агар

Цефалоспорины	Зоны подавления роста культур*							
	<i>Escherichia coli</i> ВКПМ В-6695		<i>Staphylococcus aureus</i> ВКПМ В-6646		<i>Staphylococcus aureus</i> ВКПМ В-8171		<i>Staphylococcus epidermidis</i> ВКПМ В-12635	
	С _{мин} , мМ	d, мм	С _{мин} , мМ	d, мм	С _{мин} , мМ	d, мм	С _{мин} , мМ	d, мм
CFM (7-TMCA_MA)	0.25	10.0 ± 1.5	0.03	10.0 ± 1.5	0.13	7.0 ± 1.1	–	–
Chimera (7-ACA_MA)	0.50	14.0 ± 2.0	0.03	9.0 ± 1.3	0.13	7.0 ± 1.1	0.13	7.0 ± 1.1
Chimera (TDA_MA)	0.25	12.0 ± 1.8	0.03	11.0 ± 1.6	0.13	8.0 ± 1.2	–	–
CEZ (TDA_TzAA)	0.13	7.0 ± 1.1	0.03	11.0 ± 1.6	0.13	9.0 ± 1.3	0.13	10.0 ± 1.5
Chimera (7-ACA_TzAA)	0.50	12.0 ± 1.8	0.07	7.0 ± 1.1	0.13	6.0 ± 0.9	0.13	7.0 ± 1.1
Chimera (7-TMCA_TzAA)	0.25	11.0 ± 1.6	0.03	6.0 ± 0.9	0.13	7.0 ± 1.1	–	–

* С_{мин} – минимальная эффективная концентрация цефалоспорины (наименьшая концентрация, при которой наблюдается достоверное подавление роста культуры), мМ; d – среднее значение диаметра зон подавления роста культуры при минимальной эффективной концентрации цефалоспорины, мм.

подтвердил предложенные структуры синтезированных продуктов (табл. 2).

Антимикробную активность цефалоспоринов изучали методом диффузии в агар [18] с использованием бактериальных культур из ВКПМ. Реакционные смеси, полученные при биокаталитическом синтезе “химерных” цефалоспоринов в мягких стандартных условиях в водной среде, были использованы для сравнительной оценки антибактериальной активности “химерных” соединений и известных антибиотиков CFM и CEZ. Помимо синтезированного цефалоспорины каждая реакционная смесь содержала соответствующие КА, АА и КК. Для каждой из реакционных смесей было установлено отсутствие влияния этих компонентов на рост тестируемых микроорганизмов. Существенно, что другие побочные продукты в реакционных смесях отсутствовали, что было подтверждено сохранением практически 100%-ного баланса как по β-лактаму, так и по КК в ходе процесса биокаталитического синтеза. Результаты проверки антимикробной активности CFM и CEZ, содержащихся в реакционных смесях, полученных биокаталитическим синтезом, были подтверждены с использованием стандартных образцов этих антибиотиков.

Методом диффузии в агар было установлено, что такие микроорганизмы как *Enterococcus durans* ВКПМ В-3166, *Enterococcus faecium* ВКПМ В-3491, *Enterococcus faecalis* ВКПМ В-4053, *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-7141, *Acinetobacter calcoaceticus*

ВКПМ В-2838, *Acinetobacter calcoaceticus* ВКПМ В-4389, *Serratia marcescens* ВКПМ В-143, *Pseudomonas aeruginosa* ВКПМ В-8243 нечувствительные к CFM и CEZ, не были чувствительны также ни к одному из синтезированных “химерных” цефалоспоринов, несущих ацильные части этих антибиотиков в сочетании с β-лактамами частями CFM, 7-ACA и CEZ.

Четыре микроорганизма, представленные в табл. 3, проявили чувствительность к изучаемым цефалоспорины. В табл. 3 приведены минимальные эффективные концентрации каждого цефалоспорины и соответствующие им диаметры зон подавления роста культур. Все шесть изученных цефалоспоринов продемонстрировали активность в отношении *Escherichia coli* ВКПМ В-6695, причем эффективность действия “химерных” соединений Chimera (TDA_MA) и Chimera (7-TMCA_TzAA) была близка к эффективности CFM, а “химерные” цефалоспорины, имевшие β-лактадную часть 7-ACA были менее активны (табл. 3). Представляет большой интерес наличие активности изученных цефалоспоринов в отношении стафилококков. Рост штаммов *Staphylococcus aureus* ВКПМ В-6646 и *Staphylococcus aureus* ВКПМ В-8171 подавлялся всеми шестью изученными цефалоспорины (табл. 3). Наиболее чувствителен к изучаемым цефалоспорины штамм *Staphylococcus aureus* ВКПМ В-6646, при этом “химерные” цефалоспорины, несущие ацильный остаток TzAA, несколько менее активны, чем CEZ и соединения с ацильным

остатком МА (табл. 3). Рост штамма *Staphylococcus epidermidis* ВКПМ В-12635 подавлялся только СЕЗ и “химерными” цефалоспоридами, имеющими β-лактамную часть 7-АСА (табл. 3).

Таким образом, методом биокаталитического синтеза получен набор “химерных” цефалоспоринов, несущих в С3 или С7-положении β-лактама функциональные группы антибиотиков CFM и СЕЗ. Предложенная химическая структура “химерных” соединений подтверждена путем определения их молекулярной массы методом ВЭЖХ–МС. Продемонстрирована возможность использования для оценки антибактериальной активности синтезированных соединений непосредственно реакционных смесей без выделения целевых продуктов. Обнаружена активность синтезированных “химерных” цефалоспоринов в отношении четырех штаммов микроорганизмов: *Escherichia coli* ВКПМ В-6695, *Staphylococcus aureus* ВКПМ В-6646, *Staphylococcus aureus* ВКПМ В-8171 и *Staphylococcus epidermidis* ВКПМ В-12635. Наличие у “химерных” цефалоспоринов, имеющих β-лактамную часть 7-АСА, антимикробной активности, сопоставимой с активностью известных антибиотиков, представляет особый интерес, поскольку позволяет получать цефалоспорин из 7-АСА в одну биокаталитическую стадию, избегнув химической модификации β-лактама по С3-положению.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

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. Verma T., Aggarwal A., Singh S., Sharma S., Sarma S.J. // J. Mol. Struct. 2022. V. 1248. P. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131380>
2. Аркуша А.А. // Скиф. 2018. Т.12. № 28. С. 7–19.
3. Сидоренко С.В., Тишков В.И. // Успехи биологической химии. 2004. Т. 44. С. 263–306.
4. Rodriguez-Herrera R., Puc L.E.C., Sobrevilla J.M.V., Luque D., Cardona-Felix C.S., Aguilar-Conzalez C.N. et al. // In: Enzymes in Food Biotechnology – Production, Applications, and Future Prospects. / Ed. M. Kuddus. Acad. Press. 2018. V. 36. P. 627–643. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00036-0>
5. Theuretzbacher U. // Curr. Opin. Pharmacol. 2011. V. 11. № 5. P. 433–438. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.07.008>
6. Gaurav K., Karmakar S., Kundu S., Kundu K. // In: Antibiotic Resistant Bacteria – A Continuous Challenge in the New Millennium. / Ed. Dr. Marina Pana. InTech. 2012. P. 487–502. <https://doi.org/10.5772/29658>
7. Kurochkina V.B., Satarova D.E., Nys P.S. Moscow University Chemistry Bulletin. Biocatalysis. 2000. V. 41. № 6. P. 139–143.
8. Курочкина В.Б., Ныс П.С. // Антибиотики и химиотерапия. 2002. № 2. С. 29–37.
9. Sklyarenko A.V., Groshkova I.A., Gorbunov N.A., Yarotsky S.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2023. Т. 57. № 7. С. 1027–1038. <https://doi.org/10.1134/S0003683823070062>
10. Arroyo M., De la Mata I., García J.-L., Barredo J.-L. // Biotechnology of Microbial Enzymes. 2017. V. 17. P. 451–473. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00017-0>
11. Sklyarenko A.V., Eldarov M.A., Kurochkina V.B., Yarotsky S.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. V. 51. № 6. P. 627–640. <https://doi.org/10.1134/S0003683815060150>
12. Эльдаров М.А., Скляренко А.В., Думина М.В., Медведева Н.В., Жгун А.А., Сатарова Д.Э. и др. // Биомедицинская химия. 2015. Т. 61. № 5. С. 646–651. <https://doi.org/10.18097/PBMC20156105646>
13. Sklyarenko A.V., Groshkova I.A., Sidorenko A.I., Yarotsky S.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 5. P. 526–537. <https://doi.org/10.1134/S0003683820050130>
14. Sklyarenko A.V., Groshkova I.A., Krestyanova I.N., Yarotsky S.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2022. V. 58. № 3. P. 251–260. <https://doi.org/10.1134/S0003683822030127>
15. Sklyarenko A.V., Groshkova I.A., Gorbunov N.A., Yarotsky S.V. Appl. Biochem. Microbiol. 2023. Т. 59. № 8. С. 1086–1101. <https://doi.org/10.1134/S0003683823080094>
16. Wang Lu, Sklyarenko A.V., Duanhua Li, Sidorenko A.I., Zhao C., Jinjun Li et al. // Bioprocess Biosyst. Eng. 2018. V. 41. № 12. P. 1851–1867. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2007-z>
17. Deaguero A.L., Blum J.K., Bommarius A.S. // In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology. / Ed. M. C. Flickinger. John Wiley & Sons, 2012. P. 535–567. <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib640>
18. Кулешова С.И. // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2015. (3). С. 13–17.
19. Kurochkina V.B., Sklyarenko A.V. // In: Biotechnology: State of the Art and Prospects for Development / Ed. G.E. Zaikov. Nova Science Publishers, 2008. V. 20. P. 175–204.

Comparative Evaluation of Effectiveness of Biocatalytic Synthesis and Antibacterial Activity of Known Antibiotics and “Chimeric” Cephalosporin Compounds

A. V. Sklyarenko^a, I. A. Groshkova^{a, *}, N. A. Gorbunov^a, A. V. Vasiliev^a,
A. V. Kamaev^a, S. V. Yarotsky^a

^aNational Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

*e-mail: ingagrosh@mail.ru

The processes of biocatalytic synthesis of cefamandole and cefazoline, as well as four “chimeric” cephalosporins carrying functional groups of these antibiotics in the C3 or C7 position of β -lactam, were carried out using immobilized cephalosporin-acid synthetase under mild standard conditions. A higher efficiency of biocatalytic acylation of β -lactams with a 1(H)-tetrazolylacetic acid residue compared to acylation with almond acid residue was demonstrated. The chemical structure of the obtained compounds was confirmed using the HPLC–MS method. The possibility of using directly reaction mixtures for evaluating the antibacterial activity of synthesized compounds without isolating the target products was demonstrated. The activity of the obtained cephalosporins against twelve microorganisms belonging to the genera *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* and *Escherichia* was evaluated by diffusion into agar. The activity of synthesized “chimeric” cephalosporins against four microorganisms was found: *Escherichia coli* VKPM B-6695, *Staphylococcus aureus* VKPM B-6646, *Staphylococcus aureus* VKPM B-8171 and *Staphylococcus epidermidis* VKPM B-12635.

Keywords: antibacterial activity, antibiotics, biocatalytic synthesis, “chimeric” cephalosporins

УДК 577.15

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КОНВЕРСИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗНО-БУМАЖНЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ

© 2024 г. А. С. Аксенов^{1, *}, И. Г. Синельников², А. Р. Шевченко¹, К. А. Майорова¹,
Д. Г. Чухчин¹, Д. О. Осипов², М. В. Семёнова², О. А. Синицына³, А. М. Рожкова²,
Е. В. Новожилов¹, А. П. Синицын^{2, 3}

¹Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова, Архангельск, 163002 Россия

²Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологий” РАН, Москва, 119071 Россия

³Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Москва, 119991 Россия

*email: a.s.aksenov@narfu.ru

Поступила в редакцию 14.12.2023 г.

После доработки 29.12.2023 г.

Принята к печати 10.01.2024 г.

Определена реакционная способность восьми промышленно вырабатываемых образцов целлюлозы и полуцеллюлозы при ферментативном гидролизе препаратами гликозил-гидролаз B151 и F10, продуцируемых штаммом гриба-аскомицета *Penicillium verruculosum*. Впервые показано, что среди волокнистых полуфабрикатов, доступных на рынке целлюлозно-бумажной промышленности России, максимально высокий выход глюкозы от исходной древесины при биокатализе с использованием целлюлаз и гемицеллюлаз характерен для полуцеллюлоз, полученных после варки лиственной древесины с зеленым щелоком. Установлена высокая степень ферментативной конверсии беленой сульфатной целлюлозы из хвойной древесины, что в сочетании с возможностью получения модифицированных полисахаридных материалов из негидролизующего остатка делает данный субстрат наиболее перспективным для развития биохимических подходов на предприятиях целлюлозно-бумажной промышленности. Показано, что высушивание полуфабрикатов отрицательно влияет на эффективность гидролиза целлюлозы, а механический размол улучшает показатели процесса ферментативного осахаривания.

Ключевые слова: целлюлазы, ксиланазы, *P. verruculosum*, полуцеллюлоза, сульфатная варка, гемицеллюлозы, сульфитная делигнификация, биоэкономика

DOI: 10.31857/S0555109924030068 EDN: EWVSDY

Получение продуктов с высокой добавленной стоимостью из древесины все чаще подразумевает применение различных биохимических методов [1, 2]. Важное место при разработке принципиально новых и совершенствовании существующих технологий переработки лигноцеллюлозного сырья занимает ферментативный гидролиз полисахаридов [3, 4]. Например, частичная биокаталитическая деструкция глюкуроноксилана в сульфатной целлюлозе позволяет снизить расход химикатов при последующей отбелке [5]. Глубокий ферментативный гидролиз древесных целлюлозы и гемицеллюлоз до моносахаридов позволит производить не только биотопливо, но и органические кислоты, аминокислоты и другие продукты микробиологического синтеза [6]. На предприятиях отечественной целлюлозно-бумажной промышленности (ЦБП) ранее осуществлялась биохимическая переработка сахаров

сульфитных щелоков, которые являлись отходами кислого сульфитного способа варки хвойной древесины, в этанол [7]. В настоящее время многие заводы перешли на бисульфитный способ варки или закрыты по экологическим причинам. Несмотря на это, потенциал получаемых целлюлозных продуктов для биохимических производств раскрыт далеко не в полном объеме.

Для увеличения реакционной способности целлюлозосодержащих материалов, особенно древесных, требуется предварительная обработка, направленная на измельчение растительного сырья, разрушение кристаллической структуры целлюлозы, полное или частичное удаление лигнина [8–11]. Предлагаемые способы направлены на разрушение лигноуглеводной матрицы и частичную делигнификацию: паровой взрыв (автогидролиз) [12, 13], обработка кислотами и щелочами [14], варка с органическими растворителями [15, 16]

и эвтектическими смесями [17], с “зелеными” химикатами [18], применение ионных жидкостей [19]. Для повышения эффективности процессов применяют одновременно несколько видов воздействия на сырье. Следует при этом отметить, что в литературе практически не рассматриваются доступность, стоимость и опыт промышленной регенерации используемых реагентов.

На целлюлозных заводах в основном цикле производства применяются следующие методы, которые можно рассматривать как подготовительные стадии к последующему ферментативному гидролизу полисахаридов: измельчение древесины до технологической щепы, химические методы делигнификации при варке и отбелке целлюлозы, разmol при изготовлении бумаги и картона и другие. В результате получают волокнистые полуфабрикаты с различным выходом от исходной древесины: полуцеллюлоза лиственная (выход от абсолютной сухой древесины, а.с.д., — 75–80%), технические целлюлозы, полученные сульфатным и сульфитным способом из хвойных и лиственных пород древесины (выход — 40–55% от а.с.д.). Способы удаления лигнина, которые используются при получении технических целлюлоз из древесины, являются эффективными и экономически оправданными. При производстве небеленой целлюлозы в ходе варки растворяется до 95% лигнина древесины, при выработке беленой целлюлозы практически полностью удаляется остаточный лигнин, оказывающий как правило негативный эффект на биокаталитические процессы, обусловленный сокращением доступной для ферментов поверхности целлюлозных волокон и непродуктивной адсорбцией целлюлаз на лигнине [20–22]. Таким образом, получаемые в ЦБП волокнистые полуфабрикаты, представляющие собой смесь целлюлозы и гемицеллюлоз (общее содержание 80–95%) с определенным количеством примесей в зависимости от типа варки и породы древесины, выступают подготовленными субстратами для ферментативной конверсии в простые сахара [23–25].

В России созданы рекомбинантные штаммы *Penicillium verruculosum* (синоним *Talaromyces verruculosus*) — продуценты комплекса ферментов, эффективных при ферментативном осахаривании различных лигноцеллюлозных материалов [26, 27]. Показана высокая реакционная способность полуфабрикатов ЦБП — целлюлозы и полуцеллюлозы при биокаталитической конверсии ферментными препаратами *P. verruculosum* [28–31]. Вместе с тем отсутствует многосторонний анализ биохимических превращений полуфабрикатов ЦБП, выпускающихся в настоящее время как товарные продукты по отработанным технологиям, как с высоким выходом (полуцеллюлозы), так

и с низким (беленые сульфатные и сульфитные целлюлозы).

Цель работы — оценка способности к ферментативному гидролизу различных видов технических целлюлоз и полуцеллюлоз, получаемых на предприятиях химико-лесного комплекса России.

МЕТОДИКА

Отбор образцов волокнистых полуфабрикатов.

В качестве субстратов для ферментативного осахаривания использовали образцы целлюлозных полуфабрикатов с известными выходами, промышленно выработанных на 3-х целлюлозных заводах России, расположенных на территории Архангельской и Ленинградской областей. Были отобраны образцы беленой и небеленой технической лиственной и хвойной целлюлозы, полученной путем традиционных сульфатной [30], сульфитной варок [31] и реже используемых режимов варки — нейтрально-сульфитной и варки в зеленом сульфатном щелоке [28]. Долю остаточного лигнина определяли в образцах полуфабрикатов после предварительной спиртовой экстракции по стандартным методикам, основанным на кислотном гидролизе полисахаридов и последующем определении суммарного и количества нерастворимого и кислоторастворимого лигнинов [35]. Для определения полисахаридного состава [38] исходных проб целлюлозы и полуцеллюлозы лиофильно высушенные образцы подвергали исчерпывающему гидролизу и последующему анализу с использованием ВЭЖХ системы LC-20 Prominence (“Shimadzu”, Япония) с постколоночной дериватизацией сахаров аргинином и флуориметрическим детектированием продуктов. Разделение проводили на колонке Shim-pack ISA-07/S2504 (“Shimadzu”, Япония) 250 × 4 мм. Содержание ключевых компонентов в составе целлюлозных полуфабрикатов приведено в табл. 1.

Ферментные препараты. Для определения реакционной способности целлюлозных полуфабрикатов к биокаталитической конверсии использовали лабораторные ферментные препараты, продуцируемые штаммами гриба-аскомицета *P. verruculosum*: препарат В151#3–340.н, содержащий комплекс карбогидраз (целлобиогидролаз, эндоглюканаз, эндоксиланаз), и препарат F10#3–341.н, основным компонентом которого является β-глюкозидаза. Субстратную специфичность ферментных препаратов по отношению к фильтровальной бумаге (ФБ), натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ); березовому ксилану (ксилан); микрокристаллической целлюлозе (МКЦ), *n*-НФ-β-D-глюкопиранозиду (*n*-НФГ) и целлобиозе определяли в соответствии с методами [39, 40]. Содержание белка в препаратах определяли по методу Лоури [41]. Общие

Таблица 1. Компонентный состав промышленных целлюлозных полуфабрикатов

Название	Порода	Выход от древесины**, %	Основные компоненты, %		
			Целлюлоза	Гемицеллюлозы	Лигнин
Нейтрально-сульфитная полуцеллюлоза	Береза/осина	77	61.6	15.4	22.0
Полуцеллюлоза после варки с зеленым щелоком	Береза/осина	78	60.6	16.8	21.6
Беленая сульфатная целлюлоза	Береза/осина	45	72.3	25.1	—
Небеленая сульфатная целлюлоза	Береза/осина	49	70.9	24.6	2.0
Беленая сульфатная целлюлоза (с КЩО*)	Береза/осина	44	74.5	23.3	—
Беленая сульфатная целлюлоза	Сосна/ель	40	80.3	19.4	—
Небеленая сульфатная целлюлоза	Сосна/ель	47	78.8	18.9	3.0
Беленая сульфитная целлюлоза	Ель	42	78.5	15.8	—

* Кислородно-щелочная обработка; ** значения выходов полуфабрикатов от исходной древесины при промышленной реализации различных термохимических стадий.

и удельные активности использованных ферментных препаратов приведены в табл. 2.

Подготовка целлюлозосодержащих субстратов-полуфабрикатов ЦБП к ферментативному гидролизу. Образцы целлюлозных полуфабрикатов подвергали размолу на промышленной дисковой мельнице по ГОСТ 14363.4–89. Преимущественно проводили ферментативный гидролиз не подвергавшихся сушке образцов полуфабрикатов. Для исследования влияния ороговения целлюлозных волокон и анализа углеводного состава полуфабрикатов производили лиофильную сушку на установке FreeZone 2,5 (“Labconco”, США).

Ферментативный гидролиз целлюлозных полуфабрикатов. Ферментативный гидролиз проводили при концентрации субстрата 50–100 г/л по сухому веществу при 50°C с постоянным перемешиванием 150–250 об./мин в лабораторных биореакторах двух типов: ферментере Biostat A Plus 1L (“Sartorius”, Германия) и шейкере – инкубаторе ES-200 (“Biosan”, Латвия). Для поддержания оптимального pH в реакционной смеси применяли 0.1 М Na-ацетатный буфер (pH 5.0). Использовали смесь ферментных препаратов *P. verruculosum* B151 и F10 с расходом 10 мг белка/г а.с.в. (7 ед. АФБ/г) и 3 мг белка/г а.с.в. (210 единиц целлюлазной активности/г) соответственно.

Анализ реакционной способности к гидролизу промышленных полуфабрикатов. Выбранный в данной работе подход предполагает проведение ферментативного гидролиза промышленных видов

целлюлозных полуфабрикатов в одинаковых условиях, что дает возможность сравнить и оценить их реакционную способность и потенциальный выход глюкозы и восстанавливающих сахаров. Концентрацию восстанавливающих сахаров определяли по методу Шомоди–Нельсона [40]. Концентрацию глюкозы измеряли глюкозооксидазно-пероксидазным методом с использованием автоматического анализатора мембранного типа “Энзискан Ультра” (Лабовэй, Россия). Реакционную способность древесных полисахаридов при ферментативном осахаривании оценивали по степени гидролиза до восстанавливающих сахаров [30], а также выходу глюкозы от а.с.в. [31].

Электронная микроскопия. С целью исследования изменений целлюлозных волокон в ходе ферментативного гидролиза провели микроскопию лиофильно высушенных образцов биомодифицированных полуфабрикатов после 24 ч гидролиза. Микрофотографии образцов получены на электронном микроскопе ZEISS “SIGMA VP” (“Carl Zeiss”, Германия) с применением технологии напыления слоя золото-палладиевой смеси толщиной до 5 нм на установке Q150T ES (Quorum, Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Древесина хвойных и лиственных пород по потенциалу для биохимических производств превосходит многие недревесные виды растительного

Таблица 2. Общие и удельные активности ферментных препаратов *P. verruculosum*

Препарат	ФБ	КМЦ	МКЦ	Ксилан	n-НФГ	Целлобиоза
Активность, ед/г препарата						
B151#3-340.н	706	18830	—	25000	1670	—
F10#3-341.н	186	7000	853	3800	39850	46660
Активность, ед/мг белка						
B151#3-340.н	0.7	19.7	—	26.2	1.8	—
F10#3-341.н	0.3	10.7	1.3	5.8	60.8	71.2

сырья. Суммарное содержание полисахаридов в древесине сопоставимо с их содержанием в зерновом сырье [42, 43]. Теоретически возможный выход моносахаридов при гидролизе составляет 66–72% от а.с.д. [44]. В результате процессов делигнификации древесной щепы и отбелки полуфабрикатов доля целлюлозы в полуфабрикатах возрастает (табл. 1). С точки зрения потенциального образования глюкозы в ходе гидролиза, полуфабрикаты из хвойных пород древесины имеют несомненное преимущество перед лиственными образцами и недревесными видами целлюлозосохраняющих материалов.

Для коммерциализации биохимической переработки полисахаридов полуцеллюлоз и технических целлюлоз предприятия ЦБП обладают рядом преимуществ: на действующих заводах уже перерабатывают хвойные и лиственные породы древесины в крупных масштабах (до 4–5 млн м³), они имеют развитую инфраструктуру, обученный персонал, водные ресурсы, действующее энергохозяйство, отлаженную систему регенерации химикатов и тепла. Главное направление развития биохимических производств — получение продуктов с высокой добавленной стоимостью как из целевых продуктов ферментативного гидролиза — глюкозы и других сахаров, так и из твердых и жидких отходов, образующихся при биокатализе.

Наиболее популярным и востребованным полуфабрикатом является сульфатная целлюлоза. Сульфатная варка представляет собой процесс селективной делигнификации древесины под действием гидросульфид-анионов в щелочной среде в диапазоне температур 140–175°C. Образующийся в результате варки черный щелок — отработанный варочный раствор, обогащенный продуктами щелочной деполимеризации основных компонентов древесины (лигнин, компоненты гемицеллюлозного происхождения, экстрактивные вещества и др.), направляется на сжигание и каустизацию, тем самым на сульфат—целлюлозных заводах производится регенерация реагентов и тепловой энергии [30]. Значительная часть сульфатной целлюлозы

вырабатывается в беленом виде по технологии без применения молекулярного хлора. После химического и механического воздействия такие полуфабрикаты имеют более низкую степень полимеризации по сравнению с целлюлозой в природном состоянии, практически не содержат лигнин и смолы. Беленая сульфатная хвойная целлюлоза обладала максимальной реакционной способностью при ферментативном гидролизе комплексом карбогидраз *P. verruculosum* среди всех изучаемых субстратов (табл. 3). За 48 ч процесса степень конверсии субстрата превышала 80%, среди растворимых продуктов преобладала глюкоза. Для лиственных образцов была характерна существенная разница в степени гидролиза и количестве образующихся гексоз, что связано с компонентным составом и локализацией нецеллюлозных полисахаридов. Известно, что сульфатные целлюлозы из лиственных пород древесины содержат больше ксилана, так как в среде белого сульфатного щелока за счет удаления уроновых остатков происходит стабилизация ксиланов. Данный эффект проявлялся в виде адсорбции полимера на поверхности целлюлозных волокон к концу варки, что обеспечивало повышение выхода полуфабриката и улучшение бумагообразующих свойств волокна [45]. Благодаря высокой эндоксилазной активности используемых ферментных препаратов *P. verruculosum* в растворимых продуктах гидролиза лиственных целлюлоз происходил глубокий гидролиз ксиланов, сопровождавшийся накоплением ксилозы и ксилоолигосахаридов различной длины цепи [30, 31].

Сульфитные методы делигнификации древесины предполагают частичную кислотную деградацию легкогидролизуемых древесных полисахаридов под действием активного реагента диоксида серы при 140–150°C, а также гидролиз и переход в раствор лигнина в форме лигносульфонатов [31]. Несмотря на то, что сульфитные способы утратили свое значение и доля полуфабрикатов на рынке целлюлозно-бумажной продукции не превышает 5–10%, опыт реализации крупномасштабных биохимических производств сохранился в виде

Таблица 3. Результаты ферментативного осахаривания целлюлозных полуфабрикатов различных производственных режимов

№ обр.	Вид технической целлюлозы	Дополнительная обработка	Степень конверсии, %	Выход глюкозы от субстрата, %
Полуфабрикаты из лиственных пород древесины				
1	Нейтрально-сульфитная полуцеллюлоза	—	34	21
2	Нейтрально-сульфитная полуцеллюлоза	Размол (22°ШР)	39	22
3	Полуцеллюлоза после варки с зеленым щелоком	—	59	47
4	Полуцеллюлоза после варки с зеленым щелоком	Размол (70°ШР)	62	49
5	Беленая сульфатная целлюлоза	—	70	59
6	Беленая сульфатная целлюлоза	Сушка	52	41
7	Небеленая сульфатная целлюлоза	—	56	47
8	Беленая сульфатная целлюлоза (с КЩО)	—	55	42
Полуфабрикаты из хвойных пород древесины				
9	Беленая сульфатная целлюлоза	—	84	83
10	Небеленая сульфатная целлюлоза	—	64	61
11	Беленая сульфатная целлюлоза	Сушка	44	39
12	Беленая сульфитная целлюлоза	—	78	72
13	Беленая сульфитная целлюлоза	Сушка	45	43

* Степень размола, в единицах Шоппер–Риглера.

непрерывного культивирования продуцентов кормовой биомассы на среде с сульфитными щелоками [46, 47]. Беленая сульфитная целлюлоза вырабатывается из хвойных пород древесины и обладает высокой реакционной способностью при ферментативном гидролизе (табл. 3).

Полуфабрикаты высокого выхода, полуцеллюлозы, производят в больших объемах из лиственных пород древесины. Нейтрально-сульфитный способ предполагает варку с использованием сульфита натрия при pH среды в интервале 6–8 и получение полуцеллюлозы с минимальной степенью деструкции целлюлозы. В результате ферментативного гидролиза нейтрально-сульфитной полуцеллюлозы выход глюкозы не превышал 50% от исходных глюканов в субстратах. Способ варки полуцеллюлозы с зеленым щелоком экономически более обоснован, так как использует в качестве варочного раствора реагент, после хорошо отлаженной системы регенерации, существующей на сульфат–целлюлозных заводах. Щелочная среда и механизм делигнификации, близкий к сульфатному способу [28], обуславливал улучшенную реакционную способность данных полуфабрикатов

высокого выхода из древесины при ферментативном гидролизе. Степень конверсии и выход глюкозы сопоставимы с некоторыми образцами небеленых сульфатных целлюлоз.

Считается, что размол древесных полуфабрикатов положительно влияет на адсорбцию целлюлаз и улучшает реакционную способность целлюлозы при ферментативном гидролизе [48]. В настоящих исследованиях был обнаружен эффект размола двух видов полуцеллюлоз, но он не превышал 5%. Вероятно, это связано с тем, что интенсивная фибриляция целлюлозных волокон при размолу усиливала отрицательное действие лигнина.

Другим фактором, влияющим на реакционную способность древесных полуфабрикатов, является высушивание [28, 30, 49]. Полученные нами ранее результаты свидетельствовали о резком снижении степени ферментативного гидролиза как хвойных, так и лиственных сульфатных целлюлоз [30]. Необратимое ороговение волокон связано с поведением полисахаридов при высушивании, прежде всего гемицеллюлоз [49]. Наблюдалось образование более плотной структуры волокон, что существенно снижало доступность субстрата для

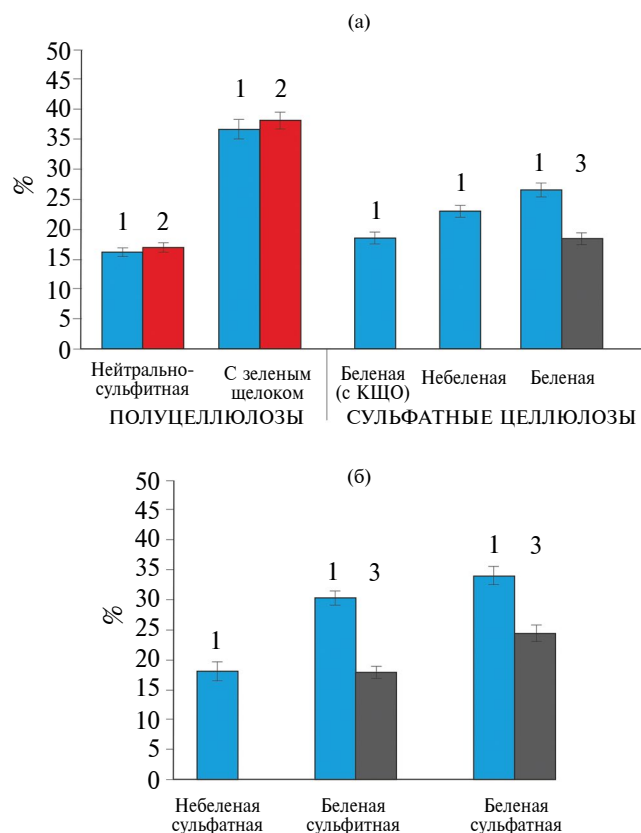


Рис. 1. Показатели выхода глюкозы от абсолютно сухой древесины (%), используемой в технологических процессах получения полуфабрикатов из лиственных (а) и хвойных пород (б): 1 — до высушивания; 2 — после размола; 3 — после высушивания.

биокатализаторов. В работе [50] показана более высокая степень ороговения сульфитной целлюлозы по сравнению с сульфатной, что объяснялось более низким содержанием ксилана и агрегацией целлюлозных молекул в кристаллических и аморфных областях при кислой сульфитной варке.

При ферментативном гидролизе различных образцов сухих технических целлюлоз препаратами *P. verruculosum* эффективность гидролиза снижалась на 25–50% (табл. 3). Для высушенной сульфатной целлюлозы из хвойных пород выход глюкозы при ферментативной конверсии уступал данному показателю для лиственной целлюлозы после сушки. Полученные результаты свидетельствовали в пользу целесообразности промышленной реализации гидролиза целлюлоз во влажном состоянии, без каких-либо дополнительных стадий высушивания на существующих предприятиях ЦБП.

Важным показателем оценки эффективности ферментативного осахаривания растительного сырья является степень конверсии до глюкозы исходного лигноцеллюлозного материала, с учетом его потерь в ходе стадий предварительной подготовки. Рассматриваемые способы подготовки (варка,

отбелка) не только улучшали реакционную способность получаемых субстратов, но и влияли на содержание в них полисахаридных компонентов. Если при получении полуфабрикатов высокого выхода происходит делигнификация и деструкция гемицеллюлоз, то при выработке белых технических целлюлоз происходит потеря более 55% компонентов древесины, в том числе и целлюлозы. Полуцеллюлозы, полученные методом варки с зеленым щелоком, наиболее перспективны в концепции биорефайнинга древесины, так как для них характерен максимальный выход глюкозы через 48 ч ферментативного гидролиза с использованием *P. verruculosum* (рис. 1). Кроме того, техническая реализация рассматриваемого метода предварительной подготовки к процессу биоконверсии может быть облегчена при интегрировании нового производства на существующем сульфат–целлюлозном предприятии. В этом случае становится возможным совместная регенерация химикатов и энергии с системой сульфатного способа делигнификации древесины.

Отрицательное влияние лигнина на ферментативный гидролиз промышленных целлюлоз не всегда подтверждается [35–37]. В сульфатных и сульфитных образцах целлюлозы содержание лигнина в количестве до 4% не оказывало существенного влияния на выход сахаров [35]. Объяснением такого явления может служить изменение структуры и свойств лигнина в ходе предобработки, которые в ряде случаев увеличивают эффективность ферментативного гидролиза целлюлозы [36]. Например, показано, что сульфирование лигнина приводит к снижению неспецифической адсорбции целлюлаз и улучшению реакционной способности целлюлозных субстратов к ферментативному гидролизу [37]. Наши исследования подтверждают неоднозначное влияние концентрации лигнина на эффективность ферментативного получения сахаров из полуфабрикатов ЦБП: образцы № 3 и 7 имеют более высокую степень конверсии в сравнении с образцом № 8, с практически полностью удаленным лигнином в процессах варки и отбелки (табл. 3).

Беленые сульфатные целлюлозы обладали хорошей реакционной способностью при ферментативном гидролизе, но эффективность биопроцессов определялась технологическими особенностями конкретных целлюлозных заводов. Например, при использовании стадии кислородно-щелочной обработки (КЩО) полуфабрикатов с сокращением расхода хлорсодержащих отбеливающих химикатов, резко снижался выход глюкозы и других моносахаридов от древесины (табл. 3, рис. 1). Сульфатная целлюлоза из лиственных пород древесины, полученная по классической схеме отбеливания, без стадии КЩО, обладала высокой реакционной способностью при ферментативном гидролизе.

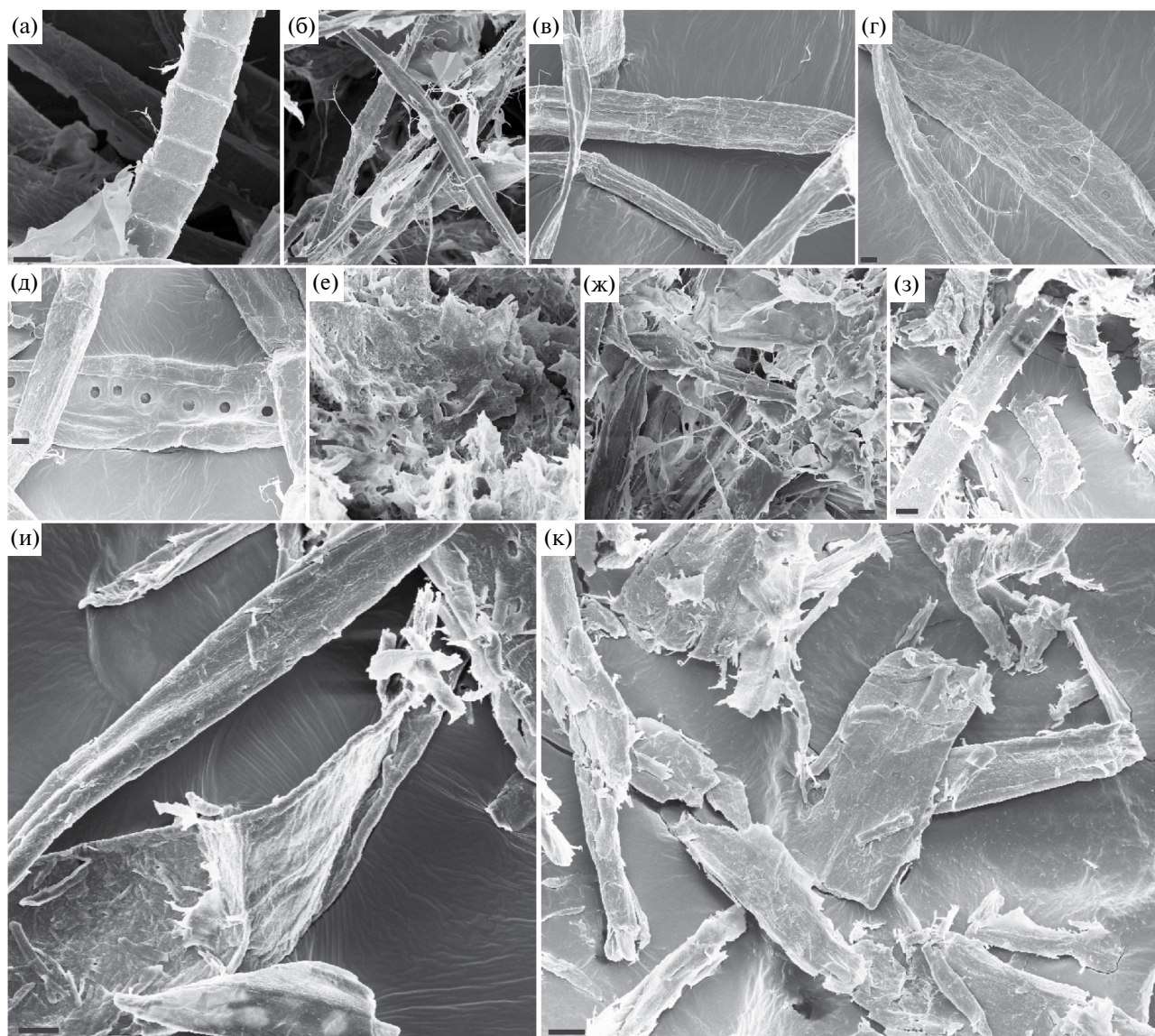


Рис. 2. Электронные микрофотографии образцов исходных волокнистых полуфабрикатов ЦБП и частично гидролизованных карбогидразами *P. verruculosum*: а – волокна нейтрально-сульфитной полуцеллюлозы; б – волокна полуцеллюлозы, полученной варкой с зеленым щелоком; в – волокна лиственной беленой сульфатной целлюлозы; г – волокна хвойной беленой сульфатной целлюлозы; д – волокна хвойной беленой сульфитной целлюлозы; е – волокна нейтрально-сульфитной полуцеллюлозы после ферментативной обработки (48 ч, степень конверсии 34%); ж – волокна полуцеллюлозы, полученной варкой с зеленым щелоком после ферментативной обработки (48 ч, степень конверсии 39%); з – волокна лиственной беленой сульфатной целлюлозы после ферментативной обработки (22 ч; степень конверсии 50%); и – волокна хвойной беленой сульфатной целлюлозы после ферментативной обработки (24 ч, степень конверсии 62%); к – волокна хвойной беленой сульфитной целлюлозы после ферментативной обработки (24 ч; степень конверсии 48%). Масштабная линейка – 10 мкм.

Основным преимуществом беленых сульфатных целлюлоз в сравнении с полуцеллюлозами является возможность получения не только гидролизатов с высоким содержанием глюкозы и без растворимых фрагментов лигнина, но и новых полисахаридных продуктов с высокой добавленной стоимостью [31]. В результате ферментативного воздействия происходят структурно-морфологические изменения целлюлозных волокон, называемые

“ферментативной модификацией” [51] или “биомодификацией” [52]. Нерастворимый продукт гидролиза полуфабрикатов представляет собой полисахаридный комплекс, состоящий в основном из целлюлозы и гемицеллюлоз, с измененным по сравнению с исходным субстратом составом, кристалличностью, степенью полимеризации и другими параметрами, зависящими от степени ферментативной конверсии [53]. На первых этапах

гидролиза под действием эндоглюканаз происходит разрушение волокон целлюлозы до более коротких фрагментов с увеличением количества концевых групп, являющихся новыми активными центрами для действия целлобиогидролаз целлюлазного комплекса. Более продолжительное воздействие ферментов способствует глубокой деструкции аморфных областей полисахаридов с повышением доли кристаллической фракции с уменьшенной длиной волокна. Так в течение 48 часов средняя длина волокон образцов полуцеллюлоз сократилась в среднем в 8 раз (рис. 2е, 2ж), когда как для лиственной беленой сульфатной целлюлозы (рис. 2з), и хвойной беленой сульфатной (рис. 2и) и сульфитных целлюлоз (рис. 2к) данный показатель за более короткий промежуток времени снизился в 15–20 раз. Структурные и механические показатели полученных биомодифицированных полисахаридных комплексов позволяют рассматривать их в качестве альтернативы порошковым целлюлозам, широко используемым в пищевой и фармацевтической отраслях промышленности [54], а также в качестве матрицы для создания легких пористых криогелевых каркасов [53].

Ферментативная конверсия полуфабрикатов ЦБП с использованием эффективных отечественных биокатализаторов позволяет получать гидролизаты, содержащие простые сахара, пригодные для дальнейшей микробной конверсии. Среди лигноцеллюлозных субстратов, доступных в промышленных объемах, максимально высокий выход глюкозы от исходной древесины при ферментативном гидролизе с использованием целлюлаз и гемицеллюлаз *P. verruculosum* характерен для полуцеллюлоз, полученных после варки лиственной древесины с зеленым щелоком. Установлена высокая степень ферментативной конверсии беленой сульфатной целлюлозы из хвойной древесины, что в сочетании с возможностью получения модифицированных полисахаридных материалов из негидролизуемого остатка делает данный субстрат наиболее перспективным для развития биохимических подходов на предприятиях целлюлозно-бумажной промышленности. Полученные результаты позволяют оценить потенциал различных методов физико-химического и механического воздействий на древесину, реализуемых на предприятиях химико-лесного России, с целью создания новых технологий получения продуктов микробиологического синтеза из ферментативных гидролизатов, богатых глюкозой.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования научным оборудованием “Арктика” Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22–24–20136).

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. Braghiroli F.L., Passarini L. // Current Forestry Reports. 2020. V. 6. P. 172–183. <https://doi.org/10.1007/s40725-020-00112-9>
2. Gonçalves M.C.P., Romanelli J.P., Cansian A.B.M., Pucci E.F.Q., Guimaraes J.R., Tardioli P.W., Saville B.A. // Ind. Crop. Prod. 2022. V. 186. 115213. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115213>
3. Семёнова М.В., Гусаков А.В., Телицин В.Д., Синуцын А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 5. С. 477–484. <https://doi.org/10.31857/S0555109921050147>
4. Синуцын А.П., Синуцына О.А., Зоров И.Н., Рожкова А.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 6. С. 551–560. <https://doi.org/10.31857/S0555109920060161>
5. Zhou B., Wang Y., Jiang Z., Salam A., Li K. // J. Wood Chem. Technol. 2021. V. 41. № 4. P. 150–159. <https://doi.org/10.1080/02773813.2021.1938130>
6. Kumar B., Verma P. // Fuel. 2021. V. 288. 119622. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119622>
7. Rabinovich M. L. // Cell. Chem. Tech. 2010. V. 44. № 4. P. 173–186.
8. Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J. // Biores. Technol. 2010. V. 101. № 13. P. 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
9. Zhu J.Y., Pan X.J. // Biores. Tech. 2010. V. 101. № 13. P. 4992–5002. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.007>
10. Hendriks A.T.W.M., Zeeman G. // Biores. Technol. 2009. V. 100. № 1. P. 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
11. Kucharska K., Rybarczyk P., Hołowacz I., Łukajtis R., Glinka M., Kamiński M. // Molecules. 2018. V. 23. № 11. 2937. <https://doi.org/10.3390/molecules23112937>
12. Asada C., Sasaki C., Uto Y., Sakafuji J., Nakamura Y. // Biochem. Eng. J. 2012. V. 60. P. 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.013>
13. Pielhop T., Amgarten J., von Rohr P.R., Studer M.H. // Biotech. Biofuels. 2016. V. 9. № 1. P. 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0567-1>
14. Doménech P., Manzanares P., Álvarez C., Ballesteros M., Duque A. // Holzforschung. 2020. V. 75. № 3. P. 250–259. <https://doi.org/10.1515/hf-2020-0068>

15. Vaidya A.A., Murton K.D., Smith D.A., Dedual G. // Biomass conv. Bioref. 2022. V. 12. № 11. P. 5427–5442. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02373-9>
16. Xu X., Wang K., Zhou Y., Lai C., Zhang D., Xia C., Pugazhendhi A. // Fuel. 2023. V. 338. P. 127361. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2022.127361>
17. Zhao X., Zhan Y., Han L., Sun X., Zhang T., Zhao Z. // Processes. 2023. V. 11. № 4. P. 1293. <https://doi.org/10.3390/pr11041293>
18. Yin X., Wei L., Pan X., Liu C., Jiang J., Wan. K. // Front. Plant Sci. 2021. V. 12. 670061. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.670061>
19. Moniruzzaman M., Goto, M. // Appl. Ionic liq. Biotech. 2019. P. 61–77. https://doi.org/10.1007/10_2018_64
20. Wu W., Li P., Huang L., Wei Y., Li J., Zhang L., Jin Y. // Biomass. 2023. V. 3. № 1. P. 96–107. <https://doi.org/10.3390/biomass3010007>
21. Przybysz Buzafa K., Kalinowska H., Małachowska E., Boruszewski P., Krajewski K., Przybysz P. // Energies. 2019. V. 12. № 15. 2952. <https://doi.org/10.3390/en12152952>
22. Cai C., Zhang C., Li N., Liu H., Xie J., Lou H., Pan X., Zhu J. Y., Wang F. // Renew. Sust. En. Rev. 2023. V. 183. 113445. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113445>
23. Van Wyk J.P.H. // Biomass Bioen. 1999. V. 16. № 3. P. 239–242.
24. Jin Y., Jameel H., Chang H. M., Phillips R. // J. Wood Chem. Tech. 2010. V. 30. № 1. P. 86–104. <https://dx.doi.org/10.1080/02773810903578360>
25. Buzafa K., Przybysz P., Rosicka-Kaczmarek J., Kalinowska H. // Cellulose. 2015. V. 22. P. 663–674. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0522-x>
26. Доценко Г.С., Чекушина А.В., Кондратьева Е.Г., Правильников А.Г., Андрианов Р.М., Осипов Д.О. и др. // Лес. Вест. 2012. Т. 8. № 91. С. 129–135.
27. Синицын А.П., Синицына О.А., Зоров И.Н., Рожкова А.М. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2023. Т. 64. № 4. С. 312–333. <https://doi.org/10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-4-312-333>
28. Новожилов Е.В., Аксенов А.С., Демидов М.Л., Чухчин Д.Г., Доценко Г.С., Осипов, Д.О., Синицын А.П. // Кат. Пром. 2014. Т. 4. С. 74–80. <https://dx.doi.org/10.1134/S2070050414040138>
29. Новожилов Е.В., Синельников И.Г., Аксенов А.С., Чухчин Д.Г., Тышкунова И.В., Рожкова А.М. и др. // Кат. Пром. 2015. Т. 5. С. 78–83. <https://doi.org/10.18412/1816-0387-2015-5-78-83>
30. Aksekov A.S., Tyshkunova I.V., Poshina D.N., Guryanova A.A., Chukhchin D.G., Sinelnikov I.G. et. al. // Catalysts. 2020. V. 10. 536. <https://doi.org/10.3390/catal10050536>
31. Shevchenko A.R., Mayorova K.A., Chukhchin D.G., Malkov A.V., Toptunov E.A., Telitsin V.D. et al // Fermentation. 2023. V. 9. 936. <https://doi.org/10.3390/fermentation9110936>
32. Saini J.K., Patel A.K., Adsul M., Singhania R.R. // Renewable Energy. 2016. V. 98. P. 29–42. <https://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.089>
33. Cai C., Li J., Hirth K., Huber G. W., Lou H., Zhu J. Y. // ChemSusChem. 2020. V. 13. P. 4649–4659. <https://doi.org/10.1002/cssc.202001120>
34. Brondi M.G., Elias A. M., Furlan F.F., Giordano R.C., Farinas C.S. // Sci. Rep. 2020. V. 10. 7367. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64316-6>
35. Aldaeus F., Larsson K., Srndovic J. S., Kubat M., Karlström K., Peciulyte A., Olsson L., Larsson, P. T. // Cellulose. 2015. V. 22. P. 3991–4002. <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0766-0>
36. Huang C., Li R., Tang W., Zheng Y., Meng, X. // Fermentation. 2022. V. 8, 558. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100558>
37. Wang Z.J., Lan T.Q., Zhu J.Y. // Biotech. Biofuels. 2013. V. 6. 9. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-9>
38. Willför S., Pranovich A., Tamminen T., Puls J., Laine C., Suurnäkki A., Saake B., Uotila K., Simolin H., Hemming J., Holmbom B. // Ind. Crops Prod. 2009. V. 29. P. 571–580. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.11.003>
39. Ghose T.K. // Pure Appl. Chem. 1987. V. 59, P. 257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
40. Nelson, N. // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. № 2. P. 375–380. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71980-7)
41. Lowry O.H., Roseborough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275. [https://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
42. Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzapple M., Ladisch M. // Biores. Technol. 2005. V. 96. № 6. P. 673–686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
43. Sun S., Sun S., Cao X., Sun R. // Biores. Technol. 2016. V. 199. P. 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>
44. Холькин Ю.И. Технология гидролизных производств. М.: Лесная промышленность, 1989. 496 с.
45. Ek M.; Gellerstedt G., Henriksson G. Pulping Chemistry and Technology. / Eds. M. Ek, G. Gellerstedt, G. r Henriksson. Berlin: Walter de Gruyter GmbH, 2009. V. 2. 471 p.
46. Мингазова Л.А., Канарский А. В., Крякунова Е.В., Канарская З.А. // Лесн. Журн. 2020. Т. 2. № 374. С. 146–158. <https://doi.org/10.37482/0536-1036-2020-2-146-158>

47. Новожиллов Е.В. // Лесн. Журн. 1999. Т. 2. № 3. С. 180–188.
48. Ko C.H., Chen F.J., Lee J.J., Tzou D.L.M. // Cellulose. 2011. V. 18. P. 1043–1054.
<https://doi.org/10.1007/s10570-011-9534-y>
49. Laivins, G.V., Scallan, A.M. // Prod. Paper. 1993. V. 2. P. 1235–1260.
<https://doi.org/10.15376/frc.1993.2.1235>
50. Rebuzzi, F., Evtuguin, D.V. // Macromol. Symposia. 2005. V. 232. № 1. P. 121–128.
<https://doi.org/10.1002/masy.200551414>
51. Kamaya Y. // J. Ferm. Bioeng. 1996. V. 82. P. 549–553.
[https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)81250-0](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)81250-0)
52. Garcia-Ubasart J., Torres A.L., Vila C., Pastor F.I.J., Vidal T. // Ind. Crop. Prod. 2013. V. 44. P. 71–76.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.019>
53. Shevchenko A.R., Tyshkunova I.V., Chukhchin D.G., Malkov A.V., Toptunov E.A., Telitsin V.D. et al. // Catalysts. 2023. V. 13. № 1. 103.
<https://doi.org/10.3390/catal13010103>
54. Mayorova K., Aksenov A., Shevchenko A. // AIP Conf. Proc. 2023. V. 2931, P. 030005-1-030005-8
<https://doi.org/10.1063/5.0178421>

Enzymatic Conversion of Wood Materials from the Pulp and Paper Industry

A. S. Aksenov^{a, *}, I. G. Sinelnikov^b, A. R. Shevchenko^a, K. A. Mayorova^a, D. G. Chukhchin^a,
D. G. Osipov^b, M. V. Semenova^b, O. A. Sinitsyna^c, A. M. Rozhkova^b,
E. V. Novozhilov^a, A. P. Sinitsyn^{b, c}

^aNorthern (Arctic) Federal University named after M. V. Lomonosov, Arkhangelsk, 163002 Russia

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

^cChemical Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: a.s.aksenov@narfu.ru

The reactivity during enzymatic hydrolysis of 8 industrially produced samples of pulps and semi-chemical pulps by enzyme preparations of glycosyl hydrolases B151 and F10 produced by a strain of ascomycete fungus *Penicillium verruculosum* has been determined. It is shown for the first time that among fibrous pulps available on the market of pulp and paper industry in Russia, the highest level of yield of glucose from the initial wood during biocatalysis using cellulases and hemicellulases is characteristic of semi-chemical pulps obtained after cooking of hardwood with green liquor. A high degree of enzymatic conversion of softwood bleached kraft pulp has been established, which in combination with the possibility of obtaining modified polysaccharide materials from non-hydrolysable residue makes this cellulosic substrate the most promising for the development of biological processes at pulp and paper industries. It is shown that drying of pulp negatively affects the efficiency of cellulose hydrolysis, while mechanical milling improves the performance of the enzymatic saccharification process.

Keywords: cellulases, xylanases, *P. verruculosum*, semi-chemical pulps, kraft pulping, hemicelluloses, sulfite delignification, bioeconomy

УДК 579.66, 579.222.4

ОБЕСЦВЕЧИВАНИЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ФИОЛЕТОВОГО СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРОЙ В УСЛОВИЯХ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ

© 2024 г. А. А. Самков^{1, *}, Е. В. Панкратова^{1, 2}, М. Н. Круглова¹, А. В. Беспалов¹, С. М. Самкова¹, Н. Н. Волченко¹, А. А. Худокормов¹

¹Кубанский государственный университет, Краснодар, 350040 Россия

²Научно-технологический университет “Сириус”, Краснодарский край, 354340 Россия

*e-mail: andreysamkov@mail.ru

Поступила в редакцию 12.10.2023 г.

После доработки 23.11.2023 г.

Принята к печати 10.01.2024 г.

В донных отложениях пресных водоемов обнаружено варьирование относительной представленности копий бактериальных генов пероксидаз ДуР, обесцвечивающих красители, характерных для рода *Shewanella* и ряда других микроорганизмов. Показано, что скорость обесцвечивания кристаллического фиолетового в лабораторной мембранной биоэлектрохимической системе смешанной культурой донных отложений, показавшей наибольшую представленность генов ДуР, зависела от способа электрической стимуляции внешней цепи и концентрации красителя. После повышения концентрации выше 20 мкМ максимальная скорость обесцвечивания достигалась при наличии полярно подключенного ко внешней электрической цепи биоэлектрохимической системы ионистора и составила 3.23 ± 0.11 мкМ/ч, в то время как при противоположном по полярности подключении наблюдалось минимальное значение 2.07 ± 0.08 мкМ/ч. В случае разомкнутой цепи и резистора имели место сходные показатели – 2.88 ± 0.09 и 2.67 ± 0.12 мкМ/ч соответственно. При анализе продуктов обесцвечивания отмечено согласованное снижение максимумов полос поглощения красителя, свидетельствующее о более полной его деградации смешанной культурой. Результаты могут представлять интерес для повышения эффективности биоэлектрохимических методов экологической биотехнологии, путем электростимуляции внешней цепи.

Ключевые слова: биоэлектрохимическая система, обесцвечивающие красители пероксидазы ДуР, кристаллический фиолетовый, трифенилметановый краситель, биоэлектрокатализ, обесцвечивание, микробный топливный элемент

DOI: 10.31857/S0555109924030075 EDN: EWOKYE

Поступательное развитие форм использования биоэлектрохимических систем, исходно связанных с микробными топливными элементами [1], обеспечивавшими получение электроэнергии, в настоящее время привело к широкому использованию таких систем в экологической биотехнологии [2–6], биосенсорах [7–11], биоэлектрокатализе [12, 13], биоэлектросинтезе [14] и др.

Изменение качественных и количественных характеристик микробиоценоза, функционирующего в условиях биоэлектрохимической системы, действующей в условиях пассивной поляризации, связано с размещением электродов в средах с разными значениями окислительно-восстановительного потенциала. При этом в зоне размещения анода, где окислительно-восстановительный потенциал низок, микрофлора вблизи поверхности электрода имеет преимущество за счет возможности сброса

избыточных восстановительных эквивалентов на искусственный акцептор электронов – анод. Это решает проблему недостатка конечных акцепторов электронов при катаболизме органических субстратов. При этом формирование сообществ, включающих, на конечных этапах, передачу электронов на анод, увеличивает интенсивность утилизации органического субстрата в анаэробных условиях [15]. Другим механизмом стимуляции является “электрическая синтрофия”, заключающаяся в облегчении прямого транспорта электронов между членами синтрофных сообществ, что выражается, например, в усилении метаногенеза, при наличии в анаэробной среде электропроводящих материалов [16].

Наиболее эффективными экзоэлектрогенными микроорганизмами являются способные использовать внешние неорганические акцепторы

электронов сапрофиты, например, *Shewanella oneidensis* [17]. Роль подобных микроорганизмов в микробиоценозах биоэлектрoхимических систем может быть связана с конечным звеном цепей межвидового переноса электронов — “биоэлектрoхимических трубопроводов”, решающих, в том числе, проблему недостатка акцепторов в восстановительных условиях [16, 18].

Использование внешней стимуляции электрической цепи биоэлектрoхимической системы значительно расширяет возможности воздействия на катаболические процессы, происходящие в околоанодной зоне, по сравнению с условиями естественной поляризации, где разность потенциалов между электродами исходно ограничена естественным максимумом около одного вольта [19]. В работе [20] доказано, что при приложении слабого внешнего напряжения (0.1–0.3 В) к электродам, находящимся в среде с культурой псевдомонад, в условиях аэрации, происходило изменение скорости деградации фенантрена, что было объяснено, в том числе, изменением проницаемости мембран, ростом относительной экспрессии (к гену *16s* рРНК) ключевых генов деградации данного субстрата у *Pseudomonas* — *nahAc*, *pcaH* и *xylE*. Для выяснения кинетики деструкционных процессов, осуществляемых уже в анаэробных условиях в классической биоэлектрoхимической системе, где электроды размещены в зоны с разными знаками окислительно-восстановительного потенциала, соединенные протонообменной системой, ранее были проведены исследования кинетики обесцвечивания чистой культурой *S. oneidensis* MR-1 азокрасителя и трифенилметанового красителя в условиях анодной камеры биоэлектрoхимической системы мембранного типа [21]. Впервые было использовано прямое и обратное по полярности подключение внешнего источника тока и напряжения, обнаружившее влияние этого фактора, при исходном равенстве прикладываемых разностей потенциалов, на кинетику процесса и спектр конечных продуктов распада кристаллического фиолетового.

Кристаллический фиолетовый, как и другие анилиновые красители, широко используется в различных технологиях и процессах, что определяет его попадание во внешнюю среду при синтезе и использовании в различных производствах. В связи с этим, ряд исследований посвящен проблеме биodeградации красителя во внешней среде [22, 23]. Помимо роли данного красителя как загрязнителя окружающей среды, он удобен для использования в качестве модельного объекта изучения влияния биоэлектрoхимической деградации в условиях анодной камеры, так как имеет стабильный спектр поглощения в широком диапазоне рН и редокс-устойчив [21]. Исследование обесцвечивания смешанной культурой в условиях электростимуляции необходимы для сравнения

с результатами, полученными на чистой культуре *S. oneidensis* MR-1 в аналогичных экспериментальных условиях, так как смешанные микробиоценозы донных отложений за счет прямой передачи электронов и протонов между клетками различных видов и электродами могут показать иную зависимость. Кроме того, в условиях практического использования, например в анаэробных очистных сооружениях, биodeградация осуществляется именно смешанными культурами.

Известно, что при внесении в анодную зону биоэлектрoхимической системы редокс-устойчивых красителей наблюдается их обесцвечивание в результате воздействия бактериальных ферментов класса пероксидаз [24], имеющих у представителей рода *Shewanella* и многих других таксонов бактерий. Способность представителей *Shewanella* обесцвечивать красители связана, в частности, с системами пероксидаз класса DyP или краситель-обесцвечивающих пероксидаз (dye decolorizing peroxidases) [25–27]. Такие пероксидазы широко представлены, в частности, у протеобактерий и актинобактерий [28].

Ранее в работе [21] было сделано предположение, что общеизвестная значительная экзоэлектрoгенная активность *S. oneidensis* MR-1 в условиях внешней стимуляции электрической цепи биоэлектрoхимической системы, обеспечивала сопряжение работы ферментов, ответственных за обесцвечивание, и электрoхимических процессов, проходящих на поверхности анода. Экстраполяция обнаруженных на чистой культуре эффектов на естественные микробиоценозы требует проверки при воздействии на краситель смешанной культурой, присутствующей в донных отложениях — повсеместно распространенной природной среды с восстановительными условиями, где накапливаются и сохраняются многие поллютанты. Подобные среды, в естественных условиях включающие как электроактивные микроорганизмы, так и микроорганизмы-деструкторы представляют собой значительно более сложную систему, реагирующую на электрoхимическую стимуляцию изменением скорости разложения поллютантов [29]. При этом, межвидовой перенос электронов, показанный в работе [18], демонстрирует рост показателей деструкции, а также теоретическую возможность смешанных культур донных отложений и подобных сред формировать, в условиях биоэлектрoхимической стимуляции, альтернативные трофические цепи и/или синтрофные связи, отличающиеся от типовых в анаэробных процессах [17]. Учет относительной представленности генов пероксидаз класса DyP в тотальной ДНК, выделенной из смешанных культур донных отложений разных водоемов, в том числе, использованных в качестве источника микрофлоры в настоящих экспериментах, может указывать на возможную взаимосвязь механизма

сопряжения электростимуляции и обесцвечивания красителя на уровне ферментных систем.

Цель данной работы — экспериментально проверить эффект воздействия внешней электрической стимуляции, на скорость обесцвечивания трифенилметанового красителя смешанной культурой донных отложений в условиях анодной камеры микробного топливного элемента.

МЕТОДИКА

Биоэлектрохимические системы представляли собой микробные топливные элементы (МТЭ) мембранного воздушно-катодного типа с объемом анодной камеры 69 мл с катионообменной мембраной МФ-4СК (ОАО “Пластополимер”, Россия) размером 35×35 мм, выполнявшей функцию протонообменной системы [30]. Электроды были выполнены из углеродного войлока НТМ-200М (АО “НИИЭИ”, Россия) толщиной 4 мм, анод имел размер 20×50 мм, воздушный катод был выполнен в форме диска диаметром 18 мм, непрерывно капиллярно смачиваемого дистиллированной водой и прижатого к мембране МФ-4СК. Электроды контактировали со внешней цепью через графитовые стержни для разобщения металлических проводников внешней цепи и жидкой среды. В случае анода графитовый стержень диаметром 2.0 мм проходил через резиновую крышку анодной камеры, обеспечивающую герметичность и далее сквозь находящийся под крышкой прямоугольник из войлока вдоль его длинной оси. Войлок был прижат к стержню хомутом-стяжкой и закреплен на пластиковом сетчатом каркасе, прикрепленном к стенкам анодной камеры. Находящийся на воздухе и прижатый к мембране МФ-4СК катод контактировал с графитовым стержнем через прижатую к нему полоску углеродного войлока, один конец которой был погружен в емкость с дистиллированной с водой для смачивания катода. Перед использованием мембраны переводили в протонную форму по стандартной методике окислительно-термического кондиционирования перфторированных мембран [31].

В качестве среды анодной камеры использовали искусственную сточную воду следующего минерального состава (мг/л): NaHCO_3 — 480; NH_4Cl — 95.5; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 146.7; KH_2PO_4 — 52.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 63.1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 19.2 [32]. В качестве источника углерода и энергии использовали пептон — 1.0 г/л.

Для инокуляции среды использовали микрофлору донных отложений озера Карасунское (Краснодар, Россия), отобранных в прибрежной зоне на глубине около 0.3 м из горизонта 3–7 см от поверхности ила. Исходный титр был установлен посевом разведений в полужидкий

питательный агар (ПЖА), следующего состава (г/л): ГМФ-бульон — 30, глюкоза — 10, агар-агар — 10. После автоклавирования при 0.5 атм в течение 20 мин в стерильные пробирки вносили 1 мл свежеприготовленного разведения исследуемого образца в физрастворе и 10 мл остуженного до $45\text{--}48^\circ\text{C}$ ПЖА. Содержимое быстро перемешивали вращательными движениями, сверху наливали 0.5 мл вазелинового масла и инкубировали при 25°C 7–10 сут. Титр общей гетеротрофной микрофлоры в донных отложениях составлял около 8×10^9 КОЕ/мл. Донные отложения разбавляли до конечного титра в анодной камере около 10^7 кл./мл.

Инкубирование биоэлектрохимических систем проводили при 25°C на орбитальных качалках Multi Shaker Psu 20i (“Biosan”, Латвия) на 100 об./мин, для предотвращения осаждения клеток на дне анодной камеры и выравнивания условий в объеме. О достижении анаэробноз судили по нарастанию разности потенциалов между анодом и катодом в биоэлектрохимической системе в режиме разомкнутой цепи, до внесения красителя. Контроль осуществляли при помощи измеряющего окислительно-восстановительный потенциал электрода HI3230 прибора Hanna HI8424 (“Hanna Instruments”, Германия). Для приложения внешней разницы потенциалов использовали ионисторы Maxwell BCAP0350 E270 T11 (“Maxwell”, Китай) с низким током саморазряда — не более 0.3 мА.

Для осаждения клеток перед измерением оптической плотности применяли центрифугу PC-6МЦ (“Dastan” Киргизия).

Для оценки концентрации красителя измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре Leki SS2107 (“LEKI Instruments”, Финляндия) в спектрофотометрических кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм при длине волны 590 нм. Регистрацию оптических спектров поглощения среды (диапазон $\lambda = 190\text{--}1100$ нм) проводили на том же спектрофотометре Leki SS2107 UV в кварцевых кюветах с использованием программного обеспечения Leki ScanPro.

Измерение разности потенциалов проводили при помощи прецизионного цифрового мультиметра Актаком АММ-1139 (ЗАО НПП “Эликс”, Россия).

Для выделения ДНК из донных отложений использовали набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из образцов, содержащих гуминовые кислоты “МетаГен” EW-002 (ООО “НПФ Синтол”, Россия). Ручную пробоподготовку проводили в соответствии с рекомендациями производителя с использованием жидкого азота.

Концентрацию ДНК измеряли с помощью фотометра Implen Nano Photometer N60 (“Implen”, Германия) в объеме 2 мкл.

Для амплификации на Rotor-Gene Q (“QIAGEN GmbH”, Германия) использовали набор реагентов R-402 для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I (ООО “НПФ Синтол”, Россия). Использовали универсальные праймеры к гену 16S рРНК (27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и 805R5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT-3'), а также вырожденные праймеры для широкого круга бактериальных обесцвечивающих красители пероксидаз DyP, (F 5'-GAYCTGTGCTTYGARCTSGC-3', R5'-ASCCGATRAARTASGTGCC-3') [33]. Относительную представленность генов пероксидаз вычисляли как отношение предварительно выявленной эффективности ПЦР с праймерами для 16S рРНК к таковой для DyP, в степенях соответствующих значений циклов количественной оценки Cq для референсного и целевого генов [34, 35]. Для построения кривой зависимости Cq от десятичного логарифма концентрации ДНК-матрицы и определения эффективности ПЦР с праймерами для генов 16S рРНК и DyP, в качестве контроля использовали ДНК, выделенную из культуры *S. oneidensis* MR-1.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента. Достоверным считали различие при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что механизм обесцвечивания кристаллического фиолетового многими микроорганизмами связан с обесцвечивающими краситель пероксидазами [35]. В частности, способная обесцвечивать краситель культура *S. oneidensis* MR-1 имела в хромосоме ген пероксидазы (DyP) обесцвечивающей краситель, что можно видеть в геномных сборках базы NCBI, например, AE014299.2 в положении 756464–757399 нуклеотидов, CP053946.1 в положении 1347631–1348566 и др. [36]. Для непосредственного выявления

гомологов генов DyP у широкого круга микроорганизмов разных филумов, в том числе, у различных протеобактерий, представленных в донных отложениях, в настоящее время эффективно используются вырожденные праймеры [33]. Ранее, при помощи данных праймеров, наличие этого гена было проверено на имеющейся культуре *S. oneidensis* MR-1 методом классической ПЦР [21].

Для оценки связи ключевых ферментативных механизмов, участвующих в обесцвечивании кристаллического фиолетового чистой культурой *S. oneidensis* MR-1 и смешанными культурами донных отложений различных водоемов Краснодарского края, методом рвПЦР оценивали относительную представленность копий гомологов генов DyP в тотальной ДНК, выделенной из образцов. Для получения стандартных кривых и определения эффективности ПЦР-реакции проводили с серией десятикратных разбавлений ДНК, выделенной из клеточной биомассы *S. oneidensis* MR-1. В качестве праймеров использовали вырожденные для DyP, а также праймеры для гена 16S рРНК, использованного в качестве гена домашнего хозяйства. Эффективность ПЦР при использованных параметрах реакции составила 1.87 и 1.99 для DyP и 16S рРНК соответственно. Тотальную ДНК, выделенную из образцов донных отложений разных водоемов, использовали в качестве матрицы в сериях амплификаций с праймерами к указанным генам. Относительную представленность выражали как отношение эффективностей ПЦР для референсного гена 16S рРНК к целевому, в степенях соответствующих циклов количественной оценки. Было обнаружено, что гены гомологов DyP представлены в микрофлоре всех образцов донных отложений, значительно варьируя по относительному количеству (рис. 1).

Обнаруженная значительная представленность гомологов генов DyP в ДНК из донных отложений согласуется с современными представлениями о большой распространенности подобных

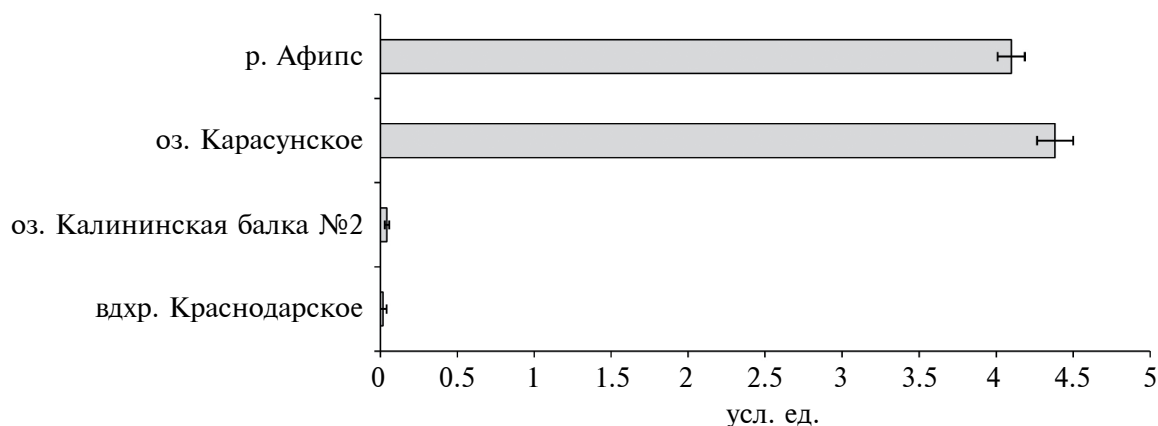


Рис. 1. Относительная представленность генов DyP в образцах донных отложений пресных водоемов Краснодарского края.

пероксидаз среди представителей различных таксонов [37] и демонстрирует наличие микроорганизмов-носителей данного гена в смешанной культуре донных отложений, предложенной для обесцвечивания в исследуемой биоэлектрохимической системе трифенилметанового красителя. Для дальнейшей работы, в качестве биологического агента, обесцвечивающего кристаллический фиолетовый в условиях биоэлектрохимической стимуляции, был выбран образец с наибольшим значением относительной представленности генов *DyP*, а именно образец из оз. Карасунское (Краснодар, Россия).

После выдерживания биоэлектрохимических систем, инокулированных смешанной культурой донных отложений в течение суток, для выравнивания разности потенциалов, в анодные камеры вносили кристаллический фиолетовый, до конечной концентрации 6.13 мкМ, а к электродам подключали один из вариантов внешних электрических цепей: пассивное сопротивление (резистор 1 кОм), либо заряженный до напряжения 1.2 В, ионистор с прямой полярностью подключения (отрицательный полюс подключен к аноду биоэлектрохимической системы), либо аналогичный ионистор с обратной полярностью подключения (положительный полюс к аноду). При отсутствии резистора или ионистора цепь была разомкнутой.

Данные варианты внешней электрической цепи представляли собой наиболее простую совокупность вариантов естественной и искусственной поляризации электродов в близких пределах значений разности потенциалов. Варианты “разомкнутая цепь” и “резистор 1 кОм” являются самыми распространенными в работах с биоэлектрохимическими системами. Вариант “разомкнутая цепь” исключает контакт анода с катодом, и следовательно, возможность вывода электронов через внешнюю цепь. При этом электропроводящий углеродный войлок анода сохраняет возможность стимулировать обесцвечивание красителя несколькими способами: через использование развитой поверхности для формирования микробных биопленок и концентрирования там кристаллического фиолетового, либо, за счет электропроводности материала, через усиление передачи электронов между микроорганизмами [16]. В случае варианта “резистор 1 кОм” между анодом и катодом обеспечивается протекание электрического тока. Величина сопротивления 1 кОм является наиболее универсальной при исследовании биоэлектрохимических систем, так как близка к порядку величин их внутреннего сопротивления. Разность потенциалов 1.2 В, используемая в вариантах “ионистор “+”” и “ионистор “-”” связана с максимальным теоретическим значением напряжения в микробных топливных

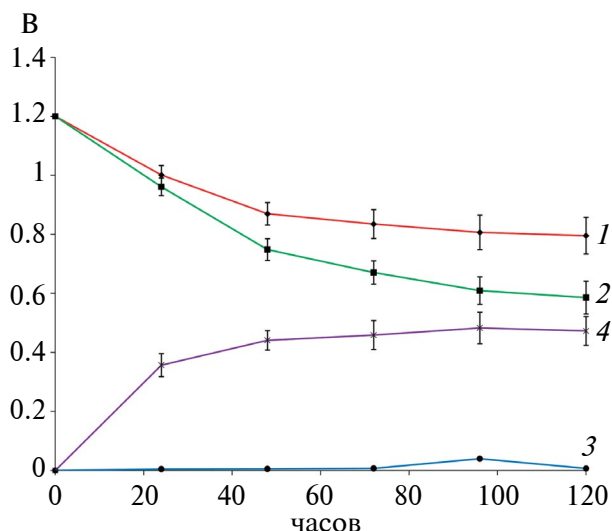


Рис. 2. Динамика разности потенциалов между электродами биоэлектрохимических систем в ходе обесцвечивания кристаллического фиолетового смешанной культурой донных отложений в зависимости от электрической стимуляции внешней цепи. 1 — ионистор прямой полярности подключения, 2 — ионистор обратной полярности подключения (значения приведены по модулю), 3 — резистор 1 кОм, 4 — разомкнутая цепь.

элементах, равным 1.105 В [19]. Было предположено, что полярное подключение ионистора (положительный электрод к катоду, отрицательный к аноду, вариант “ионистор “+””) и противоположное (“ионистор “-””) дадут противоположные эффекты воздействия на процесс разложения кристаллического фиолетового, усиливая или ослабляя сопряжение анодных полуреакций с биодеградацией красителя клетками.

Культивирование велось на движущейся платформе орбитального шейкера, при температуре 25°C и 100 RPM, с фиксацией оптической плотности центрифугата на длине волны 590 нм. Отбор (анодную жидкость) и внесение раствора красителя, во взаимокompенсирующих объемах по 0.5 мл, осуществляли иглой через резиновую крышку анодной камеры, для исключения доступа воздуха. Кратковременные перепады давления в анодной камере компенсировались упругой деформацией эластичной крышки и мембраны. Каждый эксперимент проводили в трех повторностях.

Через 1 сут инкубации, краситель вносили повторно, каждый раз увеличивая концентрацию на 18.38 мкМ в сут (расчетные концентрации 6.13, 24.51, 42.89 и 61.28 мкМ) и фиксируя оптическую плотность, что позволило оценить зависимость скорости обесцвечивания красителя от его концентрации. Для оценки разряда ионисторов, а также оценки естественной поляризации электродов в вариантах с сопротивлением

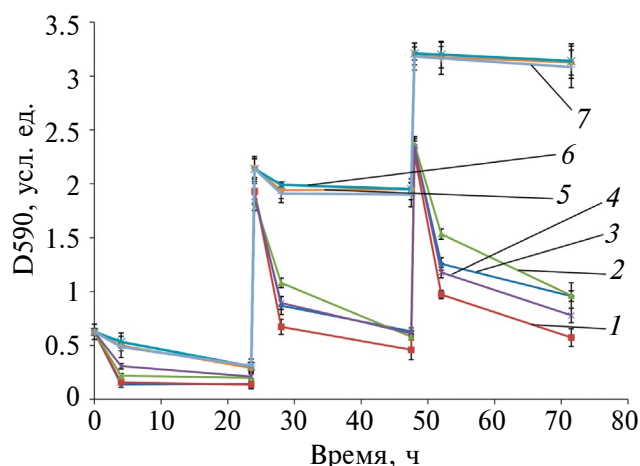


Рис. 3. Динамика D590 раствора кристаллического фиолетового при его ступенчатом внесении, в зависимости от электрической стимуляции внешней цепи. 1 – ионистор прямой полярности подключения, 2 – ионистор обратной полярности подключения, 3 – резистор 1 кОм, 4 – разомкнутая цепь, 5 – контроль без инокулята, 6 – ионистор прямой полярности подключения (контроль с автоклавированным инокулятом), 7 – ионистор обратной полярности подключения (контроль с автоклавированным инокулятом).

(“разомкнутая цепь”) и без резистора – то есть с разомкнутой цепью (РЦ) (“разомкнутая цепь”), фиксировали разности потенциалов между катодом и анодом. Для варианта “ионистор “–”” приведены модули значений. Результаты показаны на рис. 2.

Быстрое нарастание разности потенциалов до величин более 0.4 В, отражаемое кривой 4 (разомкнутая цепь), а также наличие электрического тока микроамперного порядка (кривая 3, резистор 1 кОм) на всем протяжении эксперимента говорит об отсутствии токсического действия использованных концентраций красителя на микрофлору. Достигнутое значение 0.48 В близко к значениям напряжения разомкнутой цепи аналогичными биоэлектрохимическим системам без кристаллического фиолетового, составляющим 0.45–0.55 В. Отмечен эффект значительно более интенсивного разряда ионистора, подключенного с обратной полярностью (отрицательным полюсом к катоду), по сравнению с ионистором прямой полярности. Количество электричества, продуцируемого биоэлектрохимическими системами за этот период, вычисляется как произведение величины электрического тока (полученного на основании закона Ома для участка цепи, делением напряжения в варианте “резистор 1 кОм” на сопротивление) на время (ед. кулон). Полученная величина была более чем на порядок ниже

израсходованной ионисторами за это время, вычисленной как разница произведений емкости на напряжение, в конце и начале эксперимента, отдельно для вариантов “ионистор “+”” и “ионистор “–””. Это могло представлять эффект “полупроводника”, связанного с однонаправленным движением протонов через катионселективную мембрану по градиенту концентрации от анаэробной анодной зоны к аэробной катодной.

Динамика оптической плотности кристаллического фиолетового в анодных камерах имела ступенчатый характер, из-за регулярного внесения красителя (рис. 3). По скорости снижения показателя в течение 4 ч после каждого очередного внесения порции субстрата, оценивали скорость реакции. Было обнаружено, что в абиотических условиях снижения ОП₅₉₀ практически не происходило, как при отсутствии внесения инокулята (кривая 5), так и в случае внесения инокулята, подвергнутого автоклавированию (кривые 6 и 7), вне зависимости от электрической стимуляции внешней цепи. Незначительное снижение ОП₅₉₀, отмеченное в течение первых суток после первого внесения кристаллического фиолетового для контроля без инокуляции и контроля с автоклавированным инокулятом могло быть связано с адсорбцией красителя на углеродном войлоке. Войлок имеет значительную удельную поверхность, достигающую тысяч квадратных сантиметров на см³ материала [38] и представляет собой основной сорбент в анодной камере. При инокуляции смешанной культурой донных отложений в конечной концентрации около 10⁷ КОЕ/мл было показано значительное влияние устройства внешней цепи. В частности, более выраженная степень обесцвечивания красителя отмечена при использовании во внешней цепи ионистора, поддерживающего повышенную относительно других вариантов электрической стимуляции разность потенциалов между электродами.

На основании значений ОП₅₉₀ непосредственно перед внесением очередной порции красителя, а также после него, были построены графики зависимости скорости обесцвечивания от концентрации кристаллического фиолетового, для всех вариантов внешней электрической стимуляции (резистор, подключенные прямой и обратной полярностью ионисторы, разомкнутая цепь). Поскольку наибольшая интенсивность обесцвечивания имела место в первые часы после внесения субстрата, диапазон 0–4 ч представлял наибольший интерес как с теоретической, так и с практической точки зрения, так как проточные системы очистки требуют минимального срока инкубации. Графики зависимости скорости обесцвечивания от концентрации кристаллического фиолетового приведены на рис. 4.

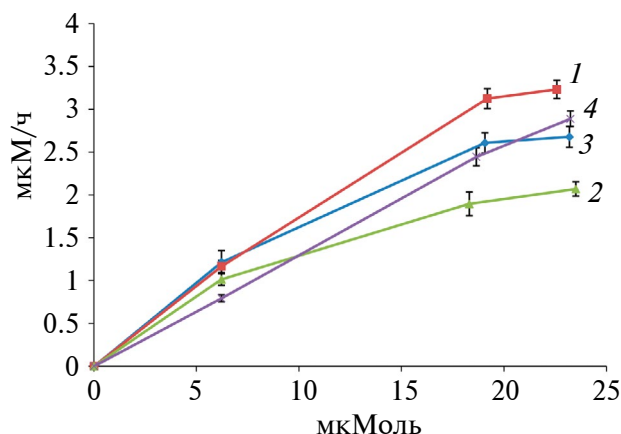


Рис. 4. Зависимость скорости обесцвечивания кристаллического фиолетового в анодных камерах БЭС от электрической стимуляции внешней цепи и концентрации красителя. 1 – ионистор прямой полярности подключения, 2 – ионистор обратной полярности подключения, 3 – резистор 1 кОм, 4 – разомкнутая цепь.

Обнаружено, что при использовании смешанной культуры донных отложений, по мере увеличения концентрации субстрата, происходил рост скорости реакции. При этом, подключение внешнего источника тока и разности потенциалов в соответствии с полярностью микробных топливных элементов (ионистор “+”, прямая полярность подключения), обеспечило максимальное значение скорости по сравнению с остальными вариантами и равное 3.23 ± 0.11 мкМ/ч. Показатели в случае “разомкнутой цепи” и “резистора 1 кОм” были сходными и составили 2.88 ± 0.09 и 2.67 ± 0.12 мкМ/ч соответственно. При использовании ионистора с обратной полярностью подключения (ионистор “–”) значение было минимальным в большей части эксперимента и составило в конце эксперимента 2.07 ± 0.08 мкМ/ч. Таким образом, полученные результаты соответствовали таковым при использовании чистой культуры *S. oneidensis* MR-1, где максимальные значения – 2.05 ± 0.07 – 2.91 ± 0.09 мкМ/ч наблюдались для суспендированных и иммобилизованных клеток соответственно при варианте “ионистор “+”” [21]. Однако, были достигнуты более высокие скорости обесцвечивания, что могло быть связано с более высокими катаболическими возможностями смешанной культуры.

Известно, что при электрохимической деградации кристаллического фиолетового в абиотических условиях высокой плотности тока, наблюдалось одновременное снижение интенсивности всех основных пиков поглощения [39]. Широкий набор продуктов обесцвечивания наблюдался при биологической деградации, причем наиболее распространенными путями биологической деградации трифенилметановых красителей были

N-деметилование и расщепление сопряженной хромофорной структуры [40, 41, 42]. В частности, при биологическом обесцвечивании кристаллического фиолетового чистой культурой *Agrobacterium radiobacter* было отмечено накопление промежуточных продуктов, таких как N,N,N,N-тетраметилпарарозанилин, [N,N-диметиламинофенил] [N-метиламинофенил]бензофенон, N,N-диметиламинобензальдегид, 4-метиламинофенол и фенол [43]. В случае использования лакказы CotA и краситель-обесцвечивающей пероксидазы BaDyP из *Bacillus amyloliquefaciens* в результате N-деметилирования образовывались бис [4-(диметиламино)фенил]метанон и его N-деметилованные производные [22, 44]. В случае представителей рода *Shewanella* наиболее характерными продуктами распада являются N,N-диметиламинобензальдегид и кетон Михлера [23].

Для сравнения состава продуктов распада кристаллического фиолетового, после проведения эксперимента с обесцвечиванием, были проанализированы оптические спектры поглощения содержимого анодных камер, в диапазоне длин волн от 190 до 1100 нм. В качестве образца сравнения использовали дистиллированную воду, среда без добавления красителя в данной области не имела выраженных полос поглощения. Спектральные кривые для всех экспериментальных вариантов в диапазоне 285–800 нм приведены на рис. 5.

Во всех исследуемых образцах по сравнению с контрольным отмечено существенное снижение интенсивности основной полосы поглощения, расположенной в районе 585–590 нм, при этом как форма самой полосы, так и положение максимума ее поглощения оставались практически неизменными. Аналогичную зависимость наблюдали для второго пика, расположенного на 301–304 нм, что позволило сделать предположение о том, что продукты биodeградации смешанной культурой кристаллического фиолетового, в основной своей массе, не обладали поглощением в видимой области спектра. Отсутствие выраженных гипсохромных сдвигов основного пика может свидетельствовать о более глубокой деградации красителя, по сравнению с чистыми культурами, накапливающими соединения с частично разрушенной хромофорной группой, которые поглощали в более коротковолновой части спектра [45]. Обнаружено сходство со спектром поглощения, в данной части спектра, продуктов разложения кристаллического фиолетового пероксидазой BaDyP из *Bacillus amyloliquefaciens*, обесцвечивающей краситель, где отдельные пики продуктов также не были выражены [22].

Таким образом, обнаружено сохранение ранее выявленного на чистой культуре *S. oneidensis* MR-1 эффекта, наблюдавшегося в условиях низкого окислительно-восстановительного потенциала

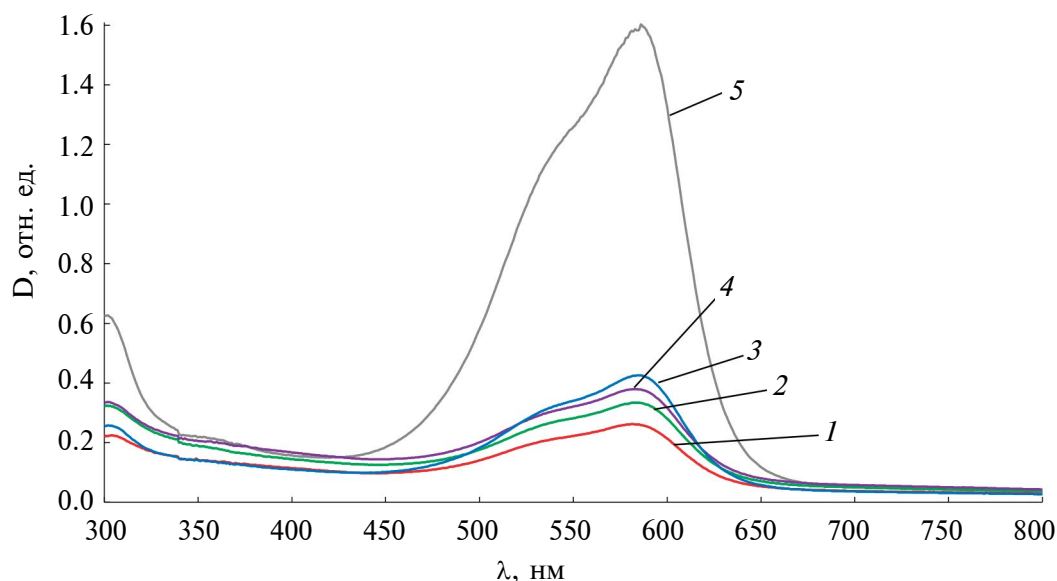


Рис. 5. Спектры поглощения продуктов разложения кристаллического фиолетового смешанной культурой в зависимости от электрической стимуляции внешней цепи. 1 – ионистор прямой полярности подключения. 2 – ионистор обратной полярности подключения, 3 – резистор 1 кОм, 4 – разомкнутая цепь, 5 – контроль.

анодной камеры. Эффект сводился к стимуляции обесцвечивания кристаллического фиолетового микробной культурой при подключении внешнего источника тока и напряжения, совпадающего с естественной полярностью биоэлектрохимической системы (БЭС) и ингибированию в случае противоположной полярности. При этом, увеличение скорости реакции по сравнению с чистой культурой могло быть связано с присутствием в смешанной культуре как экзоэлектрогенных микроорганизмов рода *Shewanella*, часто присутствующих в донных отложениях [46], так и иных, обладающих ферментными системами для обесцвечивания трифенилметанового красителя. Это было подтверждено оценкой относительного количества копий генов *DyP* в инокуляте. Сопряжение ключевых реакций обесцвечивания, связанных с N-деметилированием фенильного радикала отщеплением и расщеплением колец, могло осуществляться как в чистой культуре *S. oneidensis* MR-1, через присутствующие в донных отложениях сходные экзоэлектрогенные микроорганизмы. Эти микроорганизмы формируют прямой либо медиаторный обмен электронами с анодом и проявляли себя формированием тока и напряжения в случае разомкнутой цепи и резистора соответственно. Полученные результаты согласуются с описанной в работе [47] зависимостью обесцвечивания азокрасителя смешанной культурой биопленок от тока во внешней цепи. Это указывает на возможность использования биоэлектрохимической стимуляции в смешанных культурах, в природных анаэробных микробиоценозах, формирующих механизмы межвидового переноса

восстановительных эквивалентов [18]. Описанное в работе [48] вовлечение шеванеллами ФМН-зависимых НАДН-азоредуктаз и НАД(Ф)Н-флавинредуктаз в обесцвечивании азокрасителя реактивный чернот 5, с учетом роли рибофлавина во внеклеточном переносе электронов у данной группы, показывает разнообразие возможных путей сопряжения экзоэлектрогенеза и биodeградации.

Недавно описанная в статье [49] возможность использования представителями *Shewanella* медиаторов на основе феназинов, синтезируемых псевдомонадами, для двунаправленного переноса заряда через системы цитохромов Mtr/Oms (исходно предполагавшиеся как часть механизма исключительно внеклеточного переноса) демонстрирует одно из возможных объяснений разнонаправленного эффекта воздействия приложенной разности потенциалов разных знаков.

Сохранение влияния на обесцвечивание трифенилметанового красителя кристаллического фиолетового смешанной культурой донных отложений в условиях низкого окислительно-восстановительного потенциала анаэробной анодной камеры БЭС посредством изменения полярности подключения к электродам внешнего источника тока и напряжения, демонстрирует возможность использования подобного подхода в условиях внешней среды. Изменение скорости обесцвечивания от 2.07 до 3.23 мкМ/ч путем подключения ионистора в прямой или противоположной естественному значению полярности биоэлектрохимической системы, показывает не только сохранение эффекта в случае смешанной микробной культуры, но и его усиление

по сравнению с чистой культурой *S. oneidensis* MR-1. Это может быть связано с более широкими катаболическими возможностями природного микробного сообщества, обладающего широкими возможностями сопряжения деградации ксенобиотика с электрохимическими процессами на подвергаемых внешней электрической стимуляции электродах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00401, <https://rscf.ru/project/22-24-00401/>.

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

- Logan B.E., Regan J.M. // TRENDS Microbiol. 2006. V. 14. № 12. P. 512–518.
- Lan J., Wen F., Ren Y., Liu G., Jiang Y., Wang Z., Zhu X. // Environ. Sci. Technol. 2023. V. 16. P. 100278. <https://doi.org/10.1016/j.eset.2023.100278>
- Mohanakrishna G., Al-Raoush R.I., Abu-Reesh I.M. // Biotechnol. Rep. 2020. V. 27. P. e00478. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00478>
- Wang H., Xing L., Zhang H., Gui C., Jin S., Lin H., Li Q., Cheng C. // Chem. Eng. J. 2021. V. 419. P. 129600. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129600>
- Kondaveeti S., Govindarajan D., Mohanakrishna G., Thatikayala D., Abu-Reesh I.M., Min B. et al. // Fuel. 2023. V. 331. P. 125632. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.125632>
- Cabrera J., Irfan M., Dai Y., Zhang P., Zong Y., Liu X. // Chemosphere. 2021. V. 285. P. 131428. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131428>
- Tanikkul P., Pisutpaisal N. // Int. J. Hydrog. Energy. 2018. V. 43. № 1. P. 483–489.
- Corbella C., Hartl M., Fernandez-Gatell M., Puigagut J. // Sci. Total Environ. 2019. V. 660. P. 218–226.
- Do M.H., Ngo H.H., Guo W., Chang S.W., Nguyen D.D., Sharma P., et al. // Sci. Total Environ. 2021. V. 795. P. 148755. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148755>
- Guo F., Liu Y., Liu H. // Sci. Total Environ. 2021. V. 753. P. 142244. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142244>
- Askari A., Vahabzadeh F., Mardanpour M.M. // J. Clean. Prod. 2021. V. 294. P. 126349. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126349>
- Gao Y., Cai T., Yin J., Li H., Liu X., Lu X., et al. // Bioresour. Technol. 2023. V. 376. P. 128835. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128835>
- Karyakin A.A. // Bioelectrochemistry. 2012. V. 88. P. 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128835>
- Patil S.A., Gildemyn S., Pant D., Zengler K., Logan B.E., Rabaey K. // Biotechnol. Adv. 2015. V. 33. № 6. P. 736–744.
- Kiely P.D., Regan J.M., Logan B.E. // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. V. 22. № 3. P. 378–385.
- Ножневникова А.Н., Русскова Ю.И., Литтм Ю.В., Паршина С.Н., Журавлева Е.А., Никитина А.А. // Микробиология. 2020. Т. 89 № 2. С. 131–151.
- Voeikova T.A., Emel'yanova L.K., Novikova L.M., Shakulov R.S., Sidoruk K.V., Smirnov I.A. et al. // Microbiology. 2013. V. 82. № 4. P. 410–414.
- Marzocchi U., Palma E., Rossetti S., Aulenta F., Scota A. // Water Res. 2020. V. 173. P. 115520. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115520>
- Obileke K.C., Onyeaka H., Meyer E.L., Nwokolo N. // Electrochem. Commun. V. 125. 2021. P. 107003. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2021.107003>
- Wang X., Wan G., Shi L., Gao X., Zhang X., Li X. et al. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2019. V. 26. P. 31449–31462.
- Самков А.А., Чугунова Ю.А., Круглова М.Н., Моисеева Е.В., Волченко Н.Н., Худокормов А.А. и др. // Прикл. биохимия и микробиол. 2023. Т. 59. № 2. С. 191–199.
- Zhang Y., Ren J., Wang Q., Wang S., Li S., Li H. // Biochem. Eng. J. 2021. V. 168. P. 107930. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.107930>
- Chen C.-H., Chang C.-F., Ho C.-H., Tsai T.-L., Liu S.-M. // Chemosphere. 2008 V. 7. P. 1712–1720.
- Хмелевцова Л.Е., Сазыкин И.С., Ажогина Т.Н., Сазыкина М.А. // Прикл. биохимия и микробиол. 2020. Т. 56. № 4. С. 327–335.
- Hong Y., Guo J., Xu Z., Mo C., Xu M., Sun G. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 75. P. 647–654.
- Xiao X., Xu C.-C., Wu Y.-M., Cai P.-J., Li W.-W., Du D.-L. et al. // Bioresour. Technol. 2012. V. 110. P. 86–90.
- Lizárraga W.C., Mormontoy C.G., Calla H., Castaneda M., Taira M., Garcia R. et al. // Biotechnol. Rep. 2022. V. 33. P. e00704. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00704>
- Cordas C.M., Nguyen G.-S., Valerio G.N., Jonsson M., Sollner K., Aune I.H. et al. // J. Inorg. Biochem. 2022. V. 226. P. 111651. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111651>
- Tucci M., Viggi C.C., Núñez A.E., Schievano A., Rabaey K., Aulenta F. // Chem. Eng. J. 2021. V. 419. P. 130008. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130008>
- Фалина И.В., Самков А.А., Волченко Н.Н. // Наука Кубани. 2017. № 2. С. 4–11.
- Berezina N.P., Timofeev S.V., Kononenko N.A. // J. Membr. Sci. 2002. V. 209. P. 509–518.
- Jadhav G.S., Ghangrekar M.M. // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. P. 717–723.

33. Tian J.-H., Pourcher A.-M., Klingelschmitt F., Le Roux S., Peu P. // J. Microbiol. Methods. 2016. V. 130. P. 148–153.
34. Yuan J.S., Reed A., Chen F., Stewart C.N., Jr. // BMC Bioinform. 2006. V. 7. P. 85.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85>
35. Satta E., Nanni I.M., Contaldo N., Collina M., Poveda J.B., Ramírez A.S. et al. // Molecular and Cellular Probes. 2017. V. 35. P. 1–7.
36. Heidelberg J.F., Paulsen I.T., Nelson K.E., Gaidos E.J., Nelson W.C., Read T.D. et al. // Nat. Biotechnol. 2002. V. 20. P. 1118–1123.
37. Yoshida T., Sugano Y. // Biochem. Biophys. Rep. 2023. V. 33. P. 101401.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101401>
38. Gonzalez-García J., Bonete P., Exposito E., Montiel V., Aldaza A., Torregrosa-Macia R. // J. Mater. Chem. 1999. № 9. P. 419–426.
39. Guo Y., Zong J., Gao A., Yu N. // Int. J. Electrochem. Sci. 2022. V. 17. Article Number: 220527.
<https://doi.org/10.20964/2022.05.47>
40. Singh R., Eltis L.D. // Arch. Biochem. Biophys. 2015. V. 574. P. 56–65.
41. Lončar N., Colpa D.I., Fraaije M.W. // Tetrahedron. 2016. V. 72. P. 7276–7281.
42. Chhabra M., Mishra S., Sreekrishnan T.R. // J. Biotechnol. 2009. V. 143. P. 69–78.
43. Parshetti G.K., Parshetti S.G., Telke A.A., Kalyani D.C., Doong R.A., Govindwar S.P. // J. Environ. Sci. (China). 2011. V. 23. № 8. P. 1384–1393.
44. Yang J., Zhang Y., Wang S., Li S., Wang Y., Wang S. et al. // J. Biosci. Bioeng. 2020. V. 130. № 4. P. 347–351.
45. Kalyani D.C., Patil P.S., Jadhav J.P., Govindwar S.P. // Bioresour. Technol. 2008. V. 99. P. 4635–4641.
46. Li B.-B., Cheng Y.-Y., Fan Y.-Y., Liu D.-F., Fang C.-Y., Wu C. et al. // Sci. Total Environ. 2018. V. 637–638. P. 926–933.
47. Li C., Luo M., Zhou S., He H., Cao J., Luo J., et al. // Int. J. Hydrog. Energy. 2020. V. 45. № 53. P. 29417–29429.
48. Liu J., Fan L., Yin W., Zhang S., Su X., Lin H., et al. // J. Environ. Manage. 2023. V. 347. P. 119073.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119073>
49. Yu Y.-Y., Zhang Y., Peng L. // Sci. Total Environ. 2022. V. 838. № 3. P. 156501.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156501>

Decolorization of Crystal Violet by Mixed Culture under the Influence of Bioelectrochemical Stimulation

A.A. Samkov^a, E.V. Pankratova^{a, b}, M.N. Kruglova^a, A.V. Besspalov^a, S.M. Samkova^a,
N.N. Volchenko^a, and A.A. Khudokormov^a

^a Kuban State University, Krasnodar, 350040 Russia

^b University of Science and Technology “Sirius”, Krasnodar region, 354340 Russia

*e-mail: andreysamkov@mail.ru

A significant variation in the relative representation of copies of bacterial genes of dye-decolorizing DyP peroxidases typical for the genus *Shewanella* and a number of other microorganisms was found in the bottom sediments of freshwater reservoirs. It was found that the specific rate of decolorization of crystal violet in a laboratory bioelectrochemical system by a mixed culture of bottom sediments, which showed the highest representation of DyP genes, depended on the method of electrical stimulation of the external circuit and the concentration of the dye. After an increase in the concentration of more than 20 microns, the maximum speed was achieved in the presence of an ionistor polarly connected to the external electrical circuit of the bioelectrochemical system and amounted to $3.23 \pm 0.11 \mu\text{M/h}$, while with the opposite polarity connection, a minimum value of $2.07 \pm 0.08 \mu\text{M/h}$ was observed. In the case of an open circuit and a resistor, similar indicators occurred – 2.88 ± 0.09 and $2.67 \pm 0.12 \mu\text{M/h}$, respectively. When analyzing the decolorization products, a consistent decrease in the maxima of the absorption bands of the dye was noted, indicating its more complete degradation by mixed culture. The results may be of interest for the development of methods to improve the efficiency of bioelectrochemical methods of environmental biotechnology, by electrostimulation of the external circuit.

Keywords: bioelectrochemical system, dye-decolorizing DyP peroxidase, crystal violet, triphenylmethane dye, bioelectrocatalysis, decolorization, microbial fuel cell

УДК 57.579.6

ПОЛУЧЕНИЕ АНАЛОГОВ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ ШРОТА СЕМЯН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

© 2024 г. А. В. Синельников^{1, 3, *}, Т. В. Колганова², Р. В. Уланова^{3, *}

¹Российский университет дружбы народов, Москва, 117198 Россия

²Институт биоинженерии им. К. Г. Скрыбина, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 117312 Россия

³Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Москва, 117312 Россия

*e-mail: sinelnikov11@ya.ru

Поступила в редакцию 07.09.2023 г.

После доработки 24.10.2023 г.

Принята к печати 15.12.2023 г.

Разработан способ получения аналогов кисломолочных напитков из шрота тыквенных семян — массового отхода масличного производства — с использованием новых штаммов молочнокислых бактерий (МКБ), выделенных из разных образцов кумыса. По результатам скрининга 50 изолятов МКБ, способных сквашивать молоко и водные экстракты шрота в широком диапазоне pH, было отобрано 3 штамма с наилучшими ростовыми характеристиками. Эти штаммы были идентифицированы как представители рода *Lactocaseibacillus*, наиболее близкие к *L. rhamnosus* и *L. casei* (со сходством в 99.93% и 99.65% по последовательностям гена 16S рРНК). Подобрана оптимальная схема получения напитков, включающая: измельчение шрота, оптимизированную экстракцию щелочными растворами, термическую обработку экстракта для удаления посторонней микрофлоры, внесение инокулята (3–5% об./об.) новых штаммов МКБ, сквашивание при 37°C в течение 10 ч. По сравнению с кисломолочным продуктом, полученным при сквашивании молока этими же МКБ, напиток из экстрактов шрота отличался отсутствием лактозы и холестерина, повышенным содержанием ненасыщенных жирных кислот (в 2.3 раза), белка (в 1.7 раза) и наличием незаменимых аминокислот в составе белков. Таким образом, шрот тыквенных семян, пока еще неэффективно используемый, является хорошей основой для получения аналогов кисломолочных продуктов с полезными свойствами. Разработанный способ получения лактоферментированных напитков может быть адаптирован для переработки других типов шротов и жмыха.

Ключевые слова: шрот, молочнокислые бактерии, аминокислоты, жирные кислоты

DOI: 10.31857/S0555109924030088 EDN: EWMUMU

В последнее время существенно возрос интерес к получению растительных аналогов молока и кисломолочных продуктов на их основе в связи с высоким содержанием белка и ненасыщенных жирных кислот и отсутствием лактозы и холестерина, что привлекательно для определенных групп населения [1, 2]. Источниками аналогов молока и получаемых из него ферментированных продуктов являются ценные для пищевых производств семена масличных культур, орехи, бобы [3–5]. Основные стадии получения аналогов молока включают измельчение растительного сырья, экстракцию водными растворами, удаление крупных частиц [6–8].

Растительные экстракты с хорошим содержанием белка, витаминов, минеральных компонентов и микроэлементов — подходящие субстраты для сквашивания монокультурами или

консорциумами молочнокислых бактерий (МКБ) родов: *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*); *Lactocaseibacillus* (*L. casei*) и *Levilactobacillus* (*L. brevis*), *Streptococcus* (*Str. salivarius*) и получения ферментированных напитков [9, 10]. Их свойства определяются множеством параметров, в том числе, составом исходного растительного сырья, его предварительной подготовкой и самими микроорганизмами — агентами сквашивания.

Общим и существенным ограничением для массового получения новых ферментированных напитков становится ценность цельных семян для пищевой и перерабатывающей промышленности, поэтому актуален поиск доступного и подходящего сырья. Таким исходным сырьем может быть шрот тыквенных семян (pumpkin seed meal) с относительно

богатым составом, высоким содержанием белка и ненасыщенных жирных кислот и других компонентов [11], который используется, в основном, в качестве кормовой добавки для сельскохозяйственных животных [12]. Судя по оценкам ежегодного урожая тыквы в десятки миллионов тонн [12] и растущему мировому производству тыквенного масла, шрот, получаемый при его производстве, является массовым отходом. Однако к настоящему времени не описаны исследования по получению аналогов кисломолочных продуктов непосредственно из экстракта шрота тыквенных семян.

Данная работа была направлена на выделение и подбор штаммов молочнокислых бактерий — наиболее эффективных агентов сквашивания экстракта, поскольку применяемые культуры МКБ не обязательно адаптированы к новым субстратам, что было показано ранее [13, 14]. Среди источников выделения потенциально ценных штаммов представляет интерес кумыс — национальный напиток в регионах Азии, с высоким титром бактерий и дрожжей (5×10^7 КОЕ/мл и $1-2 \times 10^7$ КОЕ/мл) [15], а также широким разнообразием МКБ, зависящим от места происхождения и способа приготовления [16, 17].

Цель работы — выделение новых штаммов молочнокислых бактерий из кумыса и использование их для ферментации экстракта шрота тыквенных семян, подбор оптимальной схемы получения лактоферментированного напитка и его характеристика.

МЕТОДИКА

В качестве исходного объекта для выделения МКБ было отобрано 7 образцов кумыса, произведенного в летний период в Башкирии (Россия). Образцы шрота семян тыквы урожая 2020 г. были предоставлены предприятием “Маслодел”, Россия.

Аликвоты кумыса разводили в серии десятикратных разведений в стерильной воде и высевали на плотную питательную среду MRS (“Merck KGaA”, Германия) с pH 5.7 или сусло-агар. Чашки с посевами инкубировали при 37°C в течение 2 сут.

Принадлежность выросших и пересеваемых колоний к молочнокислым бактериям определяли по тесту на сквашивание стерильного обезжиренного молока. Рабочие культуры МКБ, выращенные в жидкой среде MRS, хранили при 4°C. Численность жизнеспособных клеток МКБ оценивали по титрам колониеобразующих единиц (КОЕ) после высевов на чашках с MRS-агаром и инкубации при 37°C в течение 48 ч. Наиболее ценные для использования при производстве кисломолочных продуктов штаммы были депонированы в ЦКП “Коллекция уникальных и экстремофильных микроорганизмов различных физиологических групп биотехнологического назначения” (UNIQEM) ФИЦ Биотехнологии РАН под регистрационными

номерами UQM 41618, UQM 41619, UQM 41620 и хранятся в криоконсервированном виде.

Морфологию клеток выделенных изолятов МКБ изучали при просмотрах препаратов под микроскопом Axioplan (“Carl Zeiss”, Германия). Резистентность к различным значениям pH оценивали по результатам роста на стандартно применяемой MRS и других жидких средах (молоке, слабощелочных белковых экстрактах). Кислотность измеряли с использованием pH-метра 150 МИ (ООО “Измерительная техника”, Россия).

Выделенные штаммы идентифицировали по результатам анализа нуклеотидной последовательности фрагментов гена 16S рРНК, выполненного в ЦКП “Биоинженерия” ФИЦ Биотехнологии РАН в соответствии с ранее описанными методиками [18].

Схема подготовки сырья для сквашивания включала: измельчение шрота тыквенных семян до муки на лабораторной мельнице Stegler LM-1000, экстракцию компонентов щелочными растворами pH от 6.2 до 9.0, при нагревании до 90°C (30 мин) с перемешиванием, удаление нерастворимых частиц фильтрованием. Для оптимальной экстракции были подобраны соотношения экстрагента и муки. Для удаления посторонней микрофлоры полученные экстракты подвергали термообработке при 0.5 атм 30 мин и затем охлаждали до 37°C.

Экстракты шрота семян инокулировали новыми штаммами из кумыса и штаммами *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *Streptococcus* sp. из коллекции лаборатории выживаемости микроорганизмов Института микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН. Культуры для инокуляции выращивали на стерильном обезжиренном молоке в течение 7–24 ч при 37°C и вносили в среду в соотношении 0.3–0.5% (об./об.) до достижения начального титра клеток 10^4 КОЕ/мл. В контрольных экспериментах вместо экстракта из шрота использовали обычное стерильное молоко. Сквашивание экстрактов и молока осуществляли в статических условиях (без перемешивания) при 37°C в течение 7–24 ч.

Массу сухих веществ в образцах, полученных при сквашивании экстракта из шрота, цельного молока, а также муки тыквенных семян, определяли гравиметрически с высушиванием при 105°C до постоянного веса. Общее содержание белка определяли методом Лоури или по сумме аминокислот. Содержание лактозы определяли методом, основанным на ферментативном гидролизе и колориметрическом определении продуктов его расщепления [19]. Содержание пищевых волокон (г/100 г) определяли гравиметрическим методом после их осаждения в этаноле и высушивании [20].

Образцы продуктов сквашивания для последующего анализа высушивали на лиофильной установке FreeZone (“Labconco”, США) на базе ЦКП

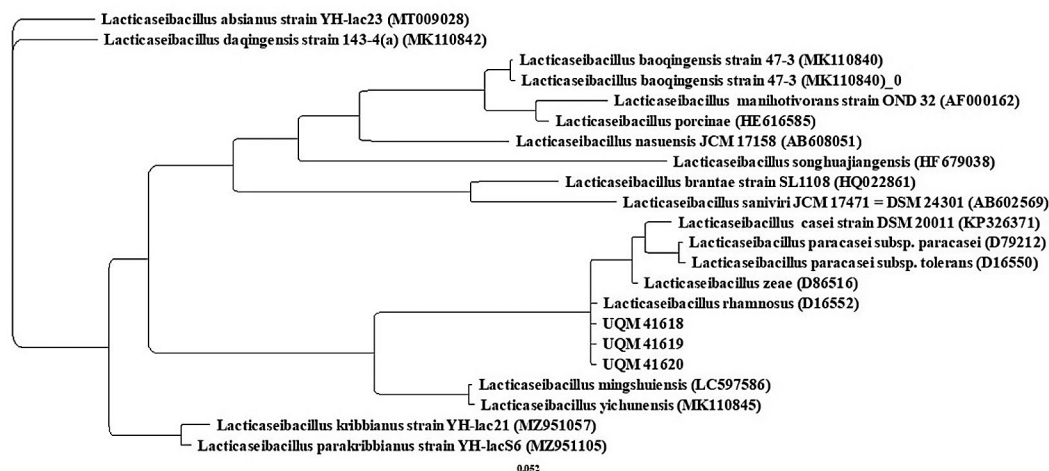


Рис. 1. Результаты идентификации штаммов по последовательностям фрагмента гена 16S рНК.

“Коллекция UNIQEM” в вакууме при -80°C . Аминокислотный состав определяли с использованием жидкостного хроматографа фирмы “Hitachi” (Япония) в стандартном режиме анализа белковых гидролизатов с сульфированным сополимером стирола с дивинилбензолом и ступенчатым градиентом натрий-цитратного буферного раствора с возрастающим значением pH и молярности. Липиды из лиофилизированных образцов экстрагировали смесью хлороформ: солянокислый метанол (2: 1) (Methanolic-HCl 0.5, н “Supelco”, Германия), по методу Фолча. Жирнокислотный состав липидов исследовали на хроматографе с масс-детектором Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra (“Shimadzu”, Япония). Исследования аминокислотного состава и профиля жирных кислот осуществляли на базе ЦКП “Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН и НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ. Базовые эксперименты проводили в трехкратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам посевов 7 образцов башкирского кумыса на MRS и сусло-агар установлено его высокая общая обсемененность бактериями $(5.0 \pm 0.7) \times 10^8$ КОЕ/мл и дрожжами $(1.5 \pm 0.7) \times 10^7$ КОЕ/мл, что соответствовало показателям численности микроорганизмов в кумысе из других регионов [15]. Доля МКБ в исследуемом кумысе варьировала от 46 до 68%, а средняя численность — от 2.3×10^8 КОЕ/мл до 3.4×10^8 КОЕ/мл, что выявлено по тесту на сбраживание стерильного молока. Путем многократных (3–5 раз) пассажей на MRS-агаре было отобрано 50 чистых изолятов МКБ, которые инокулировали в стерильное молоко и адаптировали к новому субстрату — экстракту из шрота тыквенных семян. Все выделенные из кумыса изоляты были способны сквашивать

экстракты с разной скоростью при 37°C в течение 7–24 ч. По наилучшим показателям скорости роста и органолептическим свойствам полученных продуктов было отобрано три новых штамма, которые депонированы в коллекцию UNIQEM под номерами UQM 41618, UQM 41619, UQM 41620.

Отобранные МКБ были представлены палочковидными неспорообразующими неподвижными одиночными или собранными в цепочки клетками и росли при $27\text{--}37^{\circ}\text{C}$ с образованием белого осадка в жидких средах. По результатам молекулярно-генетической идентификации путем анализа фрагмента гена 16S рНК была установлена принадлежность штаммов к роду *Lactobacillus*, недавно выведенному из р. *Lactobacillus* и валидно описанному [21]. Штаммы оказались наиболее близкими к *L. rhamnosus* и *L. casei*, судя по показателям сходства их последовательностей на 99.93 и 99.65% с известными депонированными последовательностями NR_113332.1 и NR_041893.1 соответственно. По результатам филогенетического анализа установлено высокое родство штаммов UQM 41618, UQM 41619 и UQM 41620 между собой и с типовым штаммом *Lactobacillus rhamnosus* (рис. 1). Важной особенностью выделенных штаммов *Lactobacillus* была толерантность к изменениям pH среды с верхним пределом до 9.5. Оптимальный диапазон pH для роста лактобацилл находится в пределах 5.5–6.2 [22], толерантность к повышению щелочности среды известна, а верхний предел pH варьировал у разных видов *Lactobacillus* и даже штаммов [23]. Таким образом, из кумыса были выделены новые изоляты молочнокислых бактерий, потенциал использования которых рассмотрен ниже.

По эффективности сквашивания шрота тыквенных семян новыми штаммами МКБ, а также другими заквасками, установлена необходимость оптимизации первичных стадий получения аналогов молока. Использование в качестве экстрагента воды

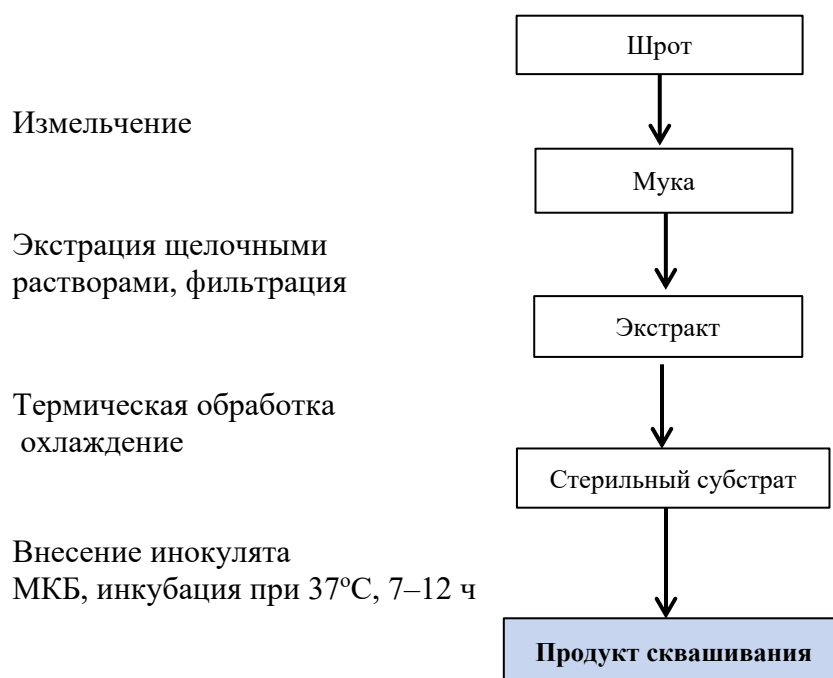


Рис. 2. Базовая схема получения лактоферментированного напитка на основе шрота тыквенных семян. Разработанные модификации выделены жирным шрифтом.

с близким к нейтральному значению рН, достаточное для получения аналогов молока из цельных семян или орехов [1, 24], оказалось неэффективным для тыквенного шрота: водные экстракты не сквашивались МКБ, что, по-видимому, объяснялось низким выходом белка. Использование щелочной экстракции, как в работах по получению аналогов молока из семян люпина [25], оказалось более эффективным для тыквенного шрота только после подбора оптимальных условий. Так, подщелачивание суспензии муки шрота с исходного значения рН 6.2 до рН 7.5 улучшало сквашиваемость; однако образующийся продукт обладал неудовлетворительными органолептическими признаками. Повышение рН экстрагируемой смеси до 9.0 обеспечивало получение субстрата, эффективно сквашиваемого при 37°C в течение 10 ч новыми штаммами МКБ из кумыса с образованием продукта однородной и плотной консистенции с кисломолочным вкусом и запахом. Использование других штаммов МКБ: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *Streptococcus* sp., оказалось менее эффективным: сбраживание проходило в течение 24 ч, титр МКБ не превышал 10^5 КОЕ/мл, а конечный продукт не обладал хорошими качествами. Для улучшения экстракции также были подобраны оптимальные соотношения шрот-экстрагент. Эти и остальные технологические параметры экстракции были ранее описаны в работе [26].

В связи с обсемененностью тыквенных семян бактериями и грибами, судя, например, по средним кумулятивным данным $\sim 1.4 \times 10^5$ КОЕ/г [27], в схему подготовки субстрата для сквашивания

была включена стадия термической обработки, без которой происходила порча конечного продукта. Установлено, что режимы термической обработки при 80–85, 90–95°C в течение 10 мин были недостаточными для уничтожения посторонней микрофлоры; необходимым был более длительный (30 мин) прогрев при 115°C. Таким образом, была подобрана оптимальная схема получения экстракта из тыквенного шрота для эффективного сквашивания, основные элементы которой с учетом модификаций приведены на рис. 2.

Важным свойством, определившим выбор этого исходного сырья для подготовки пригодного субстрата, было высокое содержание (около 30%) общего белка (рис. 3). По данным, полученным методом Лоури, степень экстракции белка из муки шрота в подобранных оптимальных условиях соответствовала 50%, и его содержание было достаточным для развития МКБ. Штаммы *Lacticaseibacillus* sp. UQM 41618, UQM 41619 и UQM 41620 эффективно сквашивали экстракт семян тыквенного шрота: численность МКБ возрастала с 10^4 КОЕ/мл с момента инокуляции до 10^8 КОЕ/мл после 10 ч инкубации при 37°C в стационарных условиях. Во время роста происходило подкисление среды с 8.5–9.5 до нейтральных рН. Важно отметить, что численность жизнеспособных молочнокислых бактерий в сквашенном продукте сохранялась на стабильном уровне (10^8 КОЕ/мл) при хранении в течение 1 месяца при 4°C. В образующихся продуктах сквашивания происходило увеличение доли водорастворимых

Таблица 1. Аминокислотный состав белка и жирнокислотный состав липидов муки из шрота тыквенных семян, продукта сквашивания экстрактов шрота и стерилизованного молока выделенными штаммами МКБ (г/100 г)

Компоненты	Мука шрота	Продукт из экстракта шрота	Продукт из молока
Аминокислоты			
Аспарагиновая кислота	2.96	3.8847	1.997
Треонин*	0.998	1.2066	0.371
Серин	1.673	2.5253	0.186
Глицин	6.188	8.9396	5.512
Пролин	1.316	1.609	2.549
Глутаминовая кислота	1.843	2.5498	0.557
Аланин	1.485	2.3934	0.908
Цистеин	0.332	0.2332	0.243
Валин*	1.579	2.1538	1.762
Метионин*	0.603	0.5759	0.66
Изолейцин*	1.281	1.4658	1.592
Лейцин*	2.419	3.0945	2.578
Тирозин	1.093	1.6608	1.271
Фенилаланин*	1.733	2.0485	1.271
Лизин*	1.236	1.5921	2.087
Гистидин	0.78	0.9823	0.714
Аргинин	5.353	6.8827	0.953
Насыщенные жирные кислоты			
Капроновая кислота	0.0	0.0	2.5
Каприловая кислота	0.0	0.0	1.6
Каприновая кислота	0.0	0.0	3.2
Масляная кислота	0.0	0.0	4.7
Миристиновая кислота	0.18	0.24	10.28
Пальмитиновая кислота	17.20	17.50	30.3
Стеариновая кислота	9.05	7.92	13.5
Маргариновая кислота	0.18	0.17	0.0
Ненасыщенные жирные кислоты			
Линолевая кислота*	40.53	53.04	3.5
Олеиновая кислота	30.78	19.54	25.5
Пальмитолеиновая кислота	0.21	0.17	1.5
Петрозелиновая кислота	1.87	1.42	0.0

* Незаменимые компоненты.

белков в 1.7 раза и снижение в 1.3 доли щелочерастворимых белков. Кроме того повышалась доля незаменимых аминокислот и ценных ненасыщенных жирных кислот (ННЖК) по сравнению с исходным шротом семян (табл. 1, рис. 3). Таким образом, экстракт из шрота тыквенных семян может быть подходящим субстратом для сквашивания новыми отобранными штаммами МКБ. Из анализа работ по получению кисломолочных продуктов из

растительного сырья, тыквенный шрот пока использовали лишь в качестве компонента смеси с верблюжьим молоком [28].

Выявлены следующие преимущества нового сквашенного продукта на основе тыквенного шрота по сравнению с кисломолочным продуктом, полученным с использованием тех же штаммов МКБ. Новый продукт характеризовался повышенным содержанием белка (в 1.7 раз)

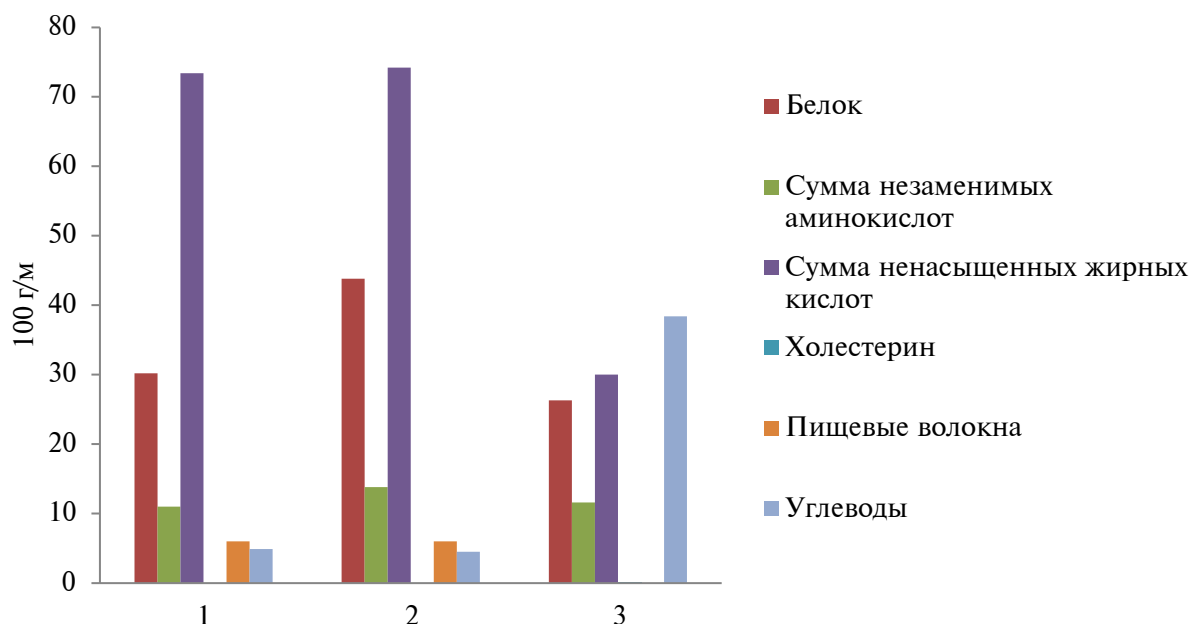


Рис. 3. Состав шрота семян тыквы (1), продукта сквашивания шрота тыквенных семян (2) и кисломолочного продукта (3).

и ценных пищевых компонентов, особенно ряда незаменимых аминокислот и полиненасыщенной линолевой кислоты.

Другими важными свойствами нового продукта было высокое соотношение ННЖК/НЖК, отсутствие лактозы и холестерина (что неудивительно с учетом состава исходного сырья), наличие пищевых волокон (рис. 3, табл. 1) и хорошие вкусовые качества. Результаты проведенных анализов общего состава шрота тыквенных семян и суммарного содержания полиненасыщенных жирных кислот (рис. 3, табл. 1) соответствуют литературным данным [29]. По вышеперечисленным свойствам полученный лактоферментированный напиток может быть привлекателен для определенных групп населения. Таким образом, на примере шрота тыквенных семян разработан оригинальный подход к валоризации массового пищевого отхода маслоэкстракционной промышленности и разработана простая и эффективная схема получения экстракта, пригодного для сквашивания, и получения аналогов кисломолочных продуктов с полезными свойствами. Полученные результаты свидетельствуют о высоком адаптационном потенциале новых штаммов лактобацилл к новым ростовым условиям и флуктуациям pH и способности сохранять выживаемость при хранении.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Госзадания 122040800164-6 ФИЦ Биотехнологии РАН и Соглашения № 075-15-2021-1051.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ.

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Silva A.R., Silva M.M., Ribeiro B.D. // Food Res. Intern. 2020. V. 131. № 1. P. 108972. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108972>
2. Vanga S.K., Raghavan V. // J. Food Sci. Technol. 2018. V. 55. № 1. P. 10–20.
3. Kundu P., Dhankhar J., Sharma A. // Curr. Res. Nutr. Food Sci. J. 2018. V. 6. № 1. P. 203–210.
4. Mortas M., Besir A., Tok Z., Keles M., Yazici F. // Plant Foods for Human Nutr. 2023. V. 78. P. 358–365.
5. Bastioğlu A.Z., Tomruk D., Koç M., Ertekin F.K. // J. Food Sci. Technol. 2016. V. 53. № 5. P. 2396–2404.
6. Mäkinen O.E., Wanhalinna V., Zannini E., Arendt E.K. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2016. V. 56. № 3. P. 339–349.
7. Ma W., Zhang C., Kong X., Li X., Chen Y., Hua Y. // Food Biosci. 2021. V. 44. Part A. P. 101416. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101416>
8. Ahmadian-Kouchaksaraei Z., Mohammad M.V., Varidi J., Pourazarang H. // LWT – Food Sci. Technol. 2014. V. 57. № 1. P. 299–305.
9. Hickisch A., Beer R., Vogel R.F., Toelstede S. // Food Res. Internat.. 2016. V. 84. P. 180–188.
10. Garro M.S., de Valdez G.F., de Giori G.S. // Food Microbiol.. 2004. V. 21. № 5. P. 511–518.

11. Vlaicu P.A., Panaite T.D. // *Anim. Biosci.* 2022. V. 35. № 2. P. 236–246.
12. Valdez-Arjona L.P., Ramírez-Mella M. // *Animals* (Basel). 2019. V. 9. № 10. P. 769.
<https://doi.org/10.3390/ani9100769>
13. Ulanova R., Kravchenko I. // *Internat. J. Engin. Sci. Innov. Technol.* 2013. V. 2. № 6. P. 618–624.
14. Уланова Р.В., Кравченко И.К., Горелова О.П., Николаева О.С. Патент на изобретение 2015. RU2557404.
15. Afzaal M., Saeed F., Anjum F., Waris N., Husaain M., Ikram A. et al. // *Food Sci. Nutr.* 2021. V. 9. № 11. P. 6421–6428.
16. Tang H., Ma H., Hou Q., Li W., Xu H., Liu W., Menghe B. // *BMC Microbiol.* 2020. V. 20. № 1. P. 1–11.
17. Meng Y., Chen X., Sun Z., Li Y., Chen D., Fang S., Chen J. // *LWT.* 2021. V. 135. P. 110049.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110049>
18. Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Колганова Т.В., Чербунина М.Ю., Брушков А.В., Мулюкин А.Л., Гальченко В.Ф. // *Известия РАН. Сер. биол.* 2019. № 3. С. 246–254.
19. Остроумов Л.А., Гаврилов В.Г. Биотрансформация лактозы ферментными препаратами β-галактозидазы // *Техника и технология пищевых производств.* 2013. № 1. С. 26–30.
20. McCleary B.V. // *Journal of AOAC International.* 2019. V. 102. № 1. С. 196–207.
21. Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M., Harris H.M., Mattarelli P. et al. // *Int. J. Syst. Evol. Microbol.* V. 70. № 4. P. 2782–2858.
22. Ślizewska K., Chlebicz-Wójcik A. // *Biology* (Basel). 2020. V. 9. № 12. P. 423.
<https://doi.org/10.3390/biology9120423>.
23. Sawatari Y., Yokota A. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2007 V. 73. № 12. P. 3909–3915.
24. Kluczkowski A., Lima N., Oliveira, M.K. // *J. Food Proc. Preserv.* 2017. V. 41. № 5. P. 13147.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.13147>.
25. Jiménez-Martínez C., Hernández-Sánchez H., Dávila-Ortiz G. // *J. Sci. Food and Agricult.* 2003. V. 83. № 6. P. 515–522.
26. Уланова Р.В., Николаев Ю.А., Колпакова В.В., Галуза О.А., Синельников А.В. Патент РФ 2022. № RU2784723.25.
27. Silva D., Nunes P., Melo J., Quintas C. // *AIMS Microbiol.* 2022. V. 8. № 1. P. 42–52.
28. Shahein M.R., Atwaa E.S.H., Alrashdi B.M., Ramadan M.F., Abd El-Sattar E.S., Siam A.A.H. et al. // *Fermentation.* 2022. V. 8. № 5. P. 223.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101416>
29. Vlaicu P.A., Panaite T.D. // *Animal Biosci.* 2022. V. 35. № 2. P. 236–246.

Obtaining Analogues of Fermented Milk Products from Seed Meal Using New Strains of Lactic Acid Bacteria

A. V. Sinelnikov^{a, c, *}, T. V. Kolganova^b, R. V. Ulanova^{c, *}

^aPeoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, 117198 Russia

^bScriabin Institute of Bioengineering, Federal Research Center of Biotechnology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

^cVinogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center of Biotechnology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

*e-mail: sinelnikov11@ya.ru

A method has been developed for producing analogues of fermented milk drinks from pumpkin seed meal – a massive waste of oilseed production – using new strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from different samples of kumiss. Based on the results of screening 50 LAB isolates capable of fermenting milk and aqueous meal extracts in a wide pH range, 3 strains with the best growth characteristics were selected. These strains were identified as representatives of the genus *Lacticaseibacillus*, most closely related to *L. rhamnosus* and *L. casei* (with 99.93 and 99.65% similarity in 16S rRNA gene sequences). An optimal scheme for producing drinks has been selected, including: grinding meal, optimized extraction with alkaline solutions, heat treatment of the extract to remove foreign microflora, introduction of inoculum (3–5% v/v) of new LAB strains, ripening at 37°C for 10 hours. Compared with the fermented milk product obtained by fermenting milk with the same microorganisms, the drink made from meal extracts was distinguished by the absence of lactose and cholesterol, an increased content of unsaturated fatty acids (2.3 times), protein (1.7 times) and the presence of essential amino acids in proteins. Thus, pumpkin seed meal, which is still ineffectively used, is a good basis for obtaining analogues of fermented milk products with beneficial properties. The developed method for producing lacto-fermented drinks can be adapted for processing other types of meal and cake.

Keywords: meal, lactic acid bacteria, amino acids, fatty acids

УДК 582.261.1:57.083.13

ДИАТОМОВАЯ ВОДОРΟΣЛЬ *Nanofrustulum shiloi* КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ОБЪЕКТ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

© 2024 г. А. А. Благинина^{1, *}, С. Н. Железнова^{1, 2}, Е. С. Мирошниченко¹,
Р. Г. Геворгиз^{1, 2}, Л. И. Рябушко¹

¹Федеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского” РАН,
Севастополь, 299011 Россия

²Институт теплофизики имени С.С. Кутателадзе СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия
*e-mail: aablaginina@gmail.com

Поступила в редакцию 09.10.2023 г.

После исправления 26.12.2023 г.

Принята к печати 10.01.2024 г.

В статье представлены результаты исследований интенсивной культуры нового для Черного моря вида бентопланктонной диатомовой водоросли *Nanofrustulum shiloi* (Lee, Reimer et McEnery) Round, Hallsteinsen et Paasche 1999. Подробно описаны особенности процесса выделения вида в альгологически чистую культуру, а также морфологические и таксономические признаки штамма в световом и электронном сканирующем микроскопах. Изучены продуктивность и биохимические характеристики штамма, а также способность к накоплению фукоксантина (Fx) и полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в лабораторных условиях. В экспоненциальной фазе роста удельная скорость роста культуры составляла $\mu = 0.8$ 1/сут, а максимальная продуктивность $P = 0.46$ г сухой массы/(сут л). Накопление ПНЖК в биомассе *N. shiloi* достигало 67.39 мг/г сухой массы водорослей. Концентрация Fx в биомассе в начале стационарной фазы роста составляла 10 мг/г сухой массы. Высокая скорость биосинтеза Fx в клетках микроводоросли, а также состав жирных кислот черноморского штамма позволили отнести *N. shiloi* к перспективным объектам в биотехнологии.

Ключевые слова: диатомовая водоросль *Nanofrustulum shiloi*, интенсивное культивирование, продуктивность, фукоксантин, полиненасыщенные жирные кислоты

DOI: 10.31857/S0555109924030092 EDN: EWHPFY

Микроводоросли как продуценты уникальных ценных биологически активных веществ (БАВ) занимают важное место в современной биотехнологии. На их основе разработано множество биотехнологий для использования в медицине, в пищевой и косметической промышленности, сельском хозяйстве и т.д. [1]. Немалую роль микроводоросли играют в технологиях очистки сточных вод и реабилитации водоемов [2]. Их используют в технологии утилизации CO₂, а также как сырье для биотоплива [3]. Особое место занимают микроводоросли в космических исследованиях для создания замкнутых экосистем, включающих человека [4]. Широкое их применение обусловлено чрезвычайной пластичностью метаболизма и видовым разнообразием, что дает практически неисчерпаемый источник продуцентов БАВ для разработки новых биотехнологий.

В настоящее время среди многих продуцентов биологически активных веществ большое внимание уделяется диатомовым водорослям (Bacillariophyta) [5, 6].

Диатомеи — одна из самых разнообразных в мире групп водорослей, насчитывающая не менее 100000 видов. Это одноклеточные водоросли, живущие одиночно или образующие разнообразные колонии. Отличительной особенностью диатомовых водорослей является наличие кремнистого панциря. Диатомовые вовлечены в биогеохимические циклы. Они широко распространены, а по образу жизни их разделяют на группы планктонных, бентосных и бенто-планктонных организмов. [7]. Распространение диатомовых, разнообразие условий обитания и стратегий выживания, вероятно, можно объяснить их исключительной способностью к адаптации. Это делает их привлекательными для использования в разработке новых биотехнологий.

В настоящее время среди многих продуцентов биологически активных веществ особый интерес представляют бентосные и бентопланктонные морские виды диатомовых водорослей. Многие из них способны активно расти и развиваться при пониженной освещенности и температуре [5]. Благодаря активному накоплению фукоксантина

бентосные и бентопланктонные виды способны выживать на больших глубинах (20 м и более), поглощая излучение в области 440–500 нм [5, 8]. В ходе эволюции они приобрели способность эффективно утилизировать световую энергию и CO_2 [8, 9], а также содержат высокие концентрации липидов (40–50% от сухой массы) и жирных кислот (ЖК) (40% от сухой массы) [10]. Способность диатомовых к биосинтезу в больших количествах таких активных соединений как пигменты (в частности, Fx), ПНЖК (в частности, эйкозопентаеновая и арахидоновые кислоты), органические соединения, включающие микроэлементы, стиролы, оксипилены и пр. [6, 11, 12] создают предпосылки для поиска новых видов-продуцентов среди них. Кроме этого, естественная способность бентосных и бентопланктонных фототрофов оседать на дно позволяет достаточно просто осуществлять сбор урожая. Это в значительной мере упрощает процесс и удешевляет технологию производства их биомассы в промышленных масштабах, что является привлекательным моментом при разработке новых технологий [5, 13].

Однако, несмотря на усилия многих лабораторий мира, примеров успешного использования диатомовых водорослей в биотехнологии немного, а биотехнологии получения плотных интенсивных культур и промышленные производства на их основе по-прежнему развиты слабо [14]. Современные промышленные технологии преимущественно основаны на планктонных видах, а технологии на основе бентосных и бентопланктонных видов практически отсутствуют. Отчасти это связано с тем, что клетки с удельной плотностью больше единицы оседают на дно, в результате чего возникают трудности перемешивания больших объемов культуры. Кроме того, это связано с отсутствием высокопродуктивных штаммов диатомовых водорослей и питательных сред для получения плотных культур, а также отсутствием у многих штаммов, выделенных в культуру, технологических характеристик, удешевляющих процесс и соответствующих требованиям современного производства.

При проведении скрининговых исследований бентосных сообществ черноморского побережья нами был обнаружен в перифитоне полимерных материалов и впервые описан для Черного моря [15] мелкоклеточный вид пеннатной, бесшовной диатомовой водоросли *Nanofrustulum shiloi* [16]. Вид известен как бентопланктонный космополит, который обладает широкой экологической пластичностью: способен расти в широком диапазоне температур от 7 до 25°C и солёности — от почти пресноводных до гипергалинных условий (от 1 до 50‰) [17].

Из литературных источников известно, что *N. shiloi* характеризуется высоким содержанием липидов, которое достигает 27–28% сухой биомассы

[18, 19, 20]. Доминирующими жирными кислотами в ПНЖК биомассы *N. shiloi* являются эйкозопентаеновая (ЭПК) и арахидоновая (АРК) кислоты [18, 19]. Клетки этого вида содержат уникальный для медицинских целей пигмент — фукоксантин (Fx) [21]. Результаты медико-биологических и фармакологических исследований свидетельствуют о высокой эффективности Fx в лечении и профилактике онкологических заболеваний, ожирения, сахарного диабета и заболеваний, связанных с нарушениями иммунной и сердечно-сосудистой систем [22]. Кроме этого, *N. shiloi* содержит другие сильнейшие антиоксиданты — ароматические соединения: фенолы и флавоноиды [20]. Следовательно, эти экологические, физиологические и биохимические характеристики вида могут свидетельствовать о перспективе его использования в биотехнологии.

Цель работы — получение альгологически чистой культуры диатомовой водоросли *N. shiloi* и получение интенсивной культуры для исследования химического состава биомассы и оценки биотехнологического потенциала.

МЕТОДИКА

Место исследования и отбор проб. Исследуемый вид был обнаружен в обрастании полимерных материалов в полузакрытой части Карантинной бухты Черного моря, которые размещались на вертикальном коллекторе на глубине от 1.5 до 3 м, время экспозиции с 21.08.2020 по 12.11.2020 гг. [15].

Обработка проб, микроскопирование и идентификация вида. Подготовку проб для микроскопирования диатомовой водоросли с образцов полимерных материалов проводили по стандартным альгологическим методикам [23]. Препараты с суспензией водоросли просматривали в световом микроскопе (СМ) С. Zeiss Axioskop 40 (“KarlZeiss”, Германия) при увеличении 10×40 , а также в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) Hitachi SU3500 (“Hitachi”, Япония). Для работы в СЭМ пробы обрабатывали по методике Симонсена: в суспензию диатомовых добавляли концентрированный раствор KMnO_4 , в котором выдерживали в течение 24 ч с последующим внесением HCl и нагревали смесь для очистки от солей. Затем проводили отмывку проб от кислоты путем многократного центрифугирования в дистиллированной воде с удалением супернатанта.

Выделение и получение монокультуры. Для получения смешанной накопительной культуры готовили смывы с образцов полимерных материалов. В колбы с 100 мл стерильной питательной среды F [24], приготовленной на морской фильтрованной воде, добавляли по 10 мл смыва. Инкубацию проводили стационарно при температуре $18 \pm 2^\circ\text{C}$ и естественном освещении. Через 3 дня просматривали культуру под световым микроскопом для



Рис. 1. Лабораторная установка для интенсивного культивирования диатомовой водоросли *N. shiloi*.

определения признаков роста исследуемого вида. Затем попеременно использовали методы многократного пересева и микроманипуляции с помощью пастеровских пипеток. Метод многократного пересева заключался в посеве 1 мл накопительной культуры в чашки Петри с 15–20 мл жидкой питательной среды F [24] с последующими многократными пересевами с соблюдением стерильности. Метод микроманипуляции пастеровскими пипетками: осуществляли перенос отдельных клеток вида в каплю питательной среды на специальном предметном стекле под микроскопом.

Для очистки культуры от цианобактерий, проводили посев штрихом на плотную питательную среду F. Для приготовления использовали 20 г/л агара с добавлением 2 мл гентамицина на литр питательной среды (концентрация 0.2%), с последующим пересевом отдельной колонии в жидкую питательную среду. Альгологически чистую культуру наращивали в колбах при комнатной температуре

(24°C) и естественном освещении. Альгологически чистую культуру зарегистрировали во внутренней коллекции отдела аквакультуры и морской фармакологии ФИЦ ИНБЮМ в июне 2021 г. под номером и индексом: IBSS № DIA-N.sh.-KarBay.

Интенсивное культивирование. Эксперимент проводили с альгологически чистой культурой. Инокулят объемом 200 мл (10% от рабочего объема культуры), адаптированной к условиям эксперимента культуры перенесли в плоскопараллельный фотобиореактор (рис. 1), затем добавляли питательную среду 5F, состав которой соответствовал среде F, но с увеличенной в 5 раз концентрацией компонентов (5F). Рабочий объем суспензии составлял 2 л слоем высотой 5 см. Культуру выращивали в накопительном режиме при постоянной температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$, которая поддерживалась посредством кондиционирования воздуха. Одностороннее круглосуточное освещение фотобиореактора осуществляли белыми лампами PILA LF36W/54-765-2450 lm (Philips, Польша). Средняя облученность рабочей поверхности фотобиореактора составляла 170 мкмоль квантов м/с (33 Втм²). В процессе выращивания культуру барботировали воздухом (1.1 л воздуха на 1 л культуры в мин) посредством компрессорной установки. Для увеличения растворимости атмосферного CO₂ в культуральной среде использовали насадку-диспергатор. Плотность культуры в начале накопительного культивирования составляла 0.1 г сухого вещества на 1 л.

Плотность культуры определяли ежедневно прямым взвешиванием сырой массы *N. shiloi* в полипропиленовых пробирках на аналитических весах с погрешностью 0.1 мг, после осаждения клеток центрифугированием (1600 g в течение 5 мин, при 20°C). Для пересчета полученных данных на сухую массу использовали экспериментально полученный коэффициент связи между сухой и сырой массой ($k = 0.13$). По данным изменения плотности культуры рассчитывали удельную скорость роста в экспоненциальной фазе и продуктивность в линейной фазе роста, аппроксимируя данные методом наименьших квадратов:

$$B(t) = B_0 \times e^{\mu \cdot t}, \quad (1)$$

где B_0 – плотность культуры в начальный момент времени, г/л; μ – максимальная удельная скорость роста, 1/сут; t – время культивирования, сут.

$$B(t) = B_L + P \cdot t, \quad (2)$$

где B_L – плотность культуры в начале линейного роста, г/л; P – максимальная продуктивность, г/(л сут).

Биохимический состав биомассы определяли в момент максимальной и минимальной продуктивности культуры (на 3 и 6 сут).

Fx и ПНЖК в биомассе определили на 6 сут эксперимента. Массовую долю белка в биомассе

водорослей определяли по методу Лоури. В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали кристаллический человеческий сывороточный альбумин. Для определения белка отбирали аликвоту (1 мл) из суспензии с известной концентрацией клеток и центрифугировали в течение 5 мин при 1600 g. Надосадочную жидкость удаляли, сырую массу водорослей промывали 5 мл дистиллированной воды. Гидролиз белков проводили на водяной бане при 100°C в 1 н щелочи в течение 10 мин.

Массовую долю суммарных липидов определяли фосфованилиновым методом. Для построения калибровочной кривой использовали стандартный раствор оливкового масла в хлороформе [25].

Отбирали аликвоту (10 мл) суспензии с известной концентрацией клеток и центрифугировали в течение 5 мин при 1600 g. Надосадочную жидкость удаляли. Из сырой массы водорослей экстрагировали липиды смесью Фолча, используя механический гомогенизатор с кварцевым песком. Экстракцию проводили дважды. Первую экстракцию проводили 5 мл смеси хлороформ : метанол в соотношении 1 : 1. Последующую экстракцию проводили 5 мл смеси хлороформ: метанол 2 : 1. Экстракты объединяли и трижды промывали водой в соотношении 1 : 3 для удаления нелипидных примесей. Затем аликвоту липидного экстракта сжигали в серной кислоте на водяной бане при 100°C в течение 20 мин. После добавления фосфованилинового реактива и развития окраски определяли оптическую плотность проб при длине волны 530 нм.

Массовую долю углеводов определяли по методу Дюбуа. В качестве стандарта использовали кристаллическую глюкозу. Отбирали аликвоту (1 мл) из суспензии с известной концентрацией клеток и центрифугировали в течение 5 мин при 1600 g. Надосадочную жидкость удаляли, сырую массу водорослей дважды промывали 5 мл дистиллированной воды и добавляли 2.5 мл фенольного реагента. Через 10 мин добавляли 2.5 мл сернокислотного реагента, перемешивали и выдерживали на водяной бане при 100°C в течение 5 мин. После развития окраски определяли оптическую плотность проб при длине волны 490 нм.

Массовую долю зольного остатка определяли с учетом доли воды в биомассе по разнице весов до и после сжигания навески в муфельной печи при 550 °C в течение 4 ч.

Фукоксантин в биомассе определяли методом тонкослойной хроматографии [21]. Экстракцию Fx из сырой биомассы проводили 96%-ным этиловым спиртом до полного обесцвечивания биомассы с помощью механического гомогенизатора с кварцевым песком. Из экстракта отбирали аликвоту (0.1 мл) и наносили ее на хроматографические стеклянные пластины с закрепленным силикагелем толщиной слоя 0.5 мм. Разделение каротиноидов

проводили в системе ацетон-гексан в соотношении 3 : 7. Фракцию силикагеля, содержащую Fx трижды экстрагировали этанолом до полного обесцвечивания, затем центрифугировали. Концентрацию Fx определяли по оптической плотности при длине волны 448 нм с последующим пересчетом на сухую массу водоросли по формуле:

$$F_x = \frac{10 \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot D_{448}}{E \cdot V_3 \cdot B} \quad (3),$$

где Fx — концентрация фукоксантина в биомассе, мг/г; V_1 — объем объединенного элюата с пластины, мл; V_2 — объем экстракта из навески, мл; V_3 — объем аликвоты, нанесенной на пластину, мл; D_{448} — оптическая плотность при длине волны 448 нм; B — навеска водоросли, г; $E = 1280$ мл/(мг см) — коэффициент удельной экстинкции для 1%-ного раствора Fx в этаноле [26].

Для идентификации Fx в качестве стандарта использовали кристаллический Fx, охарактеризованный ранее методами ВЭЖХ, масс- и ЯМР-спектроскопии [13].

Для определения содержания ЖК в биомассе на первом этапе экстрагировали липиды из сырой биомассы смесью Фолча. Удаляли нелипидные примеси дистиллированной водой. Затем проводили реакцию омыления. Для этого полученную хлороформную фракцию, содержащую 3–5 мг суммарных липидов упаривали на ротаторном испарителе при 25°C, к остатку добавляли 5 мл раствора щелочи в метаноле (10 мл 3 н NaOH и 90 мл 90% метанола). Полученную смесь нагревали до кипения метанола 64–65°C и кипятили с обратным холодильником до полного омыления в течение 2 ч. После остывания к раствору добавляли несколько капель 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина и трижды проводили экстракцию гексаном (по 5 мл) для удаления неомыляемых примесей. Водно-спиртовую фазу подкисляли соляной кислотой, добавляли 0.3 мл 6 н HCl, затем 3–4 раза проводили повторные экстракции по 5 мл. Гексановую фракцию упаривали досуха на ротаторном испарителе при температуре 30°C, к остатку для этерификации ЖК добавляли 5 мл 3%-ного раствора хлористого водорода в метаноле. Смесь кипятили 2 ч с обратным холодильником и после охлаждения повторно трижды экстрагировали гексаном (по 5 мл). Гексановую фракцию фильтровали, используя обеззоленный фильтр. До определения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) гексановую фракцию хранили не более 1 сут при температуре –20°C. МЭЖК определяли на газовом хроматографе Хроматэк Кристалл 5000.2 фирмы “Хроматэк” (Россия) с пламенно-ионизационным детектором (ПИД) и хромато-масс-спектрометрическим детектором (МСД) в центре коллективного пользования “Спектрометрия и хроматография”

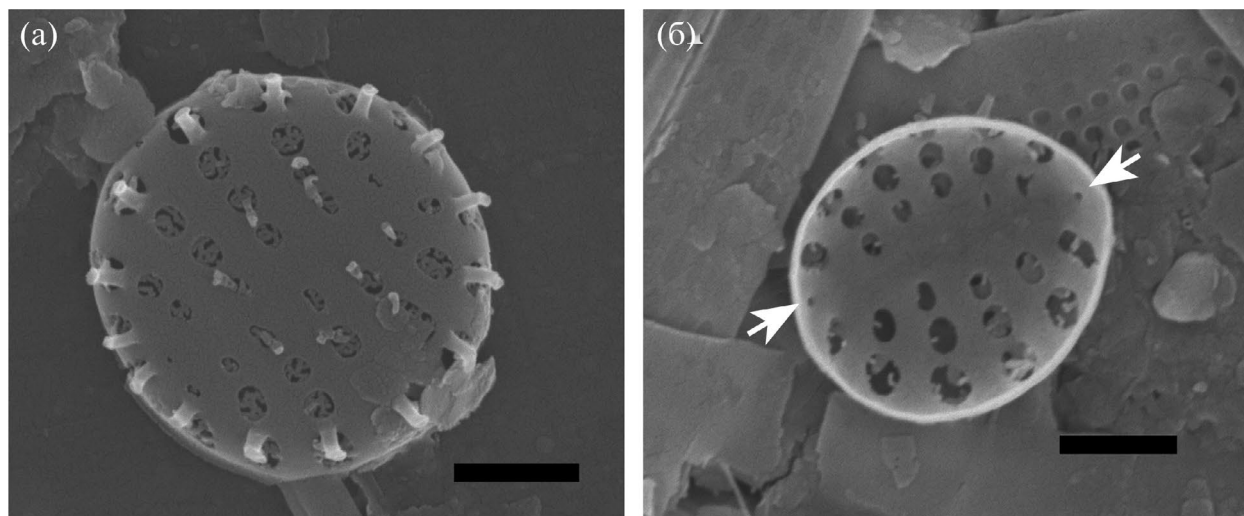


Рис. 2. Изображение в СЭМ *N. shiloi* на поверхности пластиковых субстратов: а — внешний и б — внутренний вид створок, стрелками показано по одной апикальной поре на обоих концах осевого поля. Масштаб: 1 мкм [15].

(ФИЦ ИнБЮМ им. А.О. Ковалевского РАН). Разделение МЭЖК проводили на капиллярной колонке ВРХ5 фирмы “SGE Analytical Science” (Великобритания) длиной 60 м с внутренним диаметром 0.25 мм с толщиной неподвижной фазы 0.25 мкм в температурном интервале от 40°C до 280°C в режиме программирования температуры: 1) 1 минута при 40°C; 2) подъем до 220°C со скоростью 10°C/мин (6 мин); 3) подъем до 280°C со скоростью 10°C/мин (10 мин); 4) 20 мин при 280°C, общее время анализа — 45 мин. Газ-носитель — гелий, скорость потока — 1.5 мл/мин, ввод пробы — 1 мкл пробы без деления потока, температура испарителя — 250°C.

Количественно состав ЖК определяли с использованием ПИД. В качестве внешнего стандарта использовали смесь кислот “Supelco 37 component FAME mix” фирмы “Sigma-Aldrich” (США). Анализ ЖК, которые отсутствовали в стандарте “Supelco 37 component FAME mix” проводили по хроматограмме по полному ионному току, сравнением полученных масс-спектров с библиотекой NIST 14.. Диапазон сканирования масс составлял 50–450 m/z . В качестве внутреннего стандарта использовали маргариновую кислоту [27].

Все измерения проводили в двух биологических и четырех аналитических повторностях. Статистическая достоверность результатов измерений оценивали при помощи среднеквадратического отклонения (СКО) и стандартного t -критерия ($P = 0.95$). На рисунках и в таблицах приведены средние значения и их стандартные отклонения. Для расчета доверительных интервалов использовали t -критерия Стьюдента с 95% вероятностью.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ проб перифитона трех видов пластика: полиэтилен высокого давления (**HDPE**); полистирол (**PS**); полилактид (**PLA**), экспонированных в бухте Карантинная, позволил обнаружить и идентифицировать мелкоклеточный вид бентопланктонной диатомовой водоросли *N. shiloi* (рис. 2) [15]. В природных условиях нами были отмечены только одиночные клетки *N. shiloi*, хотя известно, что вид имеет свойство образовывать колонии [16, 19, 28], что было подтверждено при выделении в культуру. Вид относится к пенатым, безшовным, клетки имеют форму цилиндра. Размеры клеток природной популяции вида варьирует в диаметре от 2.7 до 3.3 мкм при высоте 1.75–2.0 мкм (рис. 2).

Лабораторное культивирование: изолирование черноморского штамма *N. shiloi*. В процессе получения монокультуры *N. shiloi* обнаружены следующие особенности: цепочки клеток вида были тесно связаны с цианобактериями и после нескольких пересевов из накопительной культуры стабильно получали смешанную культуру из двух видов: *N. shiloi* + *Leptolyngbya* sp. (рис. 3а) или *N. shiloi* + *Stanieria* sp. (рис. 3б).

Получить чистую культуру *N. shiloi* удалось путем комбинирования 3 методов: метода многократного пересева, посева на поверхность агаризованной питательной среды и микроманипуляции с использованием пастеровских пипеток. В монокультуре все клетки схожи и объединялись в цепочки (рис. 4, 5), которые легко рвутся при барботировании.

Морфометрическая характеристика черноморского штамма в культуре. Панцирь со стороны пояса клетки *N. shiloi* прямоугольной формы (удлиненно-четыреугольный) высотой 2.6–3.2 мкм.

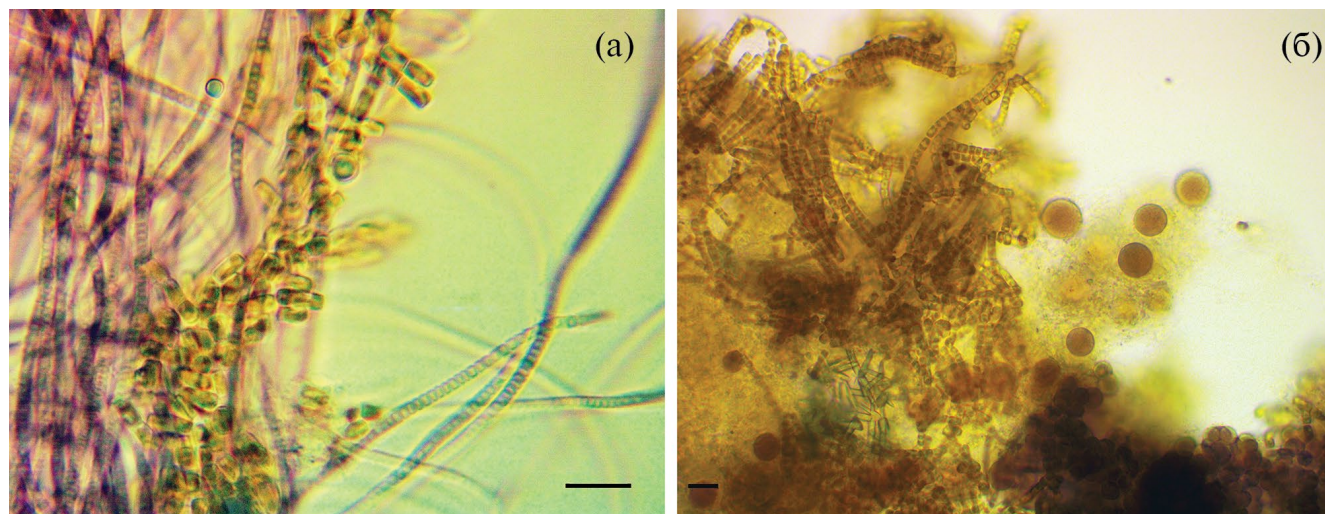


Рис. 3. Клетки *N. shiloi* в смешанных культурах с цианобактериями: *Leptolyngbya* sp. (а) и *Stanieria* sp. (б) в СМ (масштаб 10 мкм).

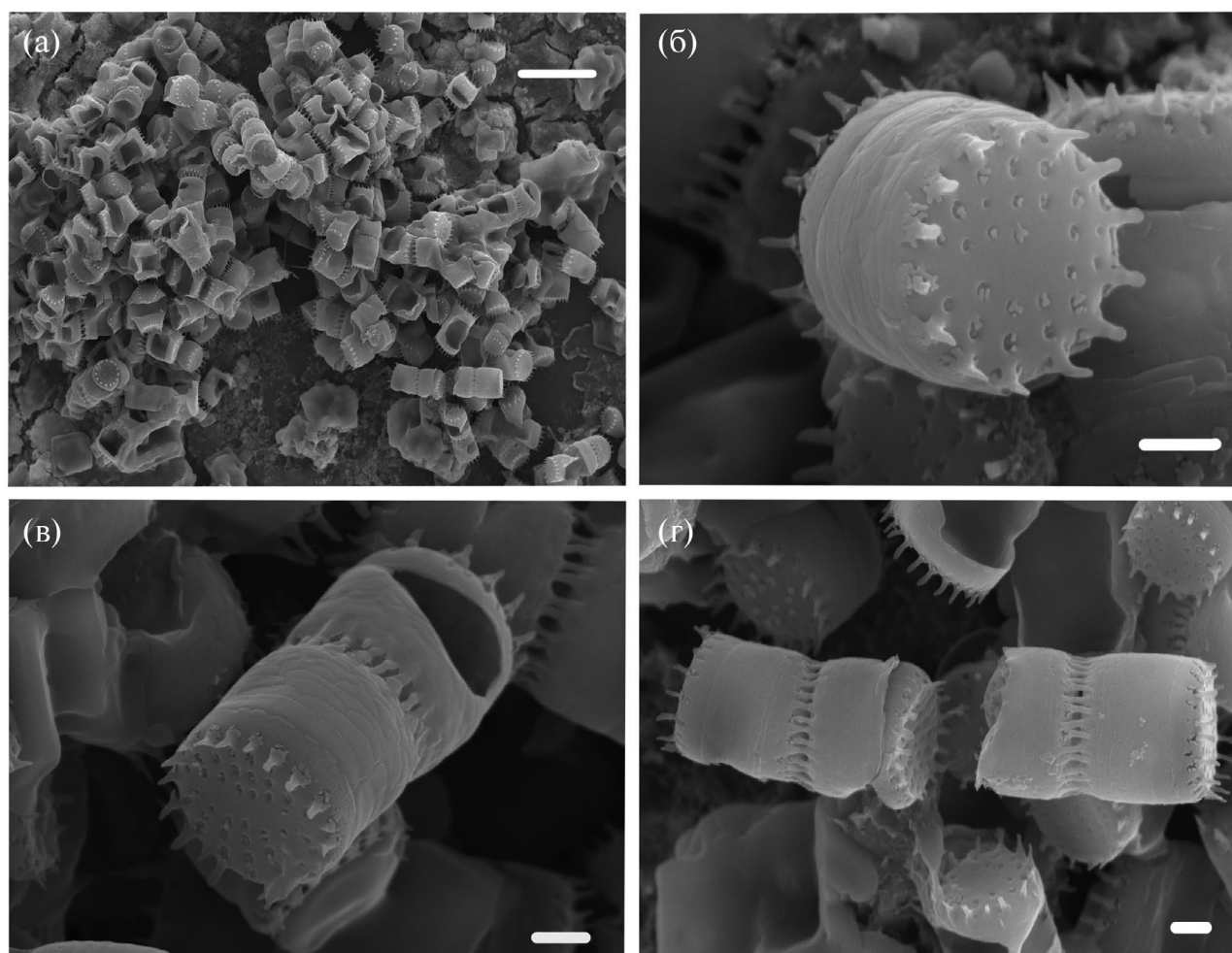


Рис. 4. Монокультура *N. shiloi*, створки в разных ракурсах в СЭМ: а — клетки в цепочках, масштаб: 10 мкм; б — одиночная клетка, в, г — клетки соединенные попарно краевыми шипами, масштаб: 1 мкм.

Створки округлые, плоские диаметром 2.8–3.6 мкм. Штрихи расположены радиально-симметрично по обе стороны от узкого осевого поля. Штрихи одно-рядные, 20–25 в 10 мкм, состоящие из нескольких крупных эллиптических ареол 30–40 в 10 мкм, которые имеют форму от округлых до прямоугольно вытянутых с закругленными концами. Ареолы на внутренней поверхности закрыты велумом и сходятся в направлении от края створки к внутренней ее части. Поверхность створки ровная или с выростами. Загиб створки глубокий, скошенный или вертикальный, с 1 или 2 ареолами под шипами. Шипы размещены краевым кольцом по краю створки на стыке с загибом створки. Вставочный ободок простой, состоящий из двух одинаковых сегментов и соединительного ободка чешуевидной формы, без ареол (рис. 4). Клетки бывают одиночными, либо соединяются в цепочки, образуя колонии (рис. 4, 5). Такие морфометрические характеристики сходны со штаммами из разных акваторий мирового океана [16, 17, 19, 28].

Отмечено, что высота клеток в пояске в условиях культивирования увеличивалась в 1.5 раз по сравнению с клетками, обнаруженными в природе, при этом диаметр практически не менялся. Это свидетельствует о том, что при культивировании вид способен наращивать биомассу не только за счет увеличения численности популяции, но и за счет увеличения размера клетки в поясковой зоне (высота клетки).

Культуры имели светло-коричневый цвет и оседали на дно (рис. 6). Свойство культуры оседать на дно имеет большое значение для биотехнологии, поскольку облегчает сбор биомассы для дальнейшей экстракции полезных веществ. Стоит

отметить, что при этом не возникало проблем с перемешиванием в процессе барботирования, поскольку вид мелкоклеточный, колониальный [19].

Все клетки *N. shiloi* при барботаже находились во взвеси и оседали только при отключении перемешивания. Естественная особенность бентосных и бенто-планктонных видов оседать на дно с одной стороны облегчает сбора урожая, но с другой стороны при увеличении объема фотобиореактора создает определенные трудности при перемешивании культуры. Одним из решений проблемы перемешивания оседающих клеток в суспензии является применение вихревых технологий [29, 30].

Лабораторное культивирование: интенсивная культура. Из литературы известно, что для культивирования диатомовых водорослей традиционно используют питательные среды F, F/2, BG11, на которых максимальная биомасса достигает от 0.38 до 0.5 г/л сухой массы [19, 20]. Питательные среды F и F/2 являются обедненными по многим биогенным элементам, а в состав среды BG11 не входит источник кремния, диатомеи растут за счет растворенного кремния в морской воде. Поскольку концентрация кремния в морской воде достаточно мала, получить интенсивную плотную культуру на среде BG11 многих видов диатомовых водорослей практически невозможно. Исключение составляют виды с низким содержанием кремния в биомассе, например, *Phaeodactylum tricornutum* [31].

Сравнение полученных результатов с литературными данными показало, что для увеличения скорости роста и накопления биомассы *N. shiloi* необходимо в питательной среде увеличивать концентрацию биогенных элементов, что соответствует представлениям о субстрат зависимом росте

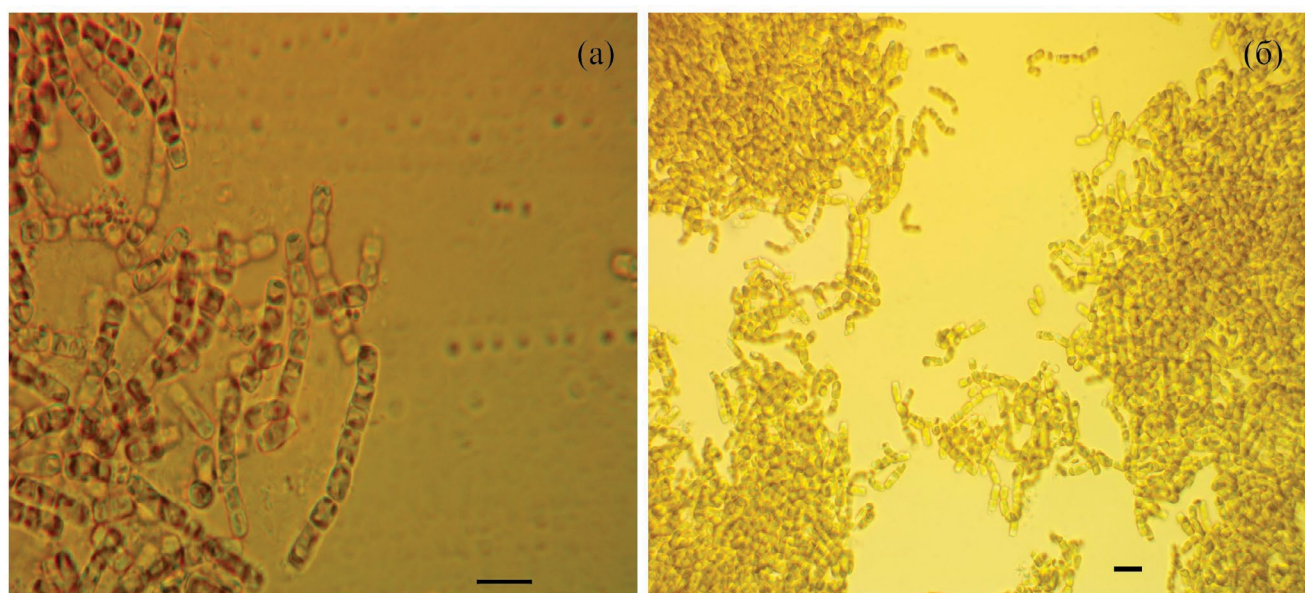


Рис. 5. СМ-изображение монокультуры *N. shiloi*, масштаб 10 мкм.

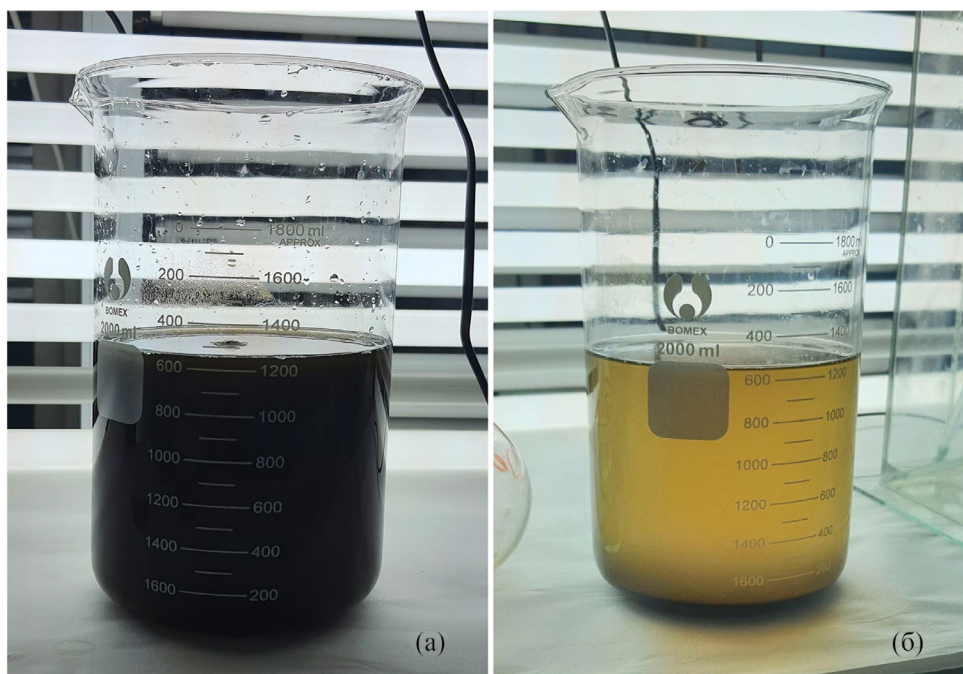


Рис. 6. Способность *N. shiloi* оседать на дно лабораторного стакана за 1 мин (а), за 3 ч (б).

микроорганизмов в культуре [32]. Поэтому для создания интенсивной культуры пропорционально были увеличены концентрации нитрата натрия, дигидрофосфата натрия и метасиликата натрия, а также концентрации всех микроэлементов в питательной среде относительно стандартной среды F в пять раз. Накопительная кривая, полученная на питательной среде 5F, характеризуется отсутствием лаг- и линейной фаз роста. Экспоненциальный рост наблюдался с 0 по 3-й день эксперимента, затем следовала фаза замедления роста с 3-го по 5-й день и стационарная фаза с 5-го по 7-й день эксперимента (рис. 7). В эксперименте была получена интенсивная культура на питательной среде 5F с максимальной плотностью 1.27 г/л сухой массы, в то время как на среде F плотность достигла 0.32 г/л. В экспоненциальной фазе роста накопительной кривой 5F максимальная удельная скорость роста составила $\mu = 0.8$ 1/сут, а время удвоения $t_d = \ln 2 / \mu = 0.87$ сут. Максимальная продуктивность была достигнута на 3 сутки эксперимента в точке перехода из экспоненциальной фазы роста в фазу замедления и составила $P_{5F} = 0.46$ г/л в сутки. У накопительной культуры на питательной среде F с 1 по 5 день эксперимента наблюдался линейный рост, при этом максимальная продуктивность составила $P_F = 0.05$ г/л в сутки. Таким образом, увеличение концентрации биогенных элементов в среде в пять раз привело к увеличению продуктивности культуры в 9.2 раза.

В сравнении с другими видами диатомовых водорослей величина продуктивности плотной культуры исследуемого штамма была

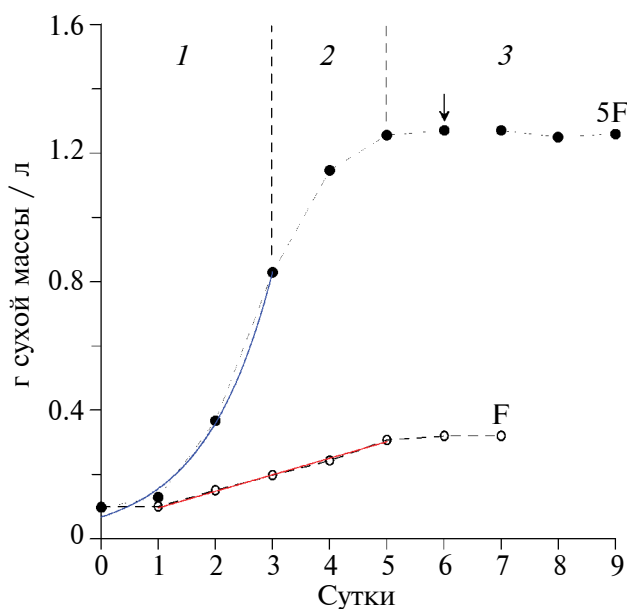


Рис. 7. Динамика биомассы *N. shiloi* в интенсивной культуре на питательных средах F и 5F. Для накопительной кривой 5F цифрами указаны фазы роста: 1 – экспоненциальная, 2 – замедления, 3 – стационарная. Для накопительной кривой F рассчитана продуктивность в линейной фазе роста по уравнению (2) (отмечено красным) $P_{F/2} = 0.05$ г/(л сут), $R^2 = 0.99$. Удельная скорость роста в экспоненциальной фазе для накопительной кривой 5F рассчитана по уравнению (1) (отмечено синим) $\mu = 0.8$ 1/сут, $R^2 = 0.99$. Точками указаны средние значения, величина СКО для всех измерений не превышала 0.01 г/л. Стрелкой указан момент измерения ЖК и фукоксантина.

Таблица 1. Биохимический состав диатомовой водоросли *N. shiloi* при накопительном культивировании

Фазы роста	Липиды, %	Белки, %	Углеводы, %	Зола, %	ПНЖК, мг/г	Фукоксантин, мг/г
Экспоненциальная фаза, 3 сут Плотность культуры В = 0.83 г/л	6 ± 0.6	51 ± 1	16 ± 0.2	30 ± 0.5	—	—
Стационарная фаза, 6 сут Плотность культуры В = 1.27 г/л	20 ± 0.6	43 ± 2	7 ± 0.4	29 ± 0.5	67.39	10 ± 0.4

близка к продуктивности других культур морских диатомей, например, у *Phaeodactylum tricornutum* $P_{\text{MAX}} = 0.8$ г/(л сут) [31] и *Odontella aurita* $P_{\text{MAX}} = 0.5$ г/(л сут) [33]. Возможно, в наших экспериментах продуктивность *N. shiloi* не достигала своего предельного значения, заложенного генетикой вида, поэтому оптимизация условий культивирования и питательной среды для *N. shiloi* в будущем приведет к увеличению продуктивности.

В связи с тем, что в литературе отсутствуют сведения о биохимическом составе *N. shiloi* в интенсивной культуре для оценки биотехнологического потенциала данного штамма был проведен биохимический анализ биомассы, полученной в разных фазах роста. Поскольку в культуре наибольшая концентрация пигментов и жирных кислот (мг/л) наблюдается в начале стационарной фазы роста, измерение F_x и ЖК было проведено в начале стационарной фазы роста (рис. 7).

Результаты измерений представлены в табл. 1, из которой видно, что у исследуемого штамма и в экспоненциальной, и в стационарной фазе роста доля белка достаточно высока и значительно превышает концентрацию белка у других видов диатомовых водорослей. Например, у *Cylindrotheca fusiformis*, *Navicula jeffreysi*, *Nitzschia closterium*, *Lauderia annulata* и *Skeletonema costatum* концентрация белка составляет от 16 до 38% от сухой массы [34]. По-видимому, это связано с генетическими особенностями исследуемого вида. Известно, что у микроводорослей содержание белка значительно снижается при лимитировании роста азотом. В питательной среде F относительное содержание азота достаточно велико (соотношение $N : P = 12 : 1$), поэтому в нашем эксперименте существенное снижение доли белка у исследуемого штамма не наблюдалось. Кроме того, отсутствие лимитирования роста азотом привело к достаточно длительной стационарной фазе роста, что является важной технологической характеристикой штамма при культивировании в промышленных масштабах.

По данным эксперимента, в экспоненциальной фазе роста биомасса *N. shiloi* характеризуется малым содержанием липидов (6% от сухой массы). При переходе культуры в стационарную фазу роста наблюдается накопление суммарных липидов до 20% от сухой массы, при этом концентрация

ПНЖК достигала 37.17% от ЖК (67.39 мг/г сухой массы) (см. табл. 2). Это обусловлено тем, что в эксперименте культура характеризовалась высокой скоростью роста. По литературным данным известно, что при высоких скоростях роста у микроводорослей наблюдалось накопление структурных липидов, основную долю которых составляют ПНЖК. В то время как при малых скоростях роста наблюдается накопление запасных нейтральных липидов (НЖК) и мононенасыщенные жирные кислоты (МНЖК) [35, 36].

Высокая концентрация липидов обусловлена снижением облученности на единицу биомассы и отсутствием азотного лимитирования. В работе [37] авторы показали, что низкий уровень освещения и отсутствие ограничений по азоту приводили к увеличению эффективности фотосинтеза у диатомовых водорослей и накоплению ПНЖК.

При изучении жирнокислотного состава *N. shiloi* в культуре были обнаружены насыщенные жирные кислоты (НЖК), МНЖК и ПНЖК, состав которых представлен в табл. 2. После хроматографического анализа были обнаружены ЖК с длиной цепи от 14 до 22 углеродных атомов (табл. 2).

Наиболее высокое содержание определено для моноеновой пальмитолеиновой (34.65% от суммы ЖК, 18.9 мг/г сухой массы), а также для полиеновых кислот ЭПК (18.49% от суммы ЖК, 47.38 мг/г сухой массы) и АРК (5.14% от суммы ЖК, 8.55 мг/г сухой массы). Концентрация докозагексаеновой (ДГК) кислоты составила 0.65% от суммы ЖК (2.69 мг/г сухой массы). Данный факт имеет большое прикладное значение, поскольку ЭПК и ДГК способствуют снижению уровня триглицеридов, обладают противовоспалительными свойствами, профилактическим действием против сердечно-сосудистых заболеваний [38] АРК служит предшественником гормоноподобных веществ, известных как эйкозаноиды: простагландины, тромбоксаны, лейкотриены и др. [39]. У исследуемого штамма содержание ЭПК достаточно высоко, а ДГК сопоставимо с другими культурами диатомовых водорослей. Например, у *Chaetoceros wighamii*, *Thalassiosira baltica*, *P. tricornutum*, *T. weissflogii* и *C. muelleri* концентрация ЭПК составляла от 10 до 35 мг/г сухой массы, а ДГК от 1 до 4 мг/г сухой массы [36, 40].

Таблица 2. Жирнокислотный состав исследуемого штамма *N. shiloi* в начале стационарной фазы роста (6 сут)

Название ЖК	Содержание от суммы ЖК, %	Концентрация, мг/г сухой массы	Другие штаммы, % от суммы ЖК
Миристиновая (C14:0)	4.3 ± 0.06	2.23 ± 0.04	0.66–2.4 [18, 19, 20]
Пентадекановая (C15:0)	0.54 ± 0.01	0.27 ± 0.07	0.19–1.07 [18, 19, 20]
Пальмитиновая (C16:0)	18.67 ± 0.56	9.48 ± 0.34	28.26–45.47 [18, 19, 20]
Стеариновая (C18:0)	0.63 ± 0.01	0.32 ± 0.03	0.08–16.71 [18, 19, 20]
Сумма НЖК	24.14	12.3	
Мононенасыщенные ЖК			
Пальмитолеиновая (C16:1ω7)	34.65 ± 0.53	18.9 ± 0.53	18.03–41.57 [36–38]
Элаидиновая кислота (Е) C18:1 (ω9)	0.75 ± 0.01	0.21 ± 0.01	—
Олеиновая (C18:1ω9)	1.57±0.04	1.46±0.03	0.67–6.26 [18, 19, 20]
Сумма МЖК	36.22	20.57	
Полиненасыщенные ЖК			
*Гексадекатетраеновая (C16:4ω1)	1.94 ± 0.01	1.07 ± 0.01	—
*Гексадекатриеновая (C16:3ω4)	9.5 ± 0.01	5.16 ± 0.31	—
γ-линоленовая (C18:3ω6)	0.18 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.6–2.43 [18, 19, 20]
Стеаридониковая кислота (C18:4ω3)	0.8 ± 0.02	0.850 ± 0.021	—
Линолевая (C18:2ω6)	2.1 ± 0.02	1.46 ± 0.04	1.31–5.99 [18, 19, 20]
Арахидоновая (C20:4ω6)	5.14 ± 0.12	8.55 ± 0.31	9.29 [20]
Эйкозопентаеновая (C20:5ω3)	18.49 ± 0.23	47.38 ± 0.61	2.2–6.96 [18, 19, 20]
Докозагексаеновая (C22:6ω3)	0.65 ± 0.01	2.69 ± 0.03	0.47 [20]
Сумма ПНЖК	37.17	67.39	—
МНЖК + ПНЖК	73.39	87.96	—
НЖК + МНЖК + ПНЖК	97.53	100.26	—
ω6/ω3	0.4	—	—

Примечание. Указаны средние значения с величиной СКО.

* Кислоты, определенные качественно при помощи МСД, количественно — при помощи ПИД с использованием внутреннего стандарта.

Диатомовая водоросль *Nanofrustulum shiloi* (Lee, Reimer et McEnergy) Round, Hallsteinsen et Paasche 1999

 Рис. 8. Биотехнологическая характеристика диатомовой водоросли *N. shiloi*.

Основная доля насыщенных ЖК приходилась на пальмитиновую кислоту (9.48 мг/г сухого веса). В целом у исследуемого штамма преобладали МЖК (36.22%) и ПНЖК (37.17% от суммы ЖК) при соотношении $\omega 6/\omega 3$ равном 0.4. Данное соотношение $\omega 6/\omega 3$ показало, что в исследуемом штамме преобладали $\omega 3$ жирные кислоты. Известно, что продукты с низким соотношением $\omega 6/\omega 3$ ПНЖК ($\omega 6/\omega 3 \leq 1$) могут использоваться в качестве профилактики таких заболеваний, как аритмия сердца, инсульт и инфаркт миокарда, а также атеросклеротического изменения сосудов [39].

Доля суммы моноеновых и полиеновых кислот составляла 73.39% от суммы ЖК, поэтому черноморский штамм *N. shiloi* может рассматриваться как перспективный объект биотехнологического получения продуктов лечебно-профилактического назначения, которые исключают недостаток ПНЖК в рационе человека и снижат вероятность многих заболеваний [41].

Важно отметить, что сравнение данных по количественному составу ЖК у *N. shiloi* с другими видами диатомей в ряде случаев достаточно затруднительно. Обусловлено это тем, что концентрации индивидуальных ЖК в публикациях обычно представляются в процентах от суммы ЖК, при этом доля суммы ЖК от сухой массы водорослей не уточняется. Концентрация суммарных липидов в биомассе и, следовательно, сумма ЖК в зависимости от фазы роста культуры изменяется в широких пределах, поэтому для сравнения

биотехнологического потенциала различных продуцентов данные о ЖК необходимо представлять в процентах от сухой массы водорослей (табл. 2). Кроме сравнения, представление данных в долях от сухой массы позволяет оценить среднюю скорость накопления ценных веществ в накопительной культуре. Например, если в стационарной фазе плотность культуры достигала $B_{\max}$ – г/л с долей ценного вещества в биомассе X , тогда концентрация ценного вещества в культуре составит $B_{\max} \times X$ г/л, а после разбавления культуры до B_0 (новый цикл накопительного культивирования) соответственно $B_0 \times X$ (г/л). Отсюда следует средняя скорость биосинтеза ценного вещества за время накопительного культивирования:

$$V_X = (B_{\max} - B_0) \times X / (t - t_0), \quad (4)$$

где $B_{\max}$, B_0 – плотность накопительной культуры в момент времени t и t_0 соответственно; V_X – средняя скорость накопления ценного вещества X за время накопительного культивирования.

Подставляя данные из табл. 2 в (4) получим среднюю скорость накопления ЭПК равную $V_{\text{эпк}} = (1.27 - 0.1) \times 0.04738 / 6 = 0.009$ г/(л сут). Аналогично для АРК и ДГК $V_{\text{АРК}} = 0.0017$ и $V_{\text{ДГК}} = 0.0005$ г/(л сут) соответственно. Сравнение скорости накопления ЭПК у исследуемого штамма *N. shiloi* с данными литературы показало, что у *N. shiloi* скорость накопления ЭПК превышала скорость накопления у других фототрофных культур диатомей.

Например, у *Cyclotella cryptica* скорость накопления ЭПК составляла 0.004 г/(л сут), а у *Odontella aurita* — 0.008 г/(л сут) [42].

Активное накопление Fx у диатомовых водорослей наблюдалось в фазе замедления роста и в стационарной фазе [43]. Высокая активность синтеза Fx была обусловлена снижением облученности внутри суспензии и снижением концентрации питательных веществ в среде. Высокая активность синтеза Fx в клетках в фазе замедления роста и в начале стационарной фазе связана с тем, что низкие значения концентрации кремния и фосфора в среде способствовали формированию стрессовых условий, при которых внутри клетки повышается концентрация активных форм кислорода, что активирует процессы биосинтеза Fx [44]. По данным эксперимента в начале стационарной фазы роста (6 сут) концентрация Fx в биомассе *N. shiloi* достигала 10 мг/г сухой массы. Следовательно, с учетом формулы (4) можно рассчитать среднюю скорость накопления Fx: $V_{FX} = 0.002$ г/(л сут).

Получена альгологически чистая культура черноморского штамма диатомовой водоросли *N. shiloi* и описаны ее морфологические характеристики. Исследованы также биохимические и продукционные характеристики в интенсивной культуре. Максимальная плотность культуры достигала 1.27 г/л, продуктивность — 0.46 г/(л сут), удельная скорость роста 0.8 1/сут и время удвоения 0.87 сут. Выявлено, что содержание жирных кислот в биомассе исследуемого штамма достаточно высоко и составляло 67.39 мг/г сухой массы, при этом соотношение $\omega 6/\omega 3 = 0.4$. Концентрация эйкозапентаеновой, арахидоновой и докозагексаеновой кислот составляла 18.49, 5.14 и 0.65% от суммы ЖК соответственно. Концентрация фукоксантина достигала 10 мг/г сухой массы.

Учитывая высокие концентрации ценных веществ и преобладание $\omega 3$ жирных кислот ($\omega 6/\omega 3 < 1$), *N. shiloi* можно рассматривать как перспективный объект для интенсивного культивирования и производства лечебно-профилактических продуктов в промышленных масштабах. Культура *N. shiloi* обладает рядом биологических и технологических характеристик (рис. 8), которые необходимо исследовать для промышленного ее использования в будущем.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ РАН по теме “Комплексное исследование механизмов функционирования биотехнологических комплексов с целью получения активных веществ из гидробионтов” (№ FNNZ-2024-0032), при частичной финансовой поддержке РНФ (№ 19-19-00083).

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. Vázquez-Romero B., Perales J.A., Pereira H., Barbosa M., Ruiz J. // Sci. Total. Environ. 2022. V. 837. P. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155742>.
2. Ahmed S.F., Mofijur M., Parisa T.A., Islam N., Kusumo F., Inayat A. et al. // Chemosphere. 2022. V. 286. Part 1. P. 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131656>.
3. Maghzian A., Aslani A., Zahedi R. // Energy Reports. 2022. V. 8. № 4. P. 3337–3349. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2022.02.125>.
4. Revellame E.D., Aguda R., Chistoserdov A., Fortela D.L., Hernandez R.A., Zappi M.E. // Algal Research. 2021. V. 55. № 5. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102258>.
5. Wang S., Verma S.K., Said I.H., Thomsen L., Ullrich M.S., Kuhnert N. // Microb. Cell. Fact. 2018. V. 17. № 1. P. 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0957-0>.
6. Supramaetakorn W., Meksumpun S., Ichimi K., Thawonsode N., Veschasit O.-I. // J. Fish. Environ. 2019. V. 43. № 3. P. 1–10.
7. Жузе А.П., Прошкина-Лавренко А.И., Шешукова В.С. Диатомовый анализ. Книга 1. Том 1. / Ред. А. И. Прошкина-Лавренко. М.-Л.: Государственное издательство геологической литературы, 1949. 239 с.
8. Kuczyńska P., Jemiola-Rzeminska M., Strzałka K. // Mar. Drugs. 2015. V. 13. № 9. P. 5847–5881. <https://doi.org/10.3390/md13095847>.
9. Геворгиз П.Г., Железнова С.Н. // Морской биологический журнал. 2020. Т. 5, № 1. С. 12–19. <https://doi.org/10.21072/mbj.2020.05.1.02>.
10. Dang N.P., Vasskog T., Pandey A., Calay R.K. // Int. J. Biol. Ecol. Eng. 2022. V. 16. № 12. P. 108–112.
11. Silva B.F., Wendt E.V., Castro J.C., Oliveira A.E., Carrim A.J.I., Gonçalves Vieira J.D., et al. // Algal Research. 2015. V. 9. P. 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.010>.
12. Jaramillo-Madrid A.C., Ashworth J., Ralph P.J. // J. Mar. Sci. Eng. 2020. V. 8. № 2. P. 1–14. <https://doi.org/10.3390/jmse8020085>.
13. Геворгиз П.Г., Гуреев М.А., Железнова С.Н., Гуреева Е.В., Нехорошев М.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2022. Т. 58. № 3.
14. Eilertsen H.C., Eriksen G.K., Bergum J.-S., Strømholth J., Elvevoll E., Eilertsen K.-E. et al. // Appl. Sci. 2022. V. 12. № 6. P. 1–35. <https://doi.org/10.3390/app12063082>.

15. Blaginina A., Ryabushko L. // Int. J. on Algae. 2021. V. 23. № 3. P. 247–256.
<https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v23.i3.40>
16. Round F.E., Hallsteinsen H., Paasche E. // Diatom Research. 1999. V. 14. № 2. P. 343–356.
<https://doi.org/10.1080/0269249X.1999.9705476>
17. Woelfel J., Schoknecht A., Schaub I., Enke N., Schumann R., Karsten U. // Phycol. 2014. V. 53. № 6. P. 639–651.
18. Sahin M.S., Khazi M.I., Demirel Z., Dalay M.C. // Biocatalysis and Agricultural Biotechnol. 2019. V. 17. P. 390–398.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.12.023>
19. Demirel Z., Imamoglu E., Dalay M.C. // Braz. Arch. Biol. Technol. 2020a. V. 63. № 4. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020190201>
20. Grubišić M., Šantek B., Zorić Z., Čošić Z., Vrana I., Gašparović B. et al. // Molecules. 2022. V. 27. № 4. P. 1–27. doi: 10.3390/molecules27041248.
21. Рябушко В.И., Железнова С.Н., Нехорошев М.В. // Algologia. 2017. Т. 27. № 1. С. 15–21.
<https://doi.org/10.15407/alg27.01.015>
22. Bae M., Kim M.-B., Park Y.-K., Lee J.-Y. // Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids. 2020. V. 1865. № 11. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158618>
23. Рябушко Л.И. Микрофитобентос Черного моря. / Ред. А. В. Гаевская. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2013. 416 с.
24. Guillard R.R.L., Ryther J. // Can. J. Microbiol. 1963. V. 8. № 2. P. 229–239.
<https://doi.org/10.1139/m62-029>.
25. Агатова А.И., Аржанова Н.В., Лапина Н.М., Налетова И.А., Торгунова Н.И. Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры / Ред А. И. Агатовой. М.: ВНИРО, 2004. 123 с.
26. Hashimoto T., Ozaki Y., Taminato M., Dass S.K., Mizuno M., Yoshimura K. et al. // British Journal of Nutrition. 2009. V. 102. № 2. P. 242–248.
<https://doi.org/10.1017/S0007114508199007>.
27. Kates M. Techniques of Lipidology. Isolation, Analysis and Identification of Lipids. /Ed. T. S. Work, E. Work. Amsterdam; North Holland Publ. 1972. V. 3. Part II. P. 347–390.
28. Sar E.A., Sunesen I. // Nova Hedwigia. 2003. V. 77. № 3–4. P. 399–406.
<https://doi.org/10.1127/0029-5035/2003/0077-0399>
29. Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н., Зозуля Ю.В., Уваров И.П., Репков А.П., Лелеков А.С. // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2016: Севастополь. 2016. Т. 1. С. 73–77.
30. Naumov I.V., Gevorgiz R.G., Skripkin S.G., Tintulova M.V., Tsoy M.A., Sharifullin B.R. // Chemical Engineering and Processing – Process Intensification. 2023b. V. 191. P. 1–12.
<https://doi.org/j.ccep.2023.109467>
31. Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г., Жондарева Я.Д. // Прикладная биохимия и микробиология. 2016. Т. 52. № 3. С. 333–338.
<https://doi.org/10.7868/S0555109916030090>
32. Тренкеншу Р.П. // Экол. моря. 2005. Вып. 67. С. 98–110.
33. Xia S., Wang K., Wan L., Li A., Hu Q., Zhang C. // Mar. Drugs. 2013. V. 11. № 7. P. 2667–2681.
<https://doi.org/10.3390/md11072667>.
34. De Castro Araújo S., Tavano Garcia V.M. // Aquaculture. 2005. V. 246. № 1–4. P. 405–412.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.051>
35. Li H.-Y., Lu Y., Zheng J.-W., Yang W.-D., Liu J.-S. // Mar. Drugs. 2014. V. 12. № 1. P. 153–166.
<https://doi.org/10.3390/md12010153>.
36. Spilling K., Seppälä J., Schwenk D., Rischer H., Tamminen T. // J Appl Phycol. 2021. V. 33. P. 1447–1455.
<https://doi.org/10.1007/s10811-021-02380-9>
37. Cointet E., Wielgosz-Collin G., Bougaran G., Rabesaotra V., Gonçalves O., Méléder V. // PLoS ONE. 2019. V. 14. № 11. P. 1–28.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224701>
38. Sprynskyy M., Monedeiro F., Monedeiro-Milanowski M., Nowak Z., Krakowska-Sieprawska A., Pomastowski P. et al. // Algal Research. 2022. V. 62. P. 1–30.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102615>
39. Preston M.R. // Curr. Atheroscler. Rep. 2019. V. 21. № 1. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1007/s11883-019-0762-1>
40. Wang H., Zhang Y., Chen L., Cheng W., Liu T. // Bioprocess Biosyst Eng. 2018. V. 41. № 7. P. 1061–1071.
<https://doi.org/10.1007/s00449-018-1935-y>
41. Гладышев М.И. // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология. 2012. Т. 5. № 4. С. 352–386.
42. Yang R., Wei D., Xie J. // Crit. Rev. Biotechnol. 2020. V. 40. № 7. P. 993–1009.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1805402>
43. Gevorgiz R.G., Gureev M.A., Zheleznova S.N., Gureeva E.V., Nechoroshev M.V. // Appl.ed Biochem. Microbiol. 2022. V. 58, № 3. P. 261–268.
<https://doi.org/10.1134/S0003683822010033>
44. Erdoğan A., Demirel Z., Dalay M.C., Eroğlu A.E. // Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 2016. V. 16. № 3. P. 499–506.
https://doi.org/10.4194/1303-2712-v16_3_01

The Diatom *Nanofrustulum shiloi* as a Promising Species in Modern Biotechnology

A. A. Blaginina^{a, *}, S. N. Zheleznova^{a, b}, E. S. Miroshnichenko^a, R. G. Gevorgiz^{a, b},
and L. I. Ryabushko^a

^aKovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of Russian Academy of Sciences, Sevastopol, 299011 Russia

^bKutateladze Institute of Thermophysics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: aablaginina@gmail.com

The article presents the results of studies of intensive culture of a new species of bentoplanktonic diatom *N. shiloi* (Lee, Reimer et McEnery) Round, Hallsteinsen et Paasche 1999 for the Black Sea. The features of the process of isolating the species into an algologically pure culture, as well as the morphological and taxonomic characteristics of the strain in light and electron scanning microscopes are described in detail. The biochemical and production characteristics of the strain were studied, as well as the ability to accumulate fucoxanthin (Fx) and polyunsaturated fatty acids (PUFA) in laboratory conditions. In the exponential growth phase, the specific culture growth rate was $\mu=0.8$ 1/day, and the maximum productivity $P = 0.46$ g dry weight / (L day). The accumulation of PUFAs in the biomass of *N. shiloi* reached 67.39 mg/g dry weight of algae. The Fx concentration in the biomass at the beginning of the stationary growth phase was 10 mg/g dry weight. The fairly high rate of Fx biosynthesis in microalgae cells, as well as the composition of fatty acids of the Black Sea strain, make it possible to classify *N. shiloi* as a promising object in biotechnology.

Keywords: diatom *Nanofrustulum shiloi*, intensive cultivation, productivity, fucoxanthin, polyunsaturated fatty acids

УДК 57.083.3:543.544

РАЗРАБОТКА МИКРОПЛАНШЕТНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НОНИЛФЕНОЛА С МАГНИТНЫМ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕМ ПРОБ

© 2024 г. А. Н. Берлина¹, Л. В. Баршевская¹, К. В. Серебренникова¹,
Н. С. Комова¹, А. В. Жердев¹, Б. Б. Дзантиев^{1, *}

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

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

Поступила в редакцию 05.12.2023 г.

После доработки 10.01.2024 г.

Принята к публикации 12.01.2024 г.

Нонилфенол является ароматическим органическим соединением, обладающим эстрогеноподобным действием и оказывающим негативное воздействие на эндокринную систему человека. Разработана методика конкурентного определения нонилфенола с использованием магнитных частиц, конъюгированных с белком G, антисывороткой кролика, конъюгатом нонилфенола с соевым ингибитором трипсина (СИТ) и биотином. Принцип анализа заключается в формировании иммунных комплексов на поверхности частиц магнетита с помощью белка G путем ориентированной иммобилизации поликлональных антител из сыворотки кролика и последующей конкурентной реакции между нативным нонилфенолом и его конъюгатом нонилфенол-СИТ-биотин за центры связывания антител. Для выявления иммунных комплексов используется взаимодействие с конъюгатом стрептавидин-полипероксидаза, обеспечивающие девятикратный выигрыш по уровню аналитического сигнала по сравнению с конъюгатом стрептавидин-пероксидаза. Предел обнаружения нонилфенола с помощью разработанного ИФА — 3.8 нг/мл, что в 14.5 раз ниже по сравнению с традиционным конкурентным ИФА. Оптимизированный объем тестируемой пробы, равный 500 мкл, позволяет концентрировать аналит в 17 раз.

Ключевые слова: нонилфенол, иммуноферментный анализ, частицы магнетита, магнитное концентрирование

DOI: 10.31857/S0555109924030108 EDN: EWAIEK

Загрязнение окружающей среды токсичными соединениями представляет серьезную угрозу как здоровью людей, так и природным объектам. В большой опасности находятся, в частности, водные экосистемы [1–3]. Промышленные сбросы, сельскохозяйственные стоки и неправильная утилизация отходов приводят к загрязнению водоемов и снижают качество потребляемой воды, что, в свою очередь, приводит к развитию различных заболеваний [4–6].

Среди многообразия токсикантов водной среды все большее беспокойство вызывают эндокринные деструкторы, такие как нонилфенол (НФ) [7–9]. Нонилфенол является конечным продуктом деградации неионных поверхностно активных веществ (ПАВ), широко используемых в текстильной, сельскохозяйственной, бумажной промышленности [10]. НФ часто обнаруживается в водных экосистемах, куда попадает в основном с промышленными

сточными водами [7, 11]. Уровни его содержания в водоемах могут достигать до 0.98 мкг/кг, в поверхностных и подземных водах — до 37.3 мг/м³ и 3.85 мг/м³ соответственно [12].

НФ отличается высокой гидрофобностью, поэтому способен накапливаться в организмах человека и животных, нарушая работу эндокринной, репродуктивной и нервной систем и повышая вероятность образования опухолей [13–15]. Максимально допустимые концентрации НФ в воде устанавливаются в пределах от 0.3 до 2 мкг/л [16]. Исходя из этого, контроль содержания НФ в водных объектах является важной задачей.

Для детекции НФ наиболее часто используются газовая, жидкостная хроматография или масс-спектрометрия, которые являются трудоемкими, длительными и требуют дорогостоящего оборудования [17–20]. Кроме того, в природных объектах НФ часто представлен в виде смеси изомеров с различной

разветвленной структурой, что затрудняет идентификацию пиков на хроматограммах и снижает точность определения. Вследствие этого необходима разработка более простых, быстрых и высокочувствительных методов обнаружения НФ.

Альтернативными методами определения НФ являются иммунохимические, такие как иммуноферментный анализ (ИФА) [21, 22], поляризационный флуоресцентный иммуноанализ [23], проточно-инжекционный иммуноанализ [24, 25]. Они отличаются быстротой и удобством проведения, высокой воспроизводимостью, возможностью автоматизации и низкой стоимостью. Разработка иммунохимических методов требует получения высокоспецифичных антител ввиду высокой гетерогенности изомеров НФ [26, 27].

В данной работе предложен ИФА для выявления НФ на основе частиц магнетита (МЧ). Поскольку содержание НФ в пробах может быть низким, оправдано концентрирование пробы. Использование МЧ позволяет одновременно проводить разделение несвязавшихся компонентов и концентрирование анализата, что повышает чувствительность и точность анализа.

Цель работы — разработка ИФА нонилфенола с применением магнитного концентрирования проб и отделения иммунных комплексов, содержащих пероксидазную метку.

МЕТОДИКА

Химические реагенты. В работе использованы нонилфенол (НФ), соевый ингибитор трипсина (СИТ), желатин, диметил сульфоксид (ДМСО), твин-80, N-сукцинимидный эфир биотинамидогексаноил-6-аминогексановой кислоты, бычий сывороточный альбумин (БСА), конъюгат стрептавидина с полимеризованной пероксидазой, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид гидрохлорид (ЭДК), формальдегид (Sigma-Aldrich, США). Антисыворотки против НФ были получены путем иммунизации кроликов конъюгатом НФ-БСА согласно методике, описанной в [26]. Также применялись поликлональные антитела козы против иммуноглобулинов кролика, меченные пероксидазой хрена, стрептококковый белок G (ИМТЕК, Россия), готовый субстрат пероксидазы на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) с H_2O_2 (Иммунотех, Россия), метанол (Fluka, Швейцария) и карбоксилированные частицы магнетита (МЧ) (Magsphere, Великобритания).

Синтез конъюгата гаптен-белок. Нонилфенол конъюгировали с соевым ингибитором трипсина по методике, основанной на реакции Манниха [26] с получением конъюгата НФ-СИТ. Для этого НФ растворяли в ДМСО, получая раствор с концентрацией 33 мг/мл. 10 мг СИТ вносили в 1 мл 0.1 М карбонатного буфера (рН 10.0). К раствору

белка добавляли 60 мкл раствора НФ. Затем добавляли 100 мкл 35% формальдегида с последующим инкубированием при перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре. Реакционную смесь оставляли в термостате на 5 суток при 37°C. Очистку препарата проводили диализом против 10 мМ фосфатного буферного раствора с 0.1 М натрия хлорида, рН 7.4. Полученный конъюгат хранили при +4°C.

Биотинилирование конъюгата гаптен-белок. Конъюгат НФ-СИТ смешивали с N-сукцинимидным эфиром биотинамидогексаноил-6-аминогексановой кислоты в мольном соотношении 1: 20 и инкубировали 2 ч при комнатной температуре и перемешивании. Продукт реакции диализовали против 50 мМ фосфатного буфера (ФБС, рН 7.4) с использованием центрифужных фильтров Amicon Ultracel 10 K (Millipore, США).

Получение магнитного иммуносорбента состава МЧ-белок G-IgG. 20 мкл раствора частиц (1 мг/мл) смешивали с 143 мкл раствора ЭДК (7 мг/мл), доводили полученную смесь до 1 мл 50 мМ ФБС (рН 7.4) и инкубировали 15 мин при перемешивании. Далее в полученный раствор вносили белок G в исходной концентрации 100 мкг/мл, инкубировали 1 ч при комнатной температуре и перемешивании. Добавляли 25 мкл 10% БСА, инкубировали еще 10 мин при перемешивании и очищали конъюгат трехкратной промывкой ФБС с использованием внешнего магнита. Затем к 1 мл полученного конъюгата добавляли 10.5 мкл антисыворотки против НФ, инкубировали 1 ч при комнатной температуре и перемешивании и отмывали, как описано выше. Полученный конъюгат хранили при +4°C.

Конкурентный иммуноферментный анализ НФ. В лунки микропланшета (Corning Costar, США) вносили конъюгат НФ-СИТ (1 мкг/мл) в ФБС и инкубировали в течение ночи при 4°C, а затем трижды промывали 50 мМ ФБС, содержащим 0.05% Твин-80 (ФБСТ). Далее 150 мкл ФБС с 0.1% желатином вносили в лунки микропланшета и инкубировали 30 мин при 37°C, после чего микропланшет промывали ФБСТ. Для приготовления растворов НФ использовали исходный метанольный раствор с концентрацией 1 мг/мл. В лунки вносили растворы НФ с различной концентрацией (от 100 мкг/мл до 0.01 нг/мл) в смеси метанол : вода (1 : 4), а затем добавляли антисыворотку в разведении 1 : 5000 в ФБС с 0.1% желатина. После инкубирования в течение 1 ч при 37°C и отмывки планшета ФБСТ добавляли конъюгат антивидовые антитела — пероксидаза (1 : 3000) и инкубировали 45 мин при 37°C и интенсивном перемешивании. Микропланшет отмывали 4 раза ФБСТ, вносили в лунки раствор субстрата ТМБ (100 мкл) и через 15 мин инкубации при комнатной температуре останавливали реакцию добавлением 50 мкл 0.1 М H_2SO_4 .

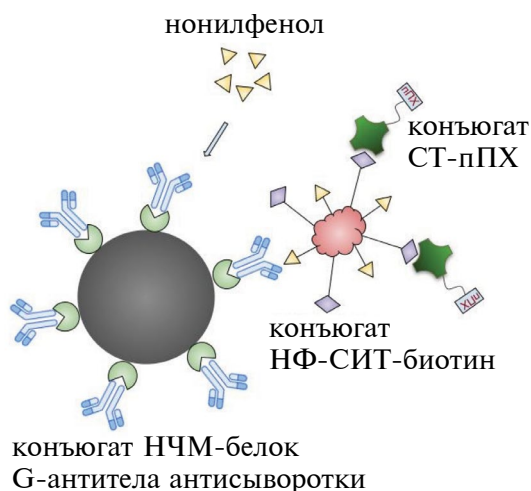


Рис. 1. Схема ИФА с магнитным концентрированием.

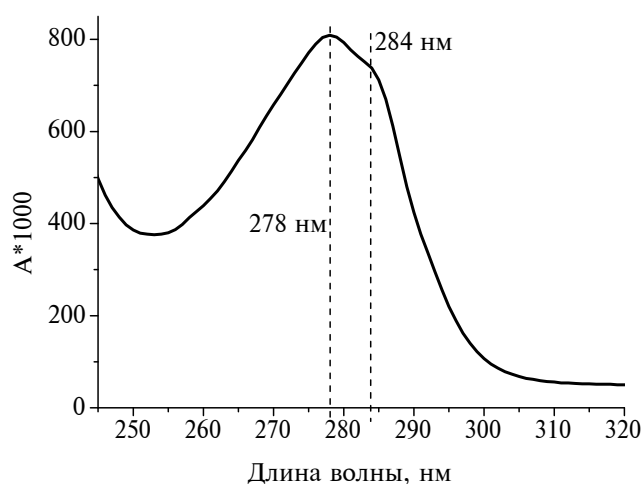


Рис. 2. Спектр поглощения конъюгата НФ-СИТ. Толщина кюветы 1 мм, концентрация конъюгата в 10 мМ ФБС — 1.2 мг/мл.

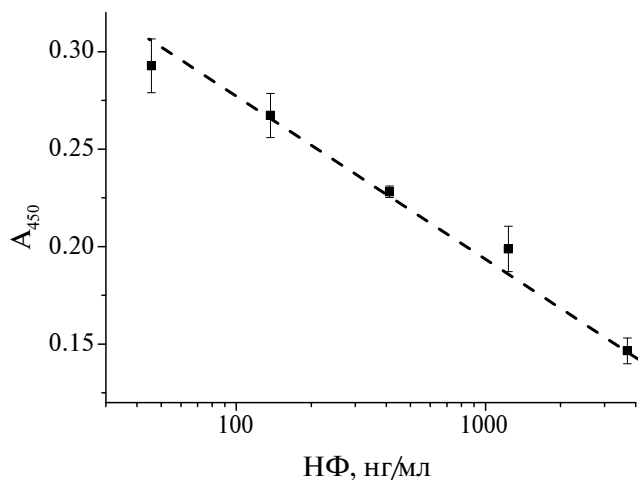


Рис. 3. Характеристика антисыворотки методом ИФА: линейный участок кривой конкурентного взаимодействия ($n = 3$).

Оптическую плотность продукта пероксидазной реакции измеряли при 450 нм с использованием многофункционального планшетного анализатора EnSpire multimode plate reader (Perkin Elmer, США).

Конкурентный иммуноферментный анализ НФ с использованием МЧ. В пробирки Эппендорф вносили растворы НФ в концентрациях от 200 нг/мл до 0/78 нг/мл в 500 мкл смеси метанол : вода (1 : 4), после чего добавляли иммуносорбент на основе МЧ (конечная концентрация 28 мкг/мл) и инкубировали 15 мин. Иммуносорбент трехкратно отмывали ФБСТ с 0.1% БСА с использованием внешнего магнита. Далее добавляли конъюгат НФ-СИТ-биотин (5 мкг/мл), инкубировали 15 мин и повторяли отмывку. Затем в полученные растворы вносили конъюгат стрептавидина с полипероксидазой (1 : 1000), инкубировали еще 10 мин и проводили отмывку, как описано выше. На конечном этапе в пробирки вносили 100 мкл субстрата на основе ТМБ, через 15 минут осаждали МЧ с помощью внешнего магнита, отбирали надосажок, переносили его в лунки микропланшета и останавливали реакцию добавлением 50 мкл 0.1 М H_2SO_4 .

Оптическую плотность продукта пероксидазной реакции измеряли, как описано выше.

Обработка результатов ИФА. Зависимость сигнала — оптической плотности (y) — от концентрации антигена (x) аппроксимировали с помощью программы Origin версии 9.0 (OriginLab, США) с использованием четырехпараметрической сигмоидной функции:

$$y = (a - b) / [1 + (x/c)^d] + b,$$

где a — максимальный сигнал, b — минимальный сигнал, c (или IC_{50}) — точка перегиба, концентрация антигена, ингибирующая 50% связывания антител, d — наклон кривой в точке c .

На основании полученной функции определяли предел обнаружения антигена согласно критерию 3σ .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Принцип анализа. Предлагаемый подход состоит в проведении конкурентного взаимодействия нативного (содержащегося в пробе) и конъюгированного с белком-носителем и биотином антигена со специфическими антителами в сочетании с взаимодействием биотина со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазной меткой, отделением сформированных иммунных комплексов из реакционной среды посредством осаждения носителя (магнитных частиц) с помощью внешнего магнита и регистрации уровня пероксидазной активности, отражающей содержание антигена в пробе.

Данные процессы изображены на рис. 1. На магнитных частицах ковалентно иммобилизован белок G, способный взаимодействовать с иммуноглобулинами (IgG) в сыворотке кролика,

формируя комплекс МЧ-белок G-IgG. При этом на поверхности магнитных частиц Fab фрагмент антител оказывается открытым и доступным для взаимодействия для конкурентов — свободного НФ и конъюгата НФ-СИТ-биотин. Если НФ присутствует в пробе, он взаимодействует с антителами, занимая центры связывания. Если НФ отсутствует, то конъюгат НФ-СИТ-биотин связывается с антителом. На следующей стадии при добавлении конъюгата стрептавидина с полипероксидазой хрена (СТ-пПХ) происходит высокоаффинное связывание биотин-стрептавидина с формированием комплекса состава МЧ-белок G-IgG-НФ-СИТ-биотин-СТ-пПХ. Наличие пероксидазной метки обеспечивает окисление субстрата (ТМБ) в присутствии пероксида водорода с получением окрашенного продукта.

Синтез и характеристика конъюгата гаптен-белок. Конъюгирование НФ с СИТ проводили с помощью реакции Манниха в молярном соотношении 30 : 1. В ходе реакции углерод формальдегида формирует метиленовую группировку, встраиваемую в орто-положение по отношению к фенольному гидроксилу. Эта группа в конъюгате является связующим звеном между аминок группой белка и НФ. Полученный конъюгат охарактеризован методом спектрофотометрии (рис. 2). Максимум поглощения нативного нонилфенола находится при 278 нм, формируя характерное “плечо” белкового пика в спектре конъюгата гаптен-белок. Вычисленная концентрация конъюгата по белку составила 7.4 мг/мл.

Характеристика иммунореагентов в микропланшетном конкурентном ИФА нонилфенола. Для оценки реакционной способности антисыворотки против нонилфенола использовали ИФА с иммобилизацией конъюгата НФ-СИТ в лунках микропланшета [28]. Оптимальное разведение антисыворотки, 1 : 10000, обеспечивало оптическую плотность 1.0 в отсутствие свободного гаптена. Далее в конкурентном ИФА была получена зависимость сигнала от концентрации НФ (рис. 3). Предел обнаружения НФ составил 55 нг/мл, рабочий диапазон определяемых концентраций — от 200 до 1700 нг/мл. Таким образом, препараты антисыворотки и конъюгата гаптен-белок продемонстрировали функциональную активность. Установленные характеристики анализа использовались для сравнения с разрабатываемым методом с применением МЧ.

Синтез конъюгата МЧ с белком G и антисывороткой против НФ. Используемые в данной работе магнитные частицы покрыты полимером с карбоксильными группами. Наличие такой модификации поверхности позволило иммобилизовать белок G ковалентно путем активации карбоксильных групп. Дальнейшее добавление антисыворотки кролика в выбранном разведении 1 : 10000

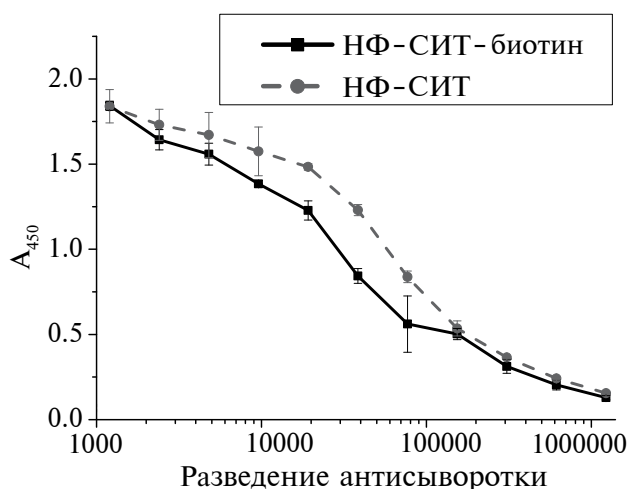


Рис. 4. Проверка сохранения иммунохимической активности конъюгата гаптен-белок до и после биотинилирования ($n = 2$).

позволило получить реагент с направленной ориентацией молекул Ig G.

Препараты были охарактеризованы методом просвечивающей электронной микроскопии. Согласно полученным данным, средний диаметр частиц составил 286 ± 6 нм.

Выбор условий проведения ИФА с использованием МЧ. Для осуществления предложенной схемы ИФА с магнитным концентрированием было проведено биотинилирование полученного конъюгата НФ-СИТ с проверкой сохранения иммунохимической активности. Поскольку конъюгат НФ-СИТ-биотин бифункционален и должен взаимодействовать как с иммуноглобулинами в составе антисыворотки, так и со стрептавидином, то проверка заключалась в тестировании данных взаимодействий. Для этого в лунки микропланшета с иммобилизованными конъюгатами НФ-СИТ и НФ-СИТ-биотин (3 мкг/мл) вносили антисыворотку в разведениях от 1 : 1000 до 1 : 1000000, а затем — антивидовые антитела, меченные пероксидазой хрена, и регистрировали оптический сигнал, генерируемый ферментной меткой в составе иммунных комплексов. Согласно полученным данным, препарат НФ-СИТ до и после биотинилирования функционально активен (рис. 4). Аналогично оценивали реакционную способность биотина, используя конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена (СТ-ПХ). Как видно из рис. 6А, связывание с биотинилированным конъюгатом наблюдается при различных разведениях препарата СТ-ПХ, однако оптическая плотность невысока. Поэтому для увеличения сигнала использовали альтернативный препарат стрептавидина, меченного полипероксидазой (СТ-пПХ). Замена на препарат с увеличенным числом ферментных меток позволила увеличить значение оптической плотности в 9 раз,

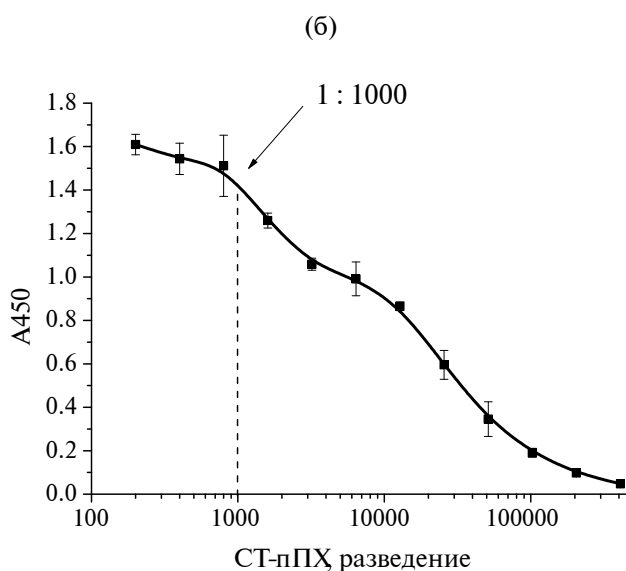
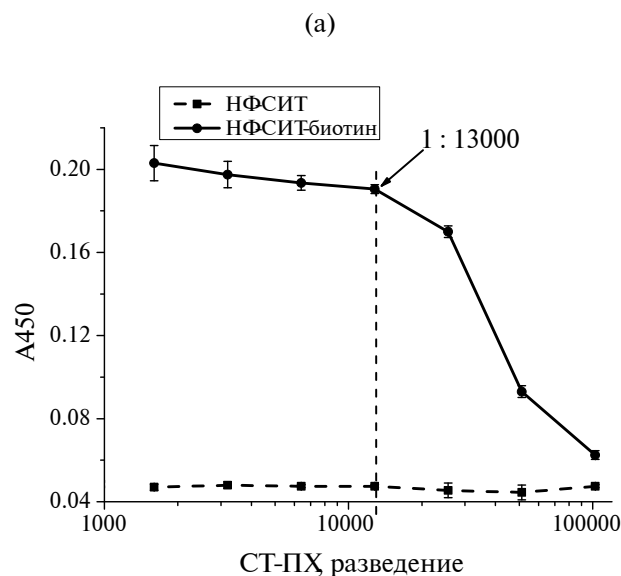


Рис. 5. Проверка связывания биотин-стрептавидин в препарате НФ-СИТ-биотин и выбор концентраций конъюгата СТ-ПХ (А) и СТ-пПХ (Б) ($n = 2$).

сохраняя низкий уровень неспецифического сигнала (рис. 5б). Таким образом, мы подтвердили реакционную способность конъюгата НФ-СИТ-биотин, а также выбрали необходимые разведения реагентов — 1 : 1000 для СТ-пПХ и 1 : 13000 для СТ-ПХ (рис. 5).

Выбор концентрации конъюгата НФ-СИТ-биотин проводили при ее варьировании от 5 до 0.6 мкг/мл. Критерием выбора было достижение наиболее высокого значения оптической плотности; была выбрана концентрация конъюгата 5 мкг/мл (рис. 6).

На следующем этапе определяли оптимальную концентрацию иммуносорбента на основе МЧ. Для

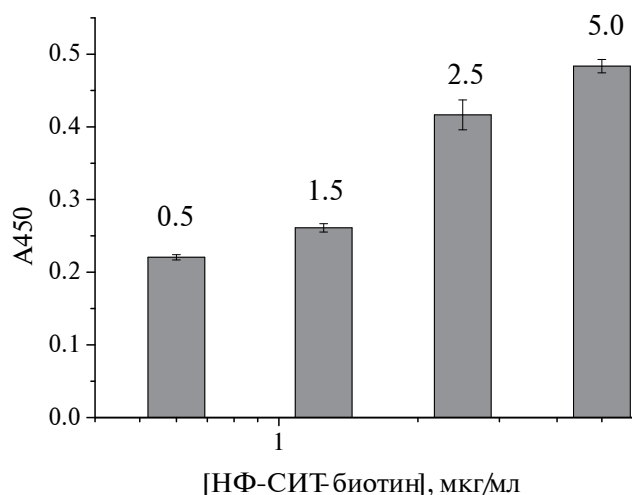


Рис. 6. Выбор оптимальной концентрации МЧ-белок G-IgG (по концентрации магнитных частиц) ($n = 3$).

этого регистрировали взаимодействие полученного препарата в концентрациях от 250 до 9 мкг/мл с поликлональными антителами козы против иммуноглобулинов кролика, меченными пероксидазой хрена. На рис. 7 представлена зависимость оптической плотности при 450 нм от концентрации МЧ. Была выбрана концентрация иммуносорбента, соответствующая ОП 1.0 (совпадающей с традиционным ИФА), которая составила 28 мкг/мл.

ИФА нонилфенола с магнитным концентрированием. С учетом установленных условий проведения ИФА с использованием МЧ было осуществлено определение НФ. В связи с низкой растворимостью НФ в воде его растворы готовили в среде с 20%-ным содержанием метанола. Данная концентрация метанола не приводит к инаktivации антител и потере антигенсвязывающих свойств [29–31]. Содержание метанола на стадии конкуренции совпадало для ИФА с использованием МЧ и для традиционного конкурентного ИФА (рис. 3). Была получена градуировочная кривая определения НФ с применением МЧ (рис. 8). Предел обнаружения составил 3.8 нг/мл, а рабочий диапазон определяемых концентраций — от 6.2 до 33 нг/мл ($IC_{50} = 14.2$ нг/мл). Таким образом, модификация ИФА позволила снизить предел обнаружения в 14.5 раз — с 55 до 3.8 нг/мл. Использование комплексов МЧ с антителами способствует сохранению реакционной способности реагентов и концентрированию анализата, что позволяет регистрировать его низкие концентрации.

Последним этапом разработки было определение объема, из которого возможно провести концентрирование без потери чувствительности анализа. Для этой цели в различных объемах растворителя (от 0.1 до 5.0 мл) были приготовлены пробы, содержащие равное количество НФ. Все

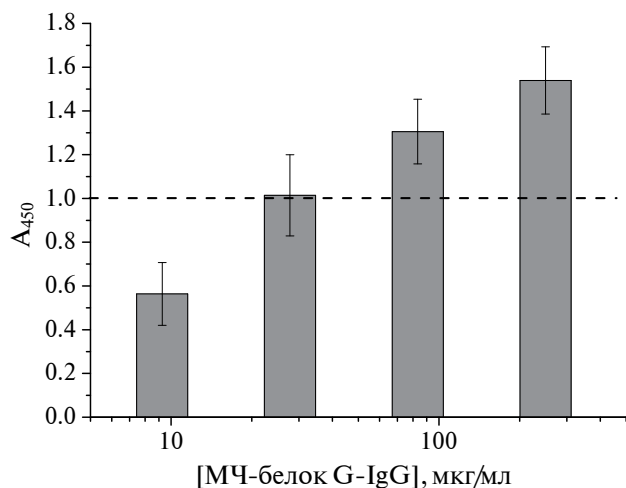


Рис. 7. Определение оптимальной концентрации конъюгата НФ-СИТ-биотин ($n = 2$). Пунктирной линией обозначено отсечение по оптической плотности 1.0.

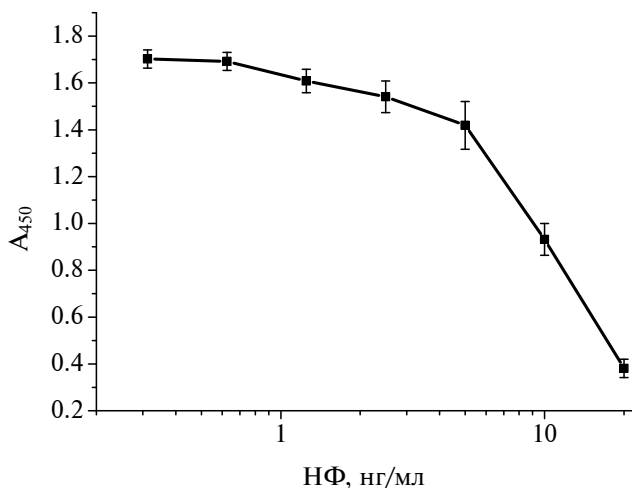


Рис. 8. Градуировочная кривая определения НФ с использованием разработанной системы на основе МЧ ($n = 3$).

стадии анализа с выбранными концентрациями реагентов проводили в малом объеме (30 мкл), за исключением стадии конкуренции. Согласно полученной зависимости от объема пробы (рис. 9), максимальный оптический сигнал достигается при концентрировании пробы из 0,5 мл. Таким образом, применение модифицированных магнитных частиц позволяет сконцентрировать пробу в 17 раз, что имеет большое значение для проб, содержащих следовые количества аналита.

Представленный в данной работе подход интересен по нескольким причинам. Проведение анализа в микропробирках минимизирует неспецифические взаимодействия НФ по сравнению с микропланшетами различной сорбционной емкости. Направленное ориентирование иммуноглобулинов сыворотки кролика при взаимодействии их Fc-фрагментов с белком G позволяет более эффективно проводить конкурентное взаимодействие с НФ — свободным либо в составе конъюгата гаптен-белок. Использование высокоаффинного взаимодействия биотин-стрептавидин, а также полипероксидазы обеспечивает снижение предела обнаружения искомого аналита. Достигнутые значения предела обнаружения НФ соответствуют установленным нормам по его содержанию в воде [12], что доказывает пригодность данного подхода для определения практически востребованных низких концентраций НФ. И, наконец, применение МЧ в качестве носителей иммунных комплексов обеспечивает концентрирование разбавленных проб и выявление следовых количеств НФ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-13-00293).

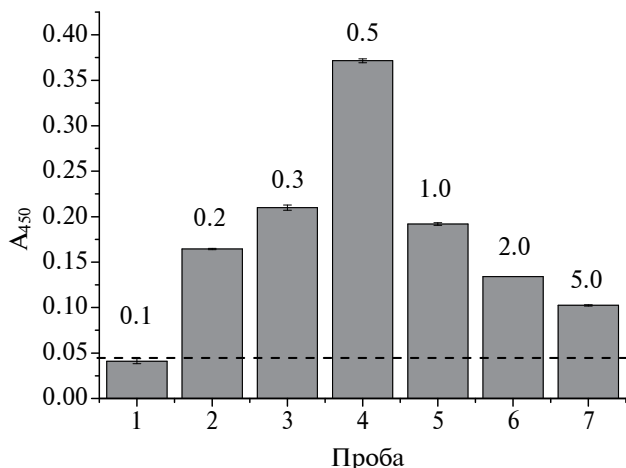


Рис. 9. Зависимость аналитического сигнала в разработанном ИФА на основе МЧ от объема, в котором происходило концентрирование ($n = 3$).

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. Evans A.E.V., Mateo-Sagasta J., Qadir M., Boelee E., Ippolito A. // Curr. Opin. Environ. Sustain. 2019. V. 36. P. 20–27.
2. Zamora-Ledezma C., Negrete-Bolagay D., Figueroa F., Zamora-Ledezma E., Ni M., Alexis F., Guerrero V.H. // Environ. Technol. Innov. 2021. V. 22. Article 101504. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101504>

3. Fang W., Peng Y., Muir D., Lin J., Zhang X. // *Environ. Int.* 2019. V. 131. Article 104994.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104994>
4. Fuller R., Landrigan P.J., Balakrishnan K., Bathan G., Bose-O'Reilly S., Brauer M. et al. // *Lancet Planet. Health.* 2022. V. 6. № 6. P. e535–e547.
5. Palani G., Arputhalatha A., Kannan K., Lakkaboyana S.K., Hanafiah M.M., Kumar V., Marella R.K. // *Molecules.* 2021. V. 26. № 9. Article 2799.
<https://doi.org/10.3390/molecules26092799>
6. Babuji P., Thirumalaisamy S., Duraisamy K., Periyasamy G. // *Water.* 2023. V. 15. № 14. Article 2532.
<https://doi.org/10.3390/w15142532>
7. Bhandari G., Bagheri A.R., Bhatt P., Bilal M. // *Chemosphere.* 2021. V. 275. Article 130013.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130013>
8. Gałazka A., Jankiewicz U. // *Microorganisms.* 2022. V. 10. № 11. Article 2236.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10112236>
9. Morin-Crini N., Lichtfouse E., Liu G., Balaram V., Ribeiro A.R. L., Lu Z. et al. // *Environ. Chem. Lett.* 2022. V. 20. № 4. P. 2311–2338.
10. Chen Y., Yang J., Yao B., Zhi D., Luo L., Zhou Y. // *Environ. Pollut.* 2022. V. 310. Article 119918.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119918>
11. Hong Y., Feng C., Yan Z., Wang Y., Liu D., Liao W., Bai Y. // *Environ. Chem. Lett.* 2020. V. 18. № 6. P. 2095–2106.
12. Careghini A., Mastorgio A.F., Saponaro S., Sezenna E. // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015. V. 22. № 8. P. 5711–5741.
13. Jarda K., Drogui P., Daghrir R. // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016. V. 23. № 4. P. 3195–3216.
14. Lu D., Yu L., Li M., Zhai Q., Tian F., Chen W. // *Chemosphere.* 2021. V. 275. Article 129973.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129973>
15. Noorimotlagh Z., Mirzaee S.A., Martinez S.S., Rachon D., Hoseinzadeh M., Jaafarzadeh N. // *Environ. Res.* 2020. V. 184. Article 109263.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109263>
16. Directive 2013/39/eu of the European parliament and of the council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.
17. Shih H.-K., Shu T.-Y., Ponnusamy V.K., Jen J.-F. // *Anal. Chim. Acta.* 2015. V. 854. P. 70–77.
18. Vargas-Berrones K., Díaz de León-Martínez L., Bernal-Jácome L., Rodríguez-Aguilar M., Ávila-Galarza A., Flores-Ramírez R. // *Talanta.* 2020. V. 209. Article 120546.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120546>
19. Aparicio I., Martín J., Santos J.L., Malvar J.L., Alonso E. // *J. Chromatogr. A.* 2017. V. 1500. P. 43–52.
20. Yin H.-L., Zhou T.-N. // *Chinese J. Anal. Chem.* 2022. V. 50. № 8. Article 100112.
<https://doi.org/10.1016/j.cjac.2022.100112>
21. Céspedes R., Skryjová K., Raková M., Zeravik J., Fránek M., Lacorte S., Barceló D. // *Talanta.* 2006. V. 70. № 4. P. 745–751.
22. Matsui K., Kawaji I., Utsumi Y., Ukita Y., Asano T., Takeo M., Kato D.-i., Negoro S. // *J. Biosci. Bioeng.* 2007. V. 104. № 4. P. 347–350.
23. Yakovleva J.N., Lobanova A.Y., Shutaleva E.A., Kourkina M.A., Mart'ianov A.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Eremin S.A. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 378. № 3. P. 634–641.
24. Ermolaeva T.N., Dergunova E.S., Kalmykova E.N., Eremin S.A. // *J. Anal. Chem.* 2006. V. 61. № 6. P. 609–613.
25. Badea M., Nistor C., Goda Y., Fujimoto S., Dosho S., Danet A., Barceló D., Ventura F., Emnéus J. // *Analyst.* 2003. V. 128. № 7. P. 849–856.
26. Mart'ianov A.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B. // *Int. J. Env. Anal. Chem.* 2004. V. 84. № 13. P. 965–978.
27. Mart'ianov A.A., Dzantiev B.B., Zherdev A.V., Eremin S.A., Céspedes R., Petrovic M., Barcelo D. // *Talanta.* 2005. V. 65. № 2. P. 367–374.
28. Berlina A.N., Komova N.S., Serebrennikova K.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Engineering Proceedings.* 2023. V. 48. № 1. Article 9.
<https://doi.org/10.3390/CSAC2023-14919>
29. Berlina A.N., Ragozina M.Y., Gusev D.I., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Chemosensors.* 2023. V. 11. № 7. Article 393.
<https://doi.org/10.3390/chemosensors11070393>
30. Kuang H., Liu L., Xu L., Ma W., Guo L., Wang L., Xu C. // *Sensors.* 2013. V. 13. № 7. P. 8331–8339.
31. Kato M., Ihara Y., Nakata E., Miyazawa M., Sasaki M., Kodaira T., Nakazawa H. // *Food and Agricultural Immunology.* 2007. V. 18. № 3–4. P. 179–187.

Development of Microplate Immunoenzyme Determination of Nonylphenol with Magnetic Sample Concentration

A. N. Berlina^a, L. V. Barshevskaya^a, K. V. Serebrennikova^a, N. S. Komova^a,
A. V. Zherdev^a, and B. B. Dzantiev^{a, *}

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

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

Nonylphenol is an aromatic organic compound that has an estrogen-like effect and has a negative effect on the human endocrine system. A method has been developed for the competitive determination of nonylphenol using magnetic particles, rabbit antiserum, nonylphenol conjugate with soybean trypsin inhibitor (STI) and biotin. The principle of the analysis is the formation of immune complexes on the surface of magnetite particles due to covalent immobilization of protein G through the oriented immobilization of polyclonal antibodies from rabbit serum during a competitive reaction between the free analyte (nonylphenol) and the bound one (as part of the nonylphenol-STI-biotin conjugate) for the binding sites of specific antibodies. The detection of formed immune complexes is proposed to be carried out using a streptavidin-polyperoxidase conjugate, which makes it possible to achieve a nine-fold gain in the level of the analytical signal. The developed ELISA using magnetite particles allows us to achieve a detection limit of nonylphenol at the level of 3.8 ng/ml, which is 14.5 times lower in comparison with the classical competitive ELISA (55 ng/ml). Based on the results of the experimental work, the optimized volume of the test sample was 500 μ l, which makes it possible to concentrate low-contaminated samples by 17 times.

Keywords: nonylphenol, enzyme immunoassay, magnetite nanoparticle, magnetic concentration