



ИНДУКЦИЯ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ СОЕДИНЕНИЯМИ СЕЛЕНА В МИЦЕЛИИ *Aspergillus niger*

© 2023 г. П. А. Полубояринов*, #, А. В. Кузнецова*, И. Я. Моисеева*,
Н. И. Микуляк*, А. П. Каплун**

*ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет», Россия, 440026 Пенза, ул. Красная, 40

**Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий
имени М.В. Ломоносова), Россия, 125190 Москва, Ленинградский просп., 80, к. 5

Поступила в редакцию 28.09.2022 г.

После доработки 10.10.2022 г.

Принята к публикации 12.10.2022 г.

Исследование индукции антиоксидантной активности соединениями селена (Na_2SeO_3 , диацетофенонилселенид (ДАФС-25), L-селеноцистин) в различных организмах представляет интерес как механизм защиты клеточных мембран от окислительного стресса. Методом кулонометрического определения электрогенерированными титрантами (бромом и иодом) проведена сравнительная оценка антиоксидантной активности 23 аминокислот. Показано, что активность уменьшается в следующем ряду: цистин > триптофан > L-селеноцистин > тирозин > 3,3'-диметил-L-селеноцистин > метионин. С иодом взаимодействуют только аминокислоты-антиоксиданты, которые содержат более активные восстановители — сульфгидрильные и селенольные группы: цистеин > селеноцистеин > трео-3-метил-L-селеноцистеин. Вероятно, коррекция антиоксидантного статуса на уровне аминокислот реализуется за счет наличия сульфгидрильных и селенольных групп в радикалах. Если сульфгидрильных и селенольных групп окажется недостаточно, в роли перехватчиков-восстановителей будут действовать цистин, L-селеноцистин, а также триптофан, тирозин и метионин. Обнаружено, что селенсодержащие соединения дозозависимо индуцируют как общую антиоксидантную активность мицелия гриба *Aspergillus niger* Tiegh., так и показатели активности антиоксидантной системы (аминокислотный состав и фермент каталазу), что в свою очередь стимулирует накопление биомассы. Наибольший эффект в индукции общей антиоксидантной активности (3.4–5.5 раза) оказывали ДАФС-25 и селенит натрия в самой высокой концентрации (0.025 мг Se/л), более низкие концентрации (0.0025–0.00025 мг Se/л) оказывали меньший эффект (25.8–41.7%). Антиоксидантная активность в пробах с L-селеноцистином повышалась на 1.6–43.3%. Отмечается, что иодная антиоксидантная активность в мицелии в целом была ниже бромной. Все исследуемые соединения селена стимулировали рост биомассы мицелия *A. niger* (селенит натрия и L-селеноцистин при 0.025 мг Se/л), эффект липофильного ДАФС-25 проявлялся при более низкой концентрации. Также в пробах с ДАФС-25 отмечено более высокое общее содержание аминокислот, активация каталазы и накопление аминокислот-антиоксидантов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в присутствии соединений селена дозозависимо активируется антиоксидантная система мицелия гриба *A. niger*, что связано с влиянием этих соединений на систему белкового обмена и накопление биомассы.

Ключевые слова: соединения селена, антиоксидантная активность, каталаза, мицелий

DOI: 10.31857/S0132342323040371, **EDN:** ODQTVF

ВВЕДЕНИЕ

Снижение активности антиоксидантной системы, которая не позволяет преодолевать негативные последствия окислительного стресса (избыточный уровень свободных радикалов в клетках) — основная причина старения и гибели

организмов [1]. Следует отметить, что свободные радикалы (в частности, кислородсодержащие) обладают неоднозначным влиянием на биохимические процессы и обмен веществ в клетках. С одной стороны, практически все системы жизнеобеспечения, системы обмена липидов и активности мембраносвязанных ферментов, ионного транспорта, энергопродуцирующих процессов, репликации ДНК требуют определенной концентрации свободных радикалов, с другой — избыток свободных радикалов приводит к окислительно-

Сокращения: GPX — глутатионпероксидаза; ДАФС-25 — диацетофенонилселенид.

Автор для связи: (тел.: +7 (950) 230-48-76; эл. почта: poluboyarinovpavel@yandex.ru).

му стрессу и повреждению клеточных структур. Показано, что низкая активность антиоксидантной системы – ограничитель ростостимулирующих процессов [2].

В норме в организме действует сбалансированная система антиоксидантной регуляции свободнорадикальных процессов, один из компонентов которой – селен (Se). Селен – это единственный ультрамикроэлемент, включенный в полипептидную цепь белков в виде остатка аминокислоты селеноцистеина (Sec). Белки, которые содержат остаток Sec, определяются как селенопротеины, присутствуют во всех таксонах живых организмов (археи, бактерии, эукариоты) и имеют ключевое значение из-за их антиоксидантной активности [3].

Роль селена заключается в повышении степени надежности функционирования клеточных мембран на фоне высокой концентрации радикалов. Это достигается активацией селеном работы ферментов глутатионпероксидаз (GPX). У человека различают восемь форм GPX, пять из которых (GPX1, 2, 3, 4 и 6) селензависимы – содержат остаток селеноцистеина в активном центре. Селензависимые GPX преобладают у позвоночных, тогда как гомологи GPX, у которых вместо селеноцистеинового остатка в активном центре находится остаток цистеина, найдены у растений, дрожжей, простейших и бактерий [4].

Неорганические соли селена (селенат и селенит натрия) и органические соединения селена – эбселен (2-фенилбензоселеназол-1,2-3(2н)-он) [5], селенопиран (9-фенил-сим-нона-гидро-10-селена-антрацен) [6], диацетофенонилселенид (препарат ДАФС-25, 1,5-дифенил-3-селенапентадион-1,5) [7], – стимулируют рост и накопление биомассы у бактерий, грибов, сельскохозяйственных животных и птицы [2], а также активируют ряд ферментов: каталазу, пероксидазу, супероксиддисмутазу, глутатиопероксидазы у растений [8, 9], бактерий [10], насекомых [11], ракообразных [12], сельскохозяйственных животных и птицы [13, 14]. Кроме того, различные соединения селена могут индуцировать увеличение антиоксидантной активности за счет увеличения концентрации аскорбиновой кислоты, полифенолов и флавоноидов в растениях и грибах [15], однако механизм этого явления малоизучен.

Очевидно, что прежде чем попасть в клетку, ткань и организм в целом, соединения селена взаимодействуют с плазматической мембраной, модифицируя ее и вызывая различного рода биологические эффекты [16]. Более того, продукты биологической трансформации соединений селена в виде селенопротеинов-ферментов также модифицируют клеточные мембраны. Вероятнее всего, что и ростостимулирующий эффект селена реализуется за счет повышения устойчивости

клеточных мембран к повреждающему воздействию свободных радикалов. В этом состоит принципиальное отличие селена от других эндогенных и экзогенных антиоксидантов, которые способны только к перехвату свободных радикалов, частично за счет отдачи электрона или атома водорода и превращению в малоактивные радикальные формы.

Влияние соединений селена на механизм свободнорадикального регулирования обменных процессов позволяет целенаправленно осуществлять выбор объектов для исследования использованных в нашей работе веществ. Большое значение также имеют форма и концентрация селена, поэтому нами в работе были использованы неорганическая соль селена – селенит натрия, селеносодержащая аминокислота L-селеноцистин и селеносодержащий ксенобиотик ДАФС-25 в различных концентрациях. Общим химическим свойством данных соединений селена выступает их способность взаимодействовать как с сульфгидрильными группами клеточных мембран, так и с тиолами цитоплазмы [17].

Совершенно очевидно, что для исследования соединений селена должны быть выбраны объекты биосферы с очень высоким уровнем обмена веществ, у которых концентрация свободных радикалов высока и близка к критической. Либо это объекты, обладающие низкой стрессоустойчивостью, в которых стрессовые воздействия легко повышают концентрацию радикальных частиц до максимально безопасного уровня. К таковым следует отнести растения и грибы, которые генетически запрограммированы на быстрый рост и высочайший уровень обмена веществ. Также не следует искать выраженный отклик на воздействие соединений селена в случае медленно растущих организмов, интенсивность обмена у которых невелика, а концентрация радикальных частиц далека от критической.

Цель работы заключалась в изучении влияния соединений селена на индукцию антиоксидантной системы и рост биомассы гриба-микромикета *Aspergillus niger* Tiegh.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антиоксидантная активность аминокислот. Ввиду большого значения, придаваемого аминокислотам как антиоксидантам, и для изучения возможного влияния соединений селена на синтез аминокислот *in vivo* нами был применен метод кулонометрического титрования для определения антиоксидантной активности 23 аминокислот. В качестве кулонометрических титрантов-окислителей использовали электрогенерированные бром и иод. Электрохимическое окисление бромид-ионов на платиновом электроде в кислых

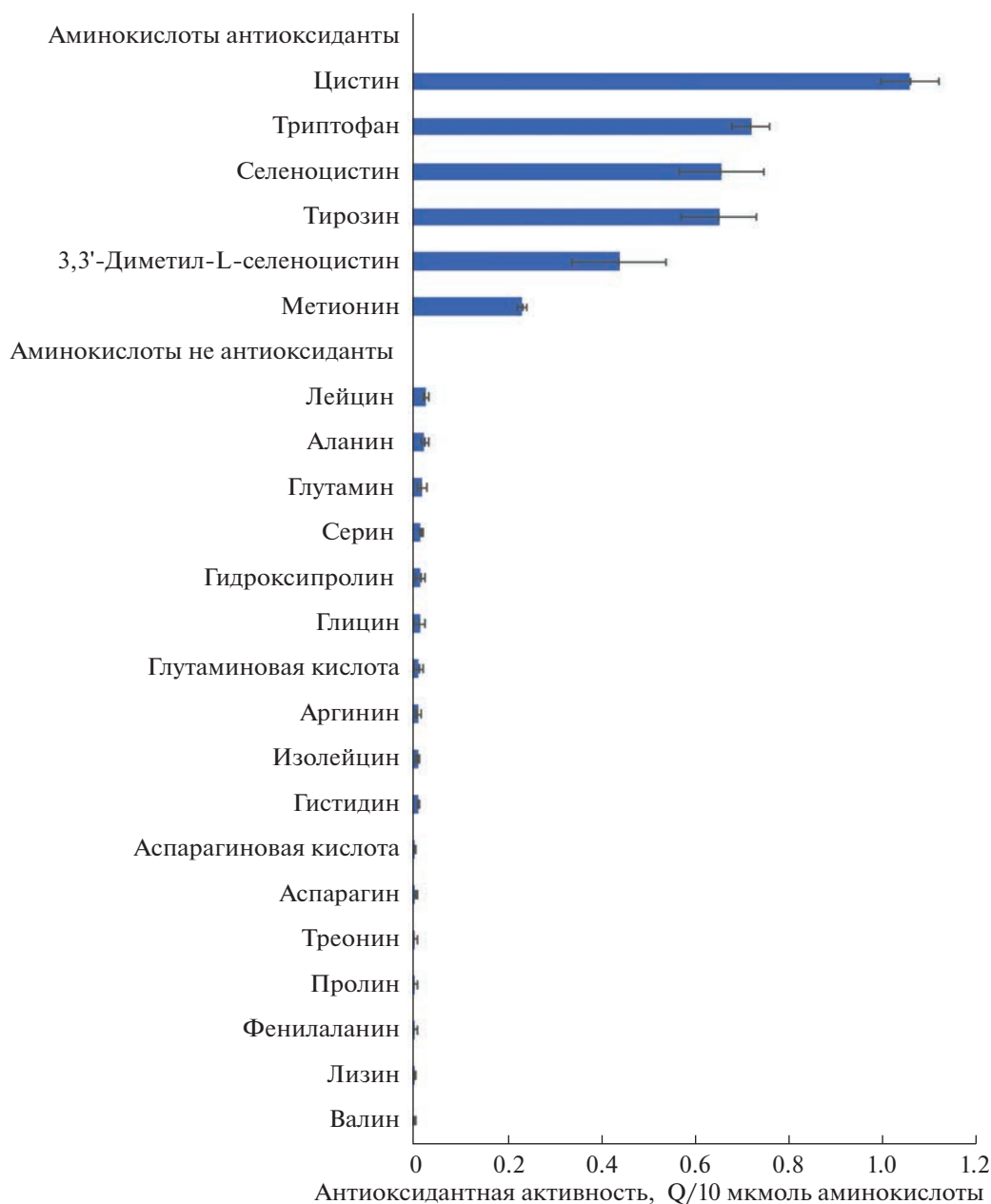


Рис. 1. Антиоксидантная активность аминокислот (окислитель — электрогенерированный бром).

средах может приводить к образованию Br_3^- , Br_2 , а также короткоживущих радикалов брома (Br^*), адсорбированных на поверхности платинового электрода [18]. Образующиеся соединения брома и сам бром легко вступают в радикальные и окислительно-восстановительные реакции, а также реакции электрофильного замещения и присоединения по кратным связям [19].

Обнаружено, что наибольшей антиоксидантной активностью обладают шесть аминокислот, и эта активность уменьшается в следующем ряду: цистин > триптофан > L-селеноцистин > тирозин >

> 3,3'-диметил-L-селеноцистин > метионин. Следует отметить, что все эти аминокислоты содержат окисляемые боковые радикалы. При сравнении серо- и селенсодержащих аминокислот выявлено, что цистин проявляет более высокую антиоксидантную активность, чем L-селеноцистин и 3,3'-диметил-L-селеноцистин, наименее выражена антиоксидантная активность метионина. Практически не проявляли антиоксидантную активность 17 протеиногенных аминокислот (рис. 1).

Кулонометрический метод окислительного галогенирования бромом растворов 23 аминокислот позволил определить высокую антиоксидантную

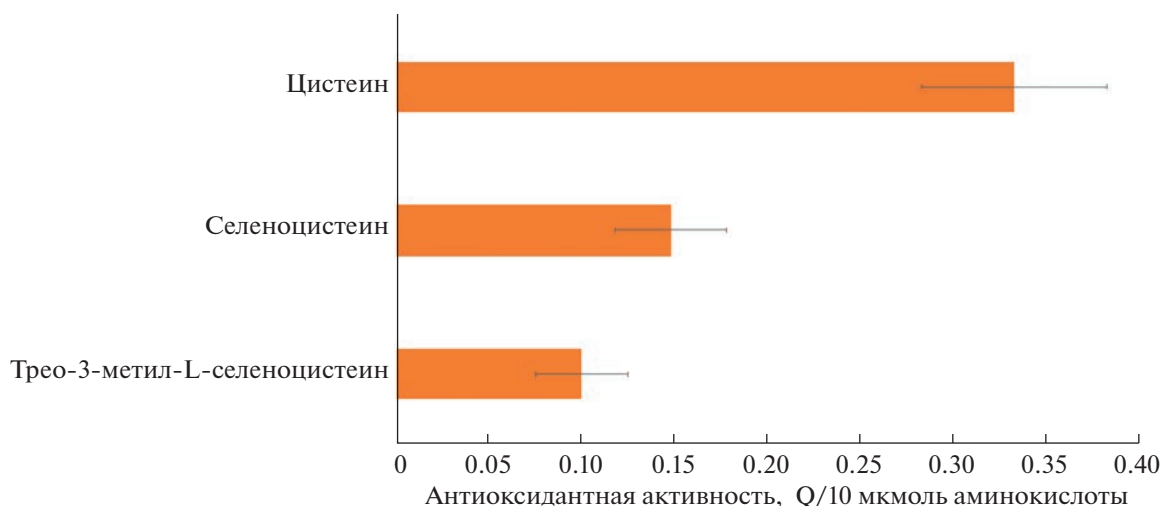


Рис. 2. Антиоксидантная активность аминокислот (окислитель – электрогенерированный иод).

активность шести аминокислот, уменьшающуюся в следующем ряду: цистин > триптофан > L-селеноцистин > тирозин > 3,3'-диметил-L-селеноцистин > метионин.

Все активные в отношении антиоксидантных свойств аминокислоты, взаимодействующие с электрогенерированным бромом, не взаимодействовали с иодом, (более слабым окислителем). По-видимому, для взаимодействия с иодом требуется наличие открытых (более активных восстановителей) антиоксидантных групп в боковом радикале аминокислоты, например, сульфгидрильных ($-SH$) или селенольных ($-SeH$) групп.

Для получения таких сульфгидрильных и селенольных групп цистин, L-селеноцистин и 3,3'-диметил-L-селеноцистин восстанавливали боргидридом натрия в инертной атмосфере, перемешивали в течение 0,5 ч, а затем добавляли серную кислоту до pH 2,0 для распада остаточного количества боргидрида и протонирования антиоксидантных групп. Как и в варианте с бромом, наибольшую антиоксидантную активность наблюдали у серосодержащей аминокислоты – цистеина, а селеноцистеин и трео-3-метил-L-селеноцистеин были менее активны (рис. 2).

Вероятно, серо- и селенсодержащие аминокислоты с сульфгидрильными и селенольными группами (цистеин, селеноцистеин и трео-3-метил-L-селеноцистеин) взаимодействуют с менее активными радикалами, в то время как аминокислоты с частично окисленными дисульфидными и диселенидными связями (цистин, L-селеноцистин, 3,3'-диметил-L-селеноцистин), как относительно слабые восстановители, нейтрализуют более активные радикалы, обеспечивая разные уровни антиоксидантной защиты.

Таким образом, если аминокислот-антиоксидантов первого уровня с сульфгидрильными и селенольными группами окажется недостаточно, для эффективного обезвреживания радикалов в роли перехватчиков-восстановителей будут действовать цистин, L-селеноцистин, а также триптофан, тирозин и метионин.

Очевидно, что аминокислоты L-цистеин/L-цистин обладают более высокой антиоксидантной активностью по сравнению с L-селеноцистеином/L-селеноцистином, что связано, по-видимому, с типом взаимодействия сульфгидрильной ($-SH$) и селенольной группы ($-SeH$) аминокислот: нуклеофильная атака на атом селена протекает через присоединение-элиминирование и имеет значительно меньшую энергию активации, чем нуклеофильная атака на атом серы, которая протекает по S_N2 -механизму [20]. Таким образом, серосодержащие аминокислоты более устойчивы к окислению и обладают большей емкостью в отношении связывания свободных радикалов по сравнению с селенсодержащими аминокислотами, из которых селен элиминирован. В то же время более высокая поляризуемость селенолов делает их более сильными нуклеофилами, чем соответствующие производные серы. Кроме того, энергия диссоциации связи $Se-Se$ (46 ккал/моль) по сравнению со связью $S-S$ (64 ккал/моль) значительно меньше [21]. Поэтому реакции селенол/диселенидного обмена протекают в $\sim 10^7$ раз быстрее, чем реакции тиол/дисульфидного обмена [22].

Очевидно, что данные свойства обуславливают каталитические преимущества L-селеноцистеина по сравнению с L-цистеином в активном центре тиоредоксинредуктазы млекопитающих. Также наличие L-селеноцистеина в ферментах рассматривается как способность противостоять

необратимому окислению. Окисление L-селеноцистеина до R-SeOH обратимо, в отличие от L-цистеина, который легко необратимо окисляется до R-SO²⁻ или R-SO³⁻, что приводит к инактивации ферментов. Предполагается, что такие циклические окислительно-восстановительные переходы R-Se⁻—R-SeOH в селенопротеинах могут не только служить механизмом редокс-регуляции клеточных процессов, но и защищать от чрезмерного окисления и инактивации [23].

Влияние селеносодержащих соединений на рост биомассы и активацию фермента каталазы *A. niger*. Из сообщества объектов биосферы высокой отзывчивостью на селен обладают грибы, что обусловлено их уникально высокой скоростью роста в сочетании с адекватно высоким уровнем обмена веществ и, как следствие, высокой концентрацией свободных радикалов, близкой к критическому уровню. Вследствие этого грибы накапливают селен и положительно отзываются на добавки микроэлемента, который выступает стимулятором роста и адаптогеном [24]. Ростостимулирующая активность селена в отношении различных в таксономическом отношении грибов отмечается в большом количестве работ (см. монографию Блинохватава с соавт. [2] и ссылки в ней). Также важна форма поступающего селена [17].

Каталаза (CAT, К.Ф. 1.11.1.6) — фермент, не содержащий селена, но участвующий в антиоксидантной защите организма от свободных радикалов. Каталаза катализирует превращение перекиси водорода до молекулярного кислорода и воды, эффективно защищая клетки от возможного окисления.

После добавления в культуральную жидкость раствора селенита натрия происходит стимуляция биомассы гриба, наиболее активно в высоких концентрациях (рис. 3а) и в течение всего времени опыта. Стимуляция биомассы гриба селеном постепенно повышается с 7-е на 21-е сутки и снижается на 28-е сутки.

Наиболее значимое накопление биомассы мицелия *A. niger* в течение всего опыта наблюдалось в варианте с самой высокой концентрацией Na₂SeO₃ — на 31% выше по сравнению с контролем. В других вариантах опыта накопление биомассы было менее значительным, за исключением варианта с самой низкой концентрацией, при использовании которой накопление биомассы к 28-м суткам превосходило контроль на 32.6%.

Селенит натрия (Na₂SeO₃) оказывает существенное влияние на активность каталазы в мицелии *A. niger* (рис. 3б). Сразу после добавления селенита натрия в питательную среду повышалась активность каталазы, причем наибольшая активность отмечалась в варианте со средней концентрацией соли (0.0025 мг Se/л) и низкой концентрацией соли — (0.00025 мг Se/л) — на 96.8 и 42.9%, ме-

нее значительно она изменялась при высокой концентрации (0.025 мг Se/л) — на 30.2%. Однако к 14, 21 и 28-м суткам значимо отличался от контроля только вариант с самой высокой концентрацией (на 56.5, 19.0 и 22.7% соответственно), в отличие от средней и низкой концентраций, при использовании которых активность фермента была близка к контролю. По-видимому, при действии высокой концентрации дольше проявляется воздействие селенита натрия, как тиолового яда, на сульфгидрильные группы гиф грибов, а среднее значение активности каталазы в мицелии *A. niger* также указывает на дозозависимую стимуляцию селенитом натрия активности этого фермента.

Аминокислота L-селеноцистин схожим образом стимулирует рост биомассы мицелия, как и в опыте с селенитом натрия (рис. 4а). В высокой концентрации (0.025 мг Se/л) L-селеноцистин наиболее стабильно стимулировал рост биомассы в течение всего опыта, и к 28-м суткам масса мицелия превосходила контроль на 7.1%. В остальных вариантах масса мицелия мало отличалась от контроля.

Добавление аминокислоты L-селеноцистина в питательную среду также стимулировало активность каталазы в мицелии *A. niger* (рис. 4б). Характер и степень повышения активности каталазы *A. niger* после добавления L-селеноцистина во многом схожи с показателями в опыте с селенитом натрия. Однако самая высокая концентрация селеносодержащей аминокислоты стабильно повышала активность каталазы в течение всего опыта: на 7-е сутки — на 113.5%, на 14-е — на 56.5%, на 21-е — на 19.0% и на 28-е — на 22.7%. Средняя и низкая концентрации аминокислоты менее значительно активировали каталазу — на 16.2–4.3%.

Диациетофенонилселенид (ДАФС-25) в самой высокой концентрации сначала ингибировал, а затем, на 21-е сутки, стимулировал рост биомассы (рис. 5а). Наибольшей стимулирующей активностью обладала самая низкая (0.00025 мг Se/л) и средняя (0.0025 мг Se/л) концентрации ДАФС-25, однако к концу опыта активность снижалась до значений контроля.

В целом липофильный ксенобиотик ДАФС-25 вызывал намного более сильную индукцию активности каталазы, чем полярные селенит натрия и L-селеноцистин (рис. 5б). Так, активность каталазы возрастала сразу после добавления селеносодержащего ксенобиотика и увеличивалась дозозависимо в 3.6, 5.4 и 7.6 раза, в пробах с концентрацией ДАФС-25 0.025, 0.0025 и 0.00025 мг Se/л соответственно. В образцах с наиболее высокой концентрацией (0.025) эффект активации фермента сохранялся до 21 суток, тогда как в вариантах с более низкими концентрациями активность была близка к контролю.

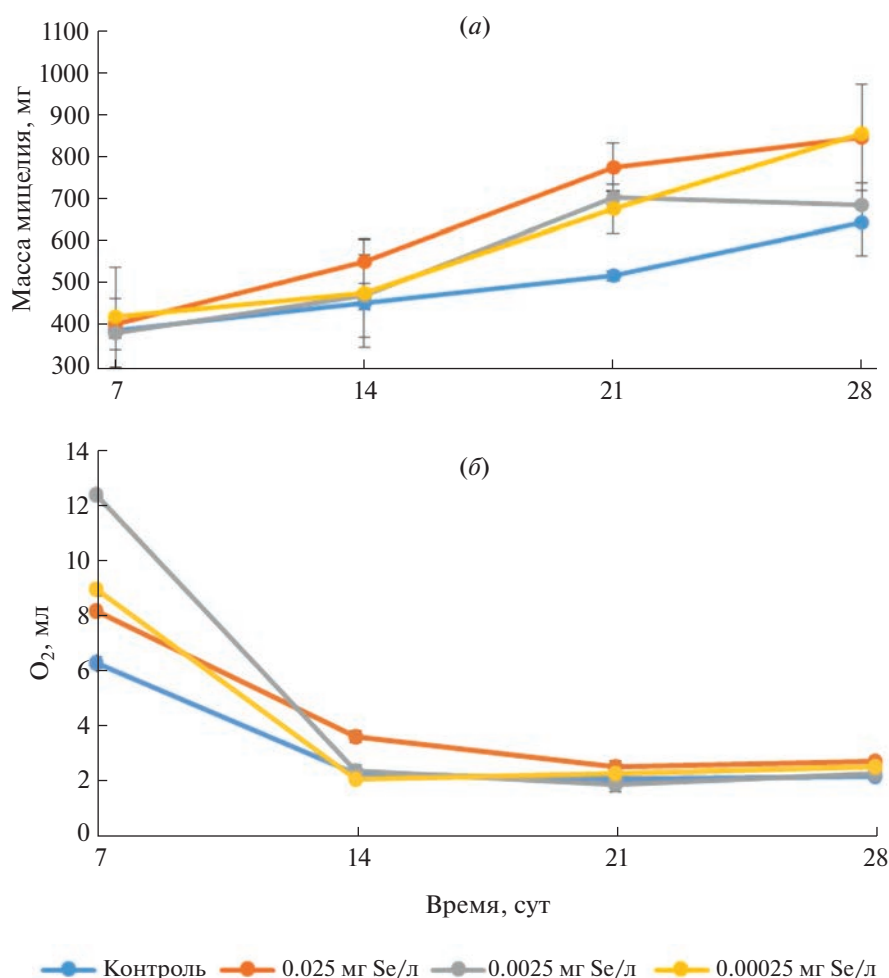


Рис. 3. (а) — Влияние селенита натрия на стимуляцию роста биомассы гриба *A. niger*; (б) — влияние селенита натрия на активность каталазы в мицелии *A. niger*. По оси ординат — выделение O₂ мл на 100 мг сырой массы ткани; по оси абсцисс — время обработки, начиная с 7 суток от момента инокуляции культуральной жидкости.

Селеносодержащие соединения, используемые в исследовании, должны снижать ферментативную активность оксидаз за счет инактивации металлсодержащих простетических групп ферментов селеноводородом (H₂Se), который генерируется при взаимодействии с тиолами клетки и ферментативно [17]. Но в ходе эксперимента наблюдалось четкое, зависимое от концентрации селена увеличение активности каталазы. Можно предположить, что высокие концентрации селеносодержащих соединений вызывают оксидативный стресс, в ответ на который индуцируется активность ферментов, утилизирующих перекись водорода. Однако времени для индукции ферментов было слишком мало: активность ферментов повышалась практически сразу и нарастала в течение суток после добавления соединений селена. Вероятнее всего, увеличение активности каталазы связано со взаимодействием селеносодержащих соединений с сульфгидрильными группами клеточных мембран, истечением электролитов, увеличе-

нием концентрации белка в клетке и, соответственно, увеличением активности фермента [25].

Индукция антиоксидантной активности в мицелии гриба. Добавление различных концентраций селеносодержащих соединений в питательную среду приводило к индукции антиоксидантной активности в мицелии гриба *A. niger* (рис. 6).

Наибольший эффект в индукции антиоксидантной активности вызывали ксенобиотик ДАФС-25 и селенит натрия в самой высокой концентрации, превышая контроль в 3.4–5.5 раза соответственно. Эти соединения в средней и низкой концентрациях действовали намного слабее, превосходя контроль на 25.8–41.7%, кроме варианта с ДАФС-25, в котором антиоксидантная активность увеличилась в 3.1–4.12 раза. Аминокислота L-селеноцистин также индуцировала антиоксидантную активность, превосходя контроль на 1.6–43.3%. Вероятно, эффект различных селеносодержащих соединений в индукции антиок-

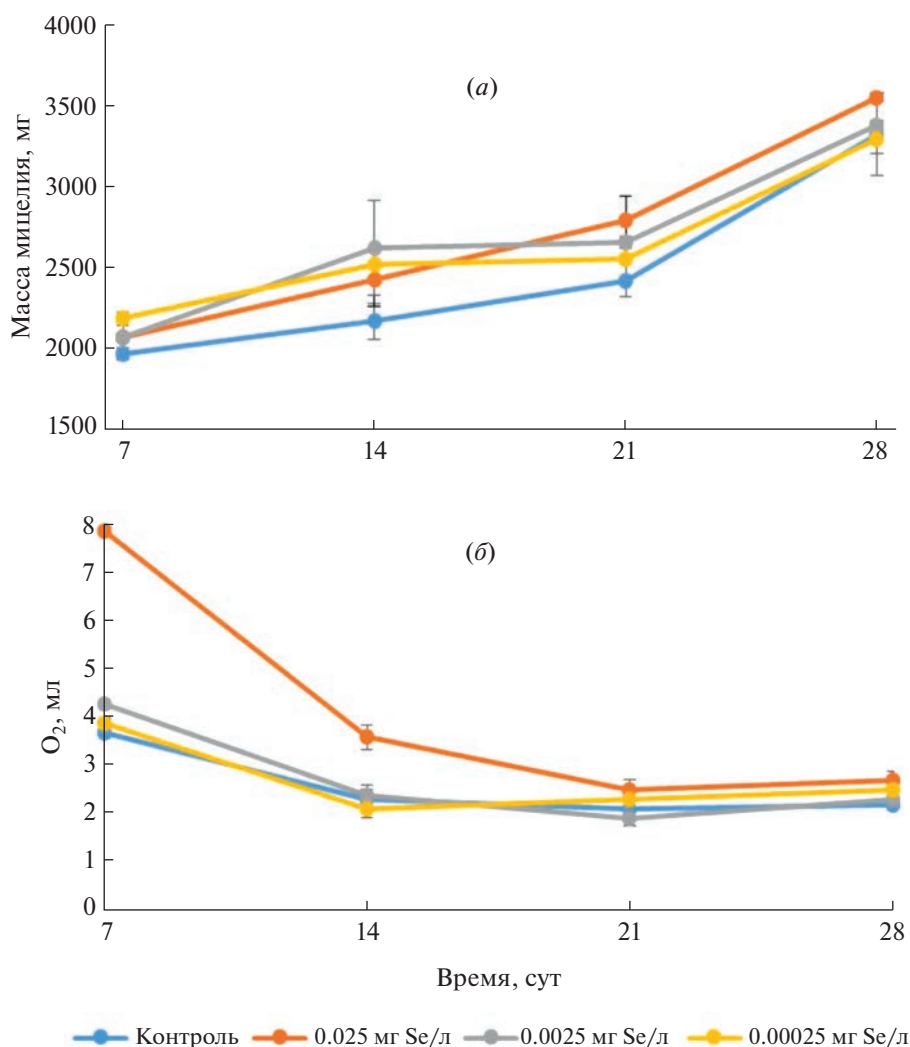


Рис. 4. (а) — Влияние L-селеноцистина на накопление биомассы гриба *A. niger*; (б) — влияние L-селеноцистина на активность каталазы в мицелии *A. niger*. По оси ординат — выделение O₂ мл, на 100 мг сырой массы ткани; по оси абсцисс — время обработки, начиная с 7 суток от момента инокуляции.

сидантной активности связан как с липофильностью молекул, так и с растворимостью в водных растворах: в отличие от L-селеноцистина, селенит натрия хорошо растворим в воде, а органическая молекула ДАФС-25 липофильна и может проходить через клеточные стенки.

При определении сильных антиоксидантов в мицелии гриба, с электрогенерированным иодом их концентрация уменьшалась примерно на порядок. Однако общая тенденция увеличения антиоксидантной активности селенсодержащими соединениями, особенно в высоких концентрациях, сохранялась (рис. 7).

В целом при определении антиоксидантной активности с электрогенерированным иодом просматривалась общая тенденция, как и с электрогенерированным бромом — наибольший эффект по увеличению антиоксидантной актив-

сти проявили ДАФС-25 и селенит натрия в самой высокой концентрации, превосходя контроль в 6.3 и 6.1 раз соответственно. Намного слабее антиоксидантную активность индуцировала аминокислота L-селеноцистин.

Следует отметить, что увеличение количества антиоксидантов, особенно в вариантах с высокими концентрациями соединений селена, коррелировало с увеличением накопления биомассы мицелия, что указывает на взаимосвязь данных процессов.

Влияние ксенобиотика ДАФС-25 на аминокислотный состав *A. niger*. Опубликовано несколько исследований, посвященных влиянию соединений селена на азотистый обмен и содержание отдельных аминокислот, в которых отмечали как увеличение суммарного содержания аминокислот при добавлении соединений селена, так и по-

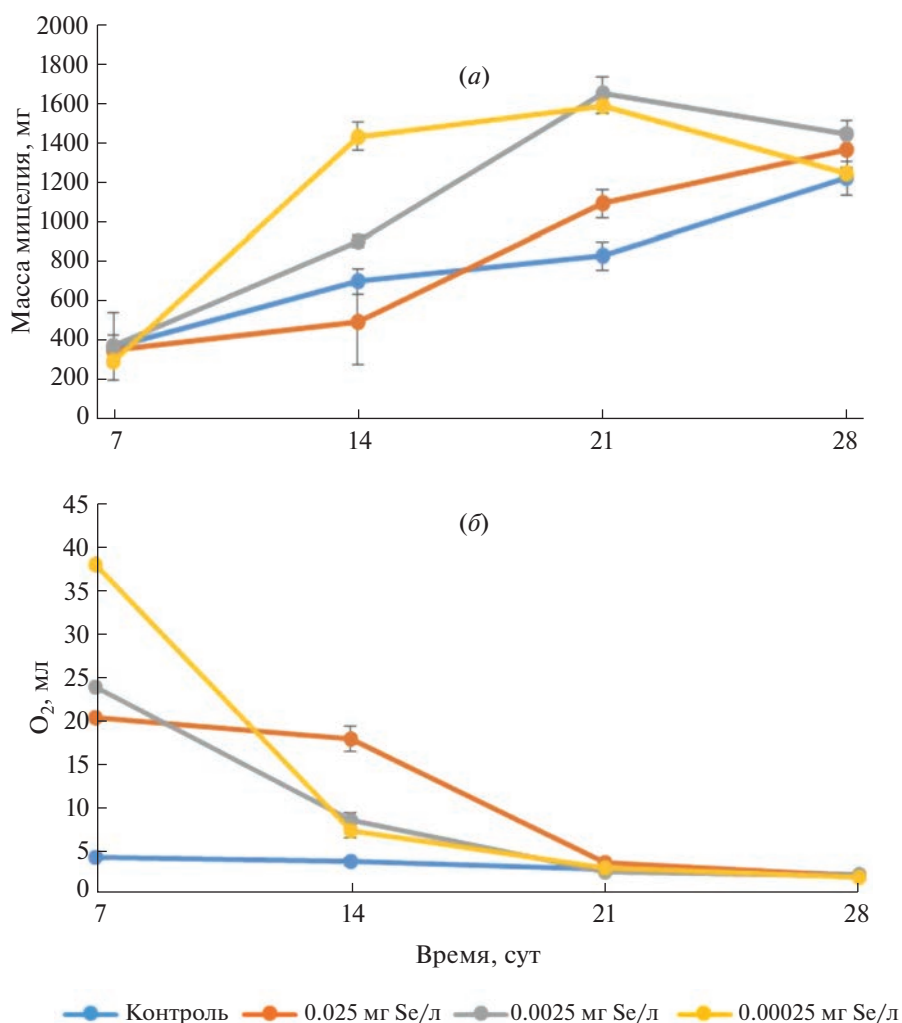


Рис. 5. (а) – Влияние диацетофенилселенида (ДАФС-25) на стимуляцию роста биомассы мицелия гриба *A. niger*; (б) – влияние ДАФС-25 на активность каталазы в мицелии *A. niger*. По оси ординат – выделение O₂ мл, на 100 мг сырой массы ткани; по оси абсцисс – время обработки, начиная с 7 суток от момента инокуляции.

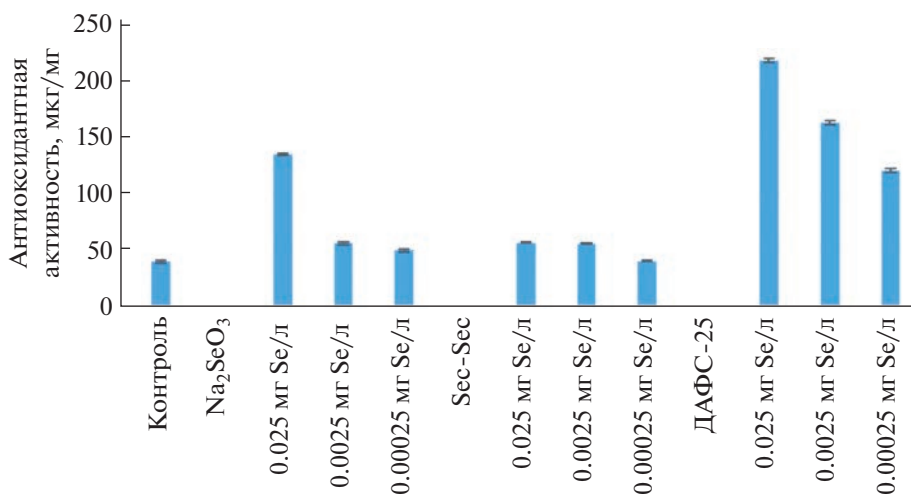


Рис. 6. Антиоксидантная активность мицелия *A. niger* (с электрогенерированным бромом, по аскорбиновой кислоте, мкг/мг).

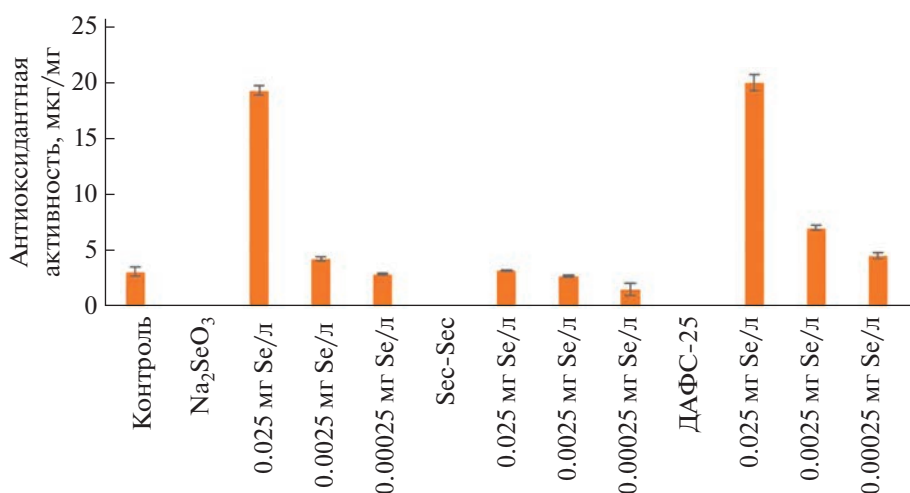


Рис. 7. Антиоксидантная активность мицелия *A. niger* (с электрогенерированным иодом, по аскорбиновой кислоте, мМ/мг).

вышение концентрации незаменимых аминокислот — триптофана, лизина и лейцина в клетках дрожжей, бактерий и членистоногих [26–28].

На индукцию антиоксидантной активности и на содержание аминокислот в мицелии *A. niger* наибольшее влияние оказал ДАФС-25 в самой высокой концентрации (табл. 1) по сравнению с серосодержащей аминокислотой-антиоксидантом цистеином и их смеси с ДАФС-25. В наших исследованиях L-цистеин проявил себя как антидот ДАФС-25 и снижал активность фермента пероксидазы, а также накопление селена в тканях растений кукурузы [8].

Анализ общего содержания аминокислот в мицелии гриба показал, что наибольшее воздей-

ствие на общую сумму аминокислот оказывал ДАФС-25, превышая контроль незначительно — на 12.4%. Поскольку добавление L-цистеина в питательную среду и ее смесь с ДАФС-25 лишь незначительно увеличивало общее содержание аминокислот, мы полагаем, что серосодержащая аминокислота-антиоксидант не оказывает существенного влияния на концентрацию аминокислот, а также нивелирует действие ДАФС-25.

Содержание аминокислоты-антиоксиданта тирозина в варианте с ДАФС-25 превышало контроль на 58%, а в варианте ДАФС-25 + цистеин концентрация тирозина уменьшалась на 51%, что также говорит об антагонизме соединений серы и селена в биологических средах. У грибов тирозин

Таблица 1. Содержание аминокислот (%) в гидролизате порошка мицелия *A. niger*

Аминокислота	Контроль	ДАФС-25 (0.025 мг Se/л)	Цистеин (0.1%)	ДАФС-25 + цистеин (0.025 мг Se/л + 0.1%)
Аргинин	12.74 ± 1.72	11.75 ± 0.47	13.06 ± 1.29	15.87 ± 1.59
Лизин	6.32 ± 0.34	6.85 ± 0.14	6.58 ± 0.13	5.77 ± 0.52
Тирозин	2.40 ± 0.11	3.79 ± 0.05	2.25 ± 0.02	1.23 ± 0.08
Фенилаланин	2.53 ± 0.08	2.93 ± 0.17	2.56 ± 0.20	3.07 ± 0.12
Гистидин	4.46 ± 0.22	4.93 ± 0.14	4.52 ± 0.50	4.78 ± 0.24
Лейцин + изолейцин	4.51 ± 0.20	6.23 ± 0.43	6.19 ± 0.41	6.24 ± 0.06
Метионин	1.24 ± 0.04	1.81 ± 0.02	1.03 ± 0.04	0.89 ± 0.03
Валин	5.43 ± 0.11	6.32 ± 0.06	5.81 ± 0.17	5.52 ± 0.50
Пролин	4.56 ± 0.16	4.88 ± 0.24	5.15 ± 0.56	4.16 ± 0.21
Треонин	6.44 ± 0.13	7.87 ± 0.16	6.65 ± 0.06	7.14 ± 0.42
Серин	5.45 ± 0.44	6.07 ± 0.12	6.26 ± 0.62	6.15 ± 0.17
Аланин	7.17 ± 0.11	7.93 ± 0.79	7.10 ± 0.14	6.83 ± 0.68
Глицин	5.22 ± 0.37	5.58 ± 0.33	5.75 ± 0.19	5.10 ± 0.22
Сумма аминокислот	68.47 ± 4.03	76.94 ± 3.12	72.91 ± 4.33	72.75 ± 4.84

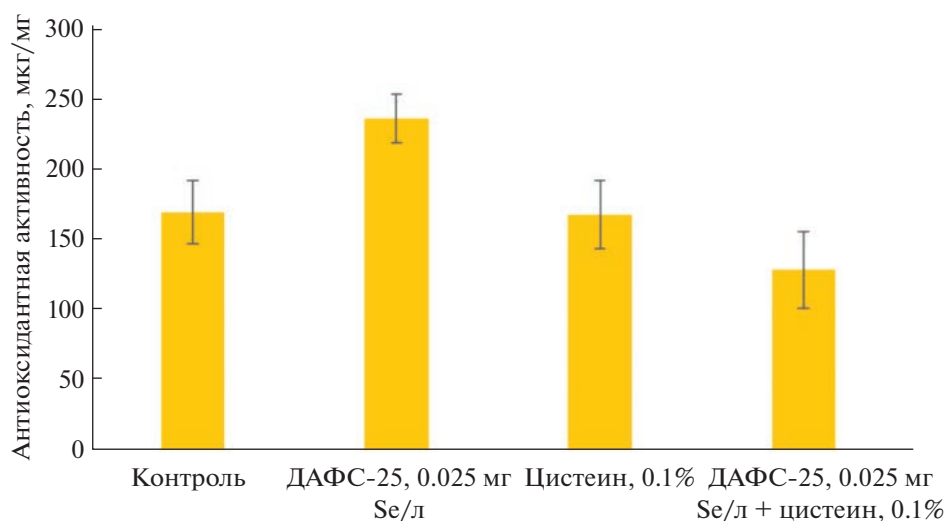


Рис. 8. Антиоксидантная активность суммы аминокислот мицелия гриба *A. niger* (по данным табл. 1, количество электричества, Q, Кл).

при участии фермента тирозиназы (К.Ф. 1.10.3.1) последовательно окисляется через промежуточные продукты в черный азотсодержащий пигмент меланин, один из самых мощных антиоксидантов [29]. Содержание другой аминокислоты-антиоксиданта — метионина — в варианте с ДАФС-25 также превышало контроль на 46%.

Аминокислота пролин не проявляет антиоксидантные свойства (табл. 1), однако ее концентрация обычно повышается при оксидативном стрессе. Пролин — аминокислота с защитными функциями в клетке, проявляющимися в регуляции ферментов пероксидазы и каталазы [27]. Можно отметить, что в варианте с ДАФС-25 содержание пролина была выше контроля на 7%, в то же время в варианте с цистеином она была выше на 12% и практически не изменялась в варианте их смеси.

Для оценки влияния ДАФС-25 на индукцию аминокислот-антиоксидантов были использованы данные рис. 1 и проведен расчет антиоксидантной активности суммы аминокислот, содержащихся в мицелии гриба *A. niger* (табл. 1), по каждому варианту опыта (рис. 8). Увеличение на 12.3% антиоксидантной активности суммы аминокислот мицелия происходило только в варианте с ДАФС-25, но не в варианте с цистеином и смесью с ДАФС-25, в основном за счет увеличения концентрации аминокислот-антиоксидантов — тирозина и метионина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и приборы. В работе использовали следующие реактивы: набор аминокислот LAA21 (Sigma-Aldrich, США) и L-селеноцистин, синтезированный по методике, опубликованной ранее

[30]. Новая аминокислота — 3,3'-диметил-L-селеноцистин — получена по методике, опубликованной ранее [31]. Из аминокислот (табл. 2) готовили 0.01 М растворы на дистиллированной воде.

Пероксид водорода 30%, бензидин, L-цистеин на гидрохлорид, ацетон (АО “Вектон”, Россия), диацетофенонилселенид (ДАФС-25; ООО “Сульфат”, Россия).

Антиоксидантная активность аминокислот. Суммарную антиоксидантную активность аминокислот и мицелия определяли на кулонометрическом анализаторе Эксперт-006 (Эконикс-Эксперт, Россия) по методике Лапина [32]. Электрогенерацию галогенов осуществляли на кулонометрическом анализаторе Эксперт-006 при силе тока 5.0 мА из водных 0.2 М растворов КВг в 0.1 М H_2SO_4 и из 0.1 М раствора KI в тартратном буфере (pH 3.56).

Кулонометрическое определение проводили в ячейке объемом 100 мл, в которую вносили 50 мл фоновых растворов, далее опускали электроды и включали генераторную цепь. По достижении определенного значения индикаторного тока в ячейку вносили аликвоту исследуемого образца (0.1 см³) — 10 мкмоль соответствующей аминокислоты. Количество электричества (кулон, Q, Кл), затраченного на генерацию брома и йода, определяется прибором автоматически. Антиоксидантную активность определяли как количество электричества, затраченного на титрование 10 мкмоль аминокислоты.

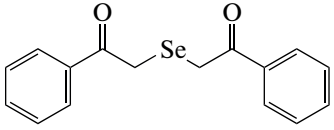
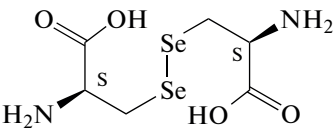
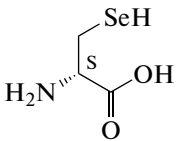
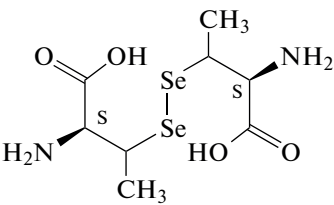
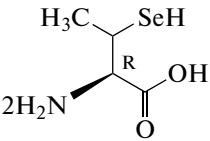
Структурные формулы используемых в работе селенсодержащих соединений и содержание селена представлены в табл. 3.

Влияние селенсодержащих соединений на рост биомассы *Aspergillus niger* и активацию каталазы. Диацетофенонилселенид (ДАФС-25) растворяли

Таблица 2. Молекулярные массы аминокислот

Аминокислота	M_r	Аминокислота	M_r	Аминокислота	M_r
Аланин	89.09	Гистидин · HCl · H ₂ O	209.63	Триптофан	204.23
Аргинин · HCl	210.66	Изолейцин	131.17	Тирозин	181.19
Аспарагин	132.12	Лейцин	131.17	Серин	105.09
Аспарагиновая кислота	133.10	Лизин · HCl	182.65	L-Селеноцистин	334.09
Валин	117.15	Метионин	149.21	3,3'-Диметил-L-селеноцистин	362.15
Глицин	75.07	Пролин	115.13	Фенилаланин	165.19
Глутамин	146.14	Транс-4-гидрокси-L-пролин	131.13	Цистеин	121.16
Глутаминовая кислота	147.13	Треонин	119.12	Цистин	240.30

Таблица 3. Содержание селена и формулы селеносодержащих соединений

Название препарата	Формула	Содержание селена, %
Селенит натрия	Na ₂ SeO ₃	45.7
ДАФС-25 (диацетофенонилселенид)		24.9
L-Селеноцистин		47.2
L-Селеноцистеин		47.0
3,3'-Диметил-L-селеноцистин		43.6
Трео-3-метил-L-селеноцистеин		39.9

в ацетоне, а селенит натрия и L-селеноцистин — в 0.1 М HCl, добавляли в питательную среду на 7-е сутки культивирования. В контрольные варианты добавляли чистые растворители — ацетон и соляную кислоту.

Объектом исследования служил штамм мицелиального гриба *Aspergillus niger* Tiegh. из коллекции кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, любезно предоставленный А.Н. Лихачевым.

Для оценки влияния соединений селена использовали споровую суспензию, которую получали следующим образом: кусочки сахарозного агара с 7-дневной культурой вносили в пробирки с жидкой питательной средой и взбалтывали не менее 5 мин. Полученную суспензию для освобождения от обрывков мицелия фильтровали через стерильную вату. Подсчет конидий проводили в камере Горяева и разбавляли суспензию так, чтобы содержание спор в питательной среде составило 10^3 конидий/мл.

Выбор питательной среды для культивирования гриба *A. niger* был определен селективностью и отсутствием необходимости стерилизации при применении лабильных к нагреванию веществ (состав: сахароза – 10%, NH_4NO_3 – 0.3%, KH_2PO_4 – 0.2%, MgSO_4 – 0.05%, FeSO_4 – 0.01%). Высокая концентрация сахара и кислая среда (за счет гидролиза KH_2PO_4) препятствовали росту бактерий. Культуру инкубировали при 30°C. На 7, 14, 21 и 28-е сутки культивирования мицелий гриба отделяли от культуральной жидкости фильтрованием на воронке Бюхнера с целлюлозным фильтром, промывали дистиллированной водой, избыток влаги удаляли при помощи фильтровальной бумаги и взвешивали на аналитических весах. Гомогенат получали, растирая 100 мг мицелия гриба, с кварцевым песком и добавлением 2 мл дистиллированной воды, с последующим центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 мин.

Для определения антиоксидантной активности в мицелии гриба надосадочную жидкость (0.1 см^3) вносили в электрохимическую ячейку, полученную из гомогената. Антиоксидантную активность мицелия выражали в пересчете на стандартное вещество – аскорбиновую кислоту (мкг/мг мицелия).

На 7-е сутки культивирования, после добавления селеносодержащих соединений, определяли активность каталазы в мицелии гриба газометрическим методом по методике Минеева с соавт. [33]. Для этого 100 мг мицелия взвешивали на аналитических весах, растирали с кварцевым песком и мелом в ступке, количественно переносили в колбу с 5 мл дистиллированной воды для определения активности фермента. Активность каталазы выражали как объем кислорода O_2 (мл) на 100 мг сырой массы мицелия гриба.

Аминокислотный состав анализировали путем кислотного гидролиза порошка сухого мицелия при 110°C в течение 14 ч с последующим определением в системе капиллярного электрофореза Капель 105 М (Люмэкс, Россия) согласно стандартной методике [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе использовался кулонометрический метод окислительного галогенирования бромом растворов 23 аминокислот, который позволил определить высокую антиоксидантную активность шести аминокислот: цистин, триптофан, L-селеноцистин, тирозин, 3,3'-диметил-L-селеноцистин и метионин. В то же время использование данного метода с другим галогеном – иодом – позволяет селективно определять антиоксидантную активность аминокислот, которые в составе бокового радикала имеют сульфгидрильные и селенольные группы.

Впервые была выявлена взаимосвязь между повышением концентрации селена и увеличением антиоксидантной активности в мицелии гриба-микромикета *A. niger*, а также активности фермента каталазы и стимуляции накопления биомассы. Стимулирование роста биомассы мицелия *A. niger* по времени совпадает со снижением активности каталазы в мицелии, когда уменьшается воздействие селеносодержащих соединений на клетку гриба. Известно, что роль селена заключается в повышении степени надежности функционирования клеточных мембран на фоне высокой концентрации радикалов, за счет чего реализуется ростостимулирующий эффект соединений селена.

Кроме того, было обнаружено, что соединения селена аналогичным образом активируют антиоксидантную активность мицелия, определяемую электрогенерированным бромом и иодом, при этом количество антиоксидантов, взаимодействующих с бромом, на порядок превосходит количество антиоксидантов, взаимодействующих с иодом. Наибольший эффект в индукции антиоксидантной активности проявили ДАФС-25 и селенит натрия в самой высокой концентрации, меньшим эффектом обладал L-селеноцистин. Один из механизмов повышения антиоксидантной активности при действии соединений селена – увеличение концентрации аминокислот-антиоксидантов в белках мицелия гриба, а также накопление других метаболитов, обладающих антиоксидантной и антирадикальной активностью [35].

Изучение ростостимулирующих свойств и индукции антиоксидантной активности различными соединениями селена кажется многообещающим. Новые подходы могут найти применение в исследованиях механизмов индукции антиоксидантной активности в различных организмах, биотехнологии и биофортификации (биообогащении) продуктов питания человека.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jitca G., Osz B.E., Tero-Vescan A., Miklos A.P., Rusz C.M., Batrinu M.G., Vari C.E. // *Antioxidants*. 2022. V. 11. P. 1–30. <https://doi.org/10.3390/antiox11030572>
2. Блиохватов А.Ф., Денисова Г.В., Ильин Д.Ю. // *Селен в биосфере* / Под ред. Блиохватова А.Ф. Пенза: Пензенская гос. с.-х. академия, 2001. 322 с.
3. Santesmasses D., Mariotti M., Gladyshev V.N. // *Antioxid. Redox Signal*. 2020. V. 33. P. 525–536. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8044>
4. Zhang Y., Roh Y.J., Han S.J., Park I., Lee H.M., Ok Y.S., Lee B.C., Lee S.R. // *Antioxidants (Basel)*. 2020. V. 9. P. 1–17. <https://doi.org/10.3390/antiox9050383>
5. Sies H. // *Free Radic. Biol. Med.* 1993. V. 14. P. 313–323. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90028-s](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90028-s)
6. Блиохватов А.Ф. // 9-*R*-сим-нонагидро-10-окса(халькогена) антрацены и соли 9-*R*-сим-октагидро-10-оксония (халькогенония) антрацена: дисс. докт. хим. наук. Саратов, 1993. 378 с.
7. Древко Б.И. // Патент RU 2051681 C1, 1996.
8. Полубояринов П.А., Голубкина Н.А. // *Физиология растений*. 2015. Т. 62. С. 396–403. [Poluboyarinov P.A., Golubkina N.A. // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 367–374.] <https://doi.org/10.1134/S1021443715030164>
9. Castillo-Godina R.G., Foroughbakhch-Pournavab R., Benavides-Mendoza A. // *J. Agr. Sci. Tech.* 2016. V. 18. P. 233–244.
10. Bebie M., Lagniel G., Garin J., Touati D., Vermeglio A., Labarre J. // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 1556–1564. <https://doi.org/10.1128/jb.184.6.1556-1564.2002>
11. Строгов В.В., Родионова Т.Н. // *Вестник ветеринарии*. 2011. Т. 59. С. 150–152.
12. Wang H.W., Cai D.B., Xiao G.H., Zhao C.L., Wang Z.H., Xu H.M., Guan Y.Q. // *Israeli J. Aquacult. - Bamidgeh*. 2009. V. 61. P. 322–332.
13. Боряев Г.И., Гаврюшина И.В., Федоров Ю.Н. // *С.-х. биол.* 2010. Т. 45. С. 65–70.
14. Dzobo K., Naik Y.S. // *South African J. Sci.* 2013. V. 109. P. 1–8. <https://doi.org/10.1590/sajs.2013/965>
15. Golubkina N., Zamana S., Seredin T., Poluboyarinov P., Sokolov S., Baranova H., Krivenkov L., Pietrantonio L., Caruso G. // *Plants (Basel)*. 2019. V. 8. P. 102. <https://doi.org/10.3390/plants8040102>
16. Misra S., Kwong R.W.M., Niyogi S. // *J. Exp. Biol.* 2012. V. 215. P. 1491–1501. <https://doi.org/10.1242/jeb.062307>
17. Полубояринов П.А., Елистратов Д.Г., Швеиц В.И. // *Тонк. химич. технол.* 2019. Т. 14. С. 5–24.
18. Casalbore G., Mastragostino M., Valcher S. // *J. Electroanal. Chem.* 1978. V. 87. P. 411–418.
19. Абуллин И.Ф., Будников Г.К. // *Заводская лаб.* 1998. Т. 64. С. 1–12.
20. Ramussen B., Sorensen A., Goffredsen H., Pittelkow M. // *Chem. Commun.* 2014. V. 50. P. 3716–3718. <https://doi.org/10.1039/C4CC00523F>
21. *Sulfur in Organic and Inorganic Chemistry* / Ed. Senning A. New York: Marcel Dekker, 1972.
22. Pleasants J.C., Guo W., Rabenstein D.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1989. V. 111. P. 6553–6558.
23. Hondal R.J., Ruggles E.L. // *Amino Acids*. 2011. V. 41. P. 73–89. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0494-6>
24. Блиохватов А.Ф., Денисова Г.В., Иванов А.И., Ильин Д.Ю. // *Микология и фитопатол.* 2000. Т. 34. С. 42–45.
25. Князева О.Е., Полубояринов П.А. // В сб. *Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии. Межвузовский сборник научных трудов XIV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием*. Саратов, 2020. С. 64–67.
26. Kieliszek M., Blazejak S., Bzducha-Wrobel A., Kot A.M. // *Biol. Trace Elem. Res.* 1989. V. 187. P. 316–327.
27. Szabados L., Savoure A. // *Trends Plant Sci.* 2010. V. 15. P. 89–97.
28. Yuan L., Zhang R., Ma X., Yang L., Zheng Q., Chen D., Li M., Fan T., Liu Y., Pan L., Yin X. // *Nutrients*. 2018. V. 10. P. 318. <https://doi.org/10.3390/nu10030318>
29. Чикин Ю.А., Лихачев А.Н. // *Микология и фитопатология*. 1997. Т. 31. № 4. С. 54–61.
30. Полубояринов П.А., Моисеева И.Я., Микуляк Н.И., Голубкина Н.А., Каплун А.П. // *Изв. высших учебных заведений. Сер. Химия и химич. технол.* 2022. Т. 65. С. 19–29. <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20226502.6466>
31. Полубояринов П.А., Голубкина Н.А., Анисков А.А., Моисеева И.Я., Глебова Н.Н., Швеиц В.И. // *Биоорг. химия*. 2019. Т. 45. С. 365–373. [Poluboyarinov P.A., Golubkina N.A., Aniskov A.A., Moiseeva I.J., Glebova N.N., Shvets V.I. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 241–247.] <https://doi.org/10.1134/S1068162019040083>
32. Лапин А.А. // МВИ-001-44538054-07. Суммарная антиоксидантная активность. Методика выполнения измерений на кулонометрическом анализаторе. Жердевка: ООО Концерн “Отечественные инновационные технологии”, 2011. 35 с.
33. Минеев В.Г., Сычев В.Г., Амелянчик О.А., Болышева Т.Н., Гомонова Н.Ф., Дурынина Е.П., Егоров В.С., Егорова Е.В., Едемская Н.Л., Карпова Е.А., Прижукова В.Г. // *Практикум по агрохимии*. Москва: изд-во МГУ, 2001. 689 с.
34. М-04-38-2009. Методика определения протеиногенных аминокислот в кормах и сырье. ООО “Люмэкс-маркетинг”. СПб., 2014. 49 с.
35. Панкратов А.Н., Цивилева О.М., Белобородова А.С., Цымбал О.А., Древко Я.Б. // *Изв. Саратовского ун. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология*. 2017. Т. 17. № 3. С. 286–298.

Induction of the Antioxidant Activity by Selenium Compounds in the *Aspergillus niger* Mycelium

P. A. Poluboyarinov*, #, A. V. Kuznetsova*, I. Ya. Moiseeva*, N. I. Mikulyak*, and A. P. Kaplun**

*Phone: +7 (950) 230-48-76; e-mail: poluboyarinovpavel@yandex.ru

*Penza State University, ul. Krasnaya 40, Penza, 440026 Russia

**MIREA – Russian Technological University (Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies),
Leningradskiy prosp. 80/5, Moscow, 125190 Russia

Investigation of the antioxidant activity (AOA) induction by selenium compounds (Na_2SeO_3 , diacetophenonyl selenide (DAPS-25), L-selenocystine) in various organisms is interesting as a protection from stress induced cell membranes damages. A comparative analysis of the antioxidant activity of 23 amino acids was performed by coulometric titration with electrogenerated bromine and iodine. The activity decreases in the order: cystine > tryptophan > selenocystine > tyrosine > 3,3'-dimethyl-L-selenocystine > methionine. Only amino acids with sulfhydryl and selenol groups as more active reductants can interact with the electrogenerated iodine: cysteine > selenocysteine > threo-3-methyl-L-selenocysteine. Probably the correction of the antioxidant status at the amino acids level is based on the sulfhydryl and selenol groups in radicals. In case they are not enough, cystine, selenocystin, tryptophan, tyrosine, and methionine will act as scavenger-reductants. It was found that selenium compounds dose-dependently induce the total antioxidant activity of the *A. niger* mycelium and affect indicators of the antioxidant status (amino acid composition and catalase activity), which in turn stimulates the biomass accumulation. DAPS-25 and sodium selenite treatment at the high doses (0.025 mg Se/L) caused the greatest effect on the total AOA induction (3.4–5.5 times). Lower concentrations (0.0025–0.00025 mg Se/L) had a lesser effect (25.8–41.7%). Activity in samples with L-selenocystin increased by 1.6–43.3%. It is noted that the iodine antioxidant activity in the mycelium was generally lower than the bromine one.

Keywords: selenium compounds, antioxidant activity, catalase, mycelium